



**Xtrem Biotech S.L.**  
**Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia**  
**Universidad de Granada**

**Control biológico de *Botrytis* por la cepa *Bacillus* sp.  
e implicaciones en la producción de plantas de  
interés agrícola**

**Laura Toral Navarro**  
**Tesis Doctoral Industrial, 2019**  
**Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Laura Toral Navarro  
ISBN: 978-84-1117-166-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71861>



La presente Tesis Doctoral de carácter Industrial ha sido subvencionada por la empresa **Xtrem Biotech S.L.**, y a través de esta, por los proyectos:

- **Título del proyecto:** “Biocontrol de patógenos en campo: desarrollo de sistemas de detección precoz y herramientas de lucha integrada (PATBIOCONTROL)”.  
**Participantes:** Bodegas San Valero, Xtrem Biotech S.L., Universidad de Zaragoza, Parque Científico Aula Dei. **Entidad Financiadora:** Convocatoria Retos-Colaboración del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. RTC-2015-4121-2.
- **Título del proyecto:** “Bioproductos de bacterias extremófilas”. Xtrem Biotech S.L.  
**Entidad financiadora:** Proyecto NEOTEC. SNEO-20161037E.

Asimismo, durante la realización de la Tesis Doctoral la doctoranda ha disfrutado de la siguiente beca:

- **Beca:** Ayudas a proyectos y doctorados industriales dentro del marco europeo Horizonte 2020 en colaboración con la escuela internacional de posgrado.  
**Entidad financiadora:** Universidad de Granada.  
**Duración:** 2016/2017-2019/2020





De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones:

- **Toral, L.**, Rodríguez, M., Béjar, V. y Sampedro, I. 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*. 9. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01315.
- Torres, M., Béjar, V., Llamas, I., Torres, B., **Toral, L.** y Sampedro, I. (2019). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*. En revision.

Y las siguientes comunicaciones en póster:

- **Toral, L.**, Castro, D., Rodríguez, M., Quesada, E., Béjar, V. Selección y caracterización taxonómica de bacterias con actividad frente a *Botrytis cinerea* aisladas de hábitats hipersalinos. XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Octubre 2016.
- Alajar, P., **Toral, L.**, Castro, D., Martínez-Checa, F., Rodríguez-M.A., Béjar, V. 2017 Producción y caracterización de exopolisacáridos producido por bacterias Gram positivas. I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica (CIBM). Granada (España), junio 2017.
- **Toral, L.**, Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I. Biological control of *Botrytis cinerea* by lipopeptides from *Bacillus* sp. I Jornadas Científicas del Centro de Investigación Biomédica. Junio 2017.
- **Toral, L.**, Calvo, H., Mendiara, I., Béjar, V., Sampedro., I. Effects of volatile compounds of strain XT1, a patented *Bacillus* sp. licensed to Xtrem Biotech S.L., on control of *Botrytis cinerea*. I Jornada de la Mujer Neurocientífica. Febrero 2018.
- Torres, M., **Toral, L.**, Castro, D., Sampedro, S., Llamas, I., Béjar, V., Torres, B. Xtrem Biotech: probiotics for agricultura. Les nouvelles biotechnologies pour l'agriculture et l'alimentation: les innovations d'aujourd'hui, des réalités de demain. Académie d'Agriculture de France. Paris, France. 2018
- **Toral, L.**, Fernández, P., Sampedro, I., Béjar, V., van Schooten, FJ., Smolinska, A. Antifungal activity of volatile compounds of strain XT1, a patented *Bacillus* sp. licensed to Xtrem Biotech S.L., against *Botrytis cinerea*. National Congress of Microbiology. Málaga, España. Julio 2019.
- **Toral, L.**, Castro, D., Rodríguez, M., Quesada, E., Béjar, V., Sampedro, I. Caracterización de un lipopéptido con actividad frente a *Verticillium dahliae*, aislado de una cepa fitoestimulante de *Bacillus* sp. Expoliva, XVIII Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines. Simposium Científico Técnico. Mayo 2017.

- Sampedro, I., **Toral, L.**, Llamas, I. Role of chemotaxis in the colonization of salicornia plants with halophilic bacteria. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). Julio 2017.
- **Toral, L.**, Béjar, V., Sampedro, I. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* sp. against *Botrytis cinerea*. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). Julio 2017.
- **Toral, L.**, Calvo, H., Mendiara, I., Béjar, V., Sampedro, I., Blanco, D., Venturini, M.E. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 and *B. methylotrophicus* CECT 8661 against the grey rot in vineyards. XV Meeting of the Working Group, Biological and integrated control of plant pathogens; Biocontrol products: from lab testing to product development. Lérida, España. Abril 2018.

Así como también las siguientes menciones y distinciones:

- Castro, D., **Toral, L.**, Rodríguez, M., Quesada, E., Béjar, V. Desarrollo de un Agente Fitoestimulante y de Control Biológico de la Verticilosis. III Premio de Investigación Científica en Olivar y Aceite de Oliva. 2016.
- **Toral, L.** “La última resistencia”. Premio en la modalidad de Alimentación y Nutrición Fotciencia15. MINECO, FECYT. 2018.
- Rodríguez, M., **Toral, L.**, Marín, A., Torres, M., Béjar, V., Campos, M., Sampedro, I. *Bacillus atropheus* strain L193 surfactants for the biocontrol of aphids in cereal crops. XV Meeting of the Working Group, Biological and integrated control of plant pathogens; Biocontrol products: from lab testing to product development. Lérida, España. Abril 2018. **Premio mejor póster presentado por estudiantes.**

A mis padres  
A mis hermanos  
Suerte la mía



## INDICE

<b>Indice de figuras</b>	1
<b>Indice de tablas</b>	7
<b>Abreviaturas</b>	9
<b>Resumen</b>	11
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Hacia el control biológico.....	15
2. Relevancia de los organismos rizosféricos como agentes de control biológico..	16
3. Especies del género <i>Bacillus</i> con actividad PGPR .....	18
3.1 <i>Bacillus velezensis</i> .....	20
3.1.1 Colonización de la zona radicular .....	22
3.1.2 Actividad biofertilizante .....	23
3.1.2.1 Producción de ACC desaminasa .....	24
3.1.2.2 Producción de sideróforos .....	25
3.1.3 Control biológico de patógenos mediante producción de metabolitos secundarios .....	26
3.1.3.1 Bacteriocinas .....	26
3.1.3.2 Policétidos no ribosomales.....	28
3.1.3.3 Lipopéptidos .....	29
3.1.3.4 Compuestos orgánicos volátiles .....	31
4. Resistencia sistémica en plantas e implicaciones del control biológico.....	32
5. <i>Botrytis cinerea</i> .....	36
5.1. Aspectos generales.....	36
5.2 Mecanismos de infección en plantas .....	37
5.3 Cultivos afectados por <i>B. cinerea</i> .....	40
5.3.1 <i>B. cinerea</i> en cultivos de tomate .....	40
5.3.2 <i>B. cinerea</i> en cultivos de fresa .....	41
5.3.3 <i>B. cinerea</i> en viñedos.....	42
5.4 Métodos actuales de control de <i>B. cinerea</i> y perspectivas de futuro.....	44
<b>OBJETIVOS</b>	47
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	51
1. Cepas bacterianas y fúngicas .....	53
2. Especies vegetales y su conservación .....	54
3. Medios de cultivo.....	54
4. Caracterización de la cepa <i>B. velezensis</i> XT1 .....	60
4.1 Crecimiento en distintos medios de cultivo.....	60

4.2 Estabilidad de la cepa XT1 .....	60
4.3. Evaluación de la actividad PGPR de la cepa <i>B. velezensis</i> XT1 y <i>B. methylotrophicus</i> LMG 27586 <sup>T</sup> .....	60
4.4 Actividad antifúngica .....	61
4.5 Compatibilidad con productos agroquímicos .....	62
5. Producción y caracterización de metabolitos secundarios .....	63
5.1 Lipopéptidos.....	63
5.1.1 Extracción de la fracción lipopeptídica .....	63
5.1.2 Actividad antifúngica .....	63
5.1.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de los lipopéptidos.....	63
5.1.4 Estabilidad de los lipopéptidos frente a variaciones de temperatura y pH	34
5.1.5 Análisis de los genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos .....	64
5.1.6 Identificación de los lipopéptidos mediante UPLC-HDMS Q-TOF .....	65
5.1.7 Actividad antifúngica de los lipopéptidos en bioensayos frente a <i>B. cinerea</i> .....	66
5.1.8 Actividad antioxidante en frutos .....	66
5.1.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) .....	67
5.2 Compuestos volátiles de la cepa XT1 .....	67
5.2.1 Actividad antifúngica .....	67
5.2.2 Análisis de los compuestos volátiles mayoritarios mediante GC-TOF-MS	68
5.2.3 Actividad antifúngica de los COVs sintéticos seleccionados .....	69
5.2.4 Efecto protectores de los COVs producidos por la cepa XT1 en <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a <i>B. cinerea</i> .....	69
5.2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) .....	70
6. Determinación de la capacidad protectora de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	70
6.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	70
6.1.1 Tolerancia de <i>A. thaliana</i> a .....	70
6.1.2 Tolerancia de <i>S. lycopersicum</i> L. a la cepa XT1 .....	71
6.1.3 Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate.....	72
6.2 Estudios <i>in vivo</i> .....	72
6.2.1 Evaluación de la actividad de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate y fresa .....	72
6.2.2 Evaluación de la actividad de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en viñedos	78
6.2.3 Determinación de la capacidad de la cepa XT1 para fomentar la resistencia a <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate, fresa y vid.....	80

<b>RESULTADOS</b>	81
<b>1. Caracterización fenotípica de la cepa <i>Bacillus velezensis</i> XT1 e implicación de sus metabolitos secundarios en el control biológico de <i>Botrytis cinerea</i></b> .....	83
Resumen.....	85
1.1. Caracterización bioquímica y fisiológica de la cepa XT1 .....	87
1.1.1 Crecimiento en distintos medios de cultivo .....	87
1.1.2 Estabilidad de la cepa XT1 .....	87
1.1.3 Caracterización de las cepas XT1 y <i>B. methylotrophicus</i> LMG 27586 <sup>T</sup> .....	88
1.1.4 Actividad antifúngica .....	90
1.1.5 Compatibilidad con productos agroquímicos.....	90
1.2 Producción de lipopéptidos por la cepa XT1.....	92
1.2.1 Actividad antifúngica de los lipopéptidos.....	92
1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima fungicida (CMF) de los lipopéptidos .....	93
1.2.3 Estabilidad de los lipopéptidos frente a variaciones de temperatura y pH ...	94
1.2.4 Genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos .....	94
1.2.5 Identificación de los lipopéptidos mediante UPLC-HDMS Q-TOF .....	94
1.2.6 Bioensayos de actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por XT1 frente a <i>B. cinerea</i> .....	97
1.2.7 Determinación de la actividad antioxidante de los lipopéptidos producidos por XT1 en frutos .....	99
1.2.8 Análisis microscópico del efecto de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 en <i>B. cinerea</i> .....	100
1.3 Producción de compuestos orgánicos volátiles .....	102
1.3.1 Actividad antifúngica frente a <i>B. cinerea</i> de los compuestos volátiles producidos por <i>B. velezensis</i> XT1 y <i>B. methylotrophicus</i> LMG 27586 <sup>T</sup> .....	102
1.3.2 Análisis de los componentes volátiles mayoritarios por cromatografía de gases .....	104
1.3.3 Actividad antifúngica de COVs sintéticos .....	105
1.3.4 Efecto protector de los COVs producidos por XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en <i>A. thaliana</i> .....	106
1.3.5 Análisis por microscopía del efecto de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> en <i>B. cinerea</i> .....	107
<b>2. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por la cepa <i>B. velezensis</i> XT1 y su efecto protector frente al fitopatógeno <i>B. cinerea</i></b> .....	109
Resumen.....	111
2.1 Estudios <i>in vitro</i> con la cepa XT1 en <i>A. thaliana</i> y <i>S. lycopersicum</i> L. ....	113



2.1.1 Determinación de la tolerancia a la cepa XT1 .....	113
2.1.2 Efecto protector de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en plantas de tomate ...	114
2.2 Estudio <i>in vivo</i> de la capacidad PGPR y de defensa frente a <i>B. cinerea</i> de la cepa XT1 en plantas de tomate y fresa.....	116
2.2.1 Ensayos en plantas de tomate.....	116
2.2.1.1 Parámetros de crecimiento y desarrollo: biomasa foliar y radicular.	116
2.2.1.2 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño .....	118
2.2.1.3 Parámetros fisiológicos en plantas de tomate, contenido en pigmentos foliares.....	119
2.2.1.4 Bioensayo en hojas de tomate frente a <i>B. cinerea</i> .....	121
2.2.2 Ensayos en plantas de fresa .....	122
2.2.2.1 Parámetros de crecimiento y desarrollo: biomasa foliar y radicular.	122
2.2.2.2 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño .....	124
2.2.2.3 Parámetros fisiológicos, contenido en pigmentos foliares.....	125
2.2.2.4 Bioensayo en hojas de fresa frente a <i>B. cinerea</i> .....	127
2.2.3 Ensayos en viñedos.....	127
2.2.3.1 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño .....	128
2.2.3.2 Bioensayo en hojas de vid frente a <i>B. cinerea</i> .....	129
<b>3. Estudio de la modulación de los parámetros de estrés y del contenido en fitohormonas vegetales por la cepa XT1 en plantas de fresa y tomate infectadas por <i>B. cinerea</i>.....</b>	<b>131</b>
Resumen.....	133
3.1 Ensayos en plantas de tomate .....	135
3.1.1 Parámetros de estrés.....	135
3.1.2 Contenido en fitohormonas vegetales .....	142
3.2 Ensayos en plantas de fresa .....	144
3.2.1 Parámetros de estrés.....	144
3.2.2 Contenido en fitohormonas vegetales .....	151
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>181</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Interacción en la zona rizosférica entre los microorganismos PGPR, las plantas y los patógenos. ....	16
<b>Figura 2.</b> Ciclo de esporulación de <i>Bacillus</i> .....	19
<b>Figura 3.</b> Producción de metabolitos por cepas del género <i>Bacillus</i> y su actividad promotora del crecimiento en plantas (PGP).....	20
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de la enzima ACC desaminasa. ....	25
<b>Figura 5.</b> Estructura química de las moléculas a) bacilobactina y b) 7-O-succinil Macrolactina A .....	27
<b>Figura 6.</b> Estructura química de algunos representantes del grupo de las a) surfactinas, b) fengicinas y c) iturinas.....	31
<b>Figura 7.</b> Representación de la respuesta inmune inducida activada por patógenos (SAR) o por microorganismos beneficiosos (ISR) .....	33
<b>Figura 8.</b> Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i> y estructuras desarrolladas a lo largo del mismo .....	38
<b>Figura 9.</b> Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i> en plantas de fresa.....	41
<b>Figura 10.</b> Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i> en viñedos. ....	43
<b>Figura 11.</b> Determinación de la actividad antifúngica de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en medio sólido (A) y en medio líquido (B).....	68
<b>Figura 12.</b> Evaluación in vivo de la capacidad antifúngica de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en <i>A. thaliana</i> . ....	70
<b>Figura 13.</b> Determinación de la tolerancia de <i>A. thaliana</i> a la cepa XT1 .....	71
<b>Figura 14.</b> Diseño experimental de los ensayos <i>in vivo</i> en plantas de fresa y tomate, en los que la cepa XT1 fue aplicada vía radicular (A) o foliar (B). ....	73
<b>Figura 15.</b> Calendario de aplicaciones del ensayo <i>in vivo</i> , con plantas de tomate y fresa, con la cepa XT1 e infecciones con <i>B. cinerea</i> durante el ensayo in vivo en plantas de fresa y tomate. ....	74
<b>Figura 16.</b> A) Detalle de la realización de una herida en fresa para facilitar la inoculación de <i>B. cinerea</i> . B) Recubrimiento de la planta de fresa con una bolsa de plástico para aumentar el porcentaje de humedad relativa y así favorecer la infección.....	74

<b>Figura 17.</b> A) Plataforma orbital con 70 L de capacidad. B) Fermentador con 500 L de capacidad.....	78
<b>Figura 18.</b> Diseño experimental y distribución de cada parcela para la aplicación de los diferentes tratamientos. ....	79
<b>Figura 19.</b> Actividad enzimática de las cepas XT1 y LMG 27586T.....	89
<b>Figura 20.</b> Actividad antifúngica de la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> en medio sólido (A) y en medio líquido (B). ....	90
<b>Figura 21.</b> Crecimiento de la cepa XT1 en combinación con mezclas habituales de productos agroquímicos.....	92
<b>Figura 22.</b> Efecto de distintas concentraciones de la fracción lipopeptídica de XT1 frente a <i>B. cinerea</i> .....	93
<b>Figura 23.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) (A) y concentración mínima fungicida (CMF) (B) de los lipopéptidos producidos por XT1.....	93
<b>Figura 24.</b> Análisis mediante PCR de los genes relacionados con la biosíntesis de lipopéptidos.....	94
<b>Figura 25.</b> Espectro del cromatograma de iones totales (TIC) del extracto obtenido del sobrenadante del cultivo de la cepa XT1. ....	95
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas obtenidos mediante espectrometría de masas UPLC-HDMS Q-TOF a partir del surfactante producido por la cepa XT1. ....	97
<b>Figura 27.</b> Actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 en uva (I) y tomate (II) frente a <i>B. cinerea</i> . ....	98
<b>Figura 28.</b> Actividad antioxidante evaluada mediante ensayo FRAP en uvas tratadas con lipopéptidos extraídos de la cepa XT1, infectados con <i>B. cinerea</i> e infectados con <i>B. cinerea</i> pero tratados con la fracción lipopeptídica de XT1.....	99
<b>Figura 29.</b> Contenido total de fenoles en uvas tratadas con lipopéptidos extraídos de la cepa XT1, infectados con <i>B. cinerea</i> e infectados con <i>B. cinerea</i> pero tratados con la fracción lipopeptídica de XT1.....	100
<b>Figura 30.</b> Microscopía SEM y TEM de las hifas de <i>B. cinerea</i> sin tratar y tratadas con lipopéptidos de la cepa XT1. ....	101
<b>Figura 31.</b> Evaluación de la actividad de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586T en los medios MM, SG y MOLP. ....	103

<b>Figura 32.</b> Cromatograma del perfil completo de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586T obtenido por cromatografía de gases GC-TOF-MS. ....	104
<b>Figura 33.</b> Análisis de componentes principales de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586T.....	105
<b>Figura 34.</b> Actividad antifúngica de la acetoina frente a <i>B. cinerea</i> .....	105
<b>Figura 35.</b> Actividad protectora de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a <i>B. cinerea</i> plantas de <i>A. thaliana</i> .....	106
<b>Figura 36.</b> Microscopía SEM y TEM de <i>B. cinerea</i> expuesto COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586T.....	108
<b>Figura 37.</b> Estudio de la tolerancia de <i>A. thaliana</i> a distintas concentraciones la cepa XT1.. ..	113
<b>Figura 38.</b> Análisis de la tolerancia de <i>S. lycopersicum</i> L. a concentraciones crecientes de la cepa XT1. ....	114
<b>Figura 39.</b> Porcentaje de supervivencia registrado en plántulas de tomate tras 20 días de incubación. ....	115
<b>Figura 40.</b> Microorganismos presentes en la zona radicular de plantas A) infectadas con <i>B. cinerea</i> y B) infectadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con XT1. ....	115
<b>Figura 41.</b> Plantas de tomate tratadas con XT1 por vía foliar (A-D) y radicular (E-F) e infectadas con <i>Botrytis</i> . ....	116
<b>Figura 42.</b> Estado del sistema radicular de las plantas de tomate tratadas con XT1 e infectadas con <i>B. cinerea</i> .....	117
<b>Figura 43.</b> Biomasa aérea y radicular en plantas de tomate.....	118
<b>Figura 44.</b> Contenido en pigmentos fotosintéticos en plantas de tomate .....	120
<b>Figura 45.</b> Bioensayos en hojas de tomate. ....	121
<b>Figura 46.</b> Detalle de los síntomas manifestados en plantas de fresa infectadas con <i>B. cinerea</i> . ....	122
<b>Figura 47.</b> Estado de las plantas de fresa inoculadas foliarmente con XT1. ....	122
<b>Figura 48.</b> Sistema radicular de las plantas de fresa inoculadas foliarmente con XT1. .	123
<b>Figura 49.</b> Biomasa aérea y radicular de plantas de fresa .....	123

<b>Figura 50.</b> Zona de infección en plantas inoculadas con <i>B. cinerea</i> (A) y en plantas inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con la cepa XT1 (B). .....	124
<b>Figura 51.</b> Contenido en pigmentos fotosintéticos en plantas de fresa .....	126
<b>Figura 52.</b> Bioensayos en hojas de fresa. ....	127
<b>Figura 53.</b> Estudio de la viabilidad en campo de la cepa XT1 durante el periodo de campaña.....	128
<b>Figura 54.</b> Bioensayos en hojas de vid. ....	130
<b>Figura 55.</b> Contenido en malondialdehído (MDA) en plantas de tomate.....	135
<b>Figura 56.</b> Tinción histoquímica de ROS realizada en tomate en plantas con aplicación foliar (A-D) y radicular (E-H) de la cepa XT1. ....	136
<b>Figura 57.</b> Contenido foliar de peróxido de hidrógeno en plantas de tomate .....	137
<b>Figura 58.</b> Actividad polifenol oxidasa (PPO) en plantas de tomate.....	138
<b>Figura 59.</b> Contenido en fenoles en plantas de tomate.....	139
<b>Figura 60.</b> Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de tomate.....	140
<b>Figura 61.</b> Microscopía de fluorescencia de los depósitos de calosa en hojas de tomate de plantas tratadas foliar y radicularmente con la cepa XT1, e infectadas con <i>B. cinerea</i> . ....	141
<b>Figura 62.</b> Contenido en malondialdehído (MDA) en plantas de fresa.....	144
<b>Figura 63.</b> Tinción histoquímica de ROS realizada en plantas de fresa con aplicación radicular (A-D) y foliar (E-H) de la cepa XT1. ....	145
<b>Figura 64.</b> Contenido foliar de peróxido de hidrógeno.....	146
<b>Figura 65.</b> Actividad polifenol oxidasa (PPO) en plantas de fresa.....	147
<b>Figura 66.</b> Contenido en fenoles en plantas de fresa .....	148
<b>Figura 67.</b> Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de fresa.....	149
<b>Figura 68.</b> Microscopía de fluorescencia de los depósitos de calosa en hojas de fresa de plantas tratadas foliar y radicularmente con la cepa XT1, e infectadas con <i>B. cinerea</i> . ....	150
<b>Figura 69.</b> Esquema de los metabolitos producidos por la cepa XT1 y su capacidad como activador de la resistencia sistémica inducida (ISR). ....	175

**Figura 70.** Esquema de los metabolitos producidos por la cepa XT1 y su implicación en la actividad PGPR y la inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR)..... 176



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clúster de genes que codifican metabolitos de biocontrol en <i>B. velezensis</i> .....	27
<b>Tabla 2.</b> Factores de virulencia de <i>B. cinerea</i> .....	39
<b>Tabla 3.</b> Ciclo de vida de la vid. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas empleadas y sus características. ....	53
<b>Tabla 5.</b> Cepas fúngicas empleadas y sus características.....	53
<b>Tabla 6.</b> Composición del medio Hewitt. ....	59
<b>Tabla 7.</b> Productos agroquímicos usados habitualmente en campo. ....	62
<b>Tabla 8.</b> Cebadores empleados en la amplificación de los genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos.....	65
<b>Tabla 9.</b> Fechas y condiciones de aplicación de la cepa XT1 en viñedos. ....	79
<b>Tabla 10.</b> Concentración (UFC/mL) alcanzada por las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> en los medios SG, MM y MOLP.....	87
<b>Tabla 11.</b> Viabilidad del cultivo líquido y liofilizado de la cepa XT1 en el tiempo.....	88
<b>Tabla 12.</b> Rango de valores de salinidad y pH para el crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> en los medios SG, MM y MOLP. ....	88
<b>Tabla 13.</b> Caracterización fenotípica de las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> . ....	89
<b>Tabla 14.</b> Compatibilidad de la cepa XT1 con productos agroquímicos usados habitualmente en campo. ....	91
<b>Tabla 15.</b> Producción de lipopéptidos por la cepa XT1 en distintos medios de cultivo...	92
<b>Tabla 16.</b> Lipopéptidos detectados mediante Q-TOF MS producidos por la cepa XT1. ...	95
<b>Tabla 17.</b> Incidencia de infección (%) por <i>B. cinerea</i> en frutos de uva, fresa y tomate tratados o no con la fracción lipopeptídica de XT1.....	98
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje de reducción de micelio de <i>B. cinerea</i> enfrentado a COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> en los medios de cultivo sólido y líquido MM, SG y MOLP. ....	102
<b>Tabla 19.</b> Identificación de COVs mayoritarios producidos por las cepas XT1 y LMG 27586 <sup>T</sup> . ....	104



<b>Tabla 20.</b> Valores de incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en plantas de tomate tratadas con la cepa XT1, vía foliar o radicular, e infectadas con <i>B. cinerea</i> . ...	119
<b>Tabla 21.</b> Valores de incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en plantas de fresa tratadas con la cepa XT1, vía foliar o radicular, e infectadas con <i>B. cinerea</i> . .....	124
<b>Tabla 22.</b> Incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en racimos de uva tomados tras el periodo de campaña.. .....	129
<b>Tabla 23.</b> Contenido de fitohormonas en plantas de tomate tras la aplicación de XT1, foliar y radicular, y posterior infección con <i>B. cinerea</i> .....	143
<b>Tabla 24.</b> Contenido de fitohormonas en plantas de fresa tras la aplicación de XT1, foliar y radicular, y posterior infección con <i>B. cinerea</i> .....	152

## Abreviaturas

<b>AIA</b>	Acido indolacético
<b>ABA</b>	Acido abcísico
<b>ACC</b>	1-aminociclopropano-1-carboxílico
<b>AN</b>	Agar nutritivo
<b>BCA</b>	Agente de control biológico
<b>BSM</b>	Medio selectivo para <i>Botrytis</i>
<b>BSV</b>	Bodegas San Valero
<b>Chl a</b>	Clorofila a
<b>Chl b</b>	Clorofila b
<b>CN</b>	Caldo nutritivo
<b>Col-0</b>	Semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia
<b>COVs</b>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>csp</b>	Cantidad suficiente para
<b>DBE</b>	Equivalente de doble enlace
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>FIB-FESEM</b>	Microscopio electrónico de barrido de alta resolución
<b>ET</b>	Etileno
<b>GA</b>	Giberelinas
<b>GAE</b>	Acido giberélico
<b>HAADF FEI TITAN G2</b>	Microscopio de transmisión de ultrarresolución
<b>HDMS</b>	Espectrometría de masas de alta definición
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>JA</b>	Acido jasmónico
<b>LPs</b>	Lipopéptidos
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MOPL</b>	Medio optimizado para la producción de lipopéptidos
<b>MOLPr</b>	Medio MOLP modificado
<b>m/z</b>	Masa/carga
<b>NI</b>	No identificado
<b>NRPS</b>	Péptido sintetasa no ribosomales
<b><i>o.n.</i></b>	<i>overnigth</i>
<b>PAL</b>	Fenilalanina amonio liasa
<b>PDB</b>	Caldo dextrosa patata
<b>PCR</b>	Reacción en cadena polimerasa
<b>PPO</b>	Polifenol oxidasa
<b>p/v</b>	Relación peso/volumen

<b>SA</b>	Acido salicílico
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TBA</b>	Acido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Acido tricloroacético
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TIC</b>	Cromatograma total de iones
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina
<b>UA</b>	Unidades de actividad
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de alta presión

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* es un hongo necrotrófico, causante del moho gris, que genera grandes pérdidas económicas en importantes cultivos de frutas y hortalizas. La alta ubicuidad, junto con la capacidad de producir estructuras de resistencia y la elevada tasa de mutación convierten a *B. cinerea* en un difícil adversario contra el que luchar. Hoy día, los tratamientos empleados para combatir el moho gris, se basan en el uso extensivo de pesticidas con el consiguiente riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por todo esto, uno de los grandes retos de la agricultura sostenible, es el desarrollo de alternativas que respeten el medio ambiente y preserven la sanidad de la población. En la última década y en la búsqueda de una naturaleza *eco-friendly*, se ha incrementado el empleo de cepas bacterianas como mecanismo de control biológico.

En este estudio, se ha caracterizado fenotípicamente la cepa *B. velezensis* XT1, se ha evaluado la actividad antifúngica de frente a *B. cinerea* y su actividad promotora de crecimiento de plantas (actividad PGP, *plant growth promotion*). Se han caracterizado los metabolitos secundarios implicados en la actividad antifúngica, optimizando su producción y evaluando el daño estructural que provocan en *B. cinerea*. Finalmente, se ha estudiado *in vivo* en plantas de tomate, fresa y vid, la actividad antifúngica de la cepa de estudio, y se han analizado los parámetros que regulan la resistencia sistémica inducida en dichas plantas.

Se pudo comprobar la relevancia de lipopeptidos y compuestos orgánicos volátiles (COVs) como principales metabolitos secundarios relacionados con la actividad antifúngica de la cepa XT1. Tanto la producción, como la actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica (surfactina, bacilomicina y fengicina) y de los COVs (16 compuestos mayoritarios) producidos por XT1, estuvo determinada por el medio de cultivo empleado. El análisis mediante microscopía (SEM/TEM,) reveló que dichos compuestos producen importantes alteraciones en la morfología del patógeno, provocando un incremento de estructuras de resistencia en los estadios tempranos de crecimiento o alteraciones y destrucción celular en las hifas del hongo. Por otro lado, estudios llevados a cabo en tomates, uvas, fresas y plantas de *Arabidopsis thaliana* demostraron la eficacia de estos metabolitos secundarios frente a la infección causada por *B. cinerea*.

Por otro lado, se ha evaluado la capacidad de la aplicación preventiva de la cepa XT1 para controlar la infección causada por *B. cinerea*, en plantas de tomate, fresa y vid, y los efectos de dicha aplicación preventiva en distintos parámetros de estrés y el contenido en fitohormonas vegetales. En estos ensayos, y de forma indirecta se constató la capacidad de XT1 de incrementar el crecimiento de las plantas estudiadas (actividad PGP).

Los ensayos en plantas de fresa y tomate, revelaron que el modo de aplicación de la cepa de estudio, influía en la respuesta de promoción del crecimiento en plantas. En general, la aplicación radicular de la cepa XT1 produjo un mayor aumento de la biomasa de las plantas de estudio. Las propiedades que justificarían su actividad promotora de crecimiento son: la capacidad de fijar nitrógeno, la producción de fosfatasas, sideróforos y ACCdesaminasa.

En lo que respecta al control de *B. cinerea*, la aplicación preventiva de la cepa XT1 en plantas de fresa, tomate y vid, disminuyó la incidencia de la enfermedad entre un 50% y un 65%, mientras que la severidad de los daños ocasionados se vio reducida hasta en un 60%. Además, se pudo comprobar la estabilidad y viabilidad en campo de XT1 y su compatibilidad con un 73% de los productos agroquímicos testados de uso rutinario para el control de *Botrytis*.

En lo que respecta a los mecanismos desarrollados por XT1 para desencadenar la respuesta de resistencia sistémica inducida, se pudo observar un aumento del contenido en peróxido de hidrógeno y en calosa en ambos tipos de plantas, independientemente del mecanismo de aplicación del microorganismo y un aumento de la actividad enzimática fenilalanina amonio liasa (PAL) tras la aplicación foliar. Por otro lado, el tratamiento con la cepa XT1 vía radicular en plantas de tomate redujo los valores de malondialdehído (MDA) mientras que, en plantas de fresa ocurrió en la aplicación foliar.

Por último, tras el análisis del contenido en fitohormonas vegetales, cabe destacar la implicación del tratamiento preventivo de la cepa XT1, tanto foliar como radicular, en el incremento de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), todas ellas relacionadas con la señalización de la resistencia sistémica.

Los resultados destacan el potencial de la cepa XT1 y sus metabolitos como agentes de control biológico contra la infección de *B. cinerea*.

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Hacia el control biológico

El enorme crecimiento de la población mundial supone un reto para la agricultura, debiendo hacer frente a una gran demanda de alimentos necesarios para suplir las necesidades básicas ([www.fao.org/economic/esa](http://www.fao.org/economic/esa)) (Berg, 2009). A las dificultades implícitas en la producción de tales cantidades de alimentos, se han de sumar los daños en los cultivos ocasionados por patógenos. Se estima que las afecciones en cultivos producen la pérdida del 10-16% de las cosechas en el mundo, lo que en términos económicos se traduce en 200 billones de euros anuales (Chakraborty y Newton, 2011).

Hoy día, la mayor fuente de resistencia frente a dichos patógenos, reside en los pesticidas de naturaleza química. Además, el uso masivo y descontrolado de este tipo de productos fruto de su efectividad, ha llevado a la acumulación de residuos nocivos para el medio ambiente y el ser humano. Todo ello ha conducido a la concienciación de los gobiernos y la búsqueda de alternativas de control de fitopatógenos que combinen tanto, la productividad y viabilidad económica como, el cuidado de la salud y el entorno (Pandín y col., 2017). Esta necesidad de cambio está también impulsada por los consumidores, quienes demandan productos de alta calidad nutricional obtenidos mediante el empleo de técnicas más ecológicas.

Por estas razones, en los últimos años, ha aumentado la popularidad por el estudio y desarrollo de los mecanismos de biocontrol como alternativa al uso de pesticidas de naturaleza química. De acuerdo a De Silva y col. (2019), el control biológico consiste en el uso de organismos beneficiosos, como metabolitos, para reducir los efectos negativos ocasionados por los fitopatógenos y promover una respuesta positiva en la planta. Entre las numerosas ventajas del uso de mecanismos de control biológico se encuentran la reducción de riesgos para la salud humana y el medio ambiente, su eficacia en pequeñas cantidades, su alta biodegradabilidad, el uso de mecanismos de acción complejos que evitan la aparición de resistencias o la posibilidad de integración con los productos habituales en el manejo de plagas (Berg, 2009; Pertot y col., 2017).

No obstante, los agentes de biocontrol, se encuentran en un estado de desarrollo muy inicial que les dificulta poder competir en igualdad de condiciones con los pesticidas químicos. Tan sólo unos pocos son considerados productos satisfactorios en el mercado (De Silva y col., 2019). Por lo tanto, el objetivo a corto plazo sería la reducción del uso de los agroquímicos habituales en pos de la coexistencia y refuerzo con agentes de control biológico.



## 2. Relevancia de los organismos rizosféricos como agentes de control biológico

Se denomina rizosfera a la zona de tierra que está íntimamente ligada a la zona radicular de las plantas y donde las características químicas y biológicas del suelo se encuentran influenciadas por los exudados producidos por las raíces. Entre los componentes que constituyen este nicho ecológico se encuentran: la raíz, la rizosfera (región del suelo inmediata a la raíz) y el rizoplano (constituido por la superficie de la raíz de la planta) (Funes-Pinter y col., 2018; Gouda y col., 218).

A pesar de que la composición de los exudados excretados en la zona radicular puede variar en función de la especie y estado fisiológico de la planta o las condiciones ambientales, la acumulación de compuestos de alto y bajo peso molecular, como azúcares y aminoácidos, suponen una gran fuente de carbono para los microorganismos y juegan un papel fundamental en el proceso de colonización radicular mediado por quimiotaxis (Glick, 2012; Pii y col., 2015). Por estas razones, la concentración de microorganismos en el suelo circundante a la raíz puede llegar a ser de 10 a 100 veces mayor que la de suelo no rizosférico (Beneduzi y col., 2012).

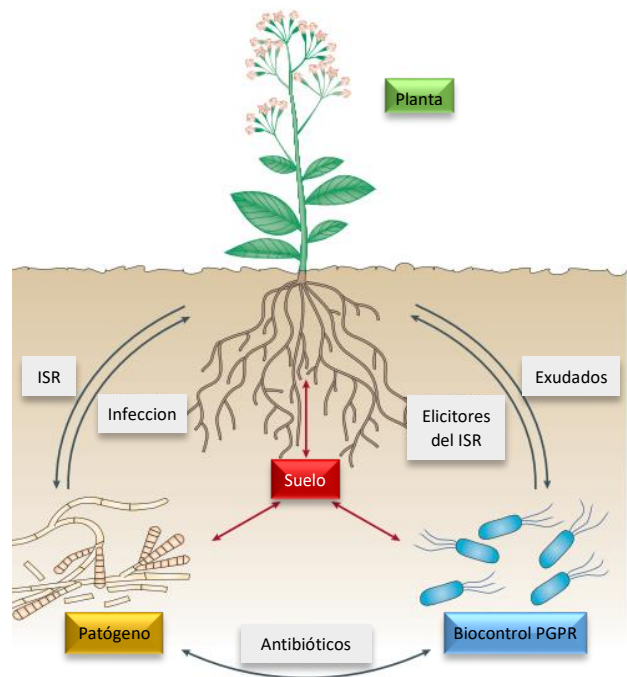


Figura 1. Interacción en la zona rizosférica entre los microorganismos PGPR, las plantas y los patógenos. Modificado de Haas y Défago, 2005.

Aunque la variedad de microorganismos asociados a este nicho ecológico es amplia, las bacterias son de lejos la forma más común, denominándose rizobacterias. La relación planta-rizobacteria puede ser beneficiosa, neutral o perjudicial para el crecimiento de la planta. En el caso de que las bacterias induzcan efectos positivos en el desarrollo de biomasa aérea y radicular se las denomina rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas o PGPR (*plant growth promotion rhizobacteria*) (Fig. 1) (Beneduzi y col., 2012; Haas y Defago, 2005; Pii y col., 2015).

Las bacterias PGPR pueden dividirse en dos grupos en función de si su actividad se lleva a cabo extracelularmente (ePGPR) o intracelularmente (iPGPR) (Chauhan y col., 2015; Gouda y col., 2018). Independientemente del grupo en el que se incluyan, dichas bacterias PGPR son capaces de fomentar el crecimiento de la planta, mejorar su estado fisiológico e incluso inhibir las infecciones producidas por patógenos mediante mecanismos, por un lado, directos como la estimulación de mecanismos de fijación de nitrógeno (Sessitsch y col., 2002); la producción de hormonas tales como auxinas, giberelinas o citoquininas, las cuáles incrementan la longitud radicular y la división celular (García de Salamone y col., 2001), la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999); y la secreción de sideróforos (Kloepper y col., 1980). Y por otro lado, indirectos, tales como la competición por el nicho ecológico, la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios, la colonización radicular y la producción de sideróforos, lipopéptidos y compuestos orgánicos volátiles (COVs, *volatile organic compounds*), (Choudary y Johri, 2009; Borriss, 2011; Beneduzi y col., 2012; Chauhan y col., 2015; Iborra y col., 2018).

No todos los agentes considerados PGPRs cuentan con el mismo tipo de mecanismos de biocontrol, e incluso aquellos que poseen varios de los citados pueden verse afectados por las condiciones ambientales, la distinta composición de los exudados, la variación en los grados de sensibilidad del patógeno al agente de biocontrol o la población microbiológica indígena y modificar dichos mecanismos. Debido a ello, previa a la explotación de un agente de control biológico es recomendable tener en cuenta diferentes factores: los mecanismos de acción específicos de cada microorganismo, las condiciones medioambientales a las que se verá sometido, el modo de empleo, la relación que se establecerá entre la planta y la rizobacteria y la situación legislativa vigente respecto a esos microorganismos en el país en el que se desee aplicar (Fravel, 2005; Glick, 2012).

En la última década se ha producido un “boom” en la explotación de los microorganismos PGPR y sus interacciones como mecanismos de control biológico. Actualmente, en el mercado se comercializan productos ecológicos cuyo componente principal incluye distintas especies microbiológicas entre las que se encuentran: Biopromoter® (*Azospirillum* sp.), Serenade® (*Bacillus subtilis* QST716), Kodiak® (*B. subtilis* GB03), YieldShield® (*B. pumilus* GB34), Bioboost® (*Delftia acidovorans*), Rotex® (*Phlebiopsis gigantea*), Proradix® (*Pseudomonas* sp.), RhizoStar® (*Serratia plymuthica* HRO-C48) o RooShield® (*Trichoderma harzianum* T22) (Berg, 2009; Calvo-Garrido y col., 2019).

Aunque se estima que ha habido un incremento del 14% (*Brisk Insight*, 2016) en el mercado de los biofertilizantes y que esta cifra va al alza, aún queda un largo camino por

recorrer. Entre los objetivos a alcanzar, se encuentra la obtención de una mayor estabilidad y durabilidad del producto, la reducción de los costes de producción y la garantía de los buenos resultados. Por otro lado, es fundamental la concienciación e instrucción de los agricultores anclados en métodos poco sostenibles (Bardin y col., 2015; Keswani y col., 2019).

### **3. Especies del género *Bacillus* con actividad PGPR**

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Ferdinand Cohn en 1872 con las especies *Bacillus anthracis* y *B. subtilis*. Actualmente, cuenta con 379 especies descritas, siendo este género considerado representante de las bacterias gram positivas con bajo contenido en G+C (32-69 mol%) y encuadrados en la familia *Bacillaceae*, orden *Bacillales*, clase *Bacilli*, filo *Firmicutes* dentro del dominio *Bacteria* (Nicholson y col., 2000; Maughan y Van der Auwera, 2011; Vos y col., 2011). Los miembros de este género, según el Manual de Bergey, son definidos como bacilos rectos o ligeramente curvados que pueden aparecer aislados, en parejas o en cadenas y, ocasionalmente, como largos filamentos. Su metabolismo es comúnmente aerobio o anaerobio facultativo (Sneath y col., 1986).

Hoy día, el uso de las especies pertenecientes al género *Bacillus* en la formulación de productos basados en PGPR, se ha convertido en el aliado de la industria agrícola en la lucha frente al manejo de plagas. Entre las características que hacen atractivas a las especies de dicho género como agentes de control biológico se encuentran: su estatus como microorganismo GRAS (*general regarding as safe*) por la agencia FDA "*Food and Drug Administration*" del gobierno de los Estados Unidos, lo que significa que la FDA ha declarado que su uso es sano y saludable para los seres humanos (Schallmeyer y col., 2004); las altas tasas de crecimiento; o, su existencia común en la microbiota del suelo, con el consecuente bajo impacto en las comunidades microbianas.

Además, la capacidad de formar esporas le confiere un magnífico vehículo de propagación y de resistencia a condiciones adversas, simplificando así la formulación de los productos y su almacenamiento (Fig. 2) (Hashem y col., 2019).

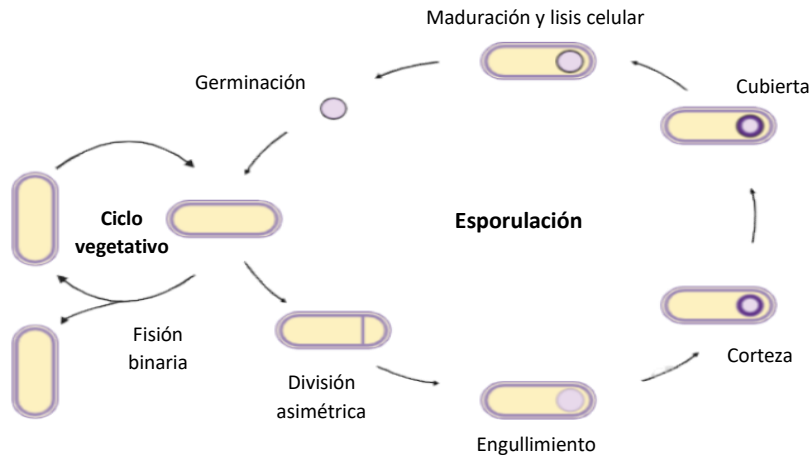
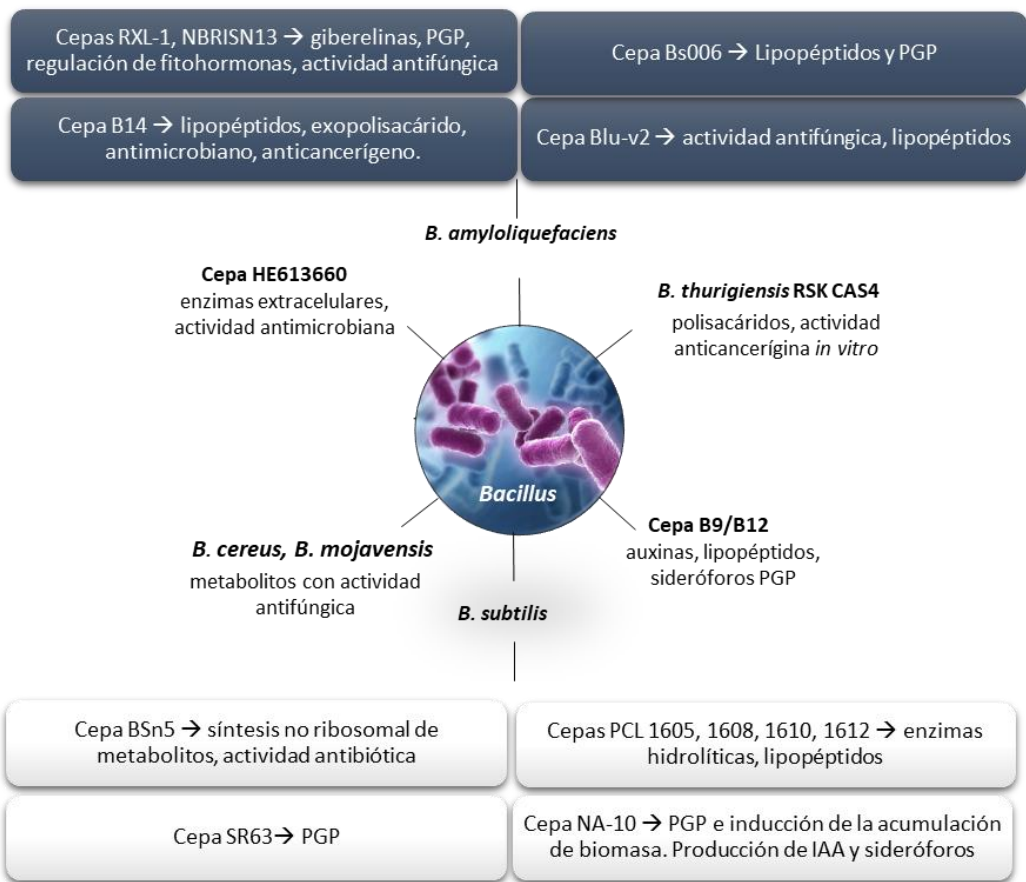


Figura 2. Ciclo de esporulación de *Bacillus*. Modificado de Errington (2003).

Junto con la esporulación, destacan la diversidad de propiedades fisiológicas como la solubilización de fosfatos, potasio y zinc (Caulier y col., 2019), su capacidad para adaptar al entorno la composición de los ácidos grasos dispuestos en la membrana celular (Diomande y col., 2015) o la habilidad de formar *biofilms* (Checinska y col., 2015), confiriendo así al género *Bacillus* las herramientas necesarias para ser uno de los microorganismos de distribución más ubicua.

Asimismo, una amplia gama de especies pertenecientes a éste género controlan las afecciones producidas por patógenos mediante la excreción al medio extracelular de proteínas y metabolitos secundarios como lipopéptidos (Torres y col., 2017), compuestos volátiles (Asari y col., 2016), policétidos (Hamdache y col., 2011; Kaspar y col., 2019) y bacteriocinas (Subramanian y Smith, 2015) (Fig. 3).



**Figura 3.** Producción de metabolitos por cepas del género *Bacillus* y su actividad promotora del crecimiento en plantas (PGP). Modificado de Ek-Ramos y col. (2019).

En los últimos años, la especie *B. velezensis* se está situando en los primeros puestos del grupo de microorganismos PGPR más usados en agricultura (Fan y col., 2018). Dicha especie ha demostrado además tener aplicaciones en otros muchos sectores, lo que la convierte en una especie económicamente relevante (Ye y col., 2018; Adeniji y col., 2019; Thurlow y col., 2019; Wang y col., 2019).

### 3.1 *Bacillus velezensis*

La especie *B. velezensis* fue descrita por primera vez por Ruíz-García y col. (2005) a partir de muestras procedentes del río Vélez-Málaga (Málaga), está taxonómicamente relacionada con *B. subtilis* (Fan y col., 2017) y se estableció como una nueva especie perteneciente al género *Bacillus* en dicha fecha. No obstante, durante años se ha visto

sometida a numerosas reclasificaciones. Basándose en estudios de hibridación de ADN-ADN, Wang y col. (2008) la catalogaron como sinónimo heterotípico de *B. amyloliquefaciens*. Actualmente, la clasificación aceptada por el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas es la establecida por Dunlap y col. (2016), quienes mediante el análisis del genoma completo reclasificaron las especies *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus* y *B. oryzzicola* bajo el sinónimo de *B. velezensis*.

Desde su descripción en 2005, son muchos los autores que han investigado el potencial como agente de biocontrol de las cepas pertenecientes a ésta especie. Pero sin duda, la cepa *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, reclasificada como *B. velezensis*, ha sido la más ampliamente estudiada a lo largo de la última década, convirtiéndose por tanto en el modelo de referencia.

La capacidad de *B. velezensis* de promover el crecimiento vegetal y reducir las afecciones derivadas de la infección por patógenos de plantas ha sido descrita frente a *Fusarium oxysporum* (Koumoutsis y col., 2004; Palazzini y col., 2016), *Ralstonia solanacearum* (Cao y col., 2018), *Aspergillus niger* (Chen y col., 2018), *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Frikha-Gargouri y col., 2017) y *Alternaria solani* (Gao y col., 2017) entre otros.

De acuerdo a Fan y col., 2017, y como ya se ha citado para otras especies del género *Bacillus*, entre los mecanismos de acción principales de *B. velezensis* se encuentran la inhibición de patógenos por competición directa o mediante síntesis de metabolitos secundarios, la activación de la resistencia sistémica de la planta (ISR, *induced systemic resistance*) y el beneficio para el microbioma de la planta hospedadora. Para dilucidar los métodos de acción descritos, que convierten a esta especie en una fuente de microorganismos con capacidad PGPR, se han llevado a cabo análisis del genoma completo de la cepa FZB42 y de otras 217 cepas ([www.eztaxon.org](http://www.eztaxon.org)).

Así por ejemplo, Chen y col. (2018) hallaron que el 18% del genoma de *B. velezensis* LM2303 codifica genes relacionados con la actividad antimicrobiana y antifúngica como la producción de lipopéptidos y policétidos, mientras que FZB42 dedica un 9% de su contenido genético a la codificación de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios (Chowdhury y col., 2015). En cuanto a los genes asociados propiamente a la promoción del crecimiento en plantas, Chen y col. (2019) describieron un clúster de genes relacionado con la síntesis de sideróforos, la producción de COVs o la síntesis de hormonas como el ácido indol acético (AIA).

### 3.1.1 Colonización de la zona radicular

Entre los requisitos que debe cumplir un potencial agente de biocontrol, para poder promover el crecimiento de la planta y/o inhibir patógenos, se encuentra que posea una colonización radicular eficiente (Fan y col., 2011; Fan y col., 2012; Zeriouh y col., 2014). No es sólo necesario que los microorganismos alcancen la raíz, sino que también deben mantener una densidad que les permita competir con las comunidades microbianas autóctonas. Según Borriss (2011), se necesita una concentración mínima de  $10^4$  UFC/raíz para que el microorganismo promotor del crecimiento produzca efectos apreciables en la planta.

De acuerdo a la bibliografía existente, para que se dé una buena colonización radicular, las cepas deben tener movilidad hacia la raíz promovida o no por los exudados producidos por la planta (Allard-Massicotte y col., 2016), ser capaces de usar las fuentes de carbono y nitrógeno presentes (Al-ali y col., 2018) y poder formar biofilms en la superficie de la raíz (Fan y col., 2018).

La movilidad es la capacidad de desplazamiento de los microorganismos que les permite moverse hacia nichos ecológicos ricos en moléculas orgánicas y fuentes de carbono, o alejarse de sustancias tóxicas para su metabolismo (Allard-Massicotte y col., 2016). En primer lugar, los propios exudados emitidos por la raíz pueden inducir la expresión de la movilidad en los microorganismos (Allard-Massicotte y col., 2016) y modificar la zona de colonización dependiendo del tipo de planta y exudado (Fan y col., 2011). Aquellos exudados ricos en fuentes de carbono fomentan la producción de surfactinas por parte de las rizobacterias y por tanto la colonización radicular. Fan y col. (2012) describieron la polaridad del movimiento de *B. velezensis* FZB42, en plantas de *A. thaliana* y *Lemna* sp., hacia la zona radicular donde había mayor producción de exudados.

En el género *Bacillus* destaca el movimiento de *swarming*, estrechamente relacionado con la producción de exopolisacáridos y la secreción de surfactinas que actuarían como agente humectante en el desplazamiento. Además, los lipopéptidos (LPs) estarían relacionados con el agrupamiento bacteriano y la coordinación del movimiento (Marvasi y col., 2010; Raaijmakers y Mazzola, 2012). Borriss (2011) señalaron el papel fundamental de estos dos factores para la cepa FZB42. Del mismo modo, Pandin y col. (2019) describieron la implicación de la expresión del gen *swrA*, relacionado con el movimiento *swarming*, en la colonización radicular de la cepa *B. velezensis* QST713. Por su parte, Cao y col. (2018) subrayaron el papel de las iturinas y las fengicinas en la colonización de dos cepas pertenecientes a *B. velezensis*.

Íntimamente vinculada a la movilidad se encuentra la capacidad de formar biofilms. Estas estructuras son agrupaciones celulares que se mantienen unidas entre sí gracias a una matriz extracelular que le confiere estabilidad, adhesión, cohesión e interconexión (Zerriouh y col., 2014). En el género *Bacillus*, dicha matriz está compuesta en su mayoría por exopolisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos (Xu y col., 2019). La actividad PGPR y de defensa frente a microorganismos patógenos mediada por el *biofilm* viene determinada por la secreción en esa matriz de compuestos antimicrobianos y la activación del ISR. Los exudados producidos por plantas de maíz fomentan en *B. velezensis* SQR9 la expresión de genes asociados a la producción de una matriz extracelular, entre los que se encuentra el gen *eps*, relacionado con la síntesis de exopolisacárido (Al-Ali y col., 2018). Como consecuencia de la formación del *biofilm* por SQR9 se incita la expresión de genes vinculados con la fengicina, la bacilibactina y la bacilisina (Rabbee y col., 2019). Al igual que en el caso de la motilidad, en las cepas pertenecientes a *B. velezensis* parece ser de gran importancia la síntesis de surfactinas en la producción de *biofilms* (Fan y col., 2011; Fan y col., 2012; Cawoy y col., 2014; Al-Ali y col., 2018). Así, tras el análisis del genoma de *B. velezensis* LM2303, Chen y col. (2018) describieron la presencia de clúster de genes relacionados con la síntesis de proteínas, exopolisacáridos y polímeros, como el ácido poli- $\gamma$ -glutámico (PGA), todos ellos relacionados con la formación de *biofilms*. Además, establecieron una correlación positiva entre la síntesis de *biofilms* y la producción de surfactina.

### 3.1.2 Actividad biofertilizante

El nitrógeno (N) y el fósforo (P) son los nutrientes que más limitan la producción agrícola a nivel mundial, debido a ello se emplean en exceso fertilizantes ricos en dichos componentes. Como consecuencia de la rápida lixiviación de estos compuestos se produce la contaminación de las aguas subterráneas y la eutrofización de las vías fluviales además de la producción de gases invernadero. Por ello, una de las metas a alcanzar en la agricultura sostenible es el desarrollo de productos biológicos formulados con bacterias capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y solubilizar o mineralizar el fosfato inorgánico u orgánico de los suelos (Alori y col., 2017).

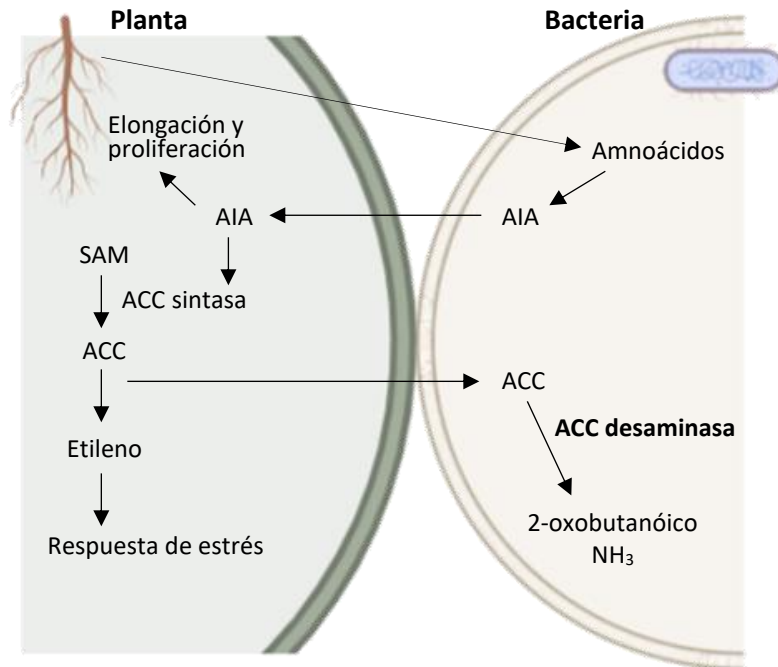
Los géneros con mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico son los noduladores radiculares *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* que fijan el nitrógeno en simbiosis con las leguminosas. En general, las cepas pertenecientes al género *Bacillus* carecen de capacidad de fijar el nitrógeno en simbiosis con leguminosas pero sí que cuentan con el complejo nitrogenasa, fundamental en la fijación de nitrógeno atmosférico (Borriss, 2011).



En cuanto al fósforo, las dos formas fundamentales en las que podemos encontrarlo en los suelos son orgánico, mayormente en forma de ácido fítico, e inorgánico. Los microorganismos solubilizadores de fosfatos se encuentran ampliamente distribuidos en los suelos. Estos son capaces de liberar al medio metabolitos como ácidos orgánicos que a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelan los cationes unidos al fosfato y disminuyen el pH del suelo, convirtiendo el P en una forma soluble (Kkan y col., 2009). A pesar de que los estudios *in vitro* desarrollados con las cepas pertenecientes a *B. velezensis* tuvieron resultados prometedores, pocos estudios han probado la habilidad solubilizadora de fosfatos en campo, y quienes si lo han hecho, han determinado la limitada actividad de la cepa *B. velezensis* FZB45 (Borriss, 2011).

### **3.1.2.1 Producción de ACC desaminasa**

El etileno es una conocida hormona promotora del crecimiento en plantas y estimuladora de la germinación (Hassan y col., 2014). Sin embargo, en respuesta a situaciones de estrés, las plantas acumulan este compuesto, rompiendo el equilibrio en su contenido, lo que detiene la elongación radicular, induce a la defoliación y conlleva una disminución en la producción de los cultivos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Hassan y col., 2014). Entre los precursores inmediatos de la síntesis del etileno se encuentra el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), capaz de regular la respuesta de defensa en plantas a condiciones ambientales adversas (Kim y col., 2019). Muchas de las bacterias PGPR cuentan en su arsenal enzimático con la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC-desaminasa), encargada de la desaminación del ACC y su conversión a ácido 2-oxobutanoico y  $\text{NH}_3$ , resultando así un aumento en la elongación radicular en la planta (Fig. 4) (Danish y Zafar-Ul-Hye, 2019). Aunque sí hay evidencias de la producción de ACC-desaminasa en el género *Bacillus* (Glick y col., 2007), son escasos los estudios relacionados con su síntesis en cepas de la especie *B. velezensis*.



**Figura 4.** Mecanismo de la enzima ACC desaminasa. En condiciones de estrés o senescencia en planta, se induce la catalización de SAM (S-adenosilmetionina) mediante la ACC sintasa y la producción de ACC. La ACC desaminasa evita la acumulación de etileno. Modificado de Glick, 2014.

### 3.1.2.2 Producción de sideróforos

Los sideróforos son moléculas orgánicas producidas por algunos microorganismos los cuales, en condiciones limitantes de hierro, promueven la captura de este mineral del ambiente y su transformación en hierro disponible para su absorción por los microorganismos. En la cepa *B.velezensis* FZB42 se detectaron cinco clústers de genes relacionados con la síntesis no ribosomal de lipopéptidos cíclicos del sideróforo bacilibactina, implicado en la quelatación de iones Fe<sup>+3</sup> y su transporte al citoplasma a través de la membrana (Chowdhury y col., 2015). Mediante la reducción de la concentración de hierro disponible, la bacilibactina de especies del género *Bacillus*, entre las que se encuentra FZB42, es capaz de inhibir el crecimiento de patógenos bacterianos y fúngicos (Chen y col., 2007; Saha y col., 2016; Rabbee y col., 2019). Por otro lado, estas moléculas mejoran la calidad y cantidad de los cultivos incrementando la cantidad de hierro disponible para las plantas.

### 3.1.3. Control biológico de patógenos mediante producción de metabolitos secundarios

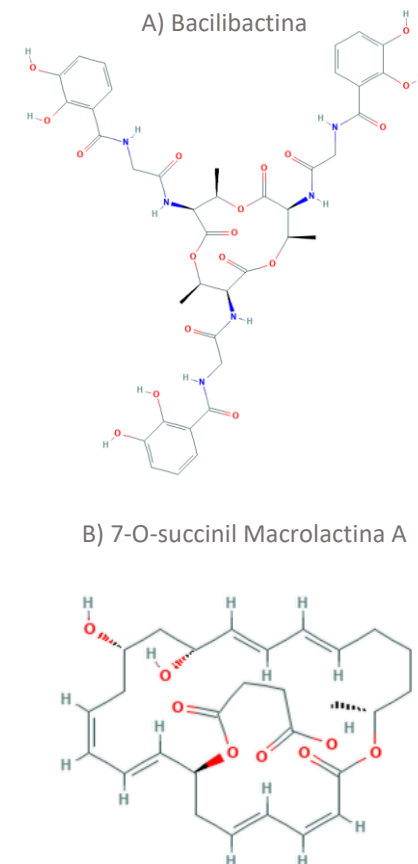
En la última década se ha multiplicado el número de estudios relativos a las cepas pertenecientes a la especie *B. velezensis* y la implicación de sus metabolitos secundarios en el control de fitopatógenos. Según el análisis del genoma completo de la cepa modelo *B. velezensis* FBZ42, trece grandes clústers de genes están destinados a la codificación de metabolitos de síntesis ribosomal o no ribosomal (NPRS, *nonribosomal peptide synthetase*), con actividad antimicrobiana y antifúngica. Tres de ellos son responsables de la producción de policétidos como las macrolactinas (Fig. 5B), las bacilinas y las difididinas. Otros cinco de ellos están destinados a la síntesis de las surfactinas, las fengicinas, las iturinas, las bacilomicinas y la bacilibactina (Fig. 5A). Para la producción del dipéptido bacilisina, se destina un clúster de genes, mientras que el contenido restante se invierte en la síntesis de toxinas peptídicas sintetizadas ribosómicamente como las bacteriocinas (plantozilina y amiloclicina) (Tabla 1). Implicado en la actividad promotora del crecimiento, cabe destacar el clúster de genes relacionado con la síntesis de compuestos orgánicos volátiles (Chen y col., 2007; Chen y col., 2018; Fan y col., 2018; Rabbee y col., 2019). Resultados similares obtenidos tras el análisis del genoma completo de cepas relacionadas con FBZ42, tales como LM2303, CAU B946 o M75, demuestran la alta capacidad de la especie *B. velezensis* de producir metabolitos secundarios, y su papel decisivo en la caracterización como agentes de control biológico (Chen y col., 2018).

#### 3.1.3.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente. Sus características bioquímicas son muy variables y su actividad suele ir asociada a una proteína. La primera bacteriocina fue descrita en el género *Bacillus* en el año 1976 (Subramanian y Smith, 2015). Mientras que en la especie *B. velezensis*, la mersacidina fue la primera bacteriocina conocida, descrita en la especie *Bacillus* sp. HIL Y85, posteriormente reclasificada como *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (Chowdhury y col., 2015) y en la actualidad perteneciente a *B. velezensis* (Dunlap y col., 2016). Recientemente, el análisis genómico de FZB42, ha permitido el descubrimiento de un clúster de genes que codifican dos nuevas bacteriocinas, la plantazolicina y la amiloclicina. Ambas tienen con actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas estrechamente relacionadas con su especie. Esto sugiere que tienen un papel relevante en la competición por el nicho ecológico en la rizosfera (Chowdhury y col., 2015; Subramanian y Smith, 2015; Rabbee y col., 2019).

**Tabla 1.** Clúster de genes que codifican metabolitos de biocontrol en *B. velezensis* (Chen y col., 2018; Rabbee y col., 2019).

Metabolito	Clúster	Tipo de sintetasa	Función	Referencia
Surfactina	srf	NRPS	Antifúngica, antibacteriana, colonización, ISR	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Chowdhury y col. (2015)
Fengicina	fen	NRPS	Antifúngica, ISR	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Koumoutsy y col. (2004)
Bacilomicina D	bmy	NRPS	Antifúngica, ISR	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Koumoutsy y col. (2004)
Bacilibactina	dhb	NRPS	Absorción de nutrientes, sideróforos	<i>B. velezensis</i> LM2303 Chen y col. (2018)
Butirosina	btr	PKS	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> LM2303 Chen y col. (2018)
Difidina	dif	PKS	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Chen y col. (2006)
Bacilina	bae	PKS-NRPS	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Chen y col. (2006)
Macrolactina	mln	PKS	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Schneider y col. (2007)
Bacilisina	bac	NRPS	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Wu y col. (2015)
Plantazolicina	pzn	Microcin	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Scholz y col. (2011)
Amiloclicina	acn	-	Antibacteriana	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Scholz y col. (2014)
Acetoina/2,3-butanodiol	Als; bdh	Acetolactato sintasa/ descarboxilasa y 2,3-butanodiol deshidrogenasa	ISR	<i>B. velezensis</i> FBZ42 Chowdhury y col. (2015)



**Figura 5.** Estructura química de las moléculas a) bacilibactina y b) 7-O-succinil Macrolactina A

PKS: polyketide synthases

NRPS: nonribosomal peptide synthetases

ISR: induced systemic resistance

### 3.1.3.2 Policétidos no ribosomales

Los policétidos comprenden una clase estructuralmente diversa de metabolitos secundarios de síntesis no ribosomal. Estos compuestos bioactivos tienen un amplio abanico de funciones entre las que se encuentran la actividad antibacteriana, inmunosupresora, antitumoral y otras fisiológicamente relevantes (Chen y col., 2006; Borriss, 2011). Su biosíntesis se lleva a cabo mediante condensaciones sucesivas de pequeños ácidos carboxílicos a través del complejo multienzimático policétido sintasa (PKS). El complejo PKS puede ser clasificado en tres grupos, tipo I, II y III, siendo éste último en el que se incluye la síntesis de la mayoría de los policétidos del género *Bacillus* (Olishevskaya y col., 2019). En concreto las bacilinas, difigidinas y macrolactinas son los policétidos, hasta ahora conocidos, producidos por las cepas pertenecientes a la especie *B. velezensis* (Chen y col., 2006).

- ♣ Bacilinas: su biosíntesis ha sido descrita en la cepa FZB42 (Chen y col., 2006). Son antibióticos poliénicos de estructura lineal que inhiben la biosíntesis de proteínas en procariontes pero no en eucariotes. Además de poseer una fuerte actividad bacteriostática frente a un amplio espectro de bacterias, estas moléculas son reconocidas por tener un papel relevante en la activación de la resistencia sistémica en plantas frente a patógenos como *B. cinerea* (Hamdache y col., 2011, Wu y col., 2018).
- ♣ Difigidinas: es un antibiótico poliénico macrocíclico compuesto por un esqueleto de 22 carbonos y un grupo fosfato raramente encontrado en los metabolitos secundarios (Olishevskaya y col., 2019). Al igual que en el caso de las bacilinas, su síntesis ha sido descrita en *B. velezensis* FZB42. Es el compuesto antibacteriano más efectivo producido por FZB42, actuando como un prometedor inhibidor de las fitopatologías causadas por *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovorum* o *Xanthomonas oryzae* (Wu y col., 2015).
- ♣ Macrolactinas: estas moléculas consisten en un esqueleto de carbono en un anillo de lactona de 24 miembros con tres grupos dieno. Las macrolactinas sintetizadas por la cepa FZB42, se encuentran dentro de los miembros de las familias de la macrolactina A, macrolactina D, 7-O-malonil y 7-O-succinil macrolactina A. Aunque la macrolactina A tienen un papel muy relevante en el control de afecciones humanas; en lo que respecta a la agricultura es interesante las macrolactina 7-O-malonil, por su actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas. Además, hay estudios que destacan el papel de estas moléculas

en la activación del ISR frente a microorganismos de infección biotrófica (microorganismos patógenos cuya nutrición se basa en las células vivas del hospedador) (Schneider y col., 2007; Hamdache y col., 2011; Wu y col., 2018).

### 3.1.3.3 Lipopéptidos

Aunque son muchos los metabolitos con características relevantes producidos por *B. velezensis* y especies del género *Bacillus*, la mayor parte de la actividad antifúngica y antibacteriana otorgada a esta especie se debe a su capacidad de producir lipopéptidos (Medeot y col., 2017). En el camino hacia una agricultura sostenible estas moléculas han adquirido un papel relevante en el control de enfermedades causadas por patógenos. Características como baja toxicidad; alta biodegradabilidad; resistencia a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad o un amplio espectro de actividad antimicrobiana, hacen de los lipopéptidos unos candidatos competitivos frente a los agroquímicos usados actualmente (Medeot y col., 2017).

Los lipopéptidos (LPs) son oligopéptidos cíclicos polares de bajo peso molecular sintetizados por un complejo multienzimático denominado péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) (Romero y col., 2007; Han y col., 2015; Deng y col., 2017). Los mayores productores bacterianos de estas moléculas son los pertenecientes al género *Bacillus*. Aunque en la mayoría de las especies descritas los lipopéptidos producidos pertenecen a una sola familia, *B. velezensis* es capaz de co-producir LPs correspondientes a dos o más familias, convirtiéndose en una de las especies bacterianas más estudiadas por su riqueza en metabolitos secundarios (Jemil y col., 2017). Los LPs sintetizados por *B. velezensis* se clasifican en tres familias: surfactinas, fengicinas o iturinas. Todas ellas comparten en su estructura un ácido graso  $\beta$ -amino o  $\beta$ -hidroxi unido a una cola lipídica, pero se diferencian en la composición y longitud del polipéptido, la longitud de la cadena hidrocarbonada y el tipo de enlace que une ambas partes (Ongena y Jaques, 2008; Frikha-Gargouri y col., 2017).

Aunque bajo condiciones *in vitro* su síntesis es elevada, en la zona radicular la producción de los lipopéptidos por los microorganismos no es constante ni homogénea. Entre los factores que activan y fomentan su síntesis se encuentran la presencia de patógenos, las fuentes de carbono y nitrógeno, la composición de los exudados radiculares y el contenido en oxígeno (Chowdhury y col., 2015; Pretorius y col., 2015; Lu y col., 2016; Al-Ali y col., 2018).

- ♣ Surfactinas: su estructura química se caracteriza por una cabeza polar heptapeptídica con distinta isomería, cuyos aminoácidos están unidos a una

cadena hidrocarbonada  $\beta$ -hidroxi de longitud (C13-C16) e isomería variables (Fig. 6A) (Jemil y col., 2017). Numerosos estudios han revelado la importancia de las surfactinas en la actividad antifúngica y antimicrobiana frente a patógenos como *B. cinerea* (Wu y col., 2018), *Pseudomonas syringae* (Bais y col., 2004), *Fusarium verticillloides*, *Ralstonia solanacearum* (Chen y col., 2018) o *Rhizoctonia solani* (Rabbee y col., 2019). A diferencia del resto de los lipopéptidos, el efecto antagónico directo de las surfactinas no es tan eficaz. Sin embargo, tienen un rol fundamental en la producción de *biofilms*, la movilidad y la colonización radicular (Zeriuoh y col., 2014; Chowdhury y col., 2015; Al-ali y col., 2018; Chen y col., 2018; Wang y col., 2019), en la desestabilización de las membranas celulares mediante la inducción de canales iónicos en la bicapa lipídica de patógenos (Ines y Dhouha, 2015; Jemil y col., 2017; Wang y col., 2019), en la alteración de la integridad del ADN (Chen y col., 2018); en la destrucción de los *biofilm* producidos por patógenos (Chen y col., 2018); o en la activación del sistema de resistencia en plantas (ISR). En el último caso, parece ser primordial la longitud de la cadena hidrocarbonada siendo las moléculas de mayor tamaño las que tendrán un efecto más potente en la activación del ISR (Cawoy y col., 2014; Chen y col., 2018; Wu y col., 2018).

- ♣ Fengicinas: estructuras cíclicas decapeptídicas que contienen un ácido graso  $\beta$ -hidroxi unido en el extremo N-terminal a una cadena carbonada con una longitud de entre 14 y 18 carbonos. Además, se caracterizan por contener aminoácidos inusuales como la alotreonina y la ornitina (Fig. 6B) (Koumoutsis y col., 2004). Normalmente, su síntesis viene determinada por la aparición de proteínas señalizadoras procedentes de la planta o de patógenos en su mayoría de naturaleza fúngica filamentosa. Entre los mecanismos que convierten a las fengicinas en buenos inhibidores de hongos se encuentra su actividad directa frente al patógeno, su efecto disruptor en la formación de *biofilm* (Medeot y col., 2017) o su actividad elicitora del ISR frente a patógenos biotróficos (Wu y col., 2018). Cabe destacar, entre muchos otros, su actividad frente a los patógenos *P. syringae* (Wu y col., 2018), *B. cinerea* o *Fusarium moniliforme* (Lu y col., 2016).
  
- ♣ Iturinas: los miembros de la familia de las iturinas, como la micosubtilina, la bacilomicina D y la iturina A, se caracterizan por una estructura peptídica de siete miembros unidos a una cadena hidrocarbonada (C14-C17), en este caso,  $\beta$ -amino, de longitud e isomería variables (Fig. 6C) (Koumoutsis y col., 2004). En el caso de las cepas pertenecientes a la especie *B. velezensis* es la Bacilomicina D la que produce alteraciones en la membrana plasmática y paredes celulares de

patógenos fúngicos como *Verticillium dahliae*, *B. cinerea*, *F. graminearum* o *Penicillium digitatum* (Han y col., 2015; Tanaka y col., 2015; Ambrico y Trupo, 2017; Rabbee y col., 2019).

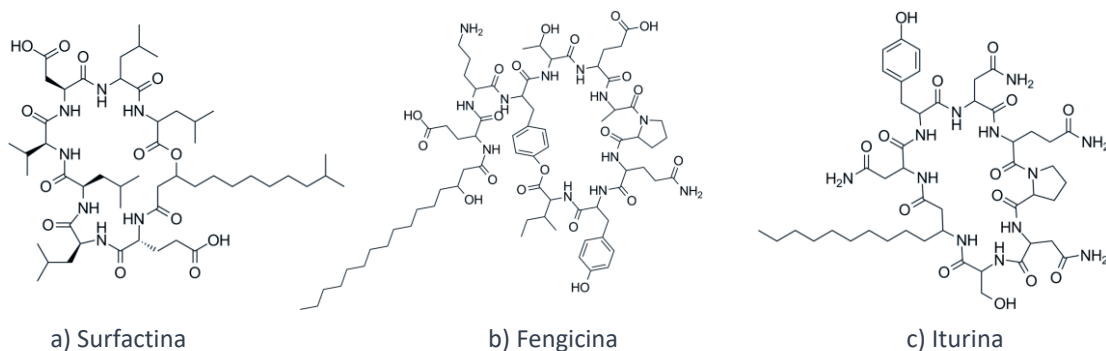


Figura 6. Estructura química de algunos representantes del grupo de las a) surfactinas, b) fengicinas y c) iturinas.

### 3.1.3.4 Compuestos orgánicos volátiles

En el año 2004 Ryu y col. describieron, por primera vez, la actividad promotora del crecimiento en plantas producida por los compuestos orgánicos volátiles (COVs) sintetizados por siete cepas bacterianas en plantas de *A. thaliana*. Desde entonces, y sobre todo en la última década, ha habido un creciente interés por estos compuestos que se ha traducido en el descubrimiento y desarrollo de su potencial en la mejora y protección de cultivos.

Los COVs son una compleja mezcla de compuestos lipófilos de bajo peso molecular que suelen ser producidos por plantas y microorganismos como consecuencia de su catabolismo (Rabbee y col., 2019). Se ha demostrado que un gran número de especies PGPR tienen la capacidad de producir compuestos volátiles como las pertenecientes al género *Bacillus*. En la especie *B. velezensis* (*B. velezensis* G341, *B. velezensis* NKG-2, *B. velezensis* ZSY-1, *B. methylotrophicus* M4-96) (Asari y col., 2016; Lim y col., 2017; Pérez-Flores y col., 2017; Myo y col., 2019), han sido bien caracterizados y descritos los compuestos 2,3-butanodiol y su precursor el 2-hidroxi-3-butanona (acetoína), ambos comúnmente producidos de forma mayoritaria (Peng y col., 2019).

Numerosas investigaciones han demostrado la implicación de estos dos compuestos, producidos por cepas de *B. velezensis*, en la promoción del crecimiento vegetal (Borriss, 2011; Pérez-flores y col., 2017) o la activación del ISR en plantas, mediante el reconocimiento de los patrones moleculares de la acetoína y la activación de su maquinaria de defensa (Asari y col., 2016; Pérez-flores y col., 2017; Chen y col., 2018;



Myo y col., 2019). Dichos compuestos también participan en la inhibición directa de patógenos como *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Penicillium*, *Alternaria* o *Erwinia carotovora* a través de la inhibición del crecimiento del micelio o de las esporas, o mediante la reducción de la motilidad y la formación de *biofilm* por el patógeno (Bailly y Weisskopf, 2017; Jiang y col., 2018; Rabbee y col., 2019).

#### **4 Resistencia sistémica en plantas e implicaciones del control biológico**

Las plantas se encuentran naturalmente protegidas frente a patógenos gracias al “sistema inmunológico” innato. En las membranas celulares cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *pattern recognition receptors*) que son capaces de reconocer a su agresor gracias a las moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*). De esta forma, como primera barrera defensiva se desencadena la respuesta inmune asociada a patrones moleculares (PTI, *PAMP-triggered immunity*), lo cual conlleva a su vez la activación de respuestas de defensa celular como la cascada oxidativa o la acumulación de depósitos de calosa (Pieterse y col., 2014; Nie y col., 2017).

No obstante, los patógenos, han evolucionado y con ellos sus sistemas de virulencia. Algunos son capaces de interrumpir la señalización PTI mediante la síntesis de moléculas conocidas como efectores o evitando por completo su detección por parte de la planta. En respuesta, las plantas han co-evolucionado con sus enemigos naturales y activan su segunda línea defensiva, desencadenada por los efectores virulentos (ETI, *effector-triggered immunity*) (Niu y col., 2016).

A esta inducción de la resistencia mediada por la infección de patógenos se la conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*). El término resistencia sistémica hace referencia al estado de resistencia de la planta inducido por factores químicos o biológicos y que protege al organismo completo frente a futuros ataques de patógenos (Pieterse y col., 2014). Además de la infección por patógenos, la resistencia sistémica puede ser inducida por la colonización radicular de microorganismos beneficiosos como bacterias u hongos micorrícicos, en cuyo caso se denominará resistencia sistémica inducida (ISR, *induced systemic resistance*). Esta preparación de los mecanismos de defensa de la planta para combatir de una forma más rápida y efectiva las infecciones por patógenos es globalmente conocida como *priming* (Conrath y col., 2002; Conrath y col., 2006).

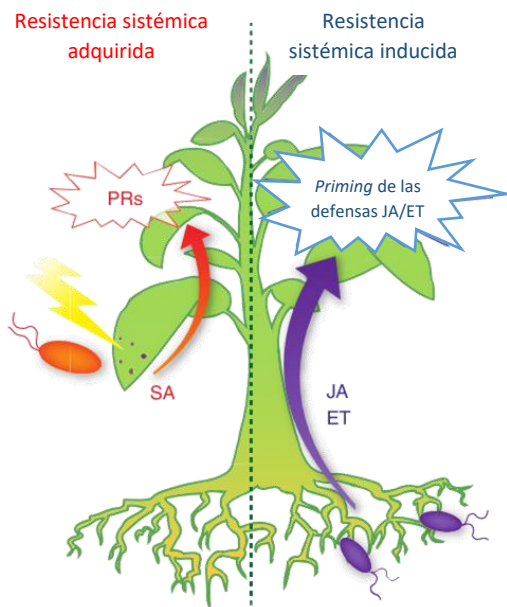


Figura 7. Representación de la respuesta inmune inducida activada por patógenos (SAR) o por microorganismos beneficiosos (ISR). Modificado de Pieterse y col. (2009).

Las vías de señalización en SAR están reguladas por la hormona ácido salicílico (SA) con la consecuente activación de genes relacionados con la patogénesis (PR, *pathogenesis related*). Mientras, la activación de la ISR por microorganismos está generalmente caracterizada por un incremento de los niveles de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), no obstante, existen estudios que también describen la activación de la vía SA tras la interacción planta-PGPR (Rabbee y col., 2019) (Fig. 7). La infección por patógenos biotróficos como *P. syringae* desencadena las defensas del hospedador mediante la actuación del SA (Mengiste, 2012). En contraposición, la coordinación de dichas defensas frente a patógenos necrotróficos (nutrición de células muertas) como *B.*

*cinerea* está regulada por la vía JA/ET. Se ha descrito que la regulación de ambos sistemas SA y JA/ET tiene un efecto antagónico, suponiendo la activación del SA, un aumento de la susceptibilidad a patógenos necrotróficos (Bari y Jones, 2009; El Oirdi y col., 2011).

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de ISR depende del reconocimiento de elicitores producidos por los microorganismos PGPR, entre los que se encuentran los flagelos, los lipopolisacáridos, las moléculas relacionadas con los sistemas *quorum-sensing*, los compuestos orgánicos volátiles y los lipopéptidos cíclicos (Rahman y col., 2015). Inicialmente la capacidad de producir estas moléculas activadoras del ISR en plantas fue descrita para cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y a otras bacterias Gram negativas (Chowdhury y col., 2015). En los últimos años han obtenido un mayor protagonismo los metabolitos secundarios elicitores producidos por especies del género *Bacillus*, con especial interés la especie *B. velezensis* (Ryu y col., 2004; Asari y col., 2016; Fan y col., 2018; Rabbee y col., 2019). En plantas de *A. thaliana* infectadas con *B. cinerea* y *P. syringae* demostraron la capacidad por parte de las surfactinas, las bacilinas, las macrolactinas y el COV 2,3-butanodiol, producidos por *B. amyloliquefaciens* (*B. velezensis*) SQR9, de inducir la resistencia sistémica (Wu y col., 2018). También se detalló la capacidad de los COVs producidos por *B. methylotrophicus* M4-96 (también transferido

a *B. velezensis*) cuyo componente mayoritario es la acetoina, de promover el crecimiento en *A. thaliana* a través de la modulación de síntesis de auxinas (Pérez-Flores y col., 2017). Además, Peng y col. (2019) relacionaron la producción de este compuesto volátil por *B. velezensis* GJ11 con una respuesta rápida en *A. thaliana* de los mecanismos de defensa, como la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calosa y enzimas defensivas, debido a la activación del ISR.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 y col., 2015; Nie y col., 2017).

- ♣ Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): es una de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que originan las plantas. Tal y como su nombre indica, las ROS son moléculas que contienen especies de oxígeno químicamente reactivas como el ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno y los radicales libres (OH<sup>·</sup>) (Niu y col., 2016). En concreto, el peróxido de hidrógeno es una especie moderada de ROS que puede formarse de manera no enzimática bajo condiciones de pH ácido o, en su mayoría, a través de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Das y Roychoudhury, 2014). Tienen un papel fundamental en los mecanismos de respuesta al estrés inducidos por patógenos. Entre las funciones que desempeñan en la restricción de la infección patogénica, se encuentran la modificación de la pared celular vegetal, la señalización del estrés, la activación del sistema SAR y la inducción de genes defensivos, la activación de la respuesta hipersensitiva (HR), la síntesis de fitoalexinas o, en última instancia, la iniciación de la muerte celular (Asselbergh y col., 2007; Niu y col., 2016; López-Cruz y col., 2017; Meng y col., 2019). Las enzimas relacionadas con la producción de ROS tras la infección por patógenos son la NADPH oxidasa, peroxidasas, la superóxido dismutasa (SOD), lipoxigenasas, quinona reductasas y amino oxidasas (Barna y col., 2012). No obstante, la acumulación excesiva de ROS puede ser perjudicial para la planta llevándola a un estado de estrés oxidativo que dañe sus ácidos nucleicos (ADN), proteínas, clorofilas y las funciones de la membrana (García-Cristóbal y col., 2015).

Aunque están ampliamente demostradas las implicaciones de las ROS en la maquinaria defensiva de la planta, hay que puntualizar que su acumulación juega distintos roles en función de la naturaleza biotrófica o necrotrófica del patógeno. En el caso de los segundos, se ha demostrado que el aumento de ROS está

implicado en la exitosa infección por patógenos necrotróficos como *B. cinerea* (Mengiste, 2012; López-Cruz y col., 2017).

- ♣ Calosa: es un polisacárido vegetal ( $\beta$ -(1,3)-glucano) que refuerza las paredes celulares, con capacidad de almacenar compuestos con actividad antimicrobiana y cuya acumulación tiene una función fundamental en la respuesta frente a patógenos (Luna y col., 2011; Mengiste, 2012; Rahman y col., 2015). En las etapas tempranas de la invasión por el patógeno, la deposición de calosa entre la membrana plasmática y la pared celular o alrededor de los estomas, actúa como una barrera efectiva que impide la penetración del invasor o incluso inhibe el desarrollo de algunas de sus estructuras. La enzima calosa sintasa es la encargada de producir este compuesto, y entre los sistemas reguladores de su deposición se encuentran la persistencia de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) o las vías de señalización mediadas por ABA (ácido abscísico) (Luna y col., 2011; Mengiste, 2012; Yu y col., 2016).
  
- ♣ Malondialdehído (MDA): compuesto orgánico que se produce cuando hay un estrés oxidativo en la planta, siendo por tanto un buen indicador de estrés. La acumulación de este compuesto se debe a la peroxidación lipídica producida por las especies reactivas de oxígeno que afectan directamente a la membrana lipídica de las células, causando una degradación oxidativa que provoca la lisis de la célula. Además el MDA es un compuesto altamente reactivo que puede dañar el ADN celular y provocar necrosis o muerte celular (Lian y col., 2017; Khanna y col., 2019).
  
- ♣ Compuestos fenólicos: son moléculas constitutivas de las plantas con capacidad antimicrobiana entre las que se incluyen los fenoles simples, los ácidos fenólicos, los flavonoides, algunos isoflavonoides y alcaloides (Ashry y Mohamed, 2011). Dichos compuestos también se sintetizan como respuesta a la presencia de microorganismos, beneficiosos o patógenos (Días y col., 2017). Al igual que el resto de los mecanismos desencadenados como respuesta a situaciones de estrés, la acumulación de fenoles juega un papel importante en plantas. Por un lado, como antioxidante en los tejidos vegetales a través la detoxificación de las ROS por la neutralización de los radicales libres. Por otro lado, inhibe el desarrollo de hongos patógenos a través de distintos mecanismos entre los que se incluyen la inhibición de enzimas fúngicas extracelulares, la inhibición de la fosforilación oxidativa del hongo o la privación de nutrientes, impidiendo la germinación de esporas y el desarrollo de hifas (Chérif y col., 2007; Ashry y Mohamed, 2011).

- ♣ Actividad polifenol oxidasa (PPO, *polyphenol oxidase*): es una enzima que actúa como antioxidante enzimático mediante la catalización de la reacción que transforma fenoles a quinonas. Estas quinonas son moléculas muy reactivas, atacan a los componentes celulares del patógeno inhibiendo la formación de enzimas necesarias para su colonización, aceleran la muerte celular en la zona de infección y generan un ambiente tóxico que inhibe el desarrollo y avance del patógeno (Ashry y Mohamed, 2011).
- ♣ Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*): también como antioxidante enzimático, por otro lado, se desencadena la síntesis de la PAL como consecuencia de una situación de estrés. Entre los metabolitos producidos como consecuencia de la actividad PAL, destacan antibióticos vegetales denominados fitoalexinas y el ácido cinámico, relacionado con la lignificación celular (Silva y col., 2004; Rodríguez-Pedroso y col., 2006).
- ♣ Carotenoides: la infección por patógenos y por tanto la acumulación de ROS conlleva en muchos casos la pérdida de capacidad fotosintética por parte de la planta. Entre los pigmentos fotosintéticos de las plantas se encuentran los carotenoides, que además de participar en la fotosíntesis desempeñan un papel fundamental como antioxidantes no enzimáticos. Según Das y Roychoudhury (2014) su actividad se desarrolla protegiendo a la maquinaria fotosintética de cuatro formas, a) reaccionando con los productos de la peroxidación lipídica para finalizar las reacciones en cadena, b) eliminando O<sub>2</sub> y generando calor como subproducto, c) reaccionando con <sup>3</sup>Chl para evitar la formación de O<sub>2</sub> y d) disipando el exceso de energía de excitación a través del ciclo de la xantofila.

## **5. *Botrytis cinerea***

### **5.1 Aspectos generales**

*Botrytis cinerea* [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel] es un hongo necrotrófico que coloniza tejidos dañados, senescentes o muertos ocasionando la “podredumbre gris” (Abdel-Rahim y Abo-Elyousr, 2018). Junto a otras tres especies, pertenece a un pequeño clado especializado en la infección de especies vegetales dicotiledóneas (Williamson y col., 2007; Dean y col., 2012).

En el ciclo de *B. cinerea* podemos reconocer una fase asexual y una fase sexual. Durante la primera de ellas se puede distinguir un micelio formado por hifas tabicadas ramificadas

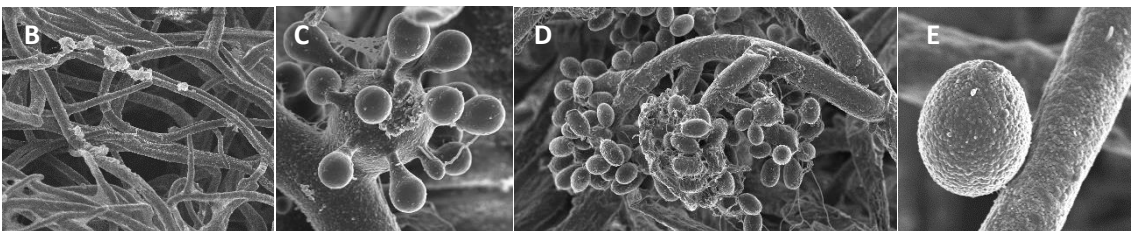
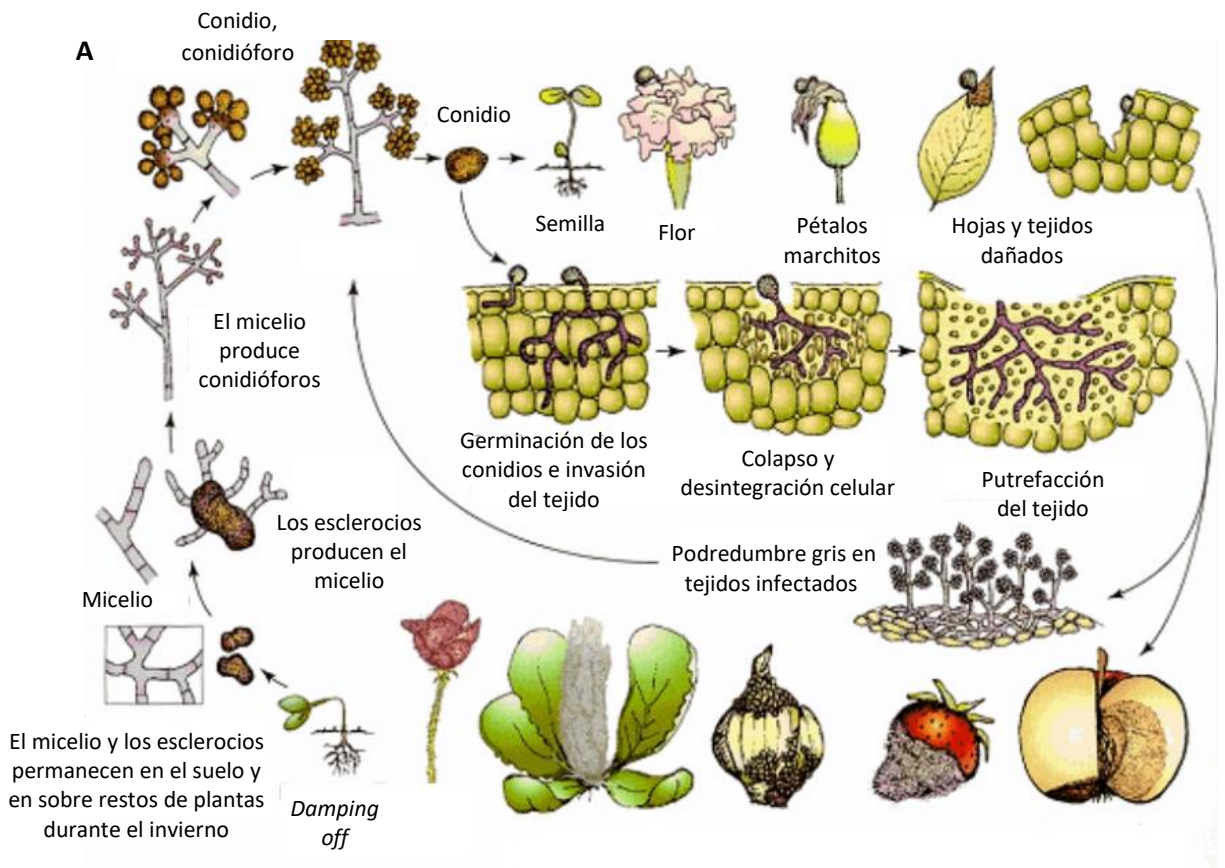
(Fig. 8B) en cuyos extremos se pueden diferenciar conidióforos ramificados (Fig. 8C) y macroconidióforos de disposición arborescente (Fig. 8D). Estas, son estructuras especializadas en la producción de conidios multinucleados (Fig. 8E) encargados de la dispersión hacia otros hospedadores a través del agua, el aire o insectos. En condiciones ambientales adversas, *B. cinerea* desarrolla estructuras de resistencia melanizadas denominadas esclerocios, capaces de soportar condiciones de desecación, alta radiación UV y el ataque de microorganismos durante largos periodos de tiempo (Tenberge, 2007; Williamson y col., 2007). En la reproducción sexual, los esclerocios pueden ser fecundados por microconidios y producir cuerpos fructíferos (apotecios) que contienen ascosporas (Veloso y van Kan, 2018).

## 5.2 Mecanismos de infección en plantas

Generalmente, tras la invasión por los conidios de *B. cinerea* comienza el ciclo de infección en el tejido vegetal (Fig. 8A). En primer lugar, para que ocurra dicho ciclo tienen que darse unas condiciones adecuadas de temperatura (20°C), humedad (>90%), luz (umbría) y un estado fenológico apropiado de la planta. Si por el contrario, las circunstancias no son propicias, el hongo puede mantenerse en un estado quiescente, asintomático para la planta, hasta que se den condiciones favorables (Williamson y col., 2007; Gao y col., 2018).

Para alcanzar una infección exitosa, *B. cinerea* debe ser capaz de inducir la muerte celular programada en el hospedador. La llegada del hongo a los tejidos vegetales puede provocar un desequilibrio en las vías de señalización de muerte celular de la planta. Si el patógeno no es capaz de controlar dichas vías, la planta conducirá su organismo hacia una autofagia celular y la consecuente resistencia a la infección. Por el contrario, en ocasiones, *B. cinerea* mediante la translocación de pequeñas moléculas de ARN es capaz de secuestrar la maquinaria de ARN de interferencia del hospedador de la planta y silenciar los genes envueltos en la respuesta inmune. De esta forma, el hongo puede mantener a la célula viva el tiempo suficiente para reproducirse y sintetizar compuestos que inicien la muerte celular en el momento apropiado (van Kan y col., 2014; Veloso y van Kan, 2018).

Tras una colonización exitosa, el proceso de infección incluye la penetración en el hospedador, la destrucción de los tejidos vegetales, la expansión de la lesión, la maceración y la formación de conidios (González-Fernández y col., 2015). Para ello, *B. cinerea* es capaz de producir una gran variedad de factores de virulencia que le permiten degradar la pared celular, provocar la muerte celular o evitar los mecanismos de defensa del hospedador (Tabla 2) (Nakajima y Akutsu, 2013; Finiti y col., 2014).



**Figura 8.** (A) Ciclo de infección de *B. cinerea* (Agrios, 2006) y estructuras desarrolladas a lo largo del mismo. B) Micelio, C) conidióforo, D) macroconidióforo y E) conidio (Toral, 2019).

**Tabla 2.** Factores de virulencia de *B. cinerea* (Nakajima y Akutsu, 2013).

<b>Funciones</b>	<b>Factores de virulencia</b>
<b>Introducción en el tejido del hospedador</b>	Lipasas
	Cutinasa
<b>Muerte celular del hospedador</b>	Botcinolida
	Metabolitos sesquiterpenoides
	Botrydial y metabolitos relacionados
	Botcininas E y F
	Superóxido dismutasa Cu-Zn
	Oxidasas NADPH
	Endopoligaractunosa1
	Xilanasa
	Proteína Nep1
Proteína de la familia de las cerato-platanina	
<b>Conversión del tejido del hospedador en biomasa fúngica</b>	Metilesterasa pectina
	BcPGq
	BCPG2
<b>Resistencia a la respuesta del hospedador</b>	BcBirl
	Transportadores dependientes de ATP

Cabe destacar la capacidad del patógeno de producir compuestos que le permiten manipular las respuestas hormonales y la cascada oxidativa del hospedador en su propio beneficio. Como se detalló en epígrafes anteriores, las vías de señalización activadas por los microorganismos necrotróficos están coordinadas por el tándem hormonal JA/ET. Entre los factores de virulencia de *B. cinerea* se encuentra un exopolisacárido ( $\beta$ -1(1,3)(1,6)-D-glucano) inductor de la producción de ácido salicílico (SA), antagónico de las vías de señalización óptimas para la defensa vegetal frente a *B. cinerea* (El Oirdi y col., 2011). Además, aunque la activación de la cascada oxidativa y la acumulación de especies reactivas de oxígeno son reconocidos mecanismos de defensa frente a patógenos, en el caso de este hongo, supone una ventaja (Sharma y Kapoor, 2017). *B. cinerea* no sólo aprovecha la muerte celular programada de la planta, además él mismo produce ROS y enzimas como la superóxido dismutasa cobre-zinc que contribuyen a la generación de  $H_2O_2$ .



### **5.3 Cultivos afectados por *B. cinerea***

La baja especificidad del hospedador hace que *B. cinerea* afecte a un elevado número de cultivos en todo el mundo, entre los que se incluyen el tomate, la uva, la fresa, la patata, la lechuga, el repollo o el brócoli, entre otros (Williamson y col., 2007; El Oirdi y col., 2011; Sylla y col., 2015; Elad y col., 2016; Petrasch y col., 2019). Además, puede perjudicar a la planta en las diferentes etapas del desarrollo vegetal e infectar las distintas partes de la misma: hojas, tallos, flores o frutos (Lee y col., 2006; Ilhan y Karabulut, 2013).

#### **5.3.1 *B. cinerea* en cultivos de tomate**

El cultivo de tomate es uno de los de mayor producción a nivel mundial, con 4,7 millones de hectáreas de cultivo. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOAST), en 2016 la producción de tomate alcanzó las 177 millones de toneladas (Luna y col., 2016; Salvatierra-Martínez y col., 2018). Este cultivo, en su gran mayoría de producción en invernadero, es afectado por numerosos patógenos biotróficos y necrotróficos, entre los que se encuentra *B. cinerea*. Derivado de su producción intensiva, los mayores daños causados por el fitopatógeno durante el cultivo de tomate se producen en los tallos como consecuencia de las heridas de poda, a través de las cuales el hongo comienza el proceso de infección, aunque el fitopatógeno puede desarrollarse en todos los órganos de la parte aérea de la planta (Williamson y col., 2007). Otro momento crítico es el de post-cosecha, debido a la habilidad de *B. cinerea* de mantenerse de forma quiescente asintomática sobre el tejido del hospedador apareciendo los síntomas de infección en frutos durante el almacenado y transporte (Gao y col., 2018). Además de la relevancia económica y nutricional derivada de su cultivo, otras características como el elevado número de mutantes disponibles, el conocimiento de su genoma completo o las herramientas genómicas desarrolladas, hacen del tomate un importante modelo de estudio en plantas (Martínez-Hidalgo y col., 2015)

#### **5.3.2 *B. cinerea* en cultivos de fresa**

La fresa es un pequeño fruto cuyo sabor y riqueza en nutrientes le convierten en uno de los más consumidos, tanto en fresco como procesados, en el mundo. No obstante, y debido a su susceptibilidad frente a patógenos como *B. cinerea*, su cultivo y almacenamiento suponen un reto para agricultores y comerciantes (Essghaier y col., 2009; Chen y col., 2018).

*B. cinerea* puede afectar a todos los estados vegetativos de la planta, hojas flores y fruto. Durante la época de cultivo el patógeno infecta flores y frutos, pero generalmente se desarrollará en el fruto maduro tras la cosecha (Ilhan y Karabulut, 2013). El moho gris en plantas de fresa puede comenzar mediante una infección primaria en los órganos de la flor. Tras la invasión del receptáculo floral, el crecimiento del hongo se detiene y se mantiene en un estado quiescente. La inducción de la fase necrotrófica se desencadena durante la maduración del fruto por los cambios bioquímicos en el tejido (Fig. 9). Por otro lado, el ciclo de infección puede comenzar mediante una infección secundaria en el tejido del receptáculo de la fruta, en este caso no se da una fase quiescente y el hongo se desarrolla directamente. En ambos casos la fuente de infección primaria suele ser material vegetal senescente adyacente (Menzel y col., 2016; Petrasch y col., 2019).

España, y en especial la provincia de Huelva, es uno de los mayores productores de fresa en Europa. En nuestro país, la fresa es un cultivo anual que comienza en junio con la preparación de la tierra y finaliza con la cosecha entre febrero y mayo. Las mayores pérdidas económicas asociadas a la afección por éste patógeno se asocian a la época de cosecha y almacenamiento. La carga de *B. cinerea* y la capacidad de resistencia a la infección de la fresa, determinan la calidad de mantenimiento del lote (Essghaier y col., 2009; Fernandez-Ortuno y col., 2016).

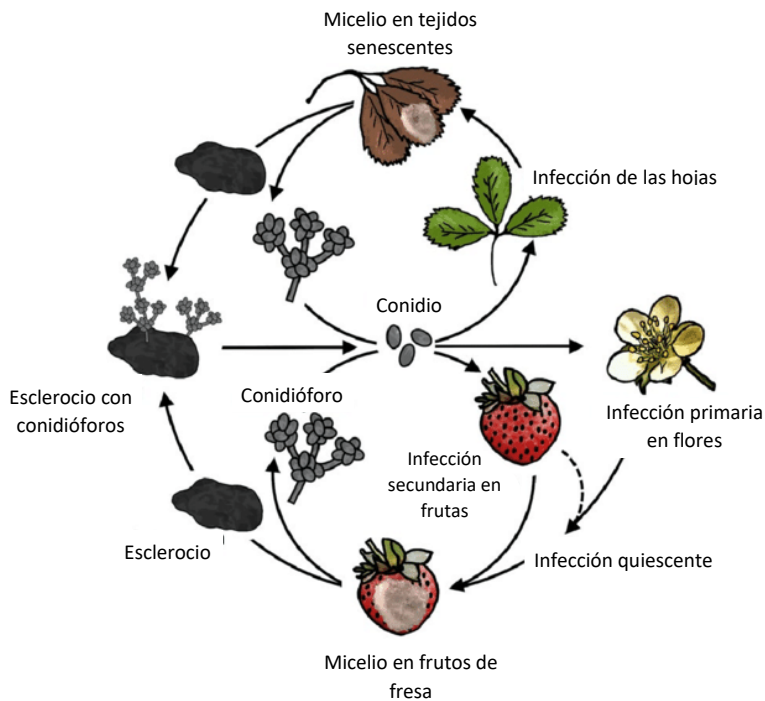


Figura 9. Ciclo de infección de *B. cinerea* en plantas de fresa. Modificado de Petrasch y col. (2019).

### 5.3.3 *B. cinerea* en viñedos

La vid es otro de los cultivos seriamente afectados por *B. cinerea* y con considerables pérdidas tanto en calidad como en cantidad de producción. En viñedos, la infección por este patógeno, es también conocida como la podredumbre noble y se da en regiones de clima templado. El ciclo de la vid comienza durante el final del otoño/principio del invierno con una fase de reposo, seguido de la floración en primavera y la caída de la hoja en otoño (Tabla 3).

Tabla 3. Ciclo de vida de la vid.

Fecha	Estado fenológico	Características
Otoño/invierno	Reposo vegetativo	La planta solo tiene parte leñosa
Invierno/primavera	Desborre	Se producen la primeras yemas
Inicio de primavera	Brotación	Desarrollo de las yemas
Final de primavera	Floración y cuajado	Floración y comienzo del fruto
Mediados de verano	Envero	Aumento de tamaño del fruto
Verano/otoño	Maduración	Maduración del fruto
1-2 meses tras vendimia	Caída de la hoja	

El ciclo de infección de *B. cinerea* (Fig. 10) se encuentra íntimamente ligado al ciclo biológico de la vid. Durante el invierno, los racimos momificados y el tejido vegetal senescente de la cosecha anterior, se convierten en el nicho ecológico y posterior fuente de infección de *B. cinerea*. Al igual que en el caso de la fresa, la infección comienza en el receptáculo durante la floración y se mantiene latente hasta después del envero, momento en el que la maduración de la fruta va acompañada de un aumento de la concentración de azúcares y una disminución de los compuestos antifúngicos en planta. La maduración y engrosamiento del racimo puede producir microfracturas en el fruto que serán el sitio de colonización del hasta ese momento durmiente, *B. cinerea* (Pertot y col., 2017).

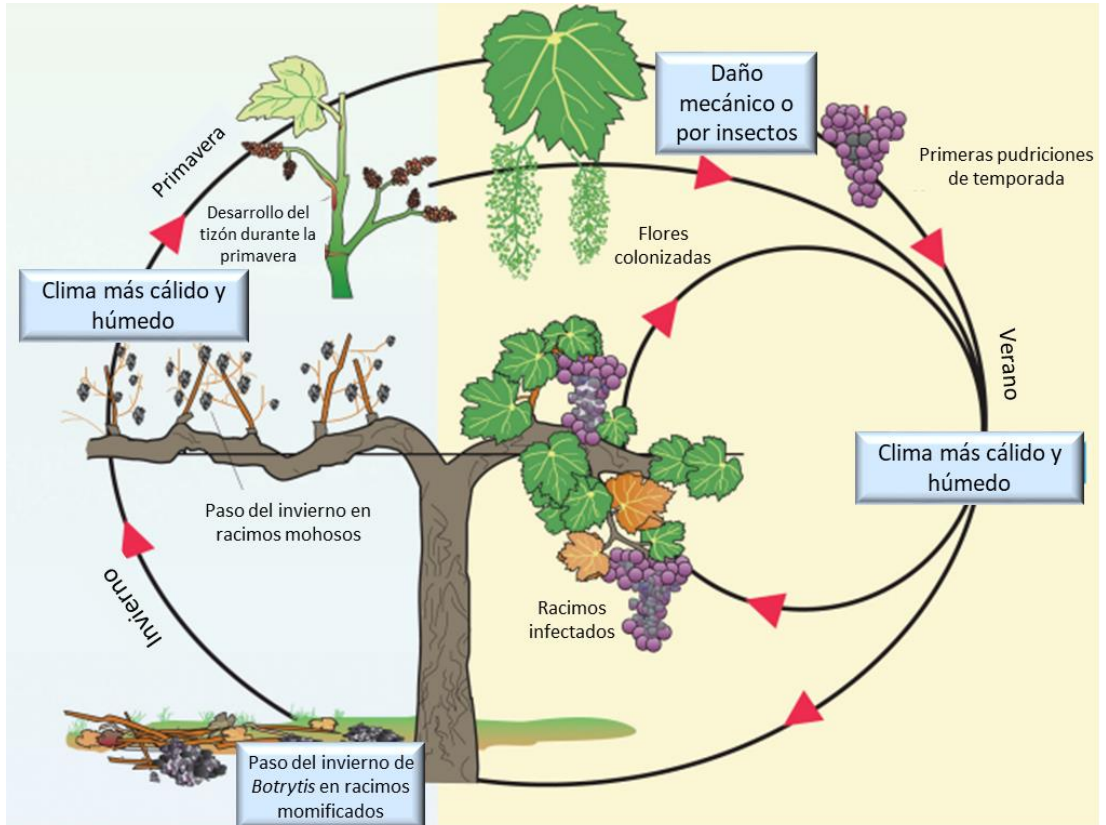


Figura 10. Ciclo de infección de *B. cinerea* en viñedos. Modificado de Nicholas y col. (1994).

#### 5.4 Métodos actuales de control de *B. cinerea* y perspectivas de futuro

Se estima que *B. cinerea* afecta a más de 200 especies de plantas en todo el mundo; actualmente el método de lucha más extendido y eficaz frente al patógeno es el uso de pesticidas de naturaleza química. La alta ubicuidad, unida a su corto ciclo de vida, su elevada variabilidad genética y su gran capacidad de reproducción, hacen de *B. cinerea* un patógeno de alto riesgo con un enorme potencial para desarrollar resistencias a los fungicidas (Dean y col., 2012; Elad y col., 2016; Calvo-Garrido y col., 2019).

En 2001, se estimó que el coste de los fungicidas empleados contra *B. cinerea* alcanzó los 540 millones de euros, de los cuales el 50% iba destinado al control de la enfermedad en viñedos (Dean y col., 2012). La viticultura es uno de los cultivos con más consumo de pesticidas entre los que se incluyen productos cuyos compuestos activos principales son el pirimetanil, el ciprohidil y el fludioxinil, todos ellos con efectos secundarios nocivos para el ser humano.

En el ámbito de los cultivos de invernadero como el tomate y la fresa, el control de la enfermedad se hace también principalmente por fungicidas químicos. No obstante, el ya mencionado alto riesgo de desarrollo de resistencia, ha hecho que el Comité Internacional de Acción a la Resistencia Fúngica (FRAC, *Fungicide Resistance Action Committee*) imponga restricciones legales que han obligado a los agricultores a diversificar el régimen de empleo de fungicidas (Petrasch y col., 2019). Además, en la última década, los riesgos para la salud humana y el medio ambiente han despertado la conciencia social y de los gobiernos, fomentando la creación de leyes que regulen y reduzcan el empleo de agroquímicos. Es el caso de la Unión Europea, que ha apostado por el desarrollo de una agricultura sostenible basada en el manejo integrado de cultivos (Lamichhane y col., 2015).

Todos los inconvenientes generados por el empleo de fungicidas de naturaleza química han conducido a las industrias al desarrollo de alternativas más ecológicas entre las que se incluye el uso de microorganismos como agentes de biocontrol. En el campo de la viticultura, entre los productos que actualmente se encuentran en el mercado con actividad frente a *B. cinerea*, podemos encontrar Serenade Max® (*B. subtilis*), Botector® (*Aureobasidium pullulans*), Sentinel® (*Trichoderma atroviride* LC52), Botry-Zen® (*Ulocladium oudemansii*) o Amylo-X® (*B. amyloliquefaciens*) (Elmer y Reglinsk, 2006; Calvo-Garrido y col., 2019).

Debido al bajo desarrollo de algunos de estos productos o la falta de aplicabilidad en campo, en el cultivo de la fresa el uso de agentes de control biológico aún es muy limitado. No obstante, sí que se han descrito resultados prometedores tras el empleo de microorganismos como *Aureobasidium pululans*, *Candida intermedia* o *B. amyloliquefaciens* (Sylla y col., 2015; Petrasch y col., 2019). Por otro lado, el estatus de modelo de planta, ha hecho que el cultivo del tomate cuente con numerosos estudios que demuestran la efectividad frente a *B. cinerea* de microorganismos como *B. velezensis*, *Trichoderma*, *Micromonospora* y de otros bioformulados que ya se encuentran en el mercado como *B. subtilis* (Botokira Wettable Powder®) o *B. amyloliquefaciens* (Double Nickel 55WDG/LC®) (Martínez-Hidalgo y col., 2015; Haidar y col., 2016; Fan y col., 2018; Salvatierra-Martínez y col., 2018).

A pesar de todo, aún queda un largo camino por recorrer. Los resultados obtenidos por los productos biológicos frente a *B. cinerea* en la mayoría de los casos, no son tan buenos como los que proporcionan el uso de agroquímicos. Además, la variabilidad de dichos resultados con un mismo producto no ofrece al agricultor la confianza suficiente para su empleo (Rotolo y col., 2018). Actualmente, la vía de actuación más plausible es el uso

conjunto de los pesticidas y los agentes de biocontrol. De esta forma se reduciría el uso de agroquímicos en pos de una agricultura más sana y sostenible.



## **OBJETIVOS**

---





El desarrollo de productos de control biológico ha adquirido un gran interés debido a los riesgos derivados del uso de productos fertilizantes y pesticidas químicos. Los componentes principales, de dichos productos biológicos, son microorganismos con actividad promotora del crecimiento en plantas (PGPR) y capacidades antimicrobianas que protegen a la planta frente a patógenos. Siguiendo esta línea, y con el fin de comercializar un producto biológico con potencial PGPR, en el año 2005, la empresa Xtrem Biotech S.L. adquirió los derechos de explotación y comenzó el desarrollo de la cepa *Bacillus velezensis* XT1 CECT 8661.

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en la empresa Xtrem Biotech S.L., como parte de un programa de Doctorado Industrial, dentro del programa “Ayudas a proyectos y doctorados industriales dentro del marco europeo horizonte 2020 en colaboración con la Escuela Internacional de Posgrado”, en colaboración con el grupo de investigación BIO 188 “Exopolisacáridos Microbianos”, de la Universidad de Granada. Por todo esto, el **objetivo general** planteado en este trabajo fue evaluar y desarrollar las capacidades de la cepa *B. velezensis* XT1 para el control de *Botrytis cinerea* en viñedos y plantas de tomate y fresa. Para ello, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar fenotípicamente la cepa XT1 y determinar los metabolitos secundarios implicados en su actividad antifúngica frente al fitopatógeno *B. cinerea*.
2. Evaluar la capacidad PGP de la cepa XT1 y su actividad protectora frente a *B. cinerea* en plantas de tomate, fresa y vid.
3. Estudiar la activación de los mecanismos de defensa de plantas de tomate y fresa por la aplicación de la cepa XT1, y su implicación en la respuesta frente a *B. cinerea*.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. Cepas bacterianas y fúngicas

Las cepas bacterianas y fúngicas empleadas en este trabajo así como las condiciones de cultivo óptimas para cada una de ellas se encuentran detalladas en las tablas incluidas a continuación (Tablas 4 y 5):

Tabla 4. Cepas bacterianas empleadas y sus características.

Cepa	Procedencia/Características	Referencias
<i>Bacillus velezensis</i> CECT 8661 (XT1)	Cepa patentada, en explotación por la empresa Xtrem Biotech S.L. (ES2639375B1). Aislada de la rizosfera de <i>Juncus effusus</i> , Málaga.	Ruíz-García y col., 2005
<i>Bacillus methylotrophicus</i> LMG 27586 <sup>T</sup>	Cepa tipo empleada en la comparativa con la cepa XT1. Aislada de cultivos de arroz	Madhaiyan y col., 2010

Tabla 5. Cepas fúngicas empleadas y sus características.

Cepa	Características	Referencia
<i>Botrytis cinerea</i> <sup>1</sup>	Patógeno de plantas aislado de viñedos de la variedad <i>Syrah</i> ubicados en Zaragoza.	Whetzel, 1945

<sup>1</sup> Cedida por el grupo de "Alimentos de origen vegetal" de la Universidad de Zaragoza.

Las cepas bacterianas se cultivaron de forma rutinaria en caldo nutritivo. Las condiciones de cultivo estandarizadas fueron 28°C con una agitación de 120 rpm durante 48 horas. En algunos casos fue necesario ampliar el tiempo de incubación a 72h con el fin de fomentar la producción de metabolitos secundarios. Generalmente, *B.cinerea* se cultivó a 21°C durante 15 días.

La conservación de las cepas bacterianas a corto plazo, se realizó en medio sólido y a 4°C. A largo plazo, se hizo por congelación a -80°C, de cultivos líquidos en el caso de las cepas bacterianas y de botones fúngicos en el del hongo, almacenados en glicerol a una concentración final del 20% (v/v).

## 2. Especies vegetales y su conservación

Las especies vegetales empleadas en este trabajo han sido: para los ensayos *in vitro* la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0); para los ensayos en invernadero las plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. var. *mina* y fresa *Fragaria ananassa* var. *san andreas*; y para los ensayos en campo en viñedo las especies *Vitis vinifera* L. cv *syrah* y *Vitis vinifera* L. cv *garnacha*.

Las semillas de las especies empleadas para los cultivos *in vitro*, *A. thaliana* y *S. lycopersicum* L. se esterilizaron en superficie según la metodología indicada a continuación y posteriormente se estratificaron a 4°C durante 72 h para asegurar la homogeneidad de la germinación. El protocolo de esterilización varió en función del tipo de semilla.

- *A. thaliana*: se esterilizaron en tubos eppendorf con etanol al 70% (v/v) suplementado con SDS 0,1% (p/v) durante 5 minutos. Pasado este tiempo se trataron con NaClO comercial 50 % (v/v) suplementado con SDS 0,1% (p/v) durante 20 minutos y se lavaron con agua estéril 4 veces. Finalmente, las semillas se mantuvieron en imbibición en agua estéril durante 1,5 horas.
- *S. lycopersicum* L.: se esterilizaron en tubos falcon de 15 mL con NaClO 50% (v/v) durante 15 minutos, tras lo cual se lavaron cuatro veces con agua estéril. A continuación, se sumergieron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7% (v/v) durante 15 minutos y se volvieron a lavar con agua estéril 4 veces. Finalmente, las semillas se mantuvieron en agua estéril durante 1,5 horas.

## 3. Medios de cultivo

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo empleados para el crecimiento, mantenimiento y caracterización de las cepas bacterianas y fúngicas empleadas en este trabajo. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En aquellos casos en los que fue necesario, el pH fue ajustado a 7 con un error del  $\pm 0,2$  empleando NaOH 1M o HCl 1M. Por último, para la preparación de los medios sólidos se empleó agar a una concentración del 1,5% (p/v).

**Caldo nutritivo (CN) y agar nutritivo (AN):** medio de cultivo empleado en el mantenimiento y recuento de las cepas *Bacillus* XT1 y *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>.

Extracto de carne.....	1 g
Extracto de levadura.....	2 g
Proteosa peptona.....	5 g
KCl.....	5 g
Agua destilada csp.....	1000 mL

Medios empleados para la identificación de la producción de metabolitos secundarios de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>.

**Medio óptimo para la producción de lipopéptidos (MOLP)** (Ahimou y col., 2000):

Proteosa peptona.....	30 g
Sacarosa.....	20 g
Extracto de levadura.....	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,9 g
CuSO <sub>4</sub> .....	0,001 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O.....	0,005 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	0,004 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O.....	3,6 mg
MgSO <sub>4</sub> .....	0,45 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,14 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,01 mg
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .....	10 mg
Agua destilada csp.....	1000 mL

**Modificación del medio MOLP (MOLP reducido, MOLPr):** con el fin de reducir los costes de producción, en algunos casos, se modificaron las cantidades de algunos componentes. Composición no detallada por encontrarse bajo secreto empresarial.



**Medio SG** (Schaeffer y col., 1965):

Extracto de carne .....	3 g
Peptona bacteriológica.....	5 g
Sacarosa.....	2 g
NaCl.....	10 g
KCl.....	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 1M.....	1 mL
MnCl <sub>2</sub> 0,1 M.....	1 mL
SO <sub>4</sub> Fe·H <sub>2</sub> O 0,001 M.....	1 mL
Agua destilada csp.....	1000 mL

**MM**: medio de cultivo desarrollado por la empresa Xtrem Biotech S.L. Composición no detallada por encontrarse bajo secreto empresarial.

El cultivo de *B. cinerea* se realizó empleando los medios descritos a continuación, todos ellos ajustados a un pH de 4-5.

**Caldo de patata y dextrosa (PDB)**: Medio deshidratado (Difco®).

**Agar patata y dextrosa (PDA)**: Medio deshidratado (Difco®).

**Medio selectivo de Botrytis (BSM)** (Edwards y Seddon, 2001):

Glucosa.....	2 g
NaNO <sub>3</sub> .....	0,1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
KCl.....	0,1 g
Cloranfenicol.....	0,2 g
Pentacloronitrobenceno.....	0,02 g
Maneb 80.....	0,02 g
Rosa bengala.....	0,05 g
Acido tánico.....	5 g
Agar.....	20 g
Agua destilada csp.....	1000 mL

La determinación *in vitro* de la capacidad de promoción del crecimiento (PGP, “*plant growth promoting*”) de la cepa objeto de estudio y de *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup> se llevó a cabo empleando los siguientes medios para las distintas pruebas fenotípicas:

**Fosfatasa alcalina** (Baird-Parker, 1963): medio empleado para la detección de la producción de la enzima fosfatasa alcalina. El fosfato de fenolftaleína 1% (p/v) esterilizado por filtración fue añadido al medio AN, descrito anteriormente, tras autoclavarlo a una concentración final 0,01% (v/v). El revelado se realizó añadiendo NH<sub>3</sub> comercial sobre la placa.

**Fosfatasa ácida** (Pikovskaya, 1948): medio empleado para la detección de la producción de la enzima fosfatasa ácida.

Glucosa.....	5 g
MgCl <sub>2</sub> .....	2,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
KCl <sub>2</sub> .....	0,1 g
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> .....	2 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	2,5 g
Agar.....	15 g
Agua destilada csp.....	1000 mL

**Cromoazurol sulfonato (O-CAS, “overlay Chrome azurol S”)** (Pérez-Miranda y col., 2007): medio empleado para la detección de la producción de sideróforos.

Cromoazurol sulfonato (CAS).....	60,5 mg
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.....	72,9 mg
PIPES.....	30,24 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 mM* .....	10 mL
Agarosa.....	9 g
Agua destilada csp.....	1000 mL

\*Solución preparada en 10 mL de HCl 10 mM

**AN almidón** (Mourey y Kilbertus, 1976): medio empleado para la evaluación de la producción de la enzima amilasa. Fue preparado añadiendo al medio AN un 1% (p/v) de almidón. El revelado se realizó añadiendo lugol a la placa.

**AN caseína** (Uttley y Collins, 1993): medio empleado para la evaluación de la producción de la enzima caseinasa. Para su preparado, los componentes necesarios para 1L de AN fueron diluidos en agua empleando el 50% del volumen total. El medio esterilizado fue suplementado con el restante 50% de leche desnatada estéril.

**AN Tween 20** (Mourey y Kilbertus, 1976): medio empleado para la determinación de la producción de lipasas. Medio AN con un 1% (v/v) de Tween-20.

**AN Tween 80** (Mourey y Kilbertus, 1976): medio empleado para la determinación de la producción de enzimas lipolíticas. Medio AN con un 1% (v/v) de Tween-80.

**AN gelatina** (Pickett y col., 1991): medio empleado para la determinación de la producción de la enzima gelatinasa. Medio AN con 1,5% (p/v) de gelatina comercial.

**Medio libre de Nitrógeno (Burk)** (Wilson y Knight, 1947): medio empleado para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de la cepa *B. velezensis* XT1.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,8 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O - 1 mM.....	5 mL
SO <sub>4</sub> Fe·7H <sub>2</sub> O - 2 mM .....	5 mL
Sacarosa.....	20 g
Agua destilada csp.....	1000 mL
pH 7	

**ACC desaminasa** (Poonguzhali y col., 2006): medio empleado para la evaluación de la producción de la enzima ACC desaminasa. Medio Burk suplementado con ACC 3 mM como fuente de nitrógeno.

El cultivo *in vitro* de plantas se realizó empleando el medio detallado a continuación:

**Medio MS** (Murashige y Skoog, 1962): medio modificado (MP Biomedicals®) empleado en el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* L. Para la preparación del medio semisólido se empleó agar al 0,3 % (p/v).

### **Soluciones:**

**Tampón TAE:** la solución Tris-acetato-EDTA (TAE) para la electroforesis en geles de agarosa se preparó diluida (TAE 1X) a partir de una solución concentrada TAE 50X cuya composición fue Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM.

**Tampón sodio fosfato 0,07 M:** tampón empleado en la tinción de los depósitos de calosa de las hojas procedentes de ensayos *in vivo* en plantas de tomate y fresa. Para preparar una solución 0,07 M:

- 12,46 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 1 l de agua destilada estéril
- 0,966 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada estéril

El pH de la solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  fue ajustado a 9 empleando la solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

**FRAP (*ferric reducing antioxidant power*):** solución empleada en el ensayo reductor de iones férricos para la determinación de la actividad antioxidante en fruto. La solución contenía 1 mM 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triacina (TPTZ) y 20 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en tampón acetato 25 M (pH 3,6).

**Solución Hewitt** (Hewitt, 1952): solución nutritiva para plantas empleada en el riego de los ensayos *in vivo* (Tabla 6).

Tabla 6. Composición del medio Hewitt.

	Concentración (g/L)
$\text{KNO}_3$	30,03
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	70,08
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,84
EDTA-Fe (II)	2,50
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,20
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,40
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,90
$\text{H}_3\text{BO}_3$	10,86
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,30
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,30
$\text{POH}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,08
Agua destilada csp	1000 mL

## **4. Caracterización de la cepa *B. velezensis* XT1**

### **4.1 Crecimiento en distintos medios de cultivo**

Se determinó el crecimiento celular de las cepas *B. velezensis* XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>, empleando tres medios de cultivo: SG, MM y MOLP. El experimento se llevó a cabo a una temperatura de 28°C con agitación a 120 rpm. A partir de un cultivo *o.n.* (*overnight*) se inocularon matraces de 25 mL al 1% y transcurridas 24 horas se realizaron recuentos en placa de AN.

### **4.2 Estabilidad de la cepa XT1**

La estabilidad en el tiempo de la cepa XT1 crecida en medio MOLP reducido fue determinada tanto en cultivo líquido como en un liofilizado celular. En el primer caso, el cultivo fue almacenado a temperatura ambiente cuatro meses durante los cuales se tomó una muestra cada mes. En el segundo caso, se depositaron 0,1 gramos del sedimento celular liofilizado procedente de un cultivo de 72 horas. El liofilizado fue almacenado a 4 y 20°C. Tras 1, 2, 3 y 4 meses de almacenamiento, tres réplicas de cada temperatura fueron rehidratadas en 5 mL de MgSO<sub>4</sub> al 20 % (p/v). La viabilidad en ambos procedimientos se comprobó mediante recuento en agar nutritivo tras incubación a 28°C durante 24 horas.

### **4.3 Evaluación de la actividad PGPR de la cepas *B. velezensis* XT1 y *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>**

El óptimo y el rango de crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> se determinó a distintas condiciones de salinidad y pH. Se tomaron alícuotas de 10 µl de cultivos *o.n.* (DO<sub>600</sub>=1) en medio MOLP crecidos a 28°C y se sembraron en placas con los medios sólidos SG, MOLP y MM con concentraciones crecientes de NaCl, que comprendían valores entre 0 y 12,5 % (p/v), o de pH con valores entre 3 y 12. Transcurridos 7 días en incubación a 28°C se verificó la presencia o ausencia de crecimiento. Los resultados se obtuvieron mediante dilución decimal y posterior recuento en placas de agar nutritivo.

Para evaluar la capacidad de promoción del crecimiento (PGP, *plant growth promoting*) de ambas cepas se realizó una batería de pruebas de detección de dicha actividad: actividades proteolítica, amilasa y gelatinasa, producción de fosfatasa ácida y alcalina, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos. Para cada una de ellas, se sembraron 10 µl de cultivos *o.n.* en caldo nutritivo (DO<sub>600</sub>=1) en los diferentes medios de cultivo detallados en el apartado 3.3. El resultado de las pruebas se obtuvo tras 7 días de

incubación a 28°C, exceptuando el ensayo de producción de sideróforos cuyo resultado se obtuvo a las 24 horas de incubación.

La caracterización bioquímica de las cepa *Bacillus* XT1 y *Bacillus* LMG 27586<sup>T</sup> se completó empleando los sistemas estandarizados API<sup>®</sup> 20 ZYM, API<sup>®</sup> 20NE y API<sup>®</sup> 50 CH.

#### **4.4 Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica frente a *B. cinerea* se determinó tanto en medio sólido como en medio líquido. En el primer caso, alícuotas de 10 µl de la cepa XT1, procedentes de un cultivo líquido de 24h en caldo nutritivo, y un botón fúngico de 0,5 cm<sup>2</sup> del micelio del patógeno, fueron sembrados a una distancia equidistante del centro de la placa con una separación de 40 mm entre ambos. Como control se utilizaron placas con botones fúngicos en ausencia de bacteria. Los valores máximos y mínimos del radio de crecimiento fúngico se midieron transcurridos 15 días de incubación a 21°C. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de micelio empleando la siguiente ecuación:  $\text{porcentaje de inhibición} = A - B/A \times 100$  donde A representa el valor máximo de crecimiento y B el valor mínimo (Gao y col., 2018).

Para la determinación de la actividad antifúngica en medio líquido, la cepa se creció durante 72 h y posteriormente el sobrenadante obtenido por centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos, se testó frente al hongo *B. cinerea*. El cultivo fúngico de 15 días en PDB se trituró con Ultra Turrax<sup>®</sup> y se filtró con gasa, todo ello en condiciones de esterilidad. Mediante cámara Neubauer la concentración del hongo se ajustó a  $5 \times 10^7$  conidios/mL en medio PDB adicionado de penicilina G (2,5 mg/mL) y estreptomycin (10 mg/mL). El experimento se llevó a cabo en placas multipocillos (Cellstar<sup>®</sup>) con 48 pocillos donde 900 µl de la solución de esporas del patógeno se enfrentó a 300 µl del sobrenadante de XT1. Como control negativo de crecimiento fúngico se utilizó medio PDB adicionado con 50 µg/mL de cicloheximida mientras que, el medio inoculado tan sólo con la suspensión de esporas de hongo se consideró el control positivo. Las placas se incubaron a 21°C durante 15 días. El resultado fue obtenido por observación de la presencia o ausencia de crecimiento fúngico (Frikha-Gargouri y col., 2017).

#### 4.5 Compatibilidad con productos agroquímicos

Con el fin de obtener información sobre la compatibilidad de nuestra cepa con los productos agroquímicos usados habitualmente se determinó, por un lado, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes antifúngicos y posteriormente, se caracterizó el crecimiento a las concentraciones admitidas de producto en agricultura (Tabla 7). Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se mezclaron distintas cantidades de los antifúngicos con el agar nutritivo y se procedió a la siembra de 10 µl de la cepa XT1 procedente de un cultivo *o.n.* en caldo nutritivo. Tras 24 h de incubación a 28°C, se observó el crecimiento en las distintas placas determinándose la mínima concentración que inhibe el crecimiento de la cepa XT1 o CMI. Una vez precisada la CMI y si esta no superaba la dosis establecida para su aplicación en campo, se procedió a la caracterización del crecimiento de nuestra cepa a estas dosis. Para ello, se determinó el crecimiento en medio líquido en placas de 48 pocillos con las tres mezclas de productos fitosanitarios más empleados en agricultura: Systhane® 0,015% (v/v) + Apache® 0,075% (v/v); Systhane® 0,015% (v/v) + Runner® 0,04% (v/v); Systhane® 0,015% (v/v) + Droxicuper® 0,038% (v/v). Las mezclas fueron inoculadas al 0,1% con cultivos de 24h de XT1 con título  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Como control positivo de crecimiento se empleó caldo nutritivo. Transcurridas 24 horas se observó el crecimiento o la ausencia de él, del microorganismo.

Tabla 7. Productos agroquímicos usados habitualmente en campo.

Categoría	Producto	Materia activa	Dosis en campo
Fungicidas	Arius®	QUINOXIFEN 25% [SC]	0,02-0,03%
	Armicarb®	CARBONATO DE HIDRÓGENO DE POTASIO 85% [SP]	5 Kg/ha
	Collis®	BOSCALIDA 20% + KRESOXIM-METIL 10% [SC]	0,04%
	Droxicuper-50®	HIDRÓXIDO CÚPRICO 50% [WP]	0,2-0,4%
	Dynali®	DIFENOCONAZOL 6% + CIFLUFENAMIDA 3% [DC]	0,05-0,06%
	Flint®	TRIFLOXISTORBIN 50% [WG]	0,0125-0,015%
	Karathane Star®	MEPTILDINOCAP 35% [EC]	0,03-0,06%
	Luna Experience®	FLUOPIRAM 20% + TEBUCONAZOL 20% [SC]	0,12-0,38 l/Ha
	Systhane®	MICLOBUTANIL 24% [EC]	0,02-0,04%
	Vivando®	METRAFENONA 50% [SC]	0,01-0,02%
Azufre en polvo	Cepsul Especial®	AZUFRE 98,5% [DP]	20-30 Kg/Ha
Insecticidas	Audace®	DELTAMETRIN 2,5% [EC]	0,03-0,05%
	Closar LE®	CLORPIRIFOS 48% [EC]	0,15-0,2%
	Runner®	METOXIFENOCIDA 24% [SC]	0,04%
Acaricidas	Apache®	ABAMECTINA 1,8% [EC]	0,05-0,1%

## 5. Producción y caracterización de metabolitos secundarios

### 5.1 Lipopéptidos

#### 5.1.1 Extracción de la fracción lipopeptídica

La producción de lipopéptidos se testó en tres medios de cultivo distintos: MOLP, SG y MM. La fracción lipopeptídica se extrajo de acuerdo al protocolo descrito por Yazgan y col. (2001) con pequeñas modificaciones. Brevemente, el sobrenadante de un cultivo de 72h de XT1, producido en los tres medios indicados y obtenido por centrifugación a 8000 rpm durante 45 minutos, se sometió a una extracción orgánica por triplicado empleando un volumen de n-butanol. La fase orgánica se concentró con un rotavapor y se liofilizó para su posterior análisis.

#### 5.1.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de la fracción extraída fue determinada como se detalla a continuación. Se prepararon placas Petri con medio PDA con concentraciones crecientes de una solución lipopeptídica: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 mg/mL (p/v). Cada uno de los preparados se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Un botón fúngico de *B. cinerea* procedente de un cultivo de 15 días se depositó en la superficie de cada una de las placas, éstas fueron incubadas a 21°C durante 15 días. Como control se emplearon placas con PDA sin lipopéptidos. Transcurrido el tiempo establecido, el porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico se calculó considerando el tratamiento control de acuerdo a la siguiente fórmula (Borah y col., 2016):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{Diámetro placa tratamiento}}{\text{Diámetro placa control}} \right) \times 100 \right]$$

#### 5.1.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de los lipopéptidos

Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la menor concentración de lipopéptidos con la capacidad de inhibir totalmente el crecimiento fúngico y la concentración mínima fungicida (CMF), descrita como la menor concentración de lipopéptidos con la capacidad de destruir el hongo. El experimento se llevó a cabo en medio líquido de acuerdo con el protocolo descrito previamente en la sección 3.4.4 de "Material y métodos" con modificaciones. En este caso, 900 µl de solución de esporas se enfrentaron a 300 µl de solución lipopeptídica 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 mg/mL (p/v). Las placas se incubaron a 21°C durante 7 días. El resultado se obtuvo mediante observación de la presencia o ausencia de crecimiento fúngico. El contenido completo de cada pocillo, donde *B. cinerea* no había crecido, se inoculó en tubos con



medio PDB y se incubaron a 21°C durante 7 días para la determinación de la CMF (Frikha-Gargouri y col., 2017).

#### **5.1.4 Estabilidad de los lipopéptidos frente a variaciones de temperatura y pH**

Con el fin de evaluar la capacidad de resistencia de los compuestos extraídos de la cepa XT1 frente a distintos valores de pH y temperatura se realizaron ensayos antifúngicos frente a *B. cinerea*. Para ello, por un lado la fracción lipopeptídica (10 mg/mL) se calentó a 100°C durante 10, 30 y 60 minutos y a 121°C durante 20 minutos. Por otro lado, la estabilidad a distintos pH se determinó ajustando el pH de la solución en un rango de valores comprendido entre 3 y 12 (Ghribi y col., 2012). La actividad antifúngica de estas soluciones tratadas se evaluó en medio líquido tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.4.4 (Frikha-Gargouri y col., 2017).

#### **5.1.5 Análisis de los genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos**

Los genes codificadores de la producción de péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS) de la cepa XT1 se amplificaron mediante PCR (*polymerase chain reaction*). La amplificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Saiki y col. (1988). Las secuencias de los cebadores específicos empleados, algunos de ellos degenerados, así como el tamaño esperado del producto, se encuentran descritas en la tabla 8. La reacción de ADN contiene 1X tampón de PCR (Bioline®), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline®), 4 mM de cada uno de los primers, 0,2 mM dNTPs (Sigma®), 5 U de Taq polimerasa (Bioline®) y csp 50 µl H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Las condiciones de amplificación empleadas incluyeron una desnaturalización previa a 95°C durante 5 minutos seguidos de 40 ciclos constituidos por 3 etapas: 94°C durante un minuto, temperatura de hibridación durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, para terminar se llevó a cabo un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Las temperaturas de hibridación fueron 45, 43, 50, 53 y 50°C para los *primers* Af2/Tf1, As1/Ts2, BmyBF/BmyBR, ItuDF/ItuDR and SrfA3/LicA3, respectivamente. Los parámetros de la reacción de PCR se eligieron de acuerdo al tamaño de los fragmentos de ADN a amplificar, temperatura de hibridación de los *primers* y tiempo de elongación.

**Tabla 8.** Cebadores empleados en la amplificación de los genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos.

Lipopeptidos	Genes	Primers	Secuencias (5'→3')	PCR Tamaño primers (bp)	Ref.
Surfactina/ liquesisina	<i>srfA3/licA3</i>	SrfA3/licA3(F) SrfA3/licA3 (R)	CAAAAKCGCAKCATACCAAKTTGAG AGCGGCAYATATTGATGCGGYTC	268	(Randall Simpson y col., 2011)
Fengicina	<i>fenC</i>	Af2 (F) Tf1 (R)	GAATAYMTCGGMCGMTKGA GCTTTWADKGAATSBCCGCC	443-455	(Tapi y col., 2010)
Surfactina	<i>srfA-A</i>	As1 (F) Ts2 (R)	CGCGGMTACCGVATYGAGC ATBCCTTTBTWDGAATGTCCGCC	419-431	(Tapi y col., 2010)
Bacilomicina	<i>bmyB</i>	BmyB (F) BmyB (R)	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA GCGGGTATTGAATGCTTGTT	370	(Mora y col., 2011)
Iturina	<i>ituD</i>	ItuD (F) ItuD (R)	TTGAAYGTCAGYGCSCTTT TGCGMAAATAATGGSGTCGT	482	(Chung y col., 2008)

Los productos de PCR obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel para determinar el tamaño y la pureza de los amplificados. Para ello, se empleó un gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 1X. Las condiciones de la electroforesis fueron 100 V, 400 mAh, durante 150 minutos.

Se empleó *Thermo Scientific*® 6X (Bioline) como colorante de carga de ADN y como referencia del tamaño y concentración de ADN se añadió el marcador *Hyperladder*® IV (Bioline). El revelado de las bandas de ADN fue posible por la adición de solución de tinción *RedSafe*® al gel, y la posterior exposición de éste a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 517 nm. Las imágenes se recogieron con una cámara digital acoplada al transluminador empleando el programa Gel Doc 2000 (Quantity One, Biorad®).

### 5.1.6 Identificación de los lipopéptidos mediante UPLC-HDMS Q-TOF

El análisis de la fracción lipopeptídica se realizó disolviendo éste en metanol al 10% (v/v) (Yazgan y col., 2001) y analizándolo mediante cromatografía líquida de alta presión (UPLC, *high-pressure liquid chromatography*) (Acquity UPLC® BEH300, Waters) acoplada a espectrometría de masas de alta definición (SYNAPT G2 HDMS Q-TOF., *high definition mass spectrometry*, Waters). La espectrometría de masas fue realizada mediante electropulverización de ionización positiva (ESI+). Con los datos recabados, se calcularon

las masas potenciales [M+H], los valores DBE (*double-bond equivalent*) e i-FIT (*theoretical isotope distribution*) de cada una de las masas obtenidas y las composiciones elementales asociadas empleando el software MassLynx (Waters).

Este análisis fue realizado en colaboración con El Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### **5.1.7 Actividad antifúngica de los lipopéptidos en bioensayos frente a *B. cinerea***

La actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por *B. velezensis* XT1 se analizó en uva, fresa y tomate. *B. cinerea* se cultivó en medio PDA a 21°C durante 15 días, tras los cuales se recolectaron las esporas producidas. Para ello, el micelio se roció con 9 mL de agua destilada estéril y, a continuación, ayudados por un asa de siembra se desprendió el micelio y las esporas adheridas a la superficie, la suspensión obtenida se filtró con gasa estéril (Zheng y col., 2018) Por otro lado, la superficie de los frutos se esterilizó con NaOCl al 5% (v/v) durante 5 minutos y se lavó con abundante cantidad de agua destilada estéril 3 veces. En la superficie de las uvas se realizaron incisiones de 3 mm con una cuchilla estéril y se aplicaron 15 µl de la fracción lipopeptídica con una concentración 20 mg/mL en las heridas. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, cuando la solución había sido absorbida se inocularon 15 µl de una suspensión de *B. cinerea* con una concentración de 10<sup>8</sup> conidios/mL en la incisión. Por otra parte, los frutos de fresa y tomate se cortaron en rodajas y se trataron mediante *spray* con la misma solución de lipopéptidos que en el caso anterior. Una hora después los frutos se infectaron también por *spray* con la suspensión conidial de *B. cinerea*. Todos los tratamientos se incubaron a 21°C con un 70% de humedad durante 6 días. Los resultados se expresan como incidencia de infección (% de fruta infectada).

### **5.1.8 Actividad antioxidante en frutos**

La actividad antioxidante en frutos se midió extrayendo los fenoles solubles mediante un ensayo reductor de iones férricos (FRAP, *ferric iron reducing antioxidant power assay*). Los fenoles solubles totales se extrajeron de 0,1 g de frutos liofilizados empleando 10 mL de metanol 80% (v/v) y ácido clorhídrico al 0,1% (v/v). La mezcla obtenida se mantuvo en oscuridad a 4°C durante dos horas en agitación a 120 rpm y posteriormente se centrifugó. El sobrenadante se filtró y se determinó el contenido fenólico resultante FRAP. La cantidad total de fenoles se determinó de acuerdo al procedimiento Folin-Ciocalteu's descrito por Ribéreau-Gayon (1968) con algunas modificaciones. El contenido fenólico se estimó utilizando una curva patrón realizada con ácido gálico (GAE) y los resultados se expresan como mg de ácido gálico en 100 g de peso seco. Para el ensayo FRAP 0,2 mL de

extracto de fruta se añadieron a 2 mL de solución FRAP y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente tras lo que se midió la absorbancia a 593 nm. El control se realizó con una solución 1mM de ácido L-ascórbico preparada en agua destilada. Los resultados han sido expresados como mM/L de iones  $Fe^{2+}$  en 100 g de peso seco (Benzie y Strain, 1999)

### **5.1.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM)**

Para observar las posibles alteraciones en la morfología de *B. cinerea* provocada por los lipopéptidos producidos por la cepa XT1, se realizaron estudios de *microscopía electrónica de barrido (SEM, scanning electron microscopy)* y transmisión (*TEM, transmission electron microscopy*) en colaboración con el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para ello, se emplearon cultivos procedentes del control y del medio PDA adicionado de 10 mg/mL de lipopeptidos (ensayo descrito en el apartado 3.5.1.2 de “Material y Métodos”). Las muestras se fijaron para ambos tipos de microscopía y se observaron empleando, por un lado, una estación de trabajo CrossBeam por bombardeo iónico focalizado, incorporada a un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FIB-FESEM) y, por otro lado, un microscopio de transmisión de ultra resolución (HAADF FEI TITAN G2).

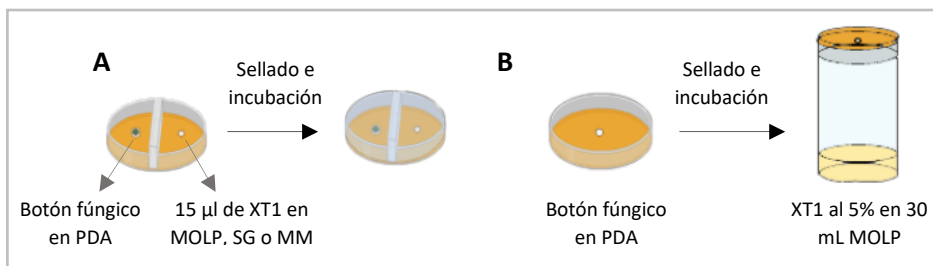
## **5.2 Compuestos volátiles de la cepa XT1**

### **5.2.1 Actividad antifúngica**

La evaluación de la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* de los compuestos volátiles producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en distintos medios de cultivo se realizó tanto en medio sólido como en medio líquido. En el primer caso se emplearon placas Petri tabicadas (Fisher Scientific®) que permitían la separación física en dos compartimentos, en uno de ellos se vertió medio PDA para el cultivo del hongo y en el otro, para el crecimiento bacteriano, los medios SG, MOLP o MM. Se inocularon 15  $\mu$ l procedentes de cultivos *o.n.* de ambas cepas con un título  $3 \times 10^7$  UFC/mL y en el lado opuesto se depositó un botón fúngico de 6 mm de diámetro de un cultivo de 15 días de *B. cinerea*. Como control negativo se emplearon placas con botones fúngicos sin inóculo bacteriano en el otro compartimento. Las placas se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 28°C *o.n.* (Lim y col., 2017). Transcurrido este tiempo, todos los tratamientos se mantuvieron a 21°C durante 15 días (Fig. 11A).

La actividad en medio líquido se realizó en botes de cristal estériles con 600 mL de capacidad. En cada frasco se esterilizaron 30 mL de medio MOLP, SG o MM y se

inocularon al 5% con cultivos *o.n.* de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> realizados en caldo nutritivo. Simultáneamente se inocularon placas petri de 5 cm de diámetro con medio PDA con un botón fúngico procedente de un cultivo de 15 días de *B. cinerea* y se encajaron boca abajo en el bote de cristal tal y como se muestra en la figura 11B. Como control, se emplearon frascos sin inóculo bacteriano acoplados a placas de medio PDA con el botón fúngico. El sistema diseñado se selló con parafilm y los ensayos se incubaron a 21°C durante 6 días.



**Figura 11.** Determinación de la actividad antifúngica de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en medio sólido (A) y en medio líquido (B).

En ambos casos, el área de crecimiento del hongo se calculó utilizando el programa ImageJ y el porcentaje de reducción de micelio se determinó mediante comparación con la placa control:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Placa tratamiento}}{\text{Placa control}}\right) \times 100$$

### 5.2.2 Análisis de los componentes volátiles mayoritarios mediante GC-TOF-MS

La detección de los compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa XT1, así como su posterior análisis de componentes principales se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Agnieszka Smolinska, del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Maastricht (Holanda). Brevemente, la cepa XT1 se cultivó en 100 mL de medio MOLP durante 48h a 28°C y una agitación de 120 rpm. Transcurrido este tiempo, se analizó su composición mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tiempo de vuelo (GC-TOF-MS, *gas chromatography time-of-flight mass spectrometry*). Los resultados obtenidos se procesaron con el programa ChromaTOF y el conjunto de compuestos mayoritarios se estudió mediante un análisis de componentes principales (PCA).

### 5.2.3 Actividad antifúngica de los COVs sintéticos seleccionados

Se seleccionó la acetoína como uno de los compuestos mayoritarios obtenidos en el ensayo anterior para su evaluación antifúngica frente a *B. cinerea*. Tal y como se describió previamente en el apartado 3.5.2.1, el experimento se llevó a cabo usando placas compartidas. En el compartimento contenedor del medio MOLP se depositaron papeles de filtro estériles de 50 mm de diámetro a los que se le añadieron 30 µl de una solución de acetoína preparada en concentraciones crecientes (300, 400 y 500 mM), y en el compartimento con PDA un botón fúngico de un cultivo de 15 días de *B. cinerea*. Las placas se sellaron y se incubaron durante 15 días a 21°C. Como control se usó medio PDA con *B. cinerea* sin ningún tratamiento (Chaves-López y col., 2015). La obtención de los datos de crecimiento y porcentaje de inhibición se realizó de la misma forma que en el apartado 3.5.2.1.

### 5.2.4 Efecto protector de los COVs producidos por la cepa XT1 en *Arabidopsis thaliana* frente a *B. cinerea*

Para determinar la capacidad protectora de los COVs producidos por la cepa *Bacillus* XT1 sobre plántulas de *A. thaliana* frente a *B. cinerea* se siguió el método previamente descrito por Ditengou y col., (2015) con modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en placas Petri de 90 x 25 mm con medio MS al 0,3% (p/v) donde se sembraron 5 semillas de *Arabidopsis* Col-0 esterilizadas y estratificadas. Las placas se mantuvieron en incubación a 21°C durante 7 días en condiciones de día largo con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Transcurrido este tiempo, se establecieron cuatro tratamientos: control, plantas tratadas con los COVs de la cepa XT1, plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas con XT1 y plantas infectadas con *B. cinerea*. La infección se realizó en la zona radicular con 10 µl de una suspensión de esporas de 10<sup>6</sup> conidios/mL del fitopatógeno. Por otro lado, las placas con medio MOLP se inocularon por estriación con la cepa XT1 y se enfrentaron a las placas que contenían las plantas de *A. thaliana* (Fig. 12). Todos los tratamientos se sellaron con parafilm, se mantuvieron las primeras 24 h a 28°C y posteriormente 7 días a 21°C en las condiciones de luz y oscuridad mencionadas anteriormente. Como control, se dispusieron placas de medio MOLP sin ningún tratamiento. Transcurridos 10 días de incubación, se tomaron datos de mortalidad y se observó la presencia o ausencia de desarrollo del fitopatógeno en la zona radicular de las plantas infectadas.



**Figura 12.** Evaluación *in vivo* de la capacidad antifúngica de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en *A. thaliana*.

### 5.2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM)

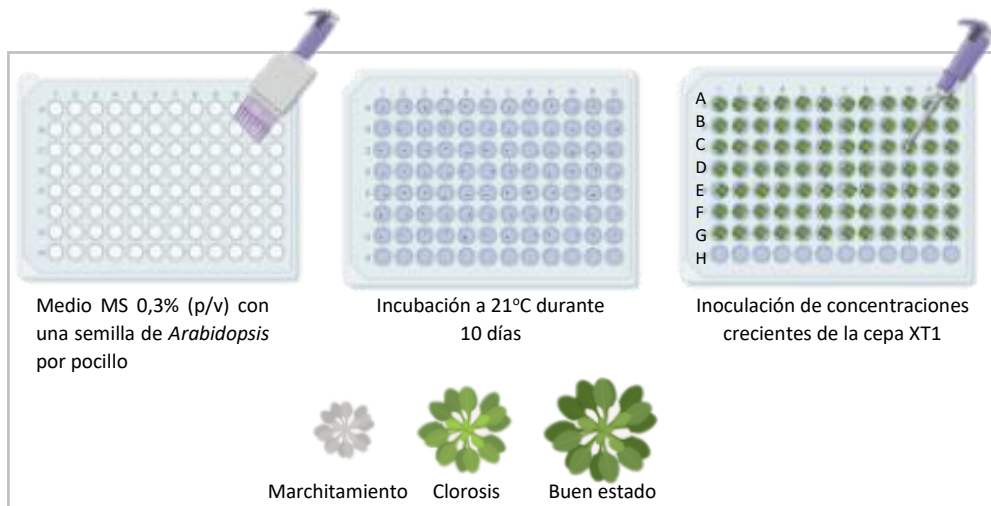
Las posibles alteraciones morfológicas en el hongo *B. cinerea* producidas por los COVs sintetizados por las cepas XT1 y *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup> se analizan siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5.1.9. Se tomaron las muestras de las placas tabicadas del ensayo antifúngico frente a *Botrytis* descrito en el apartado 3.5.2.1.

## 6. Determinación de la capacidad protectora de la cepa XT1 frente a *B. cinerea in vitro* e *in vivo*

### 6.1 Estudios *in vitro*

#### 6.1.1 Tolerancia de *A. thaliana* a XT1

La estimación de la dosis a emplear de la cepa XT1 fue determinada *in vitro* con la especie *A. thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis* Col-0 esterilizadas y estratificadas se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos con 200  $\mu$ l de medio MS al 0,3% (p/v). Las placas se sellaron para mantener la humedad y se incubaron a 21°C durante 10 días en condiciones de día largo con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Pasado este tiempo se establecieron seis tratamientos con distintas concentraciones de bacteria por placa; el experimento se hizo por triplicado (Fig. 13). El cultivo bacteriano *o.n.* en medio MOLP se centrifugó y el pellet obtenido se lavó con agua destilada estéril. En base a los datos de DO<sub>600</sub> se realizaron diluciones seriadas hasta obtener un rango que incluía los valores 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> UFC/mL, concentraciones que se inocularon en la placa multipocillo, inoculando 2  $\mu$ l por planta y pocillo. Las placas de microtitulación fueron incubadas a 21°C durante siete días y revisadas diariamente para verificar la viabilidad de *Arabidopsis*.



**Figura 13.** Determinación de la tolerancia de *A. thaliana* a la cepa XT1. Las letras A-H representan las filas con concentraciones crecientes de XT1, siendo: A)  $10^8$ UCF/mL; B)  $10^7$ UCF/mL; C)  $10^6$ UCF/mL; D)  $10^5$ UCF/mL; E)  $10^4$ UCF/mL; F)  $10^3$ UCF/mL; G) Control sin tratamiento.

### 6.1.2 Tolerancia de *S. lycopersicum* L. a la cepa XT1

Como ensayo preliminar a posteriores estudios *in vivo* se determinó la tolerancia de la especie vegetal *S. lycopersicum* L. a distintas concentraciones de la cepa *B. velezensis* XT1. Semillas esterilizadas y estratificadas de *S. lycopersicum* L., se sembraron en tubos de vidrio de 20x200 mm con 10 mL de medio MS 0,3 % (p/v) y se mantuvieron a 25°C durante 10 días en condiciones de luz/oscuridad de 16/8 h. Transcurrido este tiempo, se establecieron cinco tratamientos con concentraciones crecientes de la cepa XT1 que incluían los títulos  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Para ello, a partir del pellet celular, lavado y resuspendido en agua estéril, del cultivo *o.n.* de la cepa XT1 ( $DO_{600}=1$ ) se realizaron diluciones seriadas y ayudados por una pipeta Pasteur estéril se inocularon 100  $\mu$ l de cada una de las concentraciones en la zona radicular. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento y como control negativo se emplearon plantas inoculadas con agua estéril. Tras 20 días de incubación a las mismas condiciones indicadas anteriormente, se tomaron y analizaron los datos de viabilidad, peso de la parte aérea (g), peso total de la planta (g), longitud de la parte aérea (cm) y número de hojas.



### **6.1.3 Evaluación del efecto de la inoculación de la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en plantas de tomate**

La capacidad protectora de la XT1 frente a *B. cinerea* se testó *in vitro* en plántulas de *S. lycopersicum* L. Al igual que en el ensayo anterior, las semillas de tomate esterilizadas y mantenidas a 4°C se sembraron en tubos con 10 mL de medio MS 0,3% (p/v). Tras 10 días de incubación a 25°C y 16/8 h de luz/oscuridad), se establecieron 4 tratamientos con 10 repeticiones cada uno: a) control, b) plantas tratadas con la cepa XT1, c) plantas infectadas con *Botrytis* y d) plantas infectadas con *Botrytis* y tratadas con XT1. Por un lado, se ajustó el título de la cepa XT1 a 10<sup>8</sup> UFC/mL (DO<sub>600</sub>=1), a partir del pellet celular lavado obtenido de un cultivo *o.n.*, y se inocularon los tratamientos correspondientes con 100 µl en la zona radicular. Tras 24 h de incubación a 25°C, se realizó la infección con 100 µl de una suspensión de esporas de *B. cinerea* ajustada a 1x10<sup>6</sup> conidios/mL. Los tubos se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas previamente durante 20 días, tras los cuales se contabilizaron el número de plantas vivas en cada tratamiento. Para verificar que la cepa XT1 había colonizado la zona radicular, las raíces de las plantas del tratamiento b) se cortaron en esterilidad y se sumergieron en 5 mL de solución salina 0,9% (p/v) durante 24 h a 28°C, de la suspensión resultante se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar nutritivo para su recuento. Por último, para verificar la presencia o ausencia del fitopatógeno en las plantas de los tratamientos *Botrytis* y *Botrytis* con XT1, las raíces cortadas en condiciones estériles se depositaron sobre placas con medio PDA.

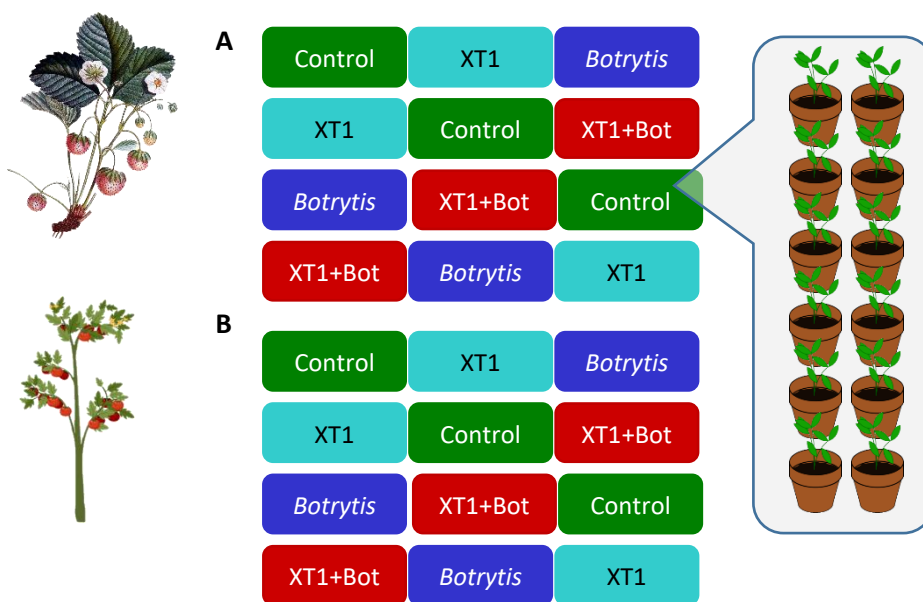
## **6.2 Estudios *in vivo***

### **6.2.1 Evaluación de la actividad de la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en plantas de tomate y fresa**

Mediante ensayos *in vivo* en plantas de tomate y fresa se determinó la capacidad de la cepa XT1 de promover la resistencia vegetal frente a *B. cinerea*. El ensayo fue realizado en colaboración con la empresa Innoplant S.L. en las instalaciones de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) (Granada).

El experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8h oscuridad, temperatura 25°C día/ 20°C noche, humedad relativa 60-80% y luminosidad 250 microsiemens/cm<sup>2</sup>/sg. Se emplearon plantones con tamaños similares de *Solanum lycopersicum* L. variedad *mina* y *Fragaria ananassa* variedad *san andreas*, variedades comerciales susceptibles a *Botrytis*. Las plantas se sembraron en macetas individuales de 1 L de capacidad con un sustrato base de turba.

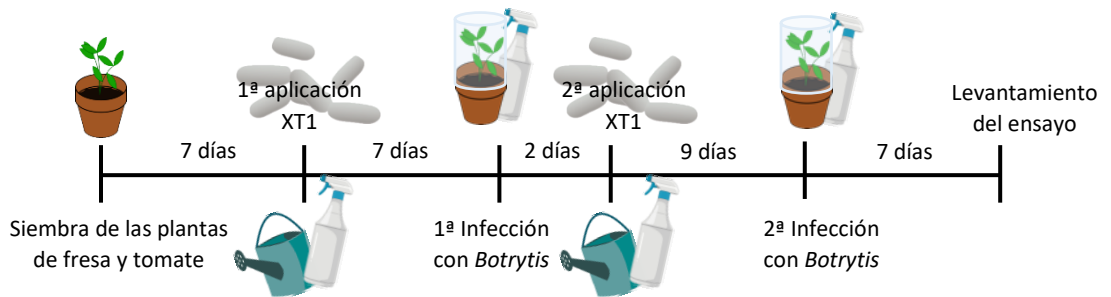
Para cada tratamiento a ensayar se dispusieron 3 repeticiones con 12 plantas cada una (36 plantas por tratamiento) (Fig. 14).



**Figura 14.** Diseño experimental de los ensayos *in vivo* en plantas de fresa y tomate, en los que la cepa XT1 fue aplicada vía radicular (A) o foliar (B).

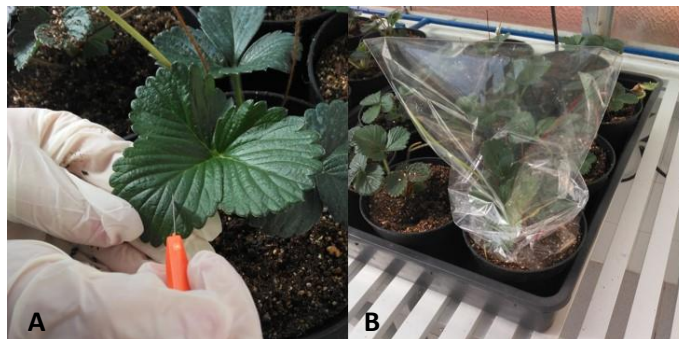
Para estudiar la eficacia del modo de empleo del microorganismo la cepa XT1 se inoculó por dos vías distintas: foliar, mediante pulverización, y por riego. Se establecieron cuatro tratamientos para cada una de estas formas de aplicación: a) control, b) *B. cinerea*: plantas infectadas, c) XT1: plantas con el microorganismo de estudio y d) *B. cinerea* + XT1: plantas infectadas y tratadas con la cepa XT1. En la figura 14 se detalla el experimento descrito.

La cepa XT1 se cultivó en medio MOLPr a 28°C en agitación (120 rpm) durante 5 días hasta alcanzar el título de  $2 \times 10^8$  UFC/mL. A partir de dicho cultivo, en agua estéril se prepararon las diluciones 1/5 (v/v) para el tratamiento foliar y 1/20 (v/v) (1ª aplicación) y 1/40 (v/v) (2ª aplicación) para el tratamiento radicular. La primera aplicación del tratamiento, se realizó una semana después de la siembra de las plantas, y el segundo tratamiento, se aplicó dos días después de la primera infección. El volumen empleado para cada planta en las aplicaciones en suelo fue de 150 mL. En ambos casos se realizaron dos aplicaciones (Fig. 15).



**Figura 15.** Calendario de aplicaciones del ensayo *in vivo*, con plantas de tomate y fresa, con la cepa XT1 e infecciones con *B. cinerea* durante el ensayo *in vivo* en plantas de fresa y tomate.

El hongo *B. cinerea* se cultivó durante 15 días en medio PDB a 21°C en agitación. Transcurrido este tiempo el cultivo se trituró, se filtró con gasas estériles y su título se ajustó a  $1 \times 10^6$  conidios/mL. La inoculación se realizó mediante pulverización en la parte foliar y en el sustrato de las plantas a infectar, posteriormente éstas fueron cubiertas con bolsas de plástico durante 24h para asegurar la infección (Fig. 16).



**Figura 16.** A) Detalle de la realización de una herida en fresa para facilitar la inoculación de *B. cinerea*. B) Recubrimiento de la planta de fresa con una bolsa de plástico para aumentar el porcentaje de humedad relativa y así favorecer la infección.

A lo largo de todo el ensayo, las plantas fueron regadas con 150 mL de solución nutritiva Hewitt, y con agua según demanda del cultivo.

Tras cinco semanas de ensayo, se procedió al levantamiento del experimento y a la toma de muestras. De todos los tratamientos se analizaron los siguientes parámetros:

A) Parámetros de crecimiento: se tomaron datos de **biomasa foliar** y **radicular** y se contabilizaron el número de flores y frutos producidos en cada tratamiento.

B) Parámetros de infección: la evaluación de la enfermedad se llevó a cabo atendiendo a la **incidencia** (porcentaje de plantas afectadas) y **severidad** de síntomas (clorosis,

marchitamiento, necrosis, defoliación), según una escala de 0-4 (0= planta sana o sin síntomas; 1= planta afectada en 1-33%; 2= 34-66%; 3=67-99%; 4= planta muerta) y se calculó la curva de progresión de la enfermedad manera porcentual (López Escudero y col., 2004).

C) Parámetros fisiológicos y de respuesta: se tomaron datos del contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehído (MDA) y compuestos fenólicos, así como de la actividad polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina-amonio liasa (PAL). Además, se realizaron tinciones histológicas que revelaron de forma cualitativa el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los depósitos de calosa. A continuación se detallan los protocolos seguidos para la medición de cada uno de los parámetros mencionados:

- ♣ Pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides): la concentración de pigmentos foliares se analizó mediante el método descrito por Wellburn (1994) con ciertas modificaciones. Se maceró 0,1 g de material vegetal congelado en 1 mL de metanol. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 5000 x g. La absorbancia se midió a 3 longitudes de onda diferentes (666 nm, 653 nm y 470 nm) y se realizaron los siguientes cálculos basándonos en las ecuaciones de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila a (Chl a)} = (15,65 \times A_{666 \text{ nm}}) - (7,34 \times A_{653 \text{ nm}})$$

$$\text{Clorofila b (Chl b)} = (27,05 \times A_{653 \text{ nm}}) - (11,21 \times A_{666 \text{ nm}})$$

$$\text{Carotenos} = \frac{1000 A_{470 \text{ nm}} - 2,86 \times \text{Chl a} - 129,2 \times \text{Chl b}}{221}$$

$$\text{Ratio Chl a/b} = \text{Chl a} / \text{Chl b}$$

- ♣ Contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: la concentración foliar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió colorimétricamente por el método descrito por Mukherjee y Choudhuri (1983). La extracción a partir de las muestras foliares se realizó con acetona fría para determinar los niveles de peróxido de hidrógeno. La intensidad del color amarillo del sobrenadante fue determinada a 415 nm.
- ♣ Tinción histológica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: se usó el método descrito por Thordal-Christensen y col. (1997) para realizar la tinción histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se preparó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Aldrich®) 1 g/L el día anterior al ensayo y se conservó toda la noche a 4°C en oscuridad. En dicha solución se sumergieron 3-4 hojas de cada tratamiento durante 8 horas en oscuridad, iluminadas con un

flexo de bombilla azul (40W). Las hojas se agitaron cada 15-30 minutos y posteriormente se sumergieron en etanol hirviendo al 98% (v/v) hasta que perdieron la clorofila por completo. Finalmente, las muestras foliares se colocaron en una solución agua:etanol 50:50 para mantenerlas hidratadas hasta que se tomaron las imágenes.

- ♣ Compuestos fenólicos: los fenoles del tejido vegetal se obtuvieron empleando una extracción orgánica con metanol. Para ello, las hojas de material fresco de cada tratamiento se homogeneizaron en un mortero empleando nitrógeno líquido. Se pesaron 0,1 g para cada muestra y cada una de ellas se sometió a una extracción orgánica empleando la mezcla metanol 40% (v/v), cloroformo 40% (v/v) y NaCl 1M 20% (v/v). Tras centrifugar a 5000 g durante 10 minutos se recogieron 100 µl de la fase metanólica y la reacción se realizó añadiendo 300 µL de tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (p/v) (disuelto en NaOH 0,1 N), 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 50% (v/v) y 200 µL de agua destilada estéril (Rivero y col., 2001). El contenido fenólico se cuantificó en cubetas de cuarzo a una absorbancia de 765 nm y la concentración en fenoles se calculó utilizando una curva patrón con ácido cafeico. De cada uno de los tratamientos se realizaron 10 repeticiones.
  
- ♣ MDA: para la extracción de malondialdehído, se homogenizaron hojas de material fresco de cada tratamiento en un mortero empleando nitrógeno líquido. Del homogeneizado de cada tratamiento se pesaron 0,15 g a los que se añadió 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) que contenía 0,25% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). La mezcla resultante se agitó en vórtex y se calentó a 95°C durante 30 minutos para luego ser enfriada rápidamente en un baño de hielo. Después, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos y la absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm. De cada uno de los tratamientos se llevaron a cabo diez repeticiones. El valor para la absorción no específica a 600 nm se restó de la lectura obtenida a 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción molar del MDA de 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Heath y Packer, 1968; Fu y Huang, 2001).

$$MDA = \frac{[(Abs. Lectura^{532} - Abs. Lectura_{600}) \cdot Vmac]}{\epsilon \cdot d \cdot gpf}$$

Donde Vmac representa el volumen de maculación (1 mL), ε tiene el valor de 156000, d representa la densidad cuyo valor es 1 g/L y gpf son los gramos de peso fresco (0,15 g).

- ♣ Actividad polifenol oxidasa (PPO): se siguió el método descrito por Aquino-Bolaños y Mercado-Silva, (2004). Para ello, se añadieron 0,1 mL de sobrenadante enzimático a un tampón 50 mM de fosfato potásico (pH 7) que contenía catecol 60 mM. La mezcla se mantuvo a 25°C y la lectura del incremento de absorbancia se realizó durante 3 minutos a 390 nm. La actividad ha sido expresada como unidades de actividad de enzima por segundo (UA, cambio en una unidad de absorbancia por segundo).
  
- ♣ Actividad fenilalanina-amonio liasa (PAL): se midió la formación de ácido cinámico, por el método descrito por Mori y col. (2000). Se maceraron 0.2 g de material foliar vegetal en un tampón de fosfato 100 mM (pH 8) adicionado con mercaptoetanol 1.4 mM. El extracto se centrifugó durante 15 minutos a 15000 g y a 200 µL del sobrenadante obtenido se le añadieron 400 µL de Buffer Tris-HCl (pH 8.8) y 200 µL fenilalanina 40 mM. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y se le añadieron 200µL de ácido tricloroacético (TCA) al 25%. Tras esto se centrifugó 15 minutos a 10000g, y se midió a una absorbancia de 280 nm.
  
- ♣ Tinción de los depósitos de calosa: se realizó sumergiendo completamente hojas frescas de cada tratamiento, en etanol 96% hasta que la clorofila de cada una de ellas fue totalmente eliminada. Las muestras se rehidrataron durante 30 minutos en tampón fosfato 0,07 M (pH 9) y posteriormente el buffer fue descartado y reemplazado por azul de metileno 0,05 % (p/v) disuelto en el mismo tampón. Tras una incubación de 30 minutos, la solución se retiró y las muestras se sumergieron en azul de metileno 0,5% (p/v) durante 5 días en oscuridad. Para poder ser observadas en microscopía, las muestras se montaron en portaobjetos usando una solución de azul de metileno 0,05% (p/v) recién preparada (Scalschi y col., 2015). Finalmente, las hojas se observaron mediante microscopía de fluorescencia con filtro UV a 380 nm.

D) Contenido en fitohormonas: tras la extracción del tejido vegetal liofilizado la cuantificación de las hormonas se realizó mediante un equipo de UHPLC-espectrometría demasas (Q-Exactive, ThermoFisher Scientific) (Stevens y Berry, 1988).

Los parámetros de crecimiento e infección, así como el contenido en pigmentos fotosintéticos, en peróxido de hidrógeno, en fitohormonas y la actividad enzimática de PPO y PAL fueron determinados por la empresa Innoplant S.L.

### 6.2.2 Evaluación de la actividad de la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en viñedos

La determinación de la eficacia de la cepa XT1, como agente de biocontrol biológico, frente al desarrollo de la podredumbre gris producida por *B. cinerea* en viñedos, se realizó como parte de un proyecto RETOS-COLABORACION “Biocontrol de Patógenos en Campo: Desarrollo de Sistemas de Detección Precoz y Herramientas de Lucha Integrada”. PATBIOCONTROL en el que participó la empresa Xtrem Biotech S.L. junto con Bodegas San Valero, la Universidad de Zaragoza y el Parque Científico Tecnológico Aula Dei. La realización de los ensayos así como los resultados obtenidos son fruto del trabajo de todos los participantes del proyecto.

Para el tratamiento de los viñedos se produjeron 300 L de cultivo de la cepa XT1 en un fermentador de Xtrem Biotech S.L. con 500 L capacidad (Fig. 17B). El cultivo se realizó en una plataforma orbital de 70 litros de capacidad (Fig. 17A). Se empleó el medio de cultivo MOLPr. El inóculo utilizado fue del 5% (v/v) y las condiciones de incubación fueron 28°C durante 3 días en agitación a 110 rpm a un pH de  $7,2 \pm 0,2$ . Tras el tiempo establecido se realizaron recuentos del número de UFC/mL en agar nutritivo.

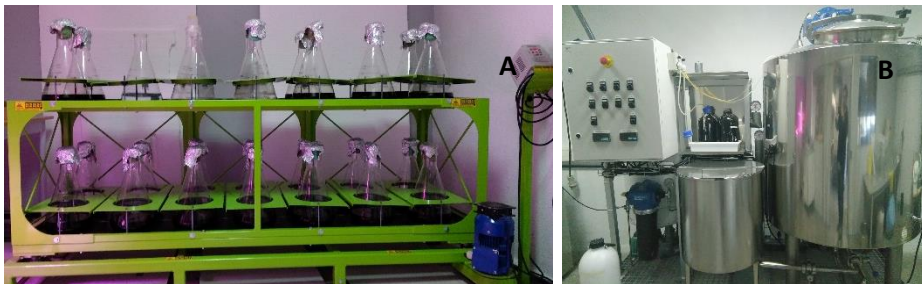
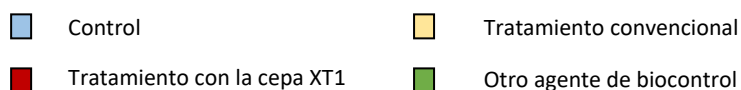


Figura 17. A) Plataforma orbital con 70 L de capacidad. B) Fermentador con 500 L de capacidad

En el fermentador de 500 litros la cantidad de inóculo empleada fue del 8% (v/v) y las condiciones de incubación fueron: 28°C con una elevada oxigenación y agitación. Terminado el proceso se realizaron recuentos de UFC/mL viables por la técnica de dilución decimal en agar nutritivo.

El ensayo de campo se llevó a cabo por el equipo de la universidad de Zaragoza participante del proyecto en fincas que contenían las variedades de uva *Garnacha* y *Syrah*, ambas sensibles a la infección por *Botrytis*. Se establecieron tres tratamientos a) control si ningún tipo de tratamiento, b) viñedos tratados con la cepa XT1 y c) viñedos tratados con los productos fitosanitarios empleados habitualmente. Se reservaron determinadas filas para cada uno de los tratamientos y éstos se aplicaron de la misma forma en la que se aplican los tratamientos convencionales (Fig. 18).



**Figura 18.** Diseño experimental y distribución de cada parcela para la aplicación de los diferentes tratamientos. A) Parcela con la variedad *garnacha* y B) parcela con la variedad *svrah*.

La estrategia de aplicación se definió de acuerdo a los datos climatológicos, obtenidos en una estación meteorológica por Bodegas San Valero, y al índice de infección determinado en muestreos previos a la época de vendimia. En la tabla 9 se pueden observar los tiempos de aplicación de los diferentes tratamientos y las condiciones:

**Tabla 9.** Fechas y condiciones de aplicación de la cepa XT1 en viñedos.

Fecha de aplicación	Estado fenológico
15 de junio	Inicio-plena floración
27 de junio	Cuajado
24 de julio	Cierre racimo
24 de agosto	Inicio de envero

La cepa XT1 se aplicó foliarmente a una dosis de 600 L/Ha con una concentración de  $10^6$  UFC/mL. El primer día de tratamiento se utilizaron papeles hidrosensibles colocados en cinco zonas diferentes de cada finca que indicaron si el tratamiento se aplicaba de forma homogénea o no.

La viabilidad en campo de la cepa XT1 se estudió mediante el muestreo de racimos cada quince días/mensualmente (dependiendo del estado fenológico y los tratamientos aplicados) y su posterior análisis microbiológico. Para ello, del zumo procedente del macerado de los frutos se realizaron diluciones seriadas en solución salina 0,9% (p/v) y se sembraron en agar nutritivo.



Por último, se evaluó la eficacia del agente de biocontrol para evitar el desarrollo de la enfermedad. De cada una de las fincas tratadas se tomaron 100 muestras para determinar tanto el porcentaje de incidencia en fruto (porcentaje de frutos afectados) como del grado de infección. La severidad fue calculada utilizando el índice de Mckinney y una escala de grados de infección del 1 al 3, donde: 1= planta afectada en 0-25%; 2= 25-50%; 3=50-75%:

$$\text{Índice de infección} = \left[ \sum (d \times f) / (N \times D) \right] \times 100$$

Donde d corresponde con la intensidad, f con la frecuencia, N con el número total de frutos examinados (sanos y afectados) y D con la categoría más alta de intensidad observada (100%).

### **6.2.3 Determinación de la capacidad de la cepa XT1 para fomentar la resistencia a *B. cinerea* en plantas de tomate, fresa y vid**

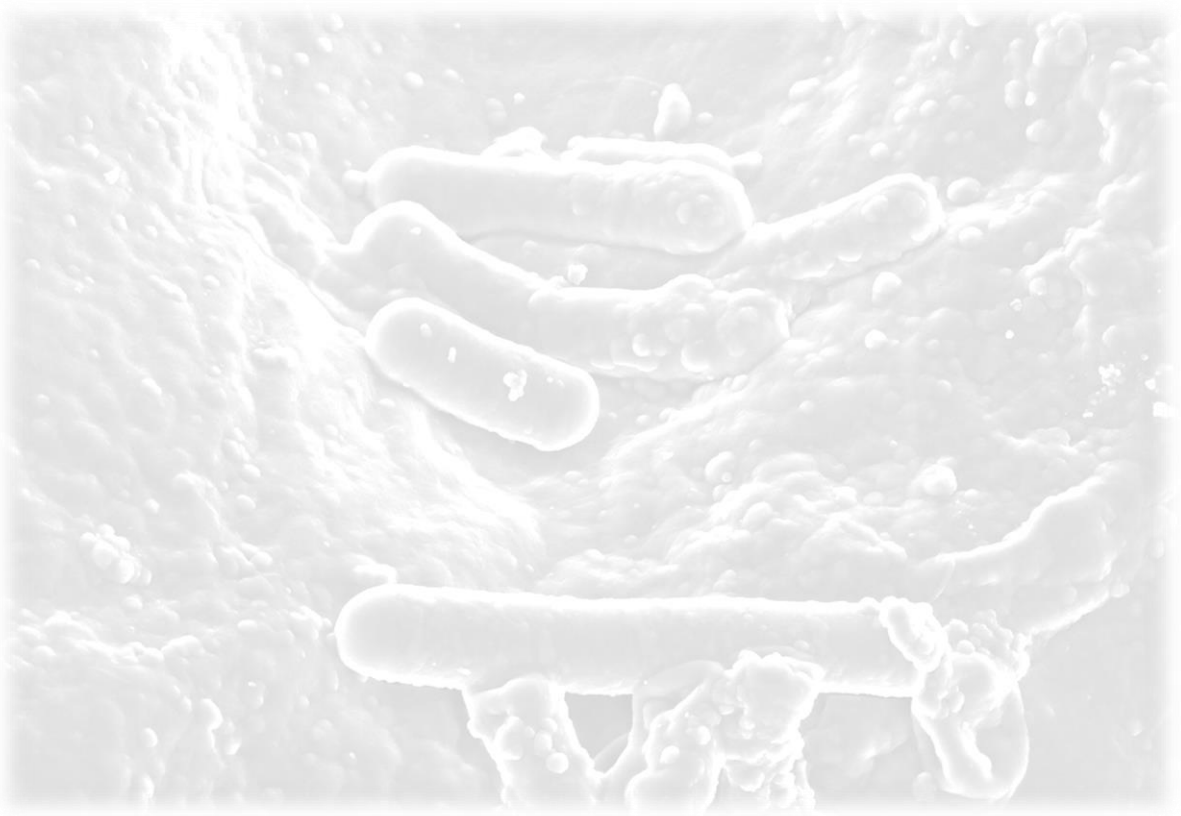
Finalmente, tras los experimentos *in vivo* en fresa, tomate y vid, se evaluó la capacidad de resistencia de las plantas tratadas con la cepa XT1 mediante ensayos de *priming* en muestras foliares tomadas de cada uno de los tratamientos de los tres cultivos. En placas Petri cuadradas (Deltalab®) de 12x12 mm se dispuso una capa de esferas de cristal de 3 mm de diámetro y se vertieron 25 mL de agua destilada estéril. Sobre la capa de esferas se colocaron las hojas procedentes de cada uno de los tratamientos y se realizaron incisiones en tres puntos mediante un bisturí estéril. Las heridas fueron inoculadas con 15 µl de una suspensión de *B. cinerea* 10<sup>6</sup> conidios/mL. Como control, para poder observar la degeneración natural de las muestras foliares, se tomaron hojas procedentes de plantas sin ningún tipo de tratamiento y sus incisiones no se inocularon con el patógeno. Las placas se sellaron con parafilm para mantener la humedad y se incubaron a 21°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo establecido se determinó el porcentaje de infección en cada uno de los tratamientos de acuerdo a la siguiente escala: 0= hoja sin síntomas; 1= hoja afectada en 1-33%; 2= 34-66%; 3=67-99%; 4= hoja totalmente deteriorada.

## **RESULTADOS**

---



**1. Caracterización fenotípica de la cepa *Bacillus velezensis* XT1 e implicación de sus metabolitos secundarios en el control biológico de *Botrytis cinerea***





## Resumen

En este capítulo se ha caracterizado fenotípicamente la cepa *B. velezensis* XT1 y se han analizado las diferencias bioquímicas y fisiológicas con la especie tipo de *B. methylotrophicus* (cepa LMG 27586<sup>T</sup>) debido a que la cepa XT1 fue inicialmente incluida en la especie *B. methylotrophicus*. En la actualidad, *B. methylotrophicus* se ha reclasificado como *B. velezensis*.

Por otro lado, se ha realizado el análisis de las condiciones óptimas para la producción de metabolitos secundarios por XT1, llevando a cabo su caracterización y el análisis de su implicación en la actividad antifúngica frente al fitopatógeno *B. cinerea*.

La cepa XT1 es capaz de alcanzar, tras 24h de incubación y 28°C de temperatura, concentraciones celulares superiores a 10<sup>8</sup> UFC/mL independientemente del medio de cultivo usado, con una estabilidad y viabilidad en el tiempo de al menos cuatro meses. Tiene una gran versatilidad metabólica pudiendo utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono, presenta una elevada actividad proteolítica, amilolítica y fosfatasa; es capaz de fijar nitrógeno, producir sideróforos y tiene actividad ACC desaminasa; todas estas características están normalmente presentes en las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

El cultivo celular de XT1 inhibe el desarrollo de *B. cinerea* en un 40% mientras que su sobrenadante detiene por completo su crecimiento. Además, se ha comprobado la compatibilidad de la cepa XT1 con un 73% de los productos agroquímicos testados de uso rutinario en campo.

El análisis por espectrometría de masas de ionización por electrospray Q-TOF nos permitió detectar diferentes lipopéptidos en cultivos de XT1, tales como surfactina, bacilomicina y fengicina. No se detectó la producción de iturina a pesar de haber encontrado los genes responsables de su síntesis. La máxima producción de lipopéptidos se logró en medio MOLP (10 g/L). La fracción lipopeptídica es termoestable pero sensible a valores extremos de pH. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida de dichos compuestos frente a *B. cinerea* se cuantificó en 8 mg/L. Los estudios de antibiosis *in vitro* demuestran la eficiencia de la fracción lipopeptídica en la inhibición del crecimiento fúngico. De hecho, el análisis mediante microscopía (SEM/TEM) revela alteraciones en la morfología del patógeno en interacción con los lipopéptidos, desarrollándose estructuras de resistencia en los estadios tempranos de crecimiento. Por otro lado, estudios llevados a cabo en tomates, uvas y fresas demuestran la eficacia de la fracción lipopeptídica de *Bacillus velezensis* XT1 frente a la infección causada por *B.*

*cinerea* y su capacidad de desencadenar una actividad antioxidante en los frutos analizados.

El análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COVs), producidos por la cepa XT1, mediante espectrometría de masas GC-TOF nos permitió detectar 16 componentes mayoritarios entre los que se identificaron 4-metiloctano, nonano, pentadieno, disulfuro de dimetilo, 2,3 butanodiol, acetoína, 4-metil-2-hexanona, 2-heptanona y butil acetato. La producción de COVs y su actividad antifúngica están relacionados con el medio de cultivo empleado en el crecimiento de la bacteria, alcanzándose los mayores porcentajes de inhibición de *B. cinerea* (93%) en medio MOLP. Mediante el análisis por microscopía electrónica SEM y TEM se observaron alteraciones y destrucción celular en las hifas del hongo expuestos a los COVs de la cepa XT1.

En el estudio comparativo realizado con la cepa LMG 27586<sup>T</sup>, se pudo constatar que la cepa XT1, presenta una actividad amilolítica superior, produce fosfatasa ácida, mayor cantidad de sideróforos, lipopéptidos y una mayor actividad de COVs siendo estos últimos diferentes desde el punto de vista químico.

Los resultados destacan el potencial de los metabolitos producido por la cepa XT1 como agentes de control biológico contra la infección de *B. cinerea*.

## 1.1 Caracterización bioquímica y fisiológica de la cepa XT1

### 1.1.1 Crecimiento en distintos medios de cultivo

Se analizaron las diferencias bioquímicas y fisiológicas de la cepa XT1 con la especie tipo de *B. methylotrophicus* (cepa LMG 27586<sup>T</sup>) debido a que dicha cepa fue inicialmente incluida en la especie *B. methylotrophicus*. En la actualidad *B. methylotrophicus* se ha reclasificado como *B. velezensis*. La determinación de la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> se realizó empleando los medios SG, MOLP y MM. Tras 24 h de incubación y 28°C de temperatura se determinó que la cepa XT1 es capaz de utilizar eficientemente los tres medios de cultivo para su crecimiento, siendo el mejor de todos el medio MOLP donde alcanzó concentraciones de 10<sup>9</sup> UFC/mL (Tabla 10):

**Tabla 10.** Concentración (UFC/mL) alcanzada por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en los medios SG, MM y MOLP.

	Concentración UFC/mL		
	SG	MM	MOLP
XT1	2,0 x 10 <sup>8</sup>	2,3 x 10 <sup>8</sup>	1,6 x 10 <sup>9</sup>
LMG 27586 <sup>T</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	9,3 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>

### 1.1.2 Estabilidad de la cepa XT1

Para el estudio de la estabilidad de la cepa XT1 en el tiempo, se hicieron recuentos mensuales de muestras almacenadas tanto de sedimento celular liofilizado a temperatura ambiente y a 4°C, como de cultivo líquido mantenido a temperatura ambiente durante 4 meses. En la tabla 11 se puede observar como a lo largo del tiempo establecido ninguno de los cultivos pierde viabilidad, alcanzando en todos los recuentos concentraciones de 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> UFC/mL tras diluir 0,1 g de liofilizado en 5 mL de MgSO<sub>4</sub> al 20 % (p/v).



**Tabla 11.** Viabilidad del cultivo líquido y liofilizado de la cepa XT1 en el tiempo.

		Concentración UFC/mL				
		Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	
Muestras desecada	4°C	A	$7,3 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
		B	$1,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
		C	$1,2 \times 10^9$	$6,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
	Temperatura ambiente	A	$8,3 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
		B	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$8,2 \times 10^8$
		C	$1,1 \times 10^9$	$9,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
Cultivo líquido	Temperatura ambiente	$8,6 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	

Las letras A, B y C se corresponde con cada una de las tres repeticiones de medida realizadas en cada recuento

### 1.1.3 Caracterización de las cepas XT1 y *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>

En primer lugar, se evaluó el crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> a concentraciones crecientes de salinidad (0-12,5% p/v) y pH (3-12). Para ello, alícuotas de ambos cultivos se inocularon en placas con los medios SG, MOLP y MM preparados con distintos valores de los parámetros a evaluar. Tras siete días de incubación, en los medios MM y SG las dos cepas mostraron crecimiento a pH comprendidos entre 4 y 10, ambos inclusive. En medio MOLP no hubo crecimiento a pH 10 para ninguno de los dos microorganismos. En cuanto a la salinidad, al igual que en el caso anterior los medios SG y MM favorecieron el crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en un rango más amplio, mostrando crecimiento hasta en valores del 12,5% (p/v) de salinidad. Sin embargo, en medio MOLP las cepas tan sólo resisten valores de hasta el 10% (p/v) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Rango de valores de salinidad y pH para el crecimiento de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en los medios SG, MM y MOLP.

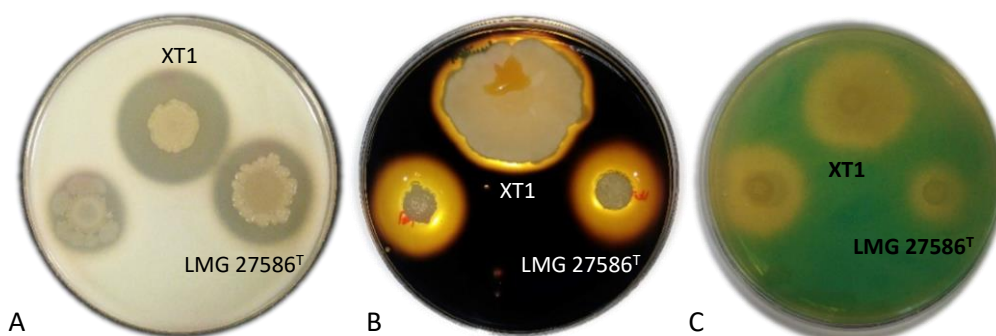
	Rango de crecimiento	
	pH	Salinidad
SG	4-10	0-12,5 %
MM	4-10	0-12,5 %
MOLP	4-9	0-10 %

A continuación, se caracterizaron ambos microorganismos (Tabla 13). Tanto la cepa XT1 como LMG 27586<sup>T</sup> tienen una elevada actividad proteolítica, amilolítica (Fig. 19A y B), son capaces de fijar nitrógeno, producir sideróforos (Fig. 19C) y tienen actividad ACC desaminasa. Sin embargo, a diferencia de la cepa LMG 27586<sup>T</sup>, la cepa XT1 tiene la

habilidad de solubilizar ambos tipos de fosfatos, mientras que LMG 27586<sup>T</sup> no tiene actividad fosfatasa ácida.

**Tabla 13.** Caracterización fenotípica de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>.

		XT1	LMG 27586 <sup>T</sup>
Hidrólisis de...	Almidón	+	+
	Gelatina	+	+
	Caseína	+	+
	Tween 20	+	+
	Tween 80	-	+
Producción de fosfatasas	Ácida	+	-
	Alcalina	+	+
Fijación de nitrógeno		+	+
Producción de sideróforos		+	+
Producción de ACC desaminasa		+	+



**Figura 19.** Actividad enzimática de las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>. A) Caseinasa, B) amilasa y C) producción de sideróforos.

Por último la caracterización bioquímica mediante los sistemas estandarizados API<sup>®</sup> 20 ZYM, API<sup>®</sup> 20NE y API<sup>®</sup> 50 CH no demostró diferencias entre ambas cepas. Tanto XT1 como LMG 27586<sup>T</sup> fueron positivas para las actividades enzimáticas: esterasa, lipasa, valina, quimiotripsina, fosfatasa alcalina, naftol,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosamida. En cuanto al metabolismo de los hidratos de carbono fueron positivas para: glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ D-glucopiranosido, amigdalina, arbutina, esculina, D-celobiosa, D-maliosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa. Las pruebas de identificación del test API<sup>®</sup> 20 NE fueron positivas para esculina, gelatina, D-glucos, L-

arabinosa, D-manosa, M-manitol, N-acetil-glucosamina, D-maltosa, ácido málico y citrato de sodio.

#### 1.1.4 Actividad antifúngica

La determinación de la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* en medio sólido reveló que la cepa XT1 es capaz de inhibir el desarrollo del hongo en más de un 40% (Fig. 20A). En medio líquido, se determinó la actividad antifúngica enfrentando el sobrenadante obtenido tras el cultivo de 72 horas, en medio MOLP, SG o MM de la cepa XT1 a una suspensión de esporas de *B. cinerea*. Tal y como se observa en la figura 20B, los tres sobrenadantes inhibieron por completo el desarrollo del micelio del hongo en los pocillos, observándose en dichos tratamientos resultados similares a los obtenidos en el control de inhibición realizado con cicloheximida.

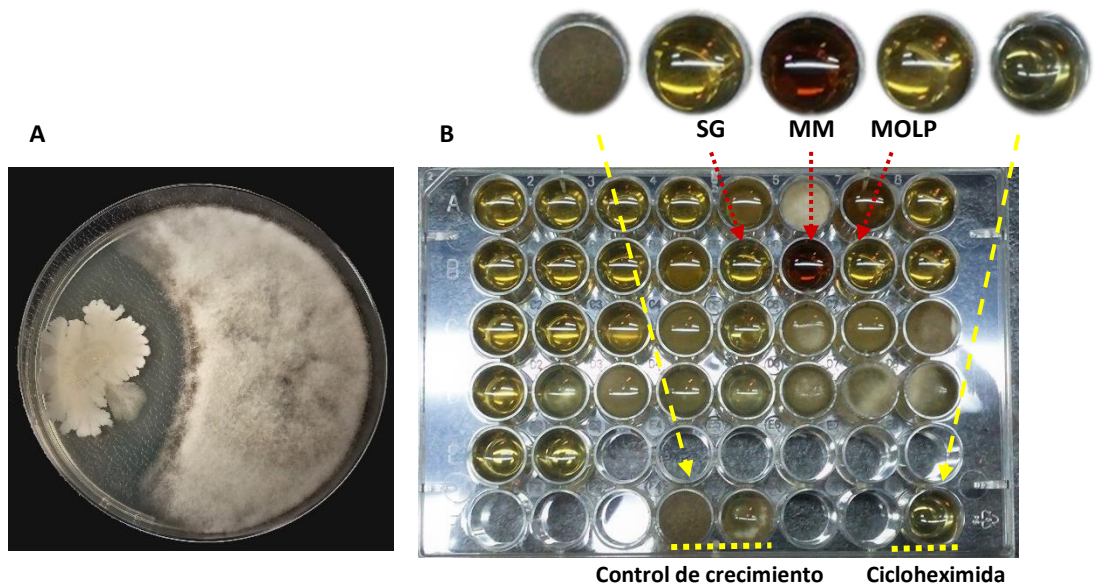


Figura 20. Actividad antifúngica de la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en medio sólido (A) y en medio líquido (B).

#### 1.1.5 Compatibilidad con productos agroquímicos.

Para evaluar la viabilidad de la cepa XT1 con pesticidas químicos de uso rutinario en campo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de estos compuestos en medio sólido. En la tabla 14 se observa como la cepa XT1 crece a las concentraciones de referencia normalmente empleadas en campo con los fungicidas Arius®, Collis®, Dynali®, Flint®, Luna Experience® y Systhane®; con el producto basado en

azufre en polvo Cepsus Especial®; con los insecticidas Audace® y Runner® y con el acaricida Apache®. La CMI con el fungicida Systhane® se alcanzó diluyendo la concentración de referencia a la mitad. Para el resto de los compuestos se hubo de rebajar la dosis inicial ocho (Droxicuper 50® y Closar Le®), dieciséis (Armicarb®) e incluso treinta y dos veces (Karathane Star®).

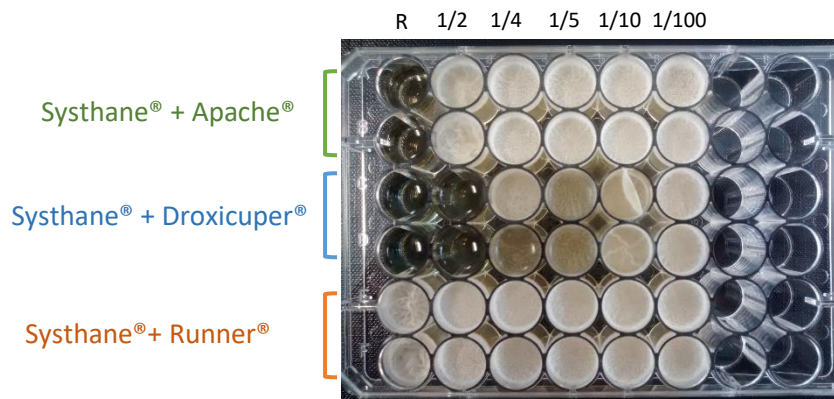
Tabla 14. Compatibilidad de la cepa XT1 con productos agroquímicos usados habitualmente en campo.

Producto registrado	Dosis empleada					
	Ref/32	Ref/16	Ref/8	Ref/4	Ref/2	Referencia
Arius	+	+	+	+	+	+
Armicarb (S)	+	+	-	-	-	-
Collis	+	+	+	+	+	+
Droxicuper-50 (S)	+	+	+	-	-	-
Dynali	+	+	+	+	+	+
Flint (S)	+	+	+	+	+	+
Karathane Star	+	-	-	-	-	-
Luna Experience	+	+	+	+	+	+
Systhane	+	+	+	+	+	-
Vivando	+	+	+	+	+	+
Cepsul Especial (S)	+	+	+	+	+	+
Audace	+	+	+	+	+	+
Closar LE	+	+	+	-	-	-
Runner	+	+	+	+	+	+
Apache	+	+	+	+	+	+

Concentraciones de referencia y sus diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32.

Se indican las concentraciones mínimas inhibitorias.

Posteriormente se analizó el crecimiento de la cepa XT1 en combinación con las tres mezclas de productos fitosanitarios más empleados en agricultura: Systhane® + Apache®; Systhane® + Runner® y Systhane® + Droxicuper®. Para ello, en placas multipocillos se testó el crecimiento del microorganismo a las concentraciones de referencia y a las diluciones 1/2, 1/4, 1/5, 1/10, y 1/100. Tal y como se aprecia en la figura 21 la cepa XT1 fue capaz de crecer en la mezcla Systhane® + Runner® a la concentración de referencia. En la mezcla Systhane® + Apache® la cepa XT1 se desarrolló a la concentración de referencia diluida a la mitad y en la mezcla Shystane® + Droxicuper®, tan sólo se alcanzó un crecimiento semejante a los anteriores en la dilución 1/10.



**Figura 21.** Crecimiento de la cepa XT1 en combinación con mezclas habituales de productos agroquímicos. R: concentración de referencia; diluciones de la concentración de referencia 1/2, 1/4, 1/5, 1/10 y 1/100.

## 1.2. Producción de lipopéptidos por la cepa XT1

Se emplearon tres medios de cultivo distintos (MOLP, SG y MM) para comparar la capacidad de producción de lipopéptidos de la cepa XT1. Los datos mostrados en la tabla 15 demuestran que el medio MOLP incrementa la producción de estos metabolitos en comparación con los otros medios testados.

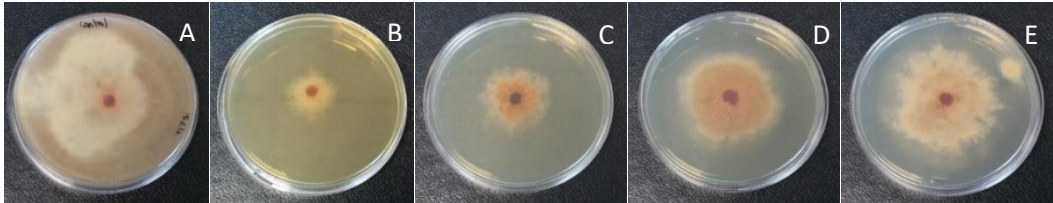
**Tabla 15.** Producción de lipopéptidos por la cepa XT1 en distintos medios de cultivo.

Medio de cultivo	Rendimiento (g/L)
MOLP	10
SG	2,8
MM	2,13

### 1.2.1 Actividad antifúngica de los lipopéptidos

Se emplearon placas con medio PDA disuelto en concentraciones crecientes de solución de lipopéptidos (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 mg/mL) para analizar la actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica secretada por XT1 contra *B. cinerea*. Los resultados demostraron que los lipopéptidos producidos por esta cepa inhiben el crecimiento de *B. cinerea*. Tras 15 días de incubación se observaron tasas de inhibición del micelio del 72%, 48%, 30% y 19% para las concentraciones de lipopéptido 10, 6, 4 y 2 mg/mL, respectivamente (Fig. 22). En general, los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 mostraron actividad antagonista frente a *B. cinerea* en un amplio rango de

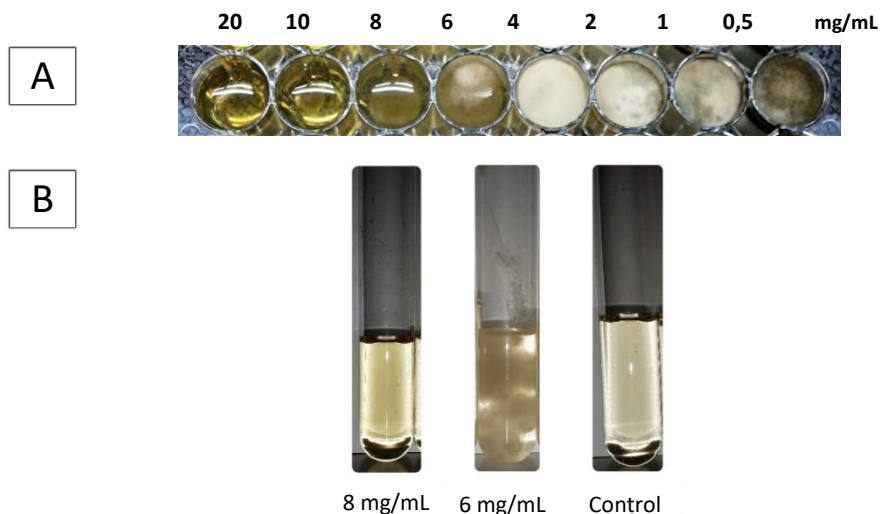
concentraciones, aunque la respuesta fúngica venía determinada por la dosis de metabolito empleada en cada caso.



**Figura 22.** Efecto de distintas concentraciones de la fracción lipopeptídica (mg/mL) de XT1 frente a *B. cinerea* control negativo (A), 10 mg/mL (B), 6 mg/mL (C), 4 mg/mL (D) y 2 mg/mL (E).

### 1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima fungicida (CMF) de los lipopéptidos

Se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los metabolitos extraídos de la cepa XT1, para ello se emplearon placas de cultivo celular con 48 pocillos y, posteriormente, a partir de estos co-cultivos se analizó la concentración mínima fungicida. Como se muestra en la figura 23, se evaluó un amplio espectro de concentraciones que comprendía valores entre 0,5 y 20 mg/mL. Se observó un claro efecto inhibitorio para las concentraciones 20 y 10 mg/mL (Fig. 23A), siendo 8 mg/mL el valor correspondiente a la CMI. La concentración mínima fungicida determinada en crecimiento en tubos de PDB tras 7 días de incubación fue también de 8 mg/mL (Fig. 23B).



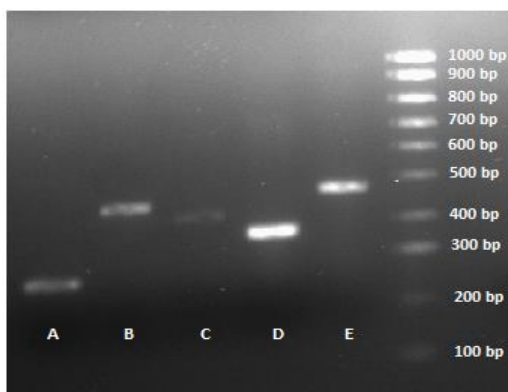
**Figura 23.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) (A) y concentración mínima fungicida (CMF) (B) de los lipopéptidos producidos por XT1.

### 1.2.3 Estabilidad de los lipopéptidos frente a variaciones de temperatura y pH

Los tratamientos de temperatura, a 100°C durante 10, 30 y 60 minutos y a 121°C durante 20 minutos, a los que se sometió la fracción lipopeptídica no afectaron a su capacidad antifúngica frente a *B. cinerea*. Sin embargo, los valores de pH 3 y 12 tuvieron repercusiones negativas en dicha capacidad, inhabilitando la actividad de los metabolitos frente al fitopatógeno. El rango óptimo en los valores de pH para su mayor eficacia antifúngica se estableció entre 7 y 9.

### 1.2.4 Genes implicados en la biosíntesis de lipopéptidos

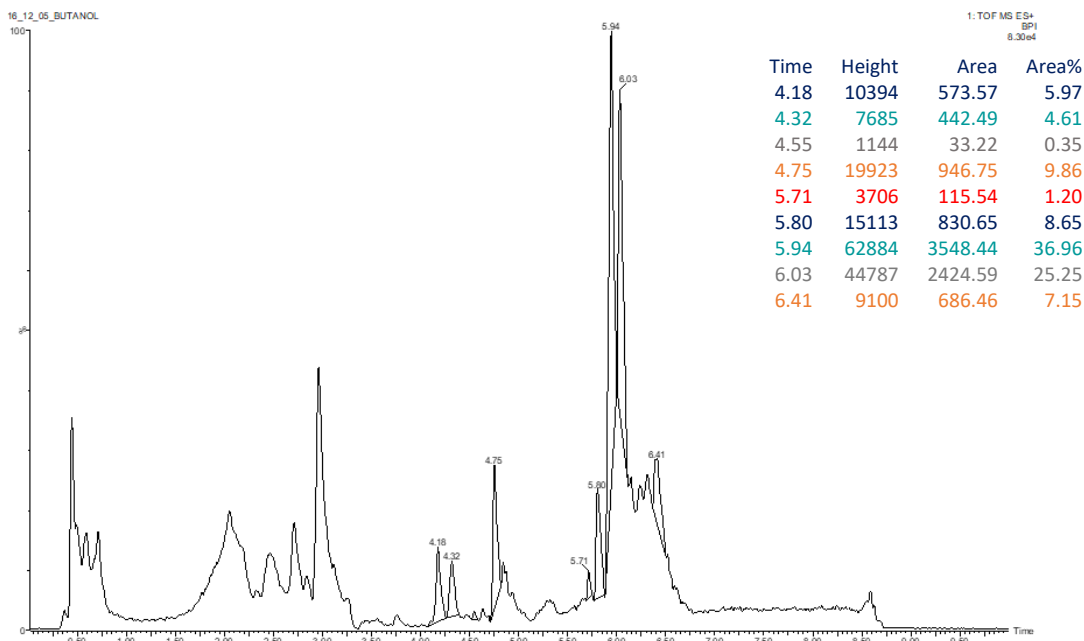
El análisis genómico por PCR indicó que la cepa XT1 contiene un *cluster* de genes relacionado con la codificación de sintetasa lipopeptídica no ribosomales. Tal y como se muestra en la figura 24 se obtuvieron amplificadas de pesos moleculares similares a los previamente descritos para los genes que codifican fengicinas, surfactinas, bacilomicinas e iturinas (*srfA-C*, *fenC*, *srfA-A*, *bmyB* y *ituD*, respectivamente).



**Figura 24.** Análisis mediante PCR de los genes relacionados con la biosíntesis de lipopéptidos. A, surfactina/liquisina; B, fengicina; C, surfactina; D, bacilomicina; y E, iturina. Hyperladder® IV, 100 pb.

### 1.2.5 Identificación de los lipopéptidos mediante UPLC-HDMS Q-TOF

Para cuantificar e identificar los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 se realizaron ensayos cuantitativos mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas de alta definición (UPLC-HDMS Q-TOF). En la figura 25 se muestra el espectro del cromatograma de iones totales (TIC, *total ion chromatogram*) del extracto obtenido del sobrenadante del cultivo de la cepa XT1 en medio MOLP.



**Figura 25.** Espectro del cromatograma de iones totales (TIC) del extracto obtenido del sobrenadante del cultivo de la cepa XT1.

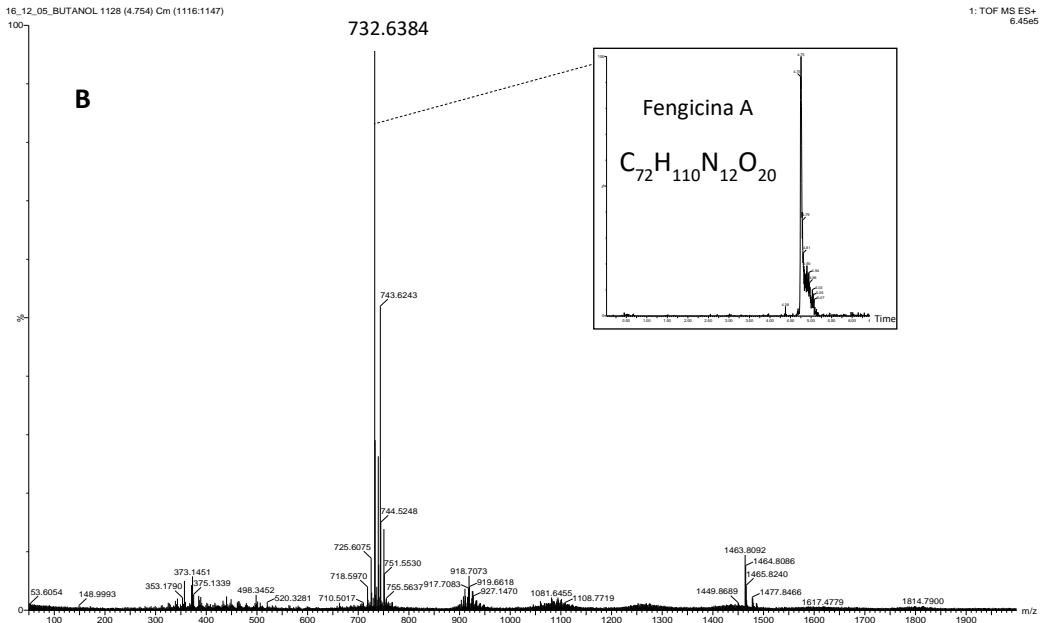
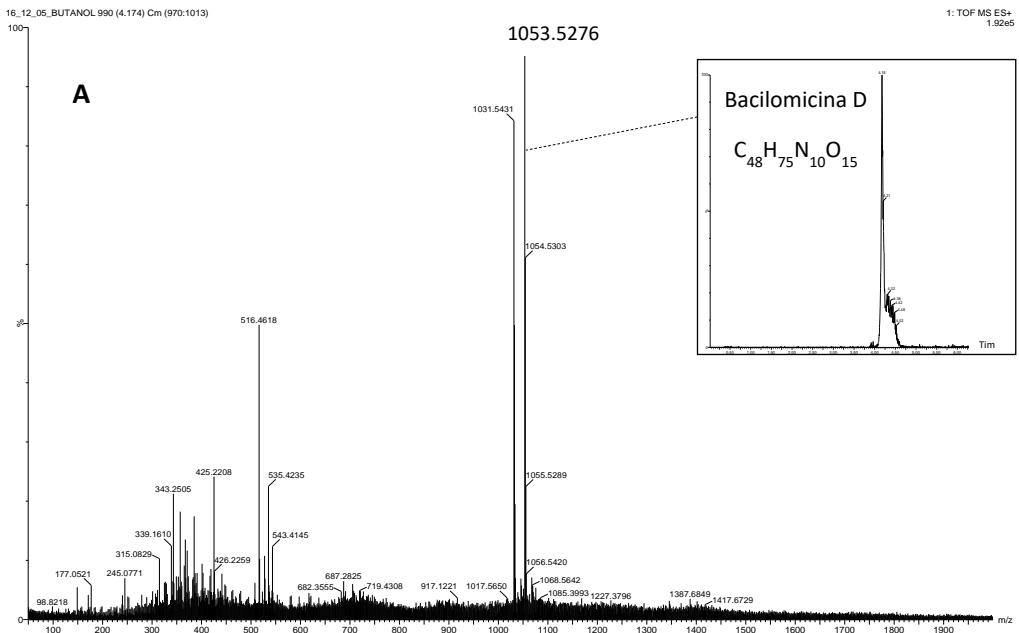
El análisis de los cromatogramas generados muestra que la cepa XT1 es capaz de producir diversas isoformas de diferentes estructuras lipopeptídicas. Se detectaron cuatro surfactinas descritas previamente con cadenas de ácidos grasos cuyo contenido en átomos de carbono variaba de C12 a C15. Se identificaron además tres bacilomicinas D (C14, C15 y C16) y dos picos correspondientes a la fengicina A y fengicina B (Tabla 16). A pesar de haberse detectado en la identificación genética de producción de lipopeptidos genes *ituD*, en los cromatogramas analizados no se detectaron señales correspondientes a iturinas.

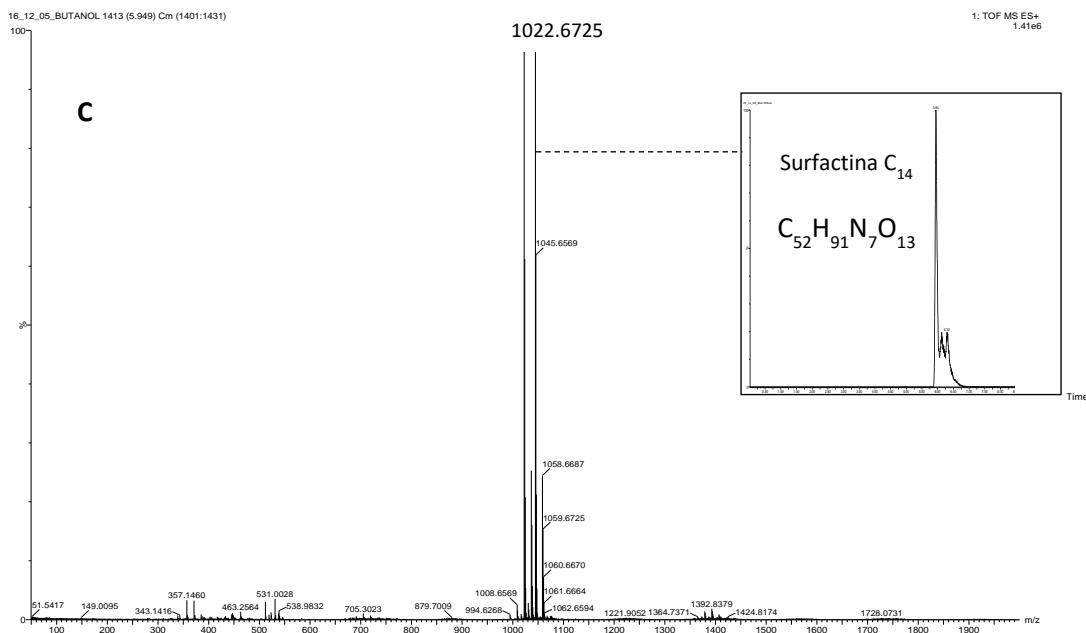
**Tabla 16.** Lipopéptidos detectados mediante Q-TOF MS producidos por la cepa XT1.

Lipopéptido	Longitud cadena grasa	[M+H] <sup>+</sup>	Tiempo de retención (min)	Area (%)	Intensidad del pico
Bacilomicina D	C14	1031.5431	4.18	5.97	1.02e4
	C15	1045.5585	4.32	4.61	8.35e3
	C16	1059.5726	4.55	0.35	1.31e3
Fengicina A	C16	1463.8038	4.75	9.86	4.81e3
Fengicina B	C15	1477.8329	4.86	0.60	1.65e3
	C16	1491.8481	4.86	0.60	1.01e3
Surfactina	C12	994.6413	5.71	1.20	4.22e3
	C13	1008.6564	5.80	8.65	1.06e4
	C14	1022.6729	5.94	36.96	8.40e4
	C15	1036.6867	6.03	25.25	6.60e4



El análisis por espectrometría de masas reveló la presencia de cuatro tipos de lipopéptidos siendo dos de ellos los componentes mayoritarios. En dicho estudio, llevado a cabo empleando ionización positiva, se detectó la presencia mayoritaria de bacilomicina D con un pico [M+H] con  $m/z$  1031.8038 (o 1053.5276 de su aducto de sodio complementario [M+Na]) con la fórmula molecular  $C_{48}H_{75}N_{10}O_{15}$  (i-Fit = 130.3 y DBE = 23.5), de fengicina A con un pico [M+H] con  $m/z$  1463.838 cuya fórmula molecular correspondiente es  $C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$  (i-Fit = 130.3 and DBE = 23.5), y de surfactina con un pico [M+H] con  $m/z$  1022.6729 y formulada como  $C_{52}H_{91}N_7O_{13}$  (i-Fit = 131.5 y DBE = 10.5) (Fig. 26 A, B y C, respectivamente).





**Figura 26.** Cromatogramas obtenidos mediante espectrometría de masas UPLC-HDMS Q-TOF a partir del surfactante producido por la cepa XT1. Derivados lineales protonados [M+H] de bacilomicina D C14 (A), fengicina A C16 (B) y surfactina C14 (C).

### 1.2.6 Bioensayos de actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por XT1 frente a *B. cinerea*

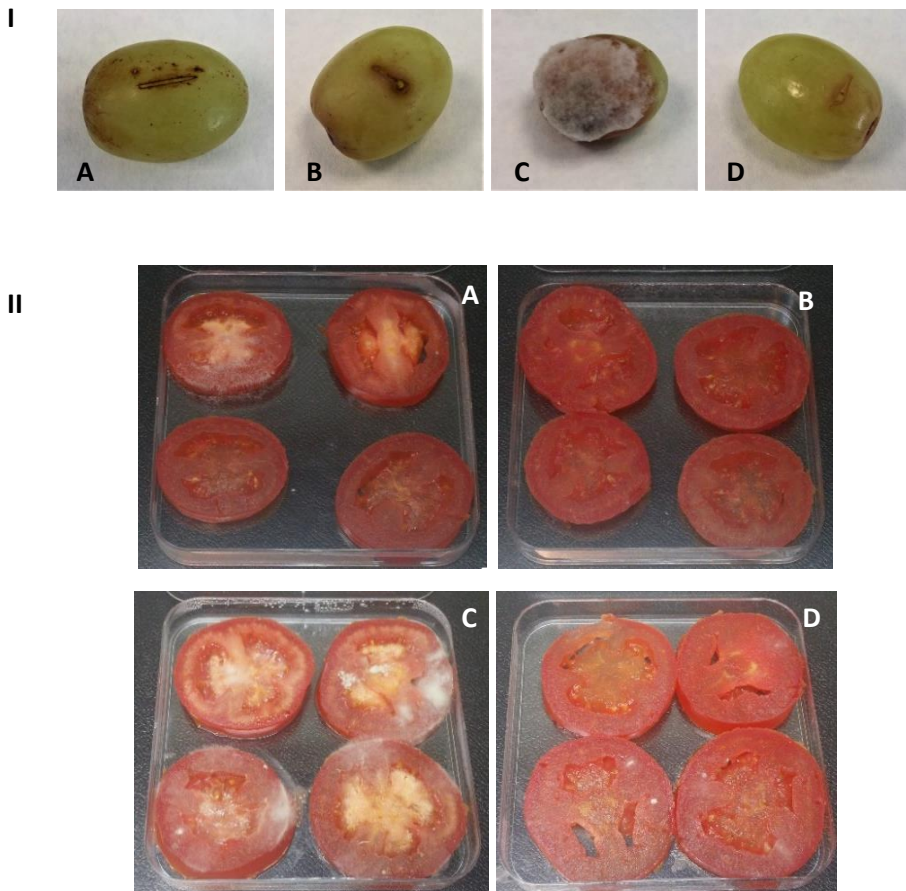
Con el fin de evaluar el efecto protector de la fracción lipopeptídica de XT1 en frutos infectados con *B. cinerea* se empleó la concentración 8 mg/mL correspondiente a los valores de CMI y CMF. Los tratamientos fueron por inyección en el caso de los bioensayos con uvas y por pulverización para los realizados con fresa y tomate.

Los niveles de incidencia de enfermedad en uvas y tomates infectados con *B. cinerea* fueron del 71, 100 y 100%, respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de reducción de la enfermedad en frutos tratados con los lipopéptidos fue de 100, 12 y 50%, respectivamente (Tabla 17). Los resultados revelaron que los síntomas de infección disminuyeron significativamente en las frutas sobre las que se empleó el tratamiento antifúngico (Fig. 27).

**Tabla 17.** Incidencia de infección (%) por *B. cinerea* en frutos de uva, fresa y tomate tratados o no con la fracción lipopeptídica de XT1.

	Incidencia de INFECCIÓN (%)			
	Control	XT1 lipopéptidos	<i>Botrytis</i>	XT1 lipopéptidos+ <i>Botrytis</i>
<b>UVA</b>	0 ± 0,00a	0 ± 0,00a	71 ± 0,18b	0 ± 0,00a
<b>FRESA</b>	43 ± 0,25b	33 ± 0,00a	100 ± 0,00d	88 ± 0,58c
<b>TOMATE</b>	25 ± 0,20b	0 ± 0,17a	100 ± 0,00d	50 ± 0,13c

Los valores identificados con la misma letra en cada fruta indican diferencias no significativas de acuerdo al test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

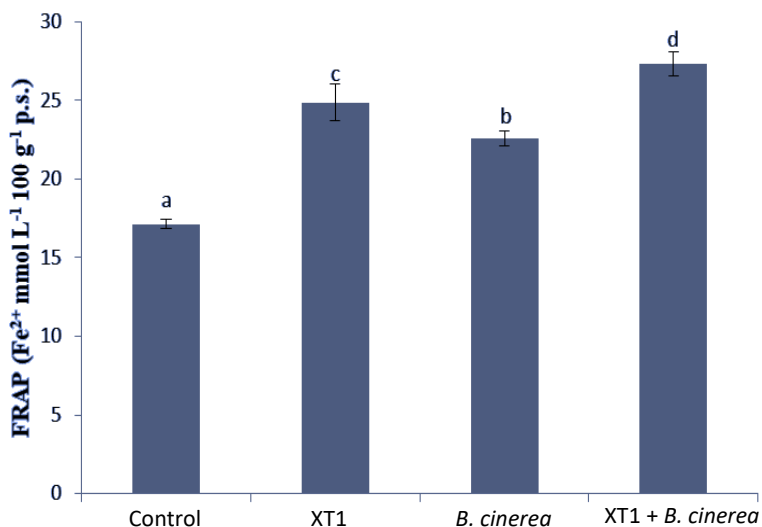


**Figura 27.** Actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 en uva (I) y tomate (II) frente a *B. cinerea*. (A) Control negativo tratado con agua estéril, (B) uvas/tomates tratados con fracción lipopeptídica de la cepa XT1, (C) uvas/tomates infectados con *B. cinerea* y (D) uvas/tomates infectados con *B. cinerea* y tratadas con lipopéptidos de la cepa XT1.

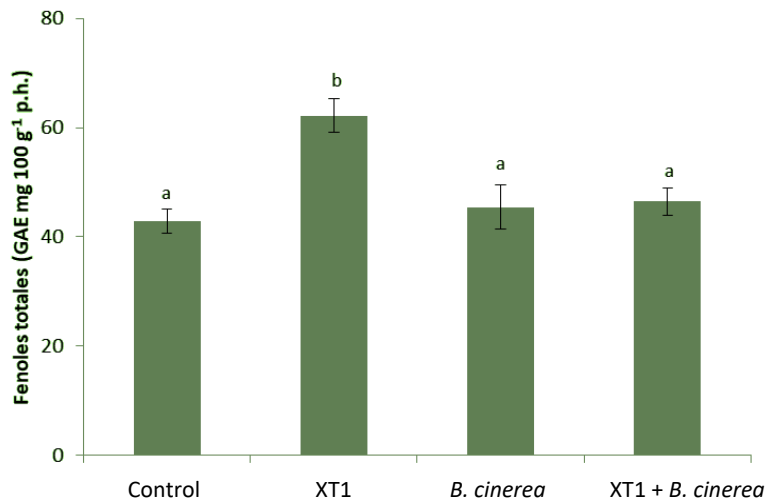
### 1.2.7 Determinación de la actividad antioxidante de los lipopéptidos producidos por XT1 en frutos

La actividad antioxidante fue testada en uvas donde se pudo observar gran reducción de la infección provocada por *B. cinerea* tras ser tratados con la fracción lipopeptídica producida por la cepa XT1. Los extractos obtenidos del liofilizado de dichos frutos mediante extracción orgánica, permitieron la estimación mediante el ensayo FRAP (*ferric iron reducing antioxidant power assay*) de los valores de iones  $\text{Fe}^{2+}$  en 100 g de peso seco de fruto, datos directamente relacionados con la cantidad de fenoles solubles presentes. Tal y como se aprecia en la figura 28, las muestras inoculadas con una concentración de 8 mg/mL de la fracción lipopeptídica obtenida de la cepa XT1, mostraron un incremento significativo de los valores de iones  $\text{Fe}^{2+}$  con respecto al resto de los tratamientos sin lipopéptidos de XT1. Aunque también se observa un incremento en los valores de actividad antioxidante en los extractos procedentes de frutos infectados con el patógeno, los datos de mayor valor se observaron en los tratamientos con lipopéptidos.

Por otro lado, la exposición del fruto a la fracción lipopeptídica también produjo un incremento en el contenido fenólico total, no obstante dicho incremento tan sólo fue significativo en las uvas sin infectar con el patógeno y tratadas con los lipopéptidos. En este caso el aumento del contenido total de fenoles fue del 30% (Fig. 29).



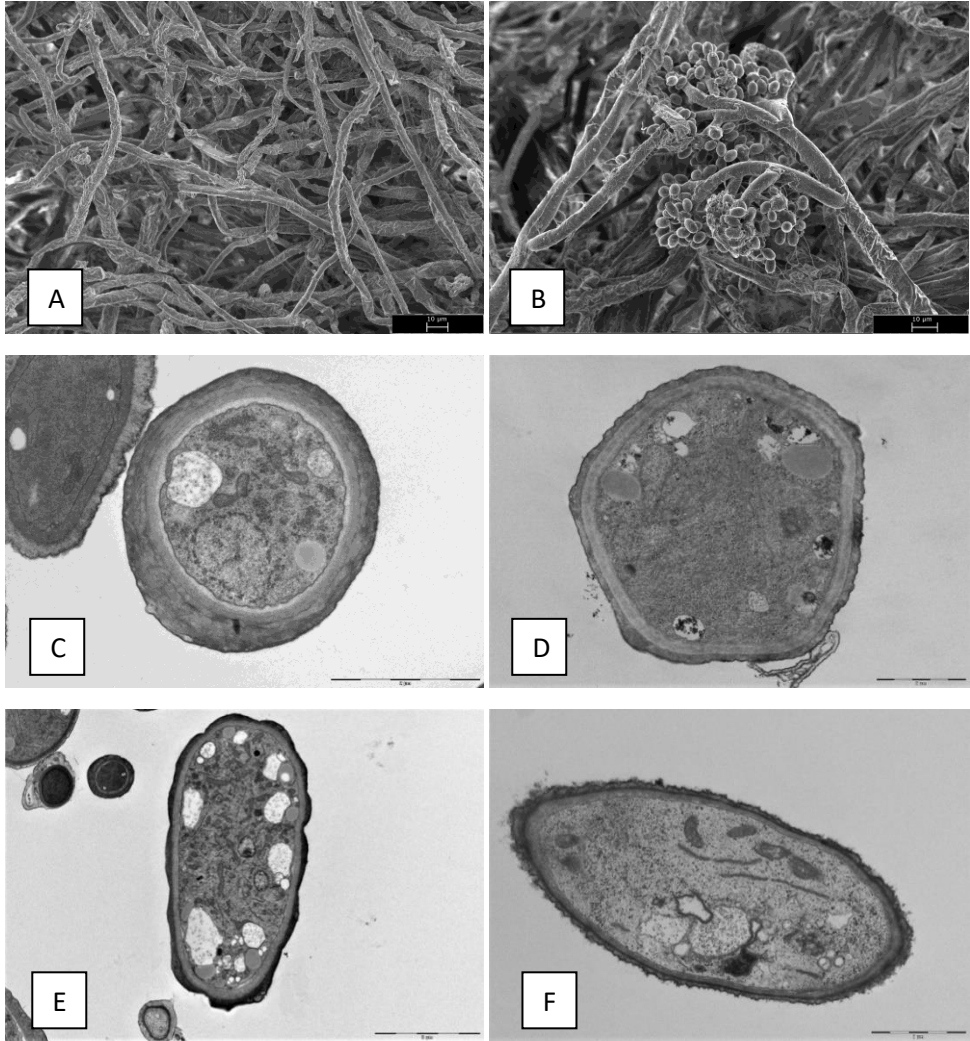
**Figura 28.** Actividad antioxidante evaluada mediante ensayo FRAP en uvas tratadas con lipopéptidos extraídos de la cepa XT1, infectados con *B. cinerea* e infectados con *B. cinerea* pero tratados con la fracción lipopeptídica de XT1. De acuerdo con el test de Duncan ( $p < 0.05$ ), los valores nombrados con las mismas letras no tienen diferencias significativas.



**Figura 29.** Contenido total de fenoles en uvas tratadas con lipopéptidos extraídos de la cepa XT1, infectados con *B. cinerea* e infectados con *B. cinerea* pero tratados con la fracción lipopeptídica de XT1. De acuerdo con el test de Duncan ( $p < 0.05$ ), los valores nombrados con las mismas letras no tienen diferencias significativas. Las líneas verticales representan los valores de error estándar de cada uno de los tratamientos.

### 1.2.8 Análisis microscópico del efecto de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 en *B. cinerea*

En la figura 30 se muestran los resultados de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) del micelio de *B. cinerea* tratado con lipopéptidos producidos por la cepa XT1. Tras el tratamiento con las concentraciones CMI o CMF de la solución lipopeptídica (8 mg/mL), el análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló importantes alteraciones morfológicas en las hifas del patógeno. Se pudo observar en *B. cinerea* sin tratamiento un desarrollo uniforme de las hifas mostrando su superficie lisa (Fig. 30A). Sin embargo, uno de los rasgos más llamativos tras la exposición a los metabolitos producidos por la cepa XT1, fue la aparición de un elevado número de estructuras de resistencia (Fig. 30B). Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las hifas sin ningún tratamiento mostraron superficies lisas, células intactas, paredes celulares bien definidas y una disposición idónea de todos los orgánulos (Fig.30C, E). No obstante, las imágenes TEM de *B. cinerea* enfrentado a los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 mostraron la degeneración de los orgánulos y la alteración en su disposición (Fig. 30D, F)



**Figura 30.** Microscopía SEM y TEM de las hifas de *B. cinerea* sin tratar y tratadas con lipopéptidos de la cepa XT1. Hifas sin tratar y tratadas con lipopéptidos (SEM) (A y B, respectivamente). Hifas sin tratar y tratadas con lipopéptidos (TEM) (C,E y D,F, respectivamente).

### 1.3 Producción de compuestos orgánicos volátiles

#### 1.3.1 Actividad antifúngica frente a *B. cinerea* de los compuestos volátiles producidos por *B. velezensis* XT1 y *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>

La determinación de la actividad antifúngica de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>, así como de la influencia del medio de cultivo, se realizó tanto en medio sólido como en medio líquido.

En el primero de los casos, y tal y como se observa en la tabla 19, la aplicación de la cepa XT1 redujo el crecimiento del hongo *B. cinerea* en un 91% en medio MOLP, un 25% en medio SG y un 17% en medio MM, con respecto al control. Por otra parte, la actividad de la cepa LMG 27586<sup>T</sup> en medio MOLP fue prácticamente nula, con un 2% de reducción, aunque en los medios MM y SG se alcanzaron porcentajes de reducción del 17% y 19%, respectivamente.

En lo que respecta a la actividad del cultivo crecido en medio líquido, de nuevo en medio MOLP se obtuvieron los niveles más altos de reducción con un 93% para la cepa XT1 y un 75% para LMG 27586<sup>T</sup>. En medio MM los valores de reducción para XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> fueron del 20% y el 6%, respectivamente, mientras que en SG no se apreció ninguna reducción del crecimiento de *B. cinerea* (Tabla 18).

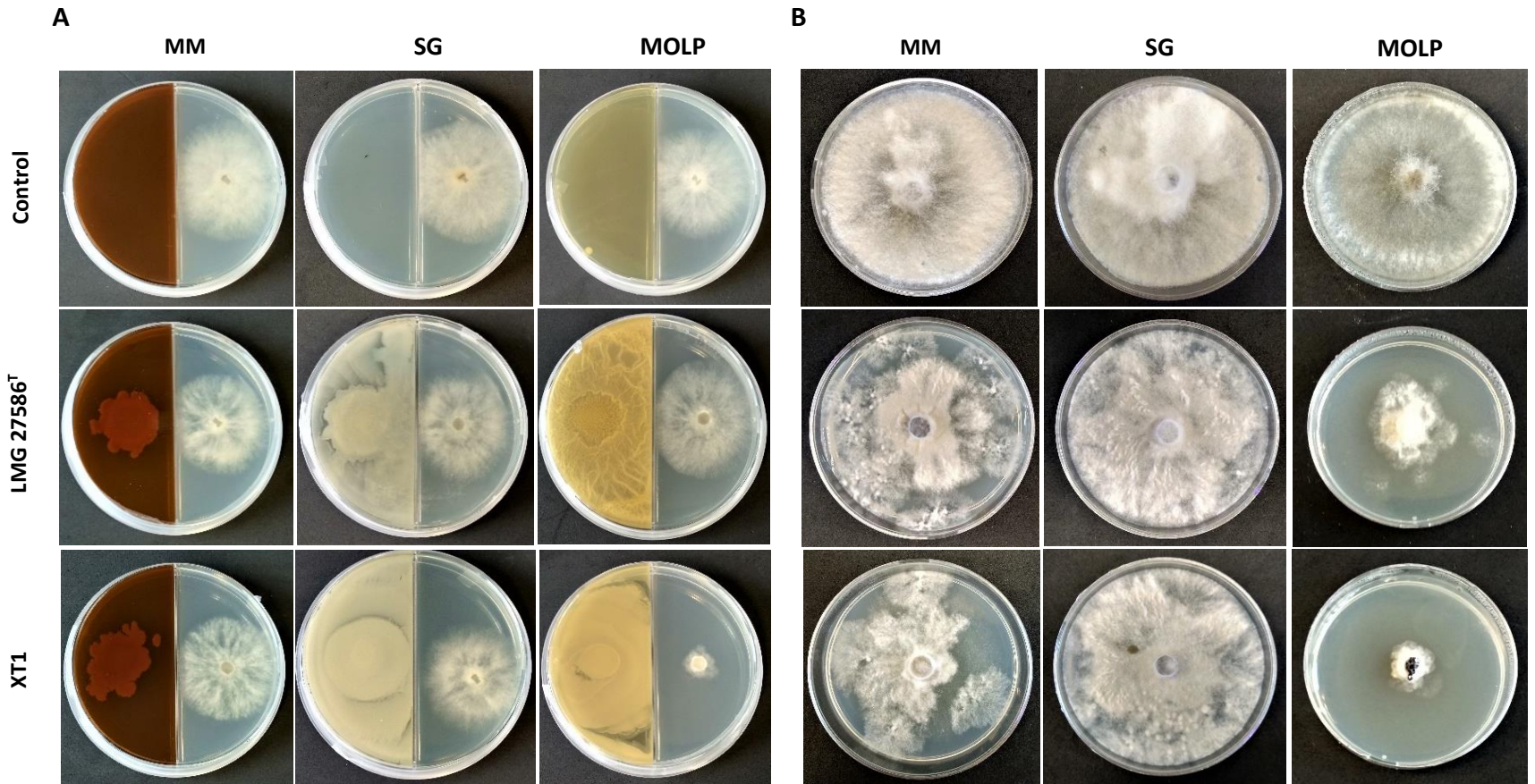
**Tabla 18.** Porcentaje de reducción de micelio de *B. cinerea* enfrenteado a COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en los medios de cultivo sólido y líquido MM, SG y MOLP.

	Porcentaje de inhibición (%)					
	MM		SG		MOLP	
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
<b>XT1</b>	17%	20%	25%	0%	91%	93%
<b>LMG 27586<sup>T</sup></b>	17%	6%	19%	0%	2%	75%

En la figura 31 se puede apreciar como la acción de los COVs producidos por ambos microorganismos alteró sustancialmente el crecimiento de *B. cinerea* con respecto al control en medio MOLP. Por otro lado, los COVs producidos por ambas bacterias en los dos medios de cultivo restantes (SG y MM) disminuyeron la densidad del micelio desarrollado por *B. cinerea*.

Al igual que en el caso anterior, en los ensayos en medio líquido, a pesar de no obtener resultados de reducción de crecimiento significativos en determinados medios tales como SG y MM, sí que se observó una alteración considerable en la morfología y la densidad del micelio (Fig. 31).





**Figura 31.** Evaluación de la actividad de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en los medios MM, SG y MOLP; sólido (A) y líquidos (B), frente a *B. cinerea*. En los ensayos en medio sólido, a la izquierda: bacteria y a la derecha: *B. cinerea*.



### 1.3.2 Análisis de los componentes volátiles mayoritarios por cromatografía de gases

Para describir la composición de los COVs producidos por la cepa XT1 y determinar si el perfil característico de compuestos nos permite discriminar a nuestro microorganismo de la cepa LMG 27586<sup>T</sup>, se hizo una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y los resultados fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) (Fig. 32).

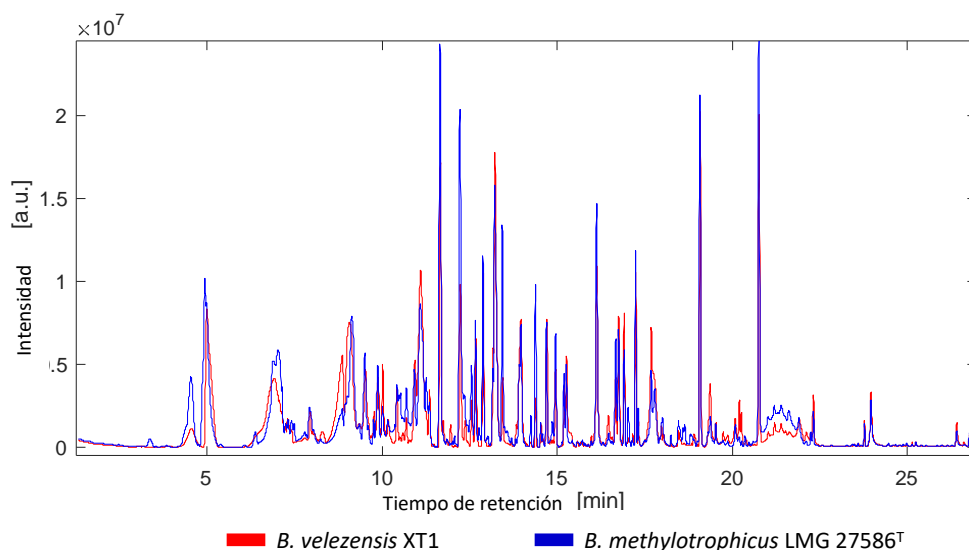


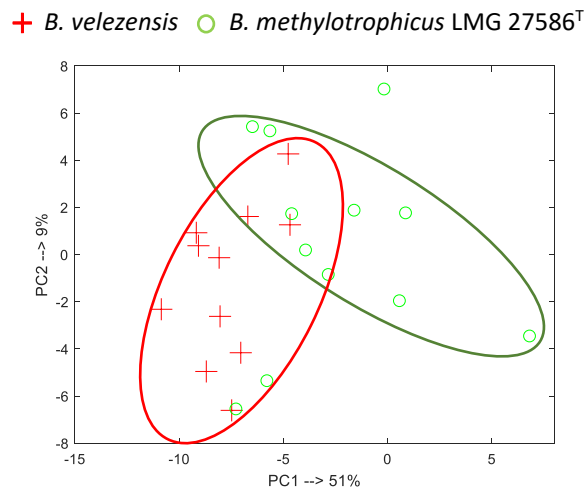
Figura 32. Cromatograma del perfil completo de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> obtenido por cromatografía de gases GC-TOF-MS.

El análisis del cromatograma obtenido a partir de los COVs producidos por ambas cepas realizado en medio MOLP, que era el medio de cultivo con que se obtuvo una actividad antifúngica mayor, reveló la presencia de 16 compuestos mayoritarios. En la tabla 19 se detallan nueve de los compuestos identificados hasta la fecha.

Tabla 19. Identificación de COVs mayoritarios producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>.

Familia	Compuestos	Familia	Compuestos
Hidrocarburos	Nonano, C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	Cetonas	Acetoína, C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
	4-metiloctano, C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>		4-metil-2-hexanona, C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O
	Pentadieno, C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>		2-heptanona, C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O
Compuestos azufrados	Disulfuro de dimetilo, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Ésteres	Butil acetato, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Alcoholes	2,3 butanodiol, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		

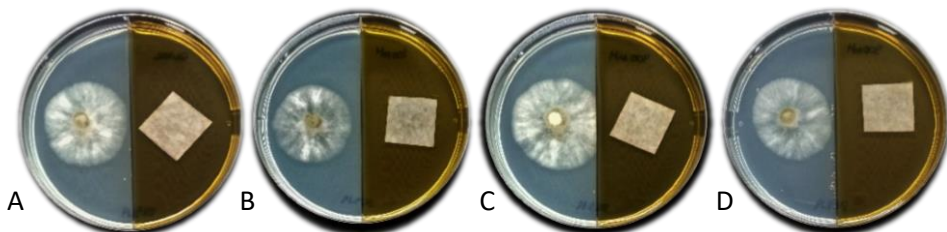
En base a los 16 compuestos mayoritarios detectados en el cromatograma se realizó el análisis de componentes principales (Fig. 33). Tras el estudio de la variación principal en los datos, se pudieron diferenciar dos grupos bien definidos con una precisión de predicción del 60%. Los niveles de los 16 componentes evaluados fueron distintos, permitiendo discriminar, a través de los COVs producidos, entre las cepas XT1 (+) y LMG 27586<sup>T</sup> (o).



**Figura 33.** Análisis de componentes principales de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>.

### 1.3.3 Actividad antifúngica de COVs sintéticos

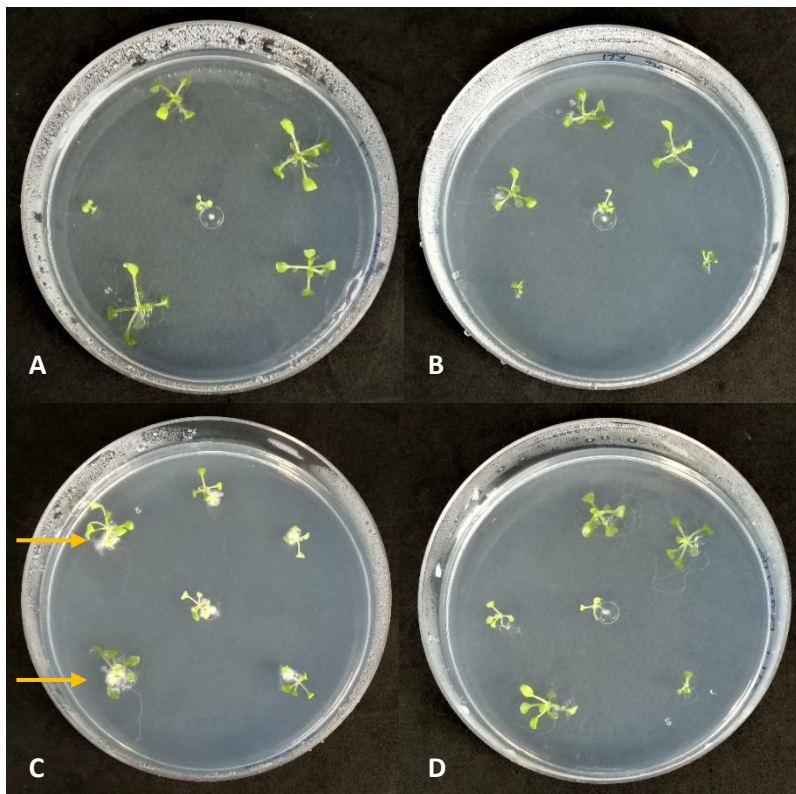
Entre los componentes mayoritarios de la fracción volátil producidos por la cepa XT1, detallados en el apartado anterior, se seleccionó la acetoína para determinar su implicación en la inhibición de *B. cinerea*. Para ello, se realizaron ensayos antifúngicos en placas compartidas con concentraciones crecientes de este compuesto. La aplicación de acetoína no supuso una reducción del crecimiento del hongo en ninguna de las concentraciones empleadas (300 mM, 400 mM y 500 mM) (Fig. 34). Sin embargo, sí que puede apreciarse como la morfología y densidad del fitopatógeno se vio afectada por este compuesto volátil.



**Figura 34.** Actividad antifúngica de la acetoína frente a *B. cinerea*. A) Control, B) 300 mM, C) 400 mM y D) 500 mM.

### 1.3.4 Efecto protector de los COVs producidos por XT1 frente a *B. cinerea* en *A. thaliana*

La determinación de la capacidad protectora de los COVs producidos por la cepa XT1 se realizó sobre plántulas de *A. thaliana* crecido en medio MS e infectadas con *B. cinerea* en la zona radicular. Como se puede apreciar en la figura 35, tras siete días de incubación la exposición a los COVs producidos por la cepa XT1 inhibe el desarrollo de *B. cinerea* en la zona radicular de las plantas (Fig. 35D). Sin embargo, en las plantas infectadas con el fitopatógeno sin ningún tipo de tratamiento, el hongo se desarrolla a lo largo de la raíz en todas las plantas (Fig. 35C).



**Figura 35.** Actividad protectora de los COVs producidos por la cepa XT1 frente a *B. cinerea* plantas de *A. thaliana*. A) Control, B) plantas tratadas con los COVs de XT1, C) plantas infectadas con *B. cinerea* y D) plantas tratadas con los COVs de XT1 e infectadas con *B. cinerea*.

### **1.3.5 Análisis por microscopía del efecto de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en *B. cinerea***

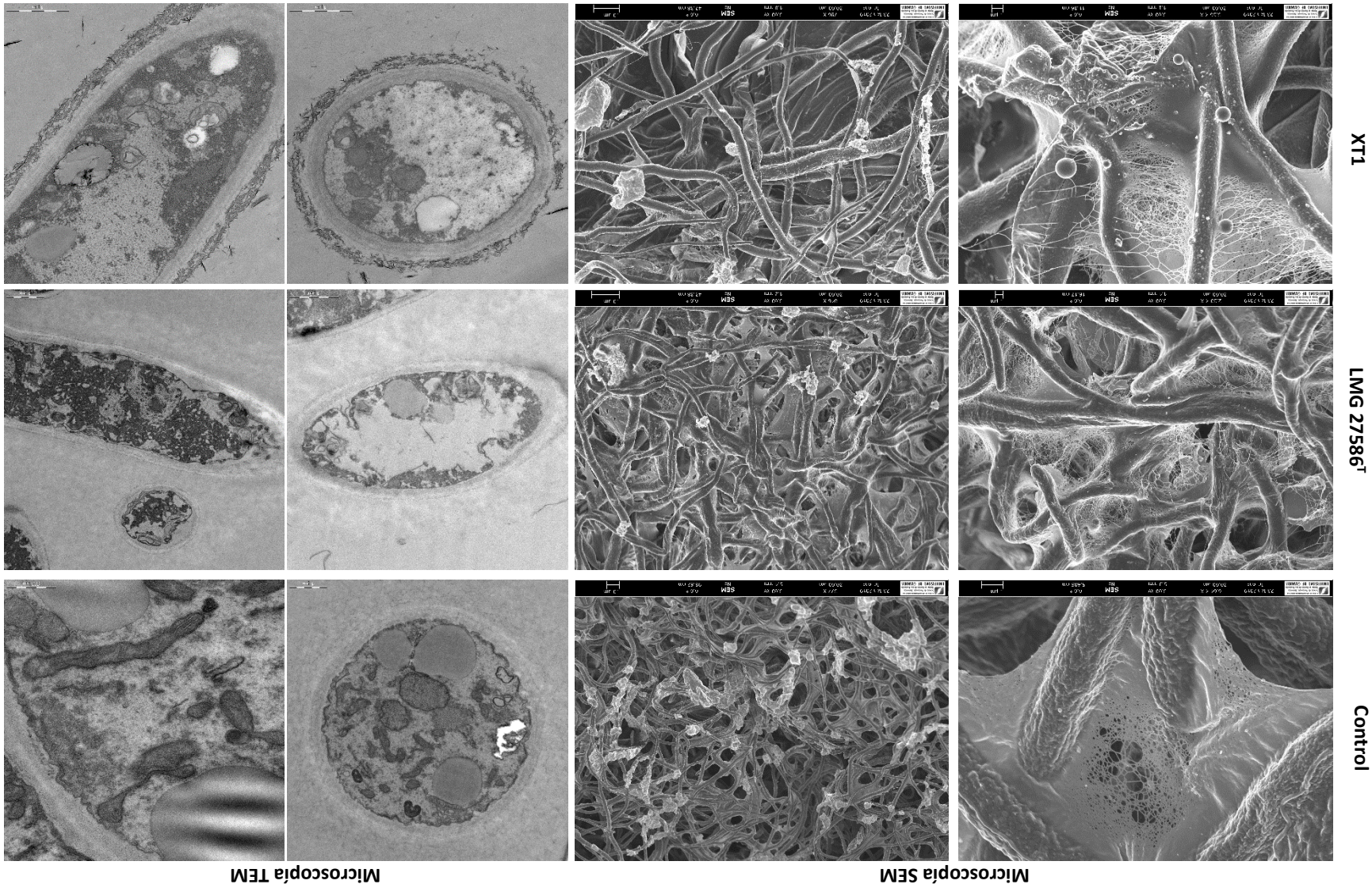
Por último, se estudió el efecto de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> en el desarrollo morfológico de *B. cinerea*. Para ello, se procesaron muestras procedentes de cada uno de los tratamientos establecidos en el ensayo antifúngico realizado en placas compartidas descrito en el apartado 4.1.3.1, y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

En las imágenes obtenidas mediante microscopía SEM, se puede observar que en el tratamiento control de hongo el micelio es más denso y las hifas tienen una superficie lisa, lineal y de consistencia turgente (Fig. 36). Las zonas de crecimiento son limpias y el polisacárido producido aparece en mayor cantidad. Por otro lado, en la muestra de *B. cinerea* enfrentada a la cepa LMG 27586<sup>T</sup>, la masa de crecimiento también es alta, sin embargo, las hifas pierden su estructura lineal y lisa apareciendo numerosas ramificaciones y zonas de engrosamiento. Por último, el hongo enfrentado a XT1 parece desarrollarse peor, pues disminuye la densidad de micelio y la cantidad de EPS asociado a este, aumenta la aparición de hifas con estructura aplanada, signo de muerte celular, y algunos de los puntos de crecimiento muestran evidentes deformaciones.

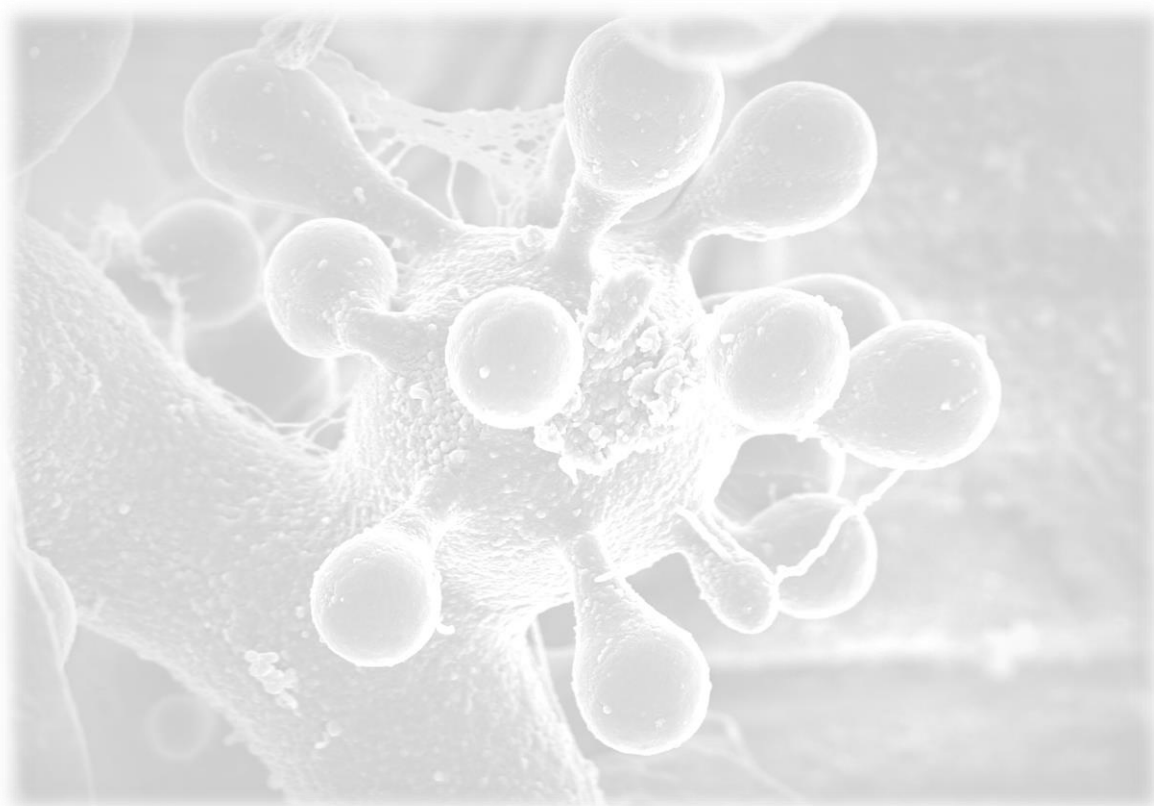
En cuando a la microscopía TEM, en el tratamiento control, la pared celular de *B. cinerea* está intacta y bien definida, se observa un citoplasma homogéneo, con mitocondrias bien estructuradas y lisosomas abundantes (Fig. 36). En el caso del micelio tratado con la cepa LMG 27586<sup>T</sup>, se aprecian alteraciones en la integridad de la membrana celular, en el citoplasma aparece una fuerte cavitación y una alta densidad electrónica, signo esto último, de coagulación. La cepa XT1, por su parte, produce una destrucción menor de las células del hongo, estando la membrana plasmática aún intacta. No obstante y al igual que en el caso de la cepa tipo, el citoplasma está vacío en algunas zonas, se ha perdido la homogeneidad del mismo y las mitocondrias están rotas o deformadas.



Figura 36. Microscopía SEM y TEM de *B. cinerea* expuesto COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup>.



**2. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por la cepa *B. velezensis* XT1 y su efecto protector frente al fitopatógeno *B. cinerea***





## Resumen

En este capítulo, se ha evaluado la actividad promotora del crecimiento en plantas de la cepa *B. velezensis* XT1 y su capacidad para reducir o inhibir la infección causada por *B. cinerea* en plantas de tomate, fresa y vid.

En primer lugar, los estudios *in vitro* en esterilidad en plantas de tomate demostraron que la cepa XT1 es endofítica y que su presencia en la raíz inhibe la colonización por el fitopatógeno *B. cinerea*.

En segundo lugar, los ensayos en invernadero en plantas de fresa y tomate revelan que el modo de aplicación está directamente relacionado con la intensidad de promoción del crecimiento en plantas. En general, la aplicación radicular de la cepa XT1 produce un mayor aumento de la biomasa de plantas de fresa y tomate en comparación con la aplicación foliar.

El contenido en pigmentos fotosintéticos como la *Chl a* y *Chl b*, no se ve modificado por el tipo de tratamiento, sin embargo, el tratamiento con la cepa XT1 aumenta el contenido en carotenoides.

En lo que respecta a la infección por *B. cinerea*, la aplicación preventiva de la cepa XT1 en plantas de fresa, tomate y vid disminuyó la incidencia de la enfermedad entre un 50% y un 65%, mientras que la severidad de los daños ocasionados se vio reducida hasta en un 60%. Además, los bioensayos en hojas tomadas de plantas tratadas con la cepa XT1 confirman su capacidad para activar el estado de *priming*, que fomenta la resistencia de las plantas frente al patógeno *B. cinerea*.

Por último, los ensayos en campo han confirmado la estabilidad de la cepa XT1 tras su aplicación en los cultivos, soportando condiciones ambientales adversas y manteniendo una concentración estable.





## 2.1 Estudios *in vitro* con la cepa XT1 en *A. thaliana* y *S. lycopersicum* L.

### 2.1.1 Determinación de la tolerancia a la cepa XT1

La determinación de la tolerancia de las plantas a XT1 se llevó a cabo en *A. thaliana* y *S. lycopersicum* L. Para ello, plántulas en estadios tempranos de su desarrollo, se sometieron a concentraciones crecientes de la cepa XT1:  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Tal y como se aprecia en la figura 37, los tratamientos con concentraciones superiores a  $10^5$  UFC/mL de XT1 disminuyeron notablemente los porcentajes de supervivencia en *A. thaliana*, pasando de valores del 100% al 60% en aquellas plantas tratadas con  $10^6$  UFC/mL. Las plántulas inoculadas con una concentración  $10^4$  UFC/mL no manifestaron diferencias con respecto a los controles sin tratamiento.



**Figura 37.** Estudio de la tolerancia de *A. thaliana* a distintas concentraciones la cepa XT1. Las filas correspondientes a las letras A-E representan concentraciones decrecientes de la cepa XT1:  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  UFC/mL, respectivamente. La fila F representa el control negativo sin ningún tratamiento.

En el caso de la plantas de tomate, ninguna de las concentraciones de la cepa XT1 empleadas produjo el marchitamiento de las plantas (Fig. 38), no obstante, en etapas tempranas del desarrollo vegetal, se pudo apreciar que las plántulas en las que se usaron altos valores de la cepa bacteriana ( $10^7$ - $10^8$  UFC/mL) se ralentizaba su crecimiento. A pesar de ello, y tal y como se aprecia en la figura 38 finalmente todos los tratamientos alcanzaron tamaños similares transcurridos 20 días desde la inoculación.

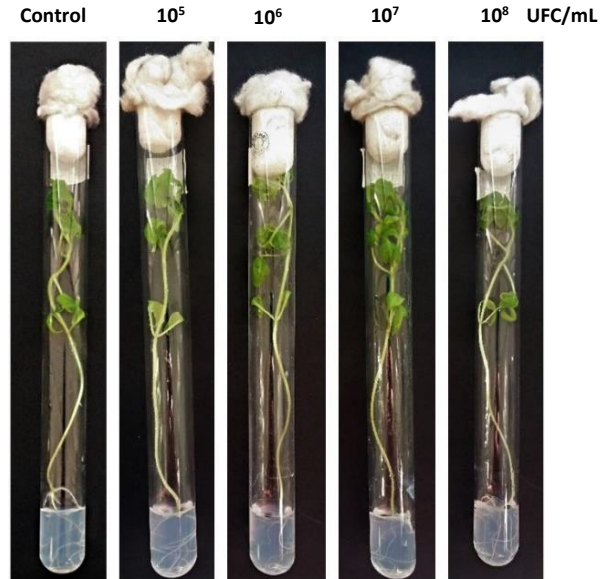
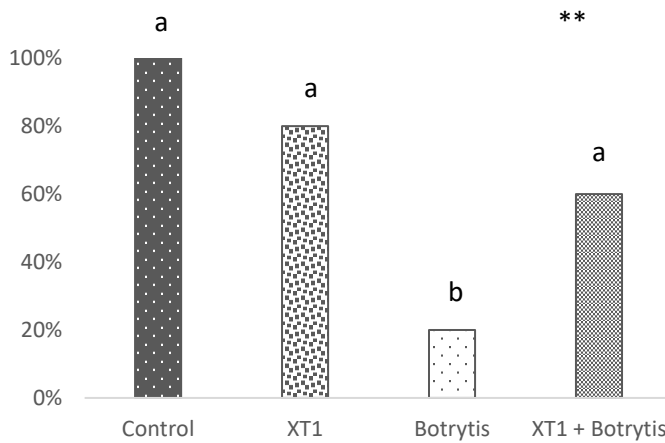


Figura 38. Análisis de la tolerancia de *S. lycopersicum* L. a concentraciones crecientes de la cepa XT1.

### 2.1.2 Efecto protector de la cepa XT1 frente a *B. cinerea* en plantas de tomate

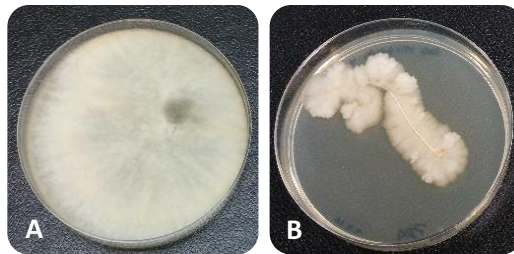
Para evaluar la capacidad protectora de la cepa XT1 frente al fitopatógeno *B. cinerea* se realizaron ensayos preliminares con plantas de tomate en tubos de vidrio con medio MS 0,3% (p/v). Se llevaron a cabo experimentos de co-cultivo del patógeno y la cepa objeto de estudio en la zona radicular de plántulas estériles de tomate.

En la figura 39 se muestran los porcentajes de plántulas viables registradas tras la infección con el hongo *B. cinerea*. El tratamiento con la cepa XT1, disminuyó en un 40% la mortalidad con respecto a las plantas sin tratar con el agente de biocontrol e infectadas con *B. cinerea* ( $p \leq 0,01$ ). Estos resultados, corroboraron lo indicado en el apartado anterior, ya que la comparativa entre los tratamientos control y XT1 confirma que la aplicación del microorganismo no tiene efectos adversos en plantas de tomate.



**Figura 39.** Porcentaje de supervivencia registrado en plántulas de tomate tras 15 días de incubación. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo). Análisis de contingencia (chi cuadrado  $\chi^2$ ,  $p \leq 0,05$ ).

El éxito de la aplicación preventiva de la cepa XT1 frente al hongo *B. cinerea* se confirmó tras analizar visualmente las placas de PDA donde se sembraron las raíces extraídas de los tratamientos *Botrytis* y *Botrytis*+XT1. En la figura 40, se puede observar como alrededor de las raíces sin tratar con XT1 e infectadas con el patógeno éste se desarrolló hasta colonizar por completo la placa. Por el contrario, la zona radicular procedente de plántulas inoculadas con la cepa XT1 tan sólo mostró crecimiento bacteriano.



**Figura 40.** Microorganismos presentes en la zona radicular de plantas A) infectadas con *B. cinerea* y B) infectadas con *B. cinerea* y tratadas con XT1.

Por otro lado, se pudo constatar la capacidad endofítica de la cepa XT1 mediante recuento en placa del número de UFC/mL intrarradiculares de cada uno de los tratamientos. Mientras que en las raíces sin tratar con el agente de biocontrol no hubo presencia de ningún microorganismo de origen bacteriano, en aquellas raíces tratadas con la cepa XT1 se alcanzaron concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

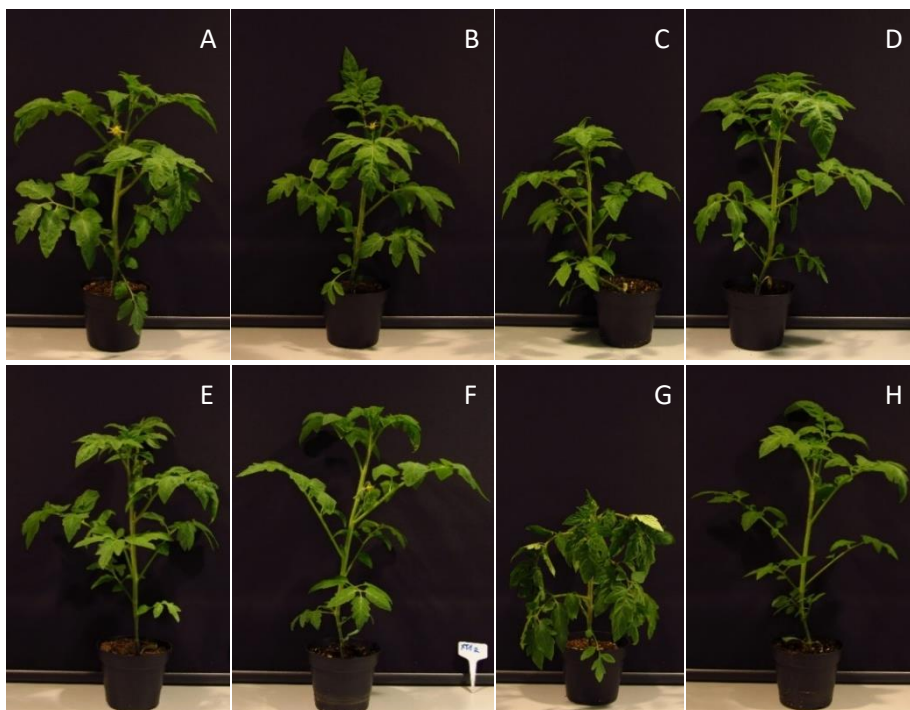
## 2.2 Estudio *in vivo* de la capacidad PGPR y de defensa frente a *B. cinerea* de la cepa XT1 en plantas de tomate y fresa

La determinación del efecto en plantas de fresa y tomate de la cepa XT1 mediante aplicación foliar o radicular, ante la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea*, se llevó a cabo mediante un ensayo en invernadero en condiciones controladas. Finalizado el periodo de cultivo establecido, se midieron parámetros de crecimiento y desarrollo, de infección y fisiológicos.

### 2.2.1 Ensayos en plantas de tomate

#### 2.2.1.1 Parámetros de crecimiento y desarrollo: biomasa foliar y radicular

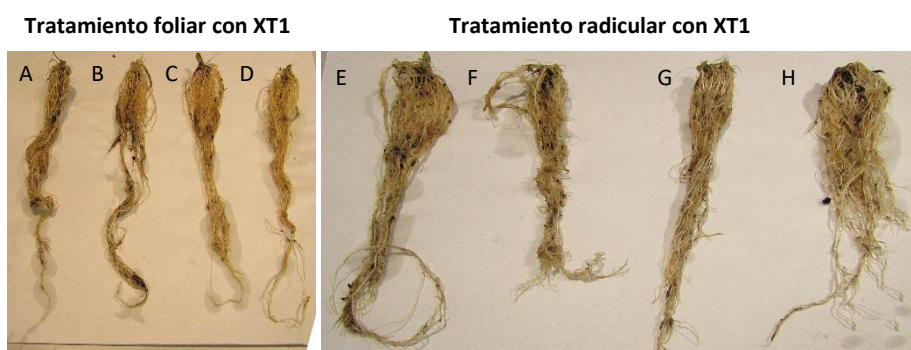
El desarrollo de los primeros síntomas del moho gris en las plantas de tomate que fueron inoculadas con el fitopatógeno, se produjo transcurridas dos semanas tras el momento de infección. La figura 41 muestra el aspecto de las plantas en el momento de la recolección de las mismas tras 5 semanas de ensayo. Se pudo observar como las plantas infectadas con el hongo (Fig. 41C y G) presentaban peor aspecto que el resto de los tratamientos. Por otro lado, las plantas infectadas con el fitopatógeno en las que se aplicó la cepa XT1 de forma preventiva, tanto foliar (Fig. 41D) como radicularmente (Fig. 41H), mostraban un apariencia muy similar a las plantas control sin infectar (Fig. 41A y E).



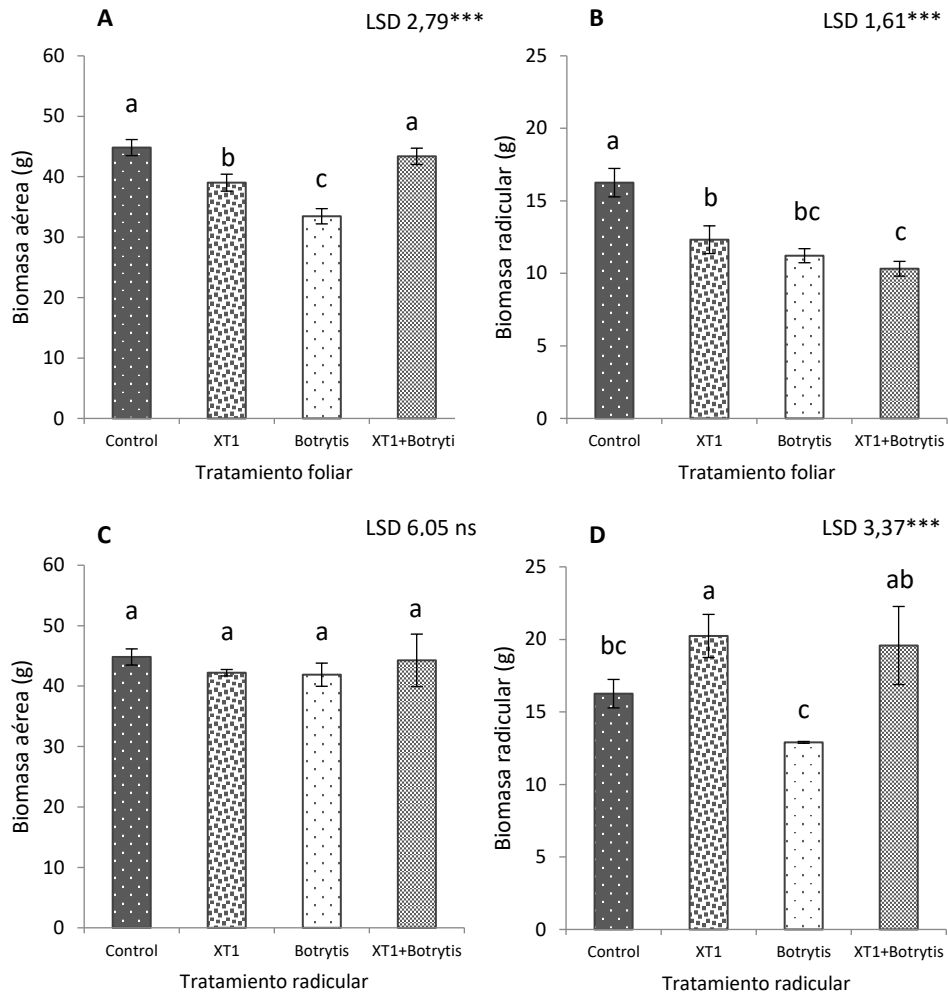
**Figura 41.** Plantas de tomate tratadas con XT1 por vía foliar (A-D) y radicular (E-F) e infectadas con *Botrytis*. A) y E) plantas control; B) y F) tratamiento con la cepa XT1; C) y G) plantas infectadas con *B. cinerea*; D) y H) plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas con la cepa XT1.

Las medidas de biomasa foliar y radicular mostraron una evidente reducción de la biomasa total (foliar y radicular) en las plantas infectadas con *B. cinerea* (Fig. 43). Se aprecia que la **aplicación foliar** de XT1, mejora en un 21% la biomasa foliar de las plantas infectadas con *B. cinerea*, alcanzando niveles similares a los observados en el control (Fig.43A). Sin embargo, la inoculación de la cepa de estudio reduce los valores de biomasa aérea en un 12% con respecto al control en plantas no infectadas con el fitopatógeno. No se encuentran diferencias significativas en la biomasa radicular, entre plantas tratadas foliarmente con XT1 y plantas no tratadas e infectadas en ambos casos con *B. cinerea* así como entre los controles (Fig. 43B), siendo el aspecto de las raíces muy similar en todos los tratamientos (Fig.4A-D). Esto podría indicar que la aplicación foliar ejerce mayor efecto en la zona aérea de la planta de tomate, pero no en la zona radicular.

Por otro lado, con respecto a la **aplicación radicular** de la cepa XT1, se observa que no hay diferencias significativas en la biomasa aérea (Fig.43C), pero si hay un incremento de la biomasa radicular tanto en el tratamiento únicamente con XT1 (20%) como en el tratamiento combinado XT1+Botrytis (16%) (Fig. 43D). Estas diferencias pueden observarse en la figura 42 (E-H), donde la raíz procedente de una planta infectada por *B. cinerea* tiene un tamaño mucho menor a las procedentes del resto de los tratamientos. Esto podría indicar el efecto positivo de la aplicación radicular de la bacteria en la raíz de la planta y un menor efecto a nivel de biomasa foliar. Por lo tanto la aplicación de XT1 de forma radicular en plantas infectadas con *B. cinerea* mejora la biomasa radicular y mantiene la biomasa foliar en valores acordes a lo observado en el control.



**Figura 42.** Estado del sistema radicular de las plantas de tomate tratadas con XT1 e infectadas con *B. cinerea*. (A-D) Aplicación foliar y (E-F) aplicación radicular de la cepa XT1. De izquierda a derecha: A) y E) tratamiento control; B) y G) tratamiento con la cepa XT1; C) y F) infección con *Botrytis*; D) y H) tratamiento con XT1 e infección con *Botrytis*.



**Figura 43.** Biomasa aérea y radicular en plantas de tomate (g). Biomasa aérea y radicular del tratamiento de aplicación foliar (A y B) y biomasa aérea y radicular de los tratamientos de aplicación radicular (C y D). Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

### 2.2.1.2 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño

La capacidad de la cepa XT1 para paliar el daño producido por *B. cinerea* en plantas de tomate se determinó teniendo en cuenta los parámetros de incidencia e índice de daño.

La aplicación de la cepa XT1 **vía foliar** en plantas inoculadas con *B. cinerea* redujo el porcentaje de plantas infectadas en un 50% y la severidad de los daños un 60% con respecto a las plantas sin tratar e infectadas con el fitopatógeno (Tabla 20).

**Tabla 20.** Valores de incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en plantas de tomate tratadas con la cepa XT1, vía foliar o radicular, e infectadas con *B. cinerea*.

	Tratamiento foliar		Tratamiento radicular	
	Incidencia (%)	ID	Incidencia (%)	ID
<b>Control</b>	0	0	0	0
<b>XT1</b>	0	0	0	0
<b><i>B. cinerea</i></b>	80	37,5	70	32,5
<b>XT1+<i>B. cinerea</i></b>	40	15	30	12,5

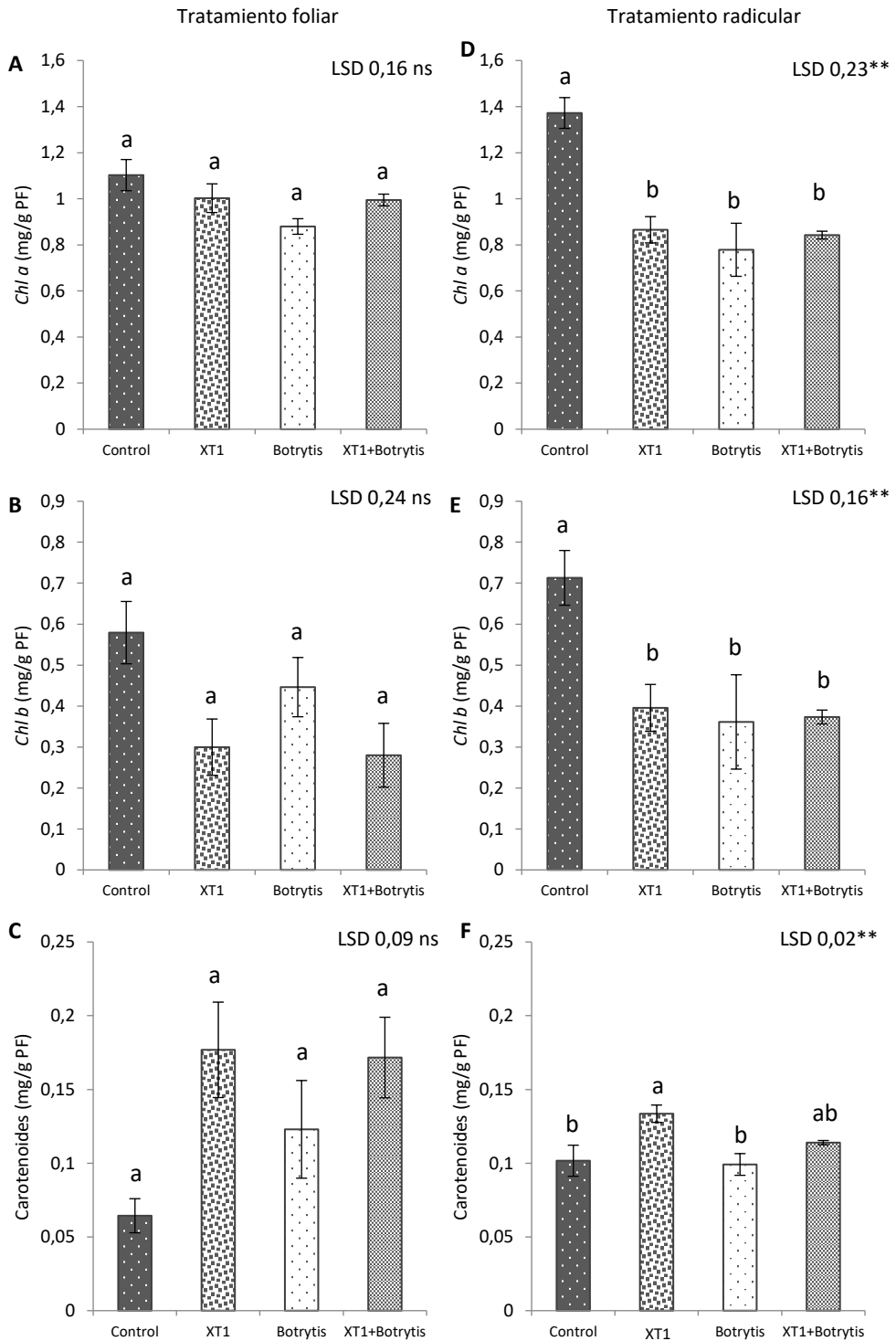
Como se puede observar en la tabla 20, el tratamiento **vía radicular** de la cepa XT1 produjo unos valores muy similares a los comentados anteriormente para la aplicación foliar. La incidencia de la enfermedad disminuyó en un 57% y la severidad de los daños un 61% con respecto a las plantas infectadas con *B. cinerea*.

### 2.2.1.3 Parámetros fisiológicos en plantas de tomate, contenido en pigmentos foliares

La determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos, reveló que la **aplicación foliar** de la cepa XT1 en plantas de tomate, no tiene efecto significativo en la síntesis de clorofilas a y b o de carotenoides. Igualmente, se aprecia que la infección provocada por el fitopatógeno no supone ninguna alteración relevante respecto al control (Fig. 4A, B, C). No obstante, se puede observar que el contenido de clorofila total es mayor en los tratamientos con el agente de biocontrol, y que la mayor parte de la clorofila que presentan las plantas enfrentadas con *B. cinerea* es *Chl b*.

La **aplicación radicular** de la cepa XT1 supuso una reducción significativa del contenido en *Chl a* y *Chl b* con respecto al control y un aumento en el nivel de carotenoides en el tejido vegetal (Fig. 44D, E, F). Sin embargo, la aplicación del agente de biocontrol no implica ninguna diferencia respecto a las plantas infectadas con *B. cinerea* en ninguno de los tres pigmentos.





**Figura 44.** Contenido en pigmentos fotosintéticos en plantas de tomate (mg/g peso fresco). Aplicación foliar (A, B, C) y radicular (D, E, F). (A y D) contenido en clorofila a; (B y E) contenido en clorofila b; (C y F) contenido en carotenoides. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

#### 2.2.1.4 Bioensayo en hojas de tomate frente a *B. cinerea*

Las muestras de la parte aérea del experimento descrito en el apartado 4.2.2.1.1 fueron re-infectadas con *B. cinerea* y utilizadas para hacer ensayos de *priming*. Como se observa en la figura 45 el daño producido alrededor de la zona de inoculación del patógeno es más reducido en las plantas tratadas con el agente de biocontrol, tanto en las hojas procedentes de plantas infectadas con *B. cinerea* como en plantas sin infectar y tan sólo tratadas con bacteria. Las hojas de los tratamientos control y *B. cinerea* presentan mayor decoloración y síntomas de necrosis.

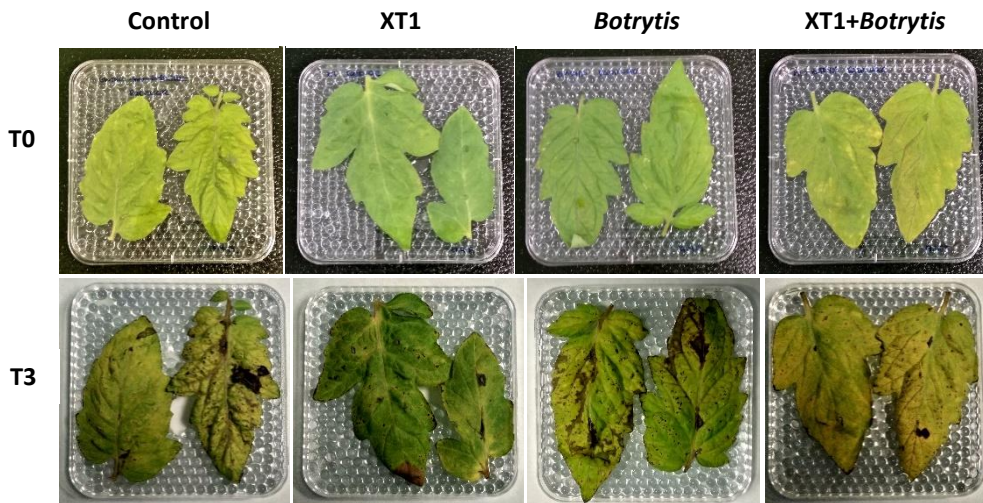


Figura 45. Bioensayos en hojas de tomate. Tiempo de incubación T0 y T3 días.

## 2.2.2 Ensayos en plantas de fresa

### 2.2.2.1 Parámetros de crecimiento y desarrollo: biomasa foliar y radicular

Los ensayos realizados con plantas de fresa, mostraron una efectiva infección con el hongo *B. cinerea* dos semanas después de la inoculación tal y como se observa en la figura 46. El tratamiento de plantas de fresa, infectadas con *B. cinerea* y con la bacteria XT1, supuso un cambio a nivel radicular, no observándose sin embargo un cambio aparente a nivel foliar (Fig.47 y 48).



Figura 46. Detalle de los síntomas manifestados en plantas de fresa infectadas con *B. cinerea*.

Como se observa en la figura 49 (A, B) la aplicación del tratamiento con la cepa XT1 **vía foliar** conllevó un aumento del 20% del peso foliar con respecto al control tanto en plantas tratadas con XT1, como en plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas con XT1 (XT1+*Botrytis*). En contraste con el tratamiento vía radicular, en este caso no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de biomasa de raíz.

Los resultados de biomasa foliar y radicular obtenidos demostraron que el tratamiento **vía radicular** con la cepa XT1 mejoraba el crecimiento de las plantas con respecto al control en un 21% (Fig.49C, D). La biomasa aérea de aquellas que fueron infectadas con *B. cinerea* se vio disminuida en un 25%, mientras que la aplicación con la cepa XT1 en plantas inoculadas con el fitopatógeno redujo la pérdida de biomasa foliar en un 20% con respecto al tratamiento con el patógeno. Además, la aplicación de XT1 vía radicular mejoró los valores obtenidos de biomasa de raíz en un 30% tanto en plantas sin infectar como en plantas infectadas con *B. cinerea*.

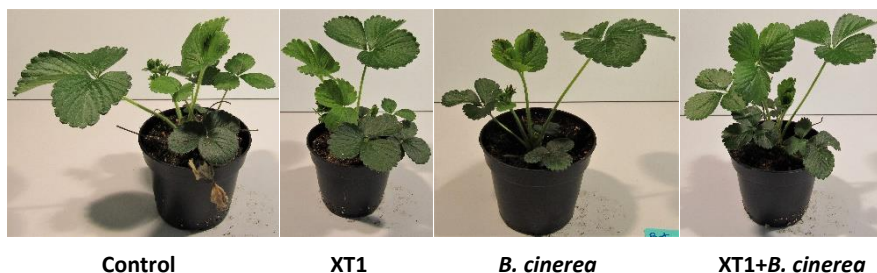
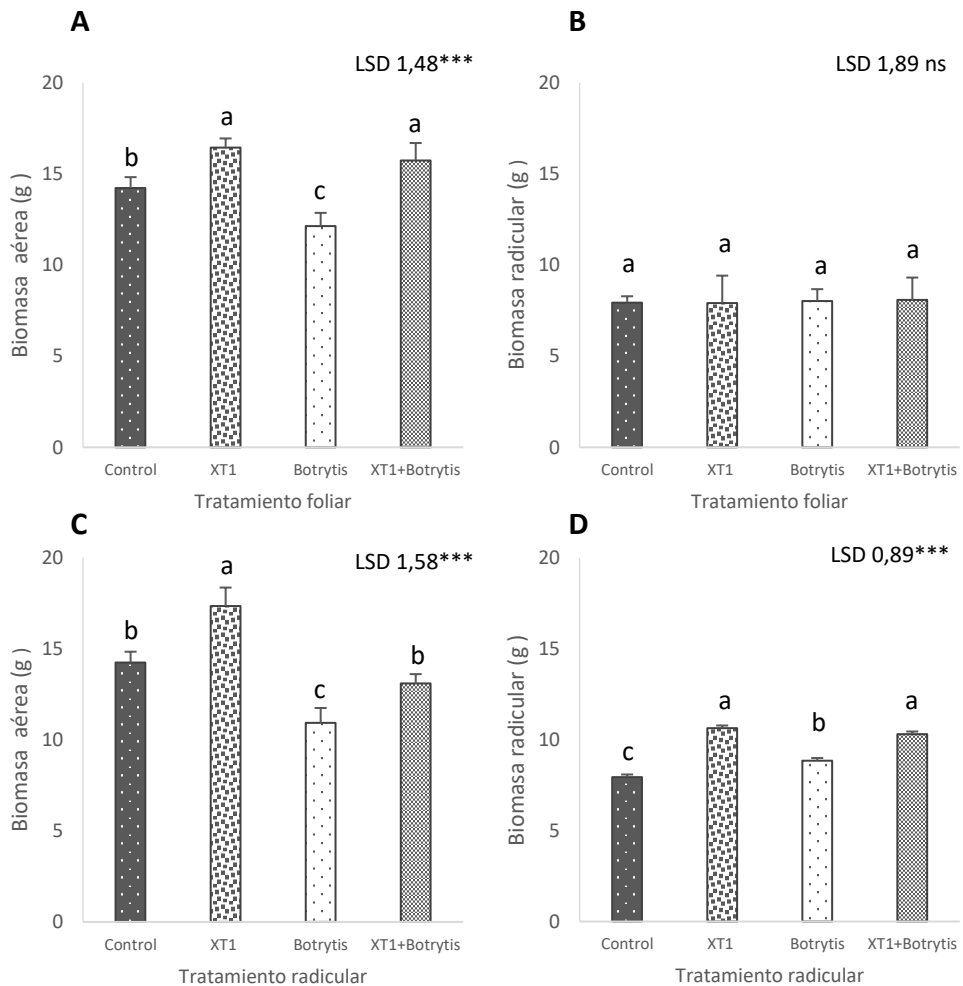


Figura 47. Estado de las plantas de fresa inoculadas foliarmente con XT1.



**Figura 48.** Sistema radicular de las plantas de fresa inoculadas foliarmente con XT1. De izquierda a derecha: A) control; B) tratamiento con la cepa XT1; C) infección con *Botrytis*; D) tratamiento con XT1 e infección con *Botrytis*.



**Figura 49.** Biomasa aérea y radicular de plantas de fresa (g). A) Biomasa aérea y radicular del tratamiento de aplicación foliar (A y B) y biomasa aérea y radicular de los tratamientos de aplicación radicular (C y D). Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

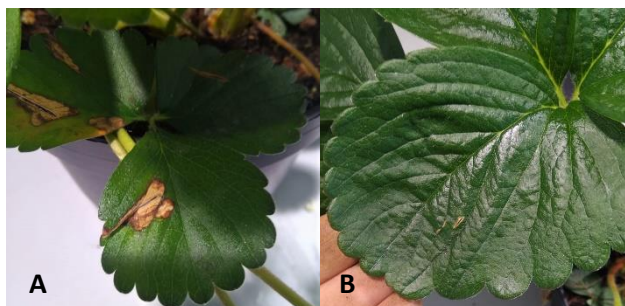
### 2.2.2.2 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño

Para cuantificar la infección producida por *B. cinerea* se tuvieron en cuenta la incidencia y el índice de daño ocasionados por el patógeno. Como se detalla en la tabla 21 la aplicación del tratamiento XT1 tanto por vía radicular como por vía foliar disminuyó la incidencia de la enfermedad en un 50-55%, respectivamente.

**Tabla 21.** Valores de incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en plantas de fresa tratadas con la cepa XT1, vía foliar o radicular, e infectadas con *B. cinerea*.

	Tratamiento foliar		Tratamiento radicular	
	Incidencia (%)	ID	Incidencia (%)	ID
<b>Control</b>	0	0	0	0
<b>XT1</b>	0	0	0	0
<b><i>B. cinerea</i></b>	90	35	80	32,5
<b>XT1+<i>B. cinerea</i></b>	40	15	40	12,5

Así mismo, el porcentaje de severidad en las hojas se determinó a través del índice de daño, reduciéndose en ambos casos considerablemente tanto con la aplicación foliar (57%) como con la radicular (61%). En la figura 50 se aprecia la capacidad de la cepa XT1 para prevenir la infección por el patógeno en la zona de inoculación, a diferencia de las plantas infectadas pero sin ningún tratamiento, en las que el lugar de infección muestra los síntomas de necrosis y coloración marrón típicos del moho gris.



**Figura 50.** Zona de infección en plantas inoculadas con *B. cinerea* (A) y en plantas inoculadas con *B. cinerea* y tratadas con la cepa XT1 (B).

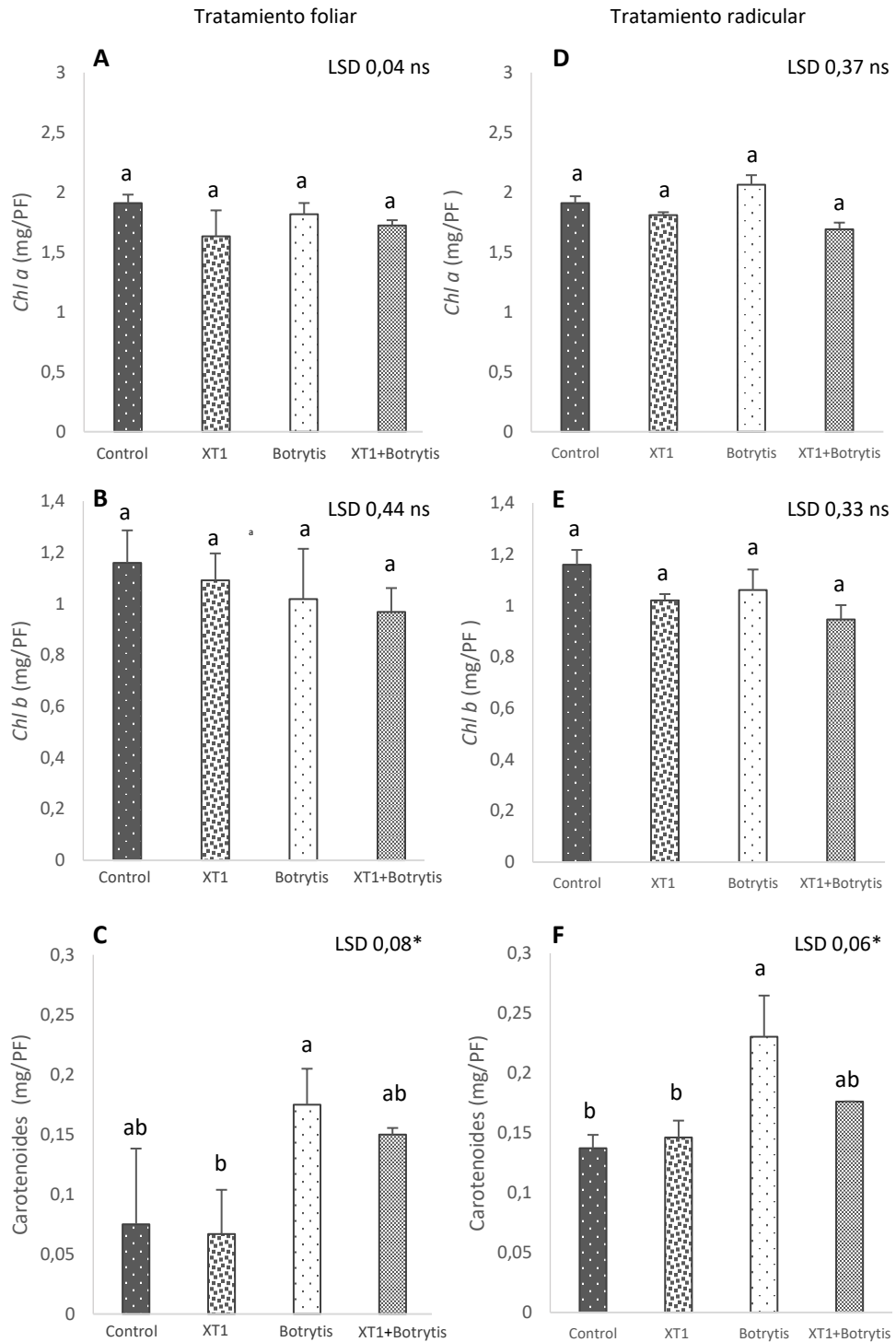
### 2.2.2.3 Parámetros fisiológicos, contenido en pigmentos foliares.

Además de alterar los parámetros más evidentes como el crecimiento o el índice de daño, la presencia de *B.cinerea* afecta a la planta de manera fisiológica. Uno de los primeros indicativos de que la planta está sufriendo algún tipo de estrés es una desregulación de sus componentes fisiológicos como el contenido en pigmentos fotosintéticos.

Tal y como se muestra en la figura 51 (A-C), la **aplicación foliar** de la cepa XT1 produjo un aumento de los carotenoides en hojas de plantas infectadas con *B. cinerea* mientras que la aplicación del tratamiento con XT1 minimizó dicho estrés con la consecuente reducción en un 20% de estos pigmentos auxiliares.

Por otro lado, en el ensayo de **aplicación radicular** (Fig. 51 D-F) observamos que la infección con *B. cinerea* condujo a un aumento significativo de los carotenoides con respecto al control, posiblemente como respuesta al estrés oxidativo que sufrió la planta. La acumulación de estos compuestos es menos acusada en plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas de forma preventiva con el agente de biocontrol, reduciéndose en un 20%.

En ninguno de los dos casos (aplicación radicular o foliar), el contenido en clorofilas a y b se vio afectado por la infección con el fitopatógeno o por el tratamiento con la cepa XT1.



**Figura 51.** Contenido en pigmentos fotosintéticos en plantas de fresa (mg/g peso fresco). Aplicación foliar (A, B, C) y radicular (D, E, F). (A y D) contenido en clorofila a; (B y E) contenido en clorofila b; (C y F) contenido en carotenoides. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

#### 2.2.2.4 Bioensayo en hojas de fresa frente a *B. cinerea*

Con el fin de evaluar la capacidad de la cepa XT1 para potenciar los mecanismos de defensa en plantas de fresa o mecanismo de *priming*, muestras de parte aérea del experimento descrito en el apartado 4.2.2.2 fueron infectadas con *B. cinerea*. La figura 52 muestra el efecto protector de la inoculación con la bacteria XT1, ya que las hojas tratadas con la cepa XT1, muestran menor daño en la zona de infección y no sufren decoloración alrededor de la herida como sí ocurre en las hojas control y las hojas infectadas con el hongo sin ningún tratamiento con XT1.

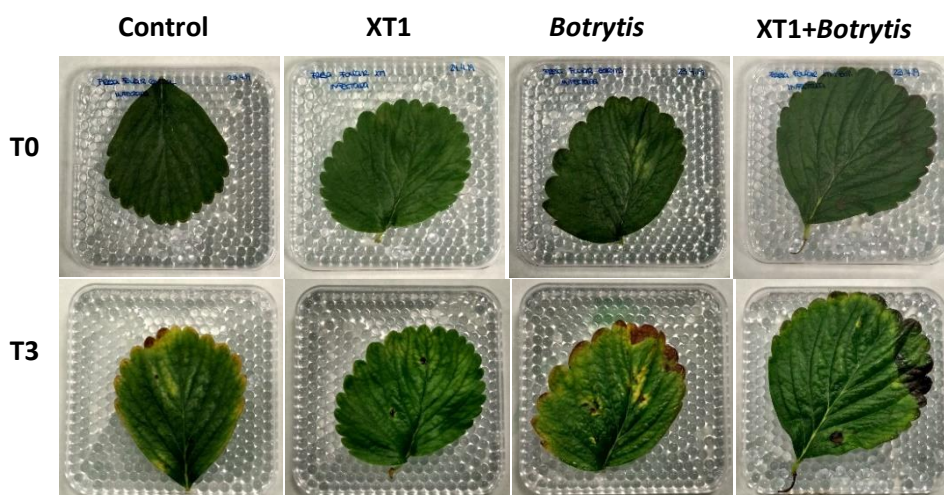


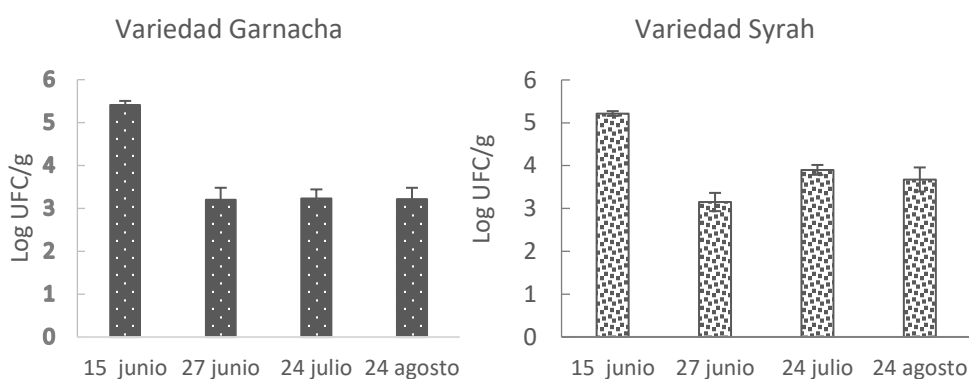
Figura 49. Bioensayos en hojas de fresa. Tiempo de incubación T0 y T3 días.

#### 2.2.3 Ensayos en viñedos.

Por último, se determinó la eficacia de la cepa XT1 frente al desarrollo de la podredumbre gris, producida por *B. cinerea*, durante el cultivo de la vid. Para ello, se produjeron 300 L de la cepa objeto de estudio a una concentración de  $1,93 \times 10^9$  UFC/mL, a partir del cual se hicieron diluciones hasta alcanzar la concentración de aplicación  $1 \times 10^6$  UFC/mL para una dosis de 600 L/ha. Se emplearon dos variedades de uva, Garnacha y Syrah.



En primer lugar, se llevó a cabo un seguimiento de la viabilidad en campo de la cepa XT1 gracias a la colaboración con Bodegas San Valero, la Universidad de Zaragoza y el Parque Científico Tecnológico Aula Dei como parte del trabajo de un proyecto RETOS-COLABORACION. Cada 15 días o mensualmente (dependiendo del estado fenológico y los tratamientos aplicados), se llevó a cabo el análisis microbiológico de distintas ramas de viñedos, realizando el recuento en placa (Unizar), comprobándose que la cepa XT1 presenta una adecuada capacidad de adaptación al medio sin observarse un descenso microbiológico importante que pudiese afectar a su efectividad. Como se puede observar en la figura 53, en ambas variedades de uva tan sólo se detectó una reducción de entre 1 y 2 unidades logarítmicas en toda la campaña.



**Figura 50.** Estudio de la viabilidad en campo de la cepa XT1 durante el periodo de campaña. Recuentos microbiológicos realizados en las variedades Garnacha y Syrah.

### 2.2.3.1 Parámetros de infección: incidencia e índice de daño.

Al igual que en los casos anteriores se evaluó la eficacia del tratamiento con la cepa XT1 mediante el cálculo del porcentaje de incidencia en cada finca y la determinación del grado de infección utilizando una escala de severidad. Como se puede apreciar en la tabla 22, en la finca de la variedad *Syrah*, el tratamiento con el agente de biocontrol no supuso un cambio significativo en incidencia o índice de daño con respecto al tratamiento control, no obstante sí que se obtuvieron mejores resultados que los alcanzados con el tratamiento convencional con productos de naturaleza química. Cabe destacar que esta finca tuvo una gran afectación por otro fitopatógeno que impidió el desarrollo de *B. cinerea* y por tanto limitó la actividad de la cepa XT1.

**Tabla 22.** Incidencia (%plantas infectadas) e índice de daño (ID) en racimos de uva tomados tras el periodo de campaña. Valores tras los tratamientos Control, XT1 y tratamiento químico en las variedades *Garnacha* y *Syrah*.

	<b>Variedad <i>Garnacha</i></b>		<b>Variedad <i>Syrah</i></b>	
	<b>Incidencia (%)</b>	<b>ID</b>	<b>Incidencia (%)</b>	<b>ID</b>
<b>Control</b>	42,06	16,82	55,83	21,11
<b>XT1</b>	14,42	8,65	51,85	19,44
<b>T. Químico</b>	23,81	10,48	75,00	30,13

En la finca de la variedad *Garnacha* (Tabla 22), la aplicación de la cepa XT1, redujo en un 65% la incidencia de la afección por *B. cinerea* y disminuyó el índice de daño a la mitad con respecto al control. Además, y en contraste con el tratamiento fitosanitario convencional, la aplicación de la cepa XT1, redujo un 22% más la incidencia en viñedos del moho gris.

Los datos de este apartado han sido facilitados por el equipo de la Universidad de Zaragoza.

### **2.2.3.2 Bioensayo en hojas de vid frente a *B. cinerea***

Procedentes de los viñedos de la variedad *Garnacha*, se tomaron muestras foliares de cada uno de los tratamientos y se sometieron a ensayos de *priming* en los cuales las hojas fueron infectadas con botones fúngicos de *B. cinerea*. Tal y como se aprecia en la figura 54, las hojas procedentes de viñedos sin ningún tipo de tratamiento (Fig. 54B) muestran los signos de necrosis y coloración marrón típicos del moho gris. Sin embargo, las hojas de aquellos inoculados con la cepa XT1 (Fig.54C) aparecen totalmente sanas. Como control del deterioro natural de la hoja y de la posible infección remanente, se dispusieron hojas del tratamiento control sin botones fúngicos; como se ve en la figura 54A, incluso sin infectar, el deterioro de la hoja es mucho mayor que en el caso de las muestras obtenidas del tratamiento con la cepa XT1.



**Figura 54.** Bioensayos en hojas de vid. A) Control: sin ningún tratamiento; B) XT1: tratamiento con bacteria XT1; C) XT1+*Botrytis*: infectado con *Botrytis* y tratamiento con bacteria XT1. Tras tres días de incubación

**3. Estudio de la modulación de los parámetros de estrés y el contenido en fitohormonas vegetales por la cepa XT1 en plantas de fresa y tomate infectadas por *B. cinerea***





## Resumen

En este último capítulo se han evaluado los efectos de la aplicación preventiva de la cepa *B. velezensis* XT1, en plantas de fresa y tomate, posteriormente infectadas con *B. cinerea*. Para ello, se han estudiado, por un lado, distintos parámetros de estrés, tales como el contenido en malondialdehído (MDA), calosa, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y fenoles así como las actividades enzimáticas polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina amonio liasa (PAL). Se ha analizado también el contenido en fitohormonas.

De forma general, el tratamiento con la cepa XT1 reduce los valores de MDA tras la aplicación radicular, en plantas de tomate y foliar, en plantas de fresa. Por el contrario, independientemente del mecanismo de aplicación de la cepa de estudio, en ambas especies vegetales el contenido en peróxido de hidrógeno aumenta y la actividad de la enzima polifenol oxidasa disminuye. En cuanto a la actividad enzimática llevada a cabo por la enzima fenilalanina amonio liasa, únicamente, los resultados de la aplicación foliar, muestran un aumento significativo tras la aplicación de la cepa XT1, tanto en plantas de tomate como de fresa.

En cuanto al contenido en depósitos de calosa, la aplicación preventiva de la cepa XT1, en ambos tipos de plantas, fomenta la acumulación de este compuesto independientemente del tipo de aplicación. Además, el aumento es más acusado en plantas tratadas con la cepa XT1 que posteriormente fueron infectadas con *B. cinerea*.

Por último, tras el análisis del contenido en fitohormonas vegetales, cabe destacar la implicación del tratamiento preventivo, tanto foliar como radicular, en el incremento de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), todas ellas relacionadas con la señalización de la resistencia sistémica.



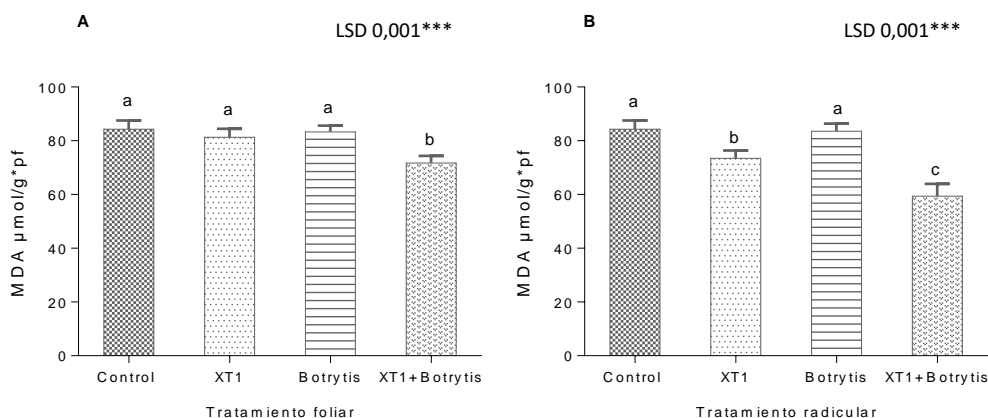
### 3.1 Ensayos en plantas de tomate

#### 3.1.1 Parámetros de estrés

Tras determinar la actividad de la aplicación preventiva de la cepa XT1, en plantas de tomate y fresa, infectadas con *B. cinerea*, se procedió al estudio de los parámetros de estrés que podrían verse implicados tras el tratamiento con un agente de biocontrol y la posterior infección con *B. cinerea*.

#### A) Contenido en malondialdehído (MDA)

Se evaluó el daño celular causado por la peroxidación lipídica en hojas de plantas de tomate mediante la determinación del contenido en malondialdehído (MDA). En la figura 55A se puede observar como en la aplicación foliar los tratamientos XT1 y *Botrytis* tienen los mismos valores en malondialdehído que el tratamiento control. Sin embargo, la aplicación previa del agente de estudio en plantas inoculadas con el fitopatógeno disminuye el contenido en MDA significativamente ( $p \leq 0,001$ ).



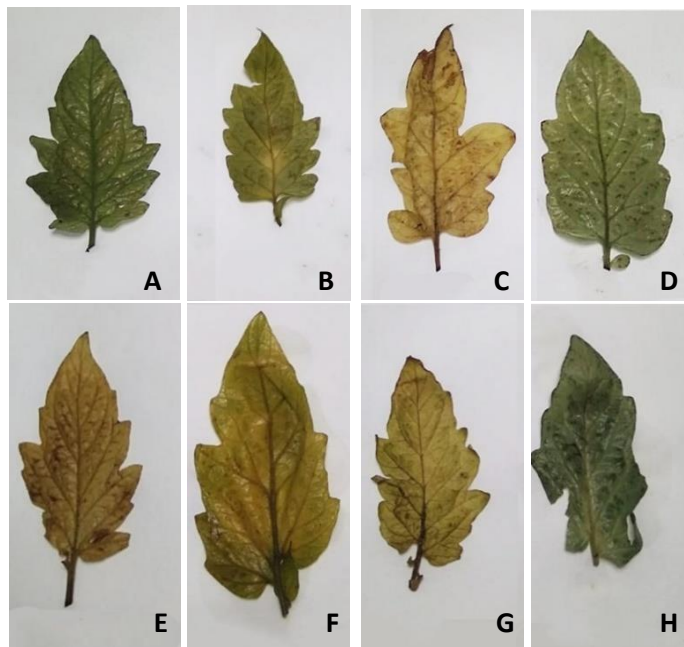
**Figura 515.** Contenido en malondialdehído (MDA) en plantas de tomate ( $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco). A) plantas tratadas con la cepa XT1 vía foliar y B) plantas con aplicación radicular de la cepa XT1. Nivel de significación \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), ns (no significativo).

La aplicación radicular de la cepa XT1 (Fig. 55B) reduce significativamente la acumulación de MDA en plantas infectadas con *B. cinerea* respecto a las plantas tan sólo inoculadas con el patógeno ( $p \leq 0,001$ ). Las plantas tratadas con el agente de biocontrol (XT1), alcanzaron valores inferiores a los alcanzados en el tratamiento control ( $p \leq 0,001$ ).



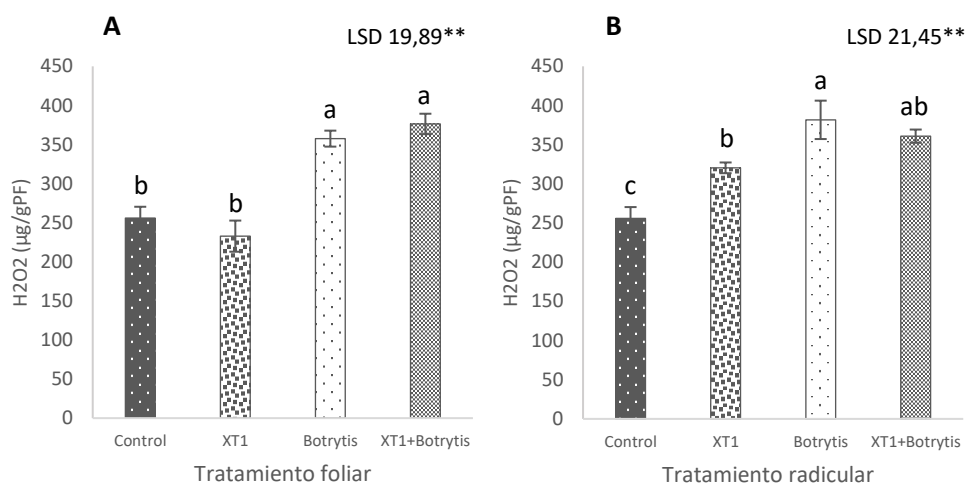
## **B) Contenido de especies reactivas de oxígeno**

Mediante la tinción histoquímica de ROS (especies reactivas de oxígeno), se puso de manifiesto el contenido de especies reactivas de oxígeno y su ubicación en la hoja. En este ensayo, se puede ver que la mayor tinción de ROS se produce en las plantas de tomate con el tratamiento *Botrytis* (Fig. 56C y G), presentando un tono marrón. Además, se observa que el tratamiento con la cepa XT1 en plantas infectadas con el fitopatógeno, presenta un bajo nivel de tinción en ambos tipos de aplicación (foliar y radicular), indicando un bajo nivel de estrés oxidativo por presencia de especies reactivas de oxígeno (Fig. 56D y H). Por lo tanto, la aplicación de XT1 en plantas infectadas por *B. cinerea* disminuye los efectos dañinos del patógeno, produciendo menor contenido en ROS.



**Figura 526.** Tinción histoquímica de ROS realizada en tomate en plantas con aplicación foliar (A-D) y radicular (E-H) de la cepa XT1. De izquierda a derecha: A y E) control, B y F) tratamiento con XT1, C y G) infección con *Botrytis*; D y H) tratamiento con bacteria XT1 e infectado con *Botrytis*.

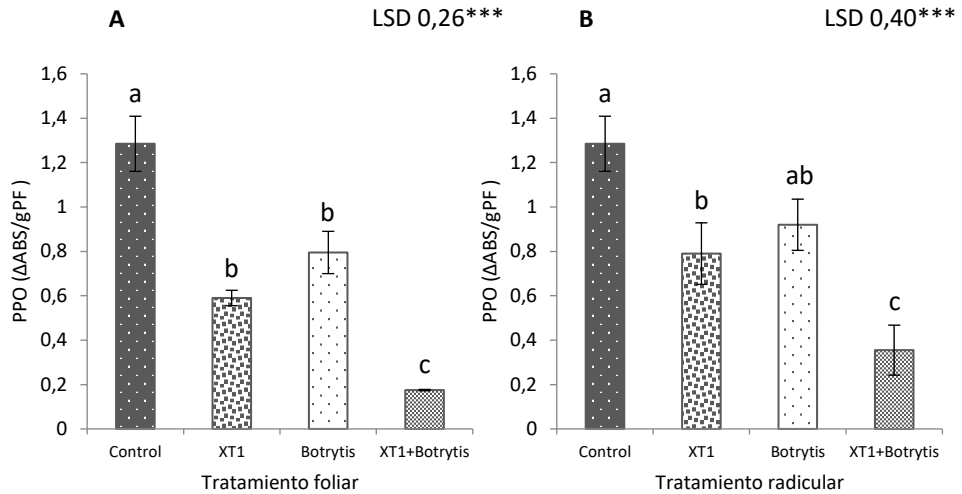
El análisis del contenido en peróxido de hidrógeno mediante espectrofotometría revela que la infección producida por *B. cinerea* en plantas de tomate aumenta significativamente el nivel en  $H_2O_2$  (Fig.57A y B). Mientras que la **aplicación radicular** de la cepa XT1 en plantas inoculadas con *B. cinerea* reduce de forma leve estos valores (Fig. 57B) la **aplicación foliar** parece no tener ningún efecto paliativo (Fig. 57A).



**Figura 537.** Contenido foliar de peróxido de hidrógeno en plantas de tomate ( $\mu\text{g}/\text{g}$  peso fresco). A) Aplicación de XT1 foliar y B) aplicación de XT1 radicular. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

### C) Actividad polifenol oxidasa (PPO)

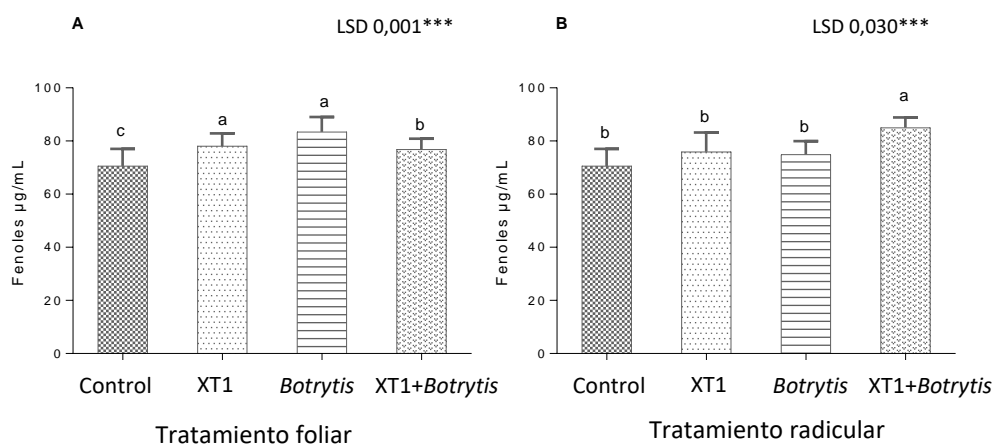
Para evaluar la capacidad de defensa de la planta frente al fitopatógeno se determinó el contenido en hoja de PPO. Tal y como se aprecia en la figura 58, en ambos tipos de aplicación, la inoculación de la cepa XT1 en plantas de tomate, supone una reducción de los valores en polifenol oxidada con respecto a las plantas control. El tratamiento con el agente de biocontrol en plantas infectadas con *B. cinerea* reduce significativamente el contenido en PPO con respecto a las plantas sin tratamiento XT1 e infectadas con *B. cinerea*.



**Figura 548.** Actividad polifenol oxidasa (PPO) en plantas de tomate ( $A_{390}$ /minuto). A) Actividad PPO tras la aplicación foliar y B) Actividad PPO en la aplicación radicular.

#### **D) Determinación de compuestos fenólicos**

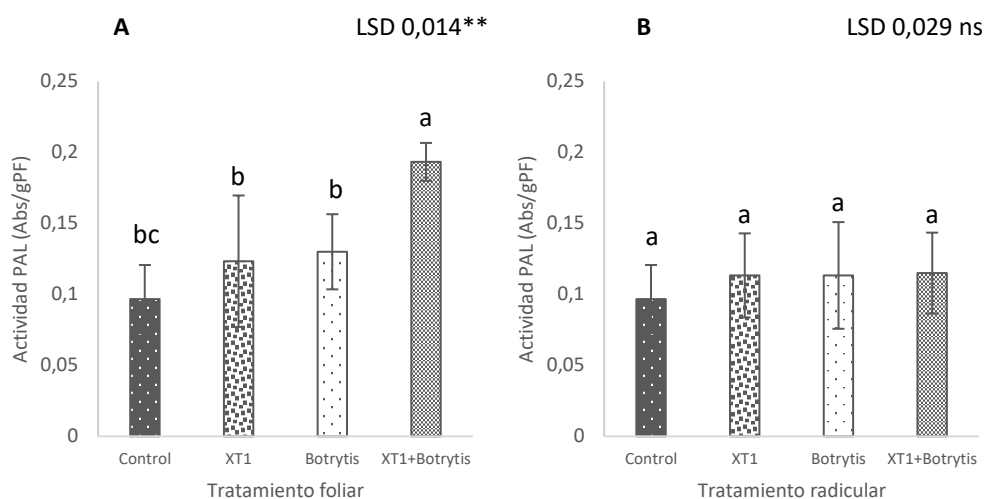
Mediante una extracción orgánica con metanol, se determinó el contenido en compuestos fenólicos en plantas de tomate. Como se observa en la figura 59A durante la aplicación foliar de XT1, el tratamiento con el patógeno *B. cinerea*, produce un aumento del contenido en compuestos fenólicos respecto al control ( $p < 0,001$ ). La aplicación de la cepa XT1 reduce levemente este valor en plantas infectadas ( $p < 0,030$ ). Por otro lado, en la inoculación vía radicular de la bacteria (Fig. 59B) la infección con *B. cinerea* no implica un cambio significativo en el contenido de fenoles con respecto al control o al tratamiento XT1. A diferencia de la aplicación vía foliar, en plantas infectadas con *B. cinerea* la inoculación previa del agente de biocontrol radicularmente produce un incremento de los compuestos fenólicos ( $p < 0,001$ ).



**Figura 559.** Contenido en fenoles en plantas de tomate ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). A) plantas tratadas con la cepa XT1 vía foliar y B) plantas con aplicación radicular de la cepa XT1. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

### **E) Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)**

Para evaluar los mecanismos de defensa activados en plantas de tomate durante el ensayo, se determinó la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), a través de la cuantificación mediante espectrofotometría del ácido cinámico, subproducto en la vía de síntesis de fenoles tras la acción de la enzima PAL sobre la fenilalanina. En el **tratamiento foliar**, la actividad fenilalanina amonio liasa se ve incrementada en plantas tratadas con la cepa XT1 y posteriormente infectadas con *B. cinerea* con respecto al resto de los tratamientos (Fig. 60A). Sin embargo, las plantas tratadas con la bacteria XT1 **vía radicular**, no muestran diferencias significativas para todos los tratamientos de estudio (Fig. 60B).



**Figura 60.** Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de tomate. A) Plantas con aplicación foliar y B) plantas con aplicación radicular del tratamiento con la cepa XT1. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

#### **F) Tinción de los depósitos de calosa**

Para observar los depósitos de calosa acumulados durante el ensayo en plantas de tomate, el material foliar se trató con azul de metileno y se observó mediante microscopía de fluorescencia. Tras la aplicación foliar del agente de estudio se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos (Fig. 61). Mientras que las imágenes obtenidas de las plantas infectadas con *B. cinerea* revelaron pequeños depósitos de calosa en la superficie foliar, la aplicación de la cepa XT1 produjo un gran aumento de esos depósitos, de tal manera que debieron modificarse los parámetros de observación para poder obtener imágenes nítidas. Del mismo modo ocurrió tras la aplicación radicular de nuestra bacteria, las plantas tratadas con la cepa XT1 sin infectar mostraban mayor luminiscencia debido a los depósitos de calosa que los tratamientos control y *Botrytis*. Además, la aplicación preventiva de XT1 en plantas posteriormente infectadas con *B. cinerea* hizo que dichos depósitos fuesen aún mayores que en el resto de los tratamientos.

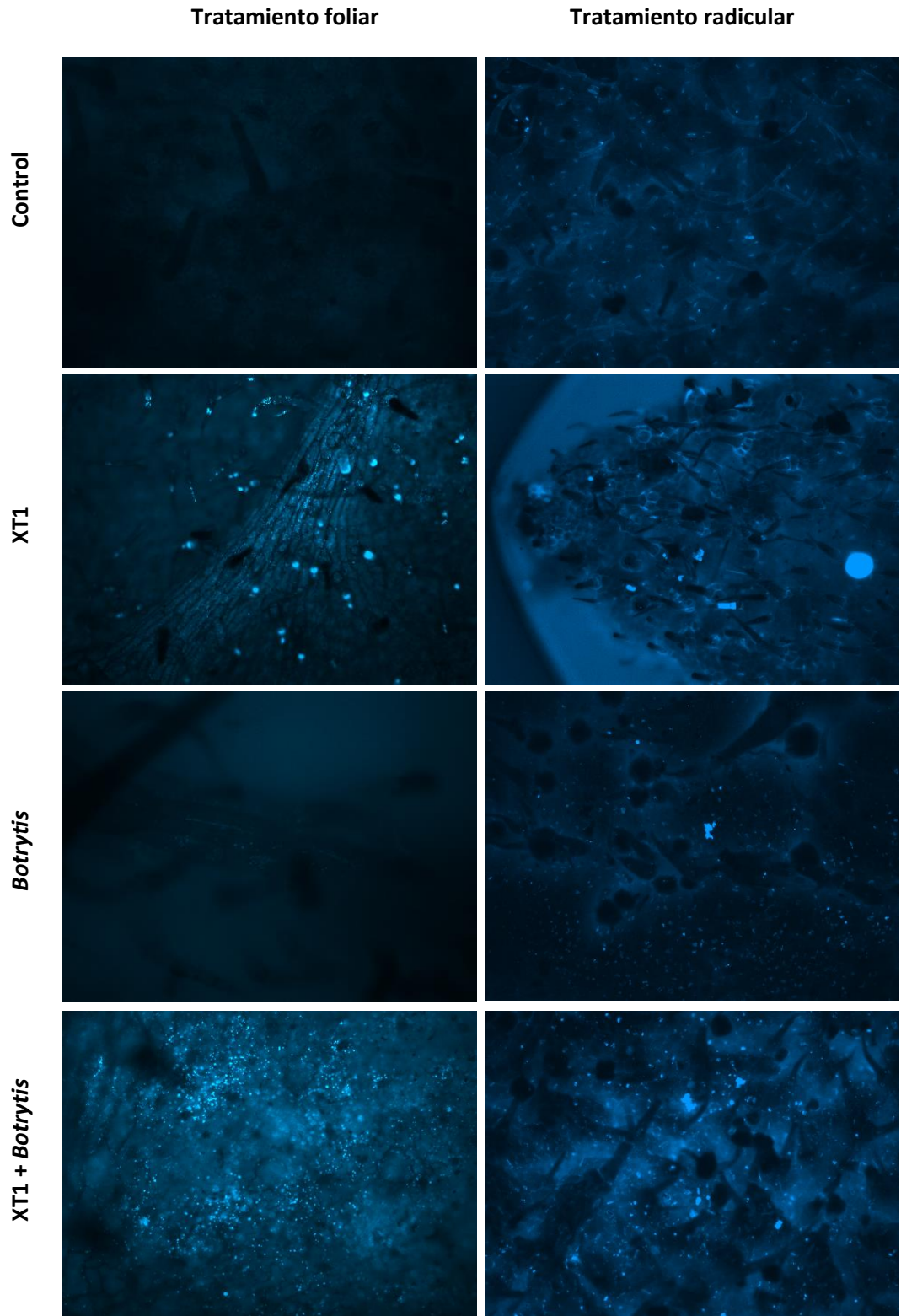


Figura 61. Microscopía de fluorescencia de los depósitos de calosa en hojas de tomate de plantas tratadas foliar y radicularmente con la cepa XT1, e infectadas con *B. cinerea*.

### 3.1.2 Contenido en fitohormonas vegetales

La determinación del contenido en hormonas vegetales se llevó a cabo mediante HPLC-MS a partir de las muestras foliares obtenidas de cada uno de los tratamientos. Tal y como se aprecia en la tabla 23, la aplicación de la cepa XT1 tanto vía foliar como radicular no implicó diferencias en el contenido en **citoquininas** y **auxinas** (AAI) respecto al resto de los tratamientos. Del mismo modo, la infección con el fitopatógeno tampoco generó cambios en el contenido de estos compuestos.

En lo que respecta al **etileno** (ET, ACC), aunque en las plantas del tratamiento control no se detectó ninguna cantidad de este compuesto, la aplicación de la cepa XT1 por ambas vías, tanto en plantas infectadas como sin infectar por el fitopatógeno, supuso un incremento leve de etileno. Las plantas infectadas con *B. cinerea* también manifestaron pequeñas concentraciones de dicho compuesto.

Se obtuvieron resultados similares para las **giberelinas** (GA), en el tratamiento control tan sólo se detectó la presencia de uno de los tres tipos de GA analizadas. Sin embargo, la aplicación de la cepa XT1 tanto en plantas infectadas como sin infectar, tuvo como consecuencia la acumulación de los tres tipos de giberelinas. En las plantas del tratamiento *Botrytis* al igual que en el tratamiento control, únicamente se detectó la GA4.

Por otro lado, la aplicación de la cepa XT1 vía foliar tanto en plantas sin infectar como infectadas con *B. cinerea*, produjo un aumento del 16% y 23 %, respectivamente, en el contenido en **ácido abscísico** (ABA) respecto al control. Igualmente, la aplicación radicular incrementó la concentración en más de un 55% en plantas con y sin infección por el fitopatógeno, en comparación con el tratamiento control. Las plantas infectadas con *B. cinerea* y sin ningún tratamiento tan sólo aumentaron el contenido en ABA en un 12% respecto al control.

En cuanto al contenido en **ácido jasmónico** (JA), respecto al tratamiento control tanto en plantas sin infectar como infectadas por el hongo, la aplicación de la cepa XT1 vía foliar multiplicó por tres el contenido en este compuesto y la aplicación radicular por cuatro. La infección con el patógeno aumentó el contenido en ácido jasmónico al doble de la concentración detectada en las plantas control.

Por último, en comparación con el tratamiento control en plantas sin infectar la aplicación foliar y radicular de la cepa XT1 supuso aumentos del 18% y 32 % en **ácido salicílico** (SA), respectivamente, mientras que tratadas con la cepa XT1 por ambas vías e infectadas con el hongo, estos porcentajes aumentaron hasta alcanzar valores del 42% (foliar) y el 63% (radicular). Por otro lado, en plantas infectadas con *B. cinerea* el incremento en este compuesto fue del 25%.

**Tabla 23.** Contenido de fitohormonas en plantas de tomate tras la aplicación de XT1, foliar y radicular, y posterior infección con *B. cinerea*. Datos expresados en ng/g PF.

		Tratamiento					
		Control	XT1		<i>B. cinerea</i>	XT1+ <i>B. cinerea</i>	
Grupo	Hormona	Foliar/Radicular	Foliar	Radicular	Foliar/Radicular	Foliar	Radicular
Etileno	ACC	NI	<b>0.002</b>	<b>0.007</b>	<b>0.010</b>	<b>0.009</b>	<b>0.006</b>
Citoquininas	Trans-zeatina	61.53	56.57	54.65	59.58	62.31	60.26
	Ribósido zeatina	6.43	6.02	5.89	6.89	6.19	6.23
	Isopentenil-adenina	3.25	3.12	3.10	3.78	3.16	3.10
Giberelinas	GA1	NI	NI	0.002	NI	0.001	0.007
	GA3	NI	0.004	0.005	NI	NI	0.002
	GA4	0.054	0.019	0.034	0.061	0.068	0.075
Auxinas	AAI	68.05	65.24	61.25	63.05	60.51	66.64
Otras	A. abcísico (ABA)	1.05	1.16	<b>1.59</b>	1.12	1.23	<b>1.56</b>
	A. salicílico (SA)	7.72	<b>9.12</b>	<b>10.23</b>	<b>9.65</b>	<b>11.05</b>	<b>12.65</b>
	A. jasmónico (JA)	1.32	<b>4.26</b>	<b>5.12</b>	<b>3.03</b>	<b>4.19</b>	<b>5.23</b>

NI: no identificado

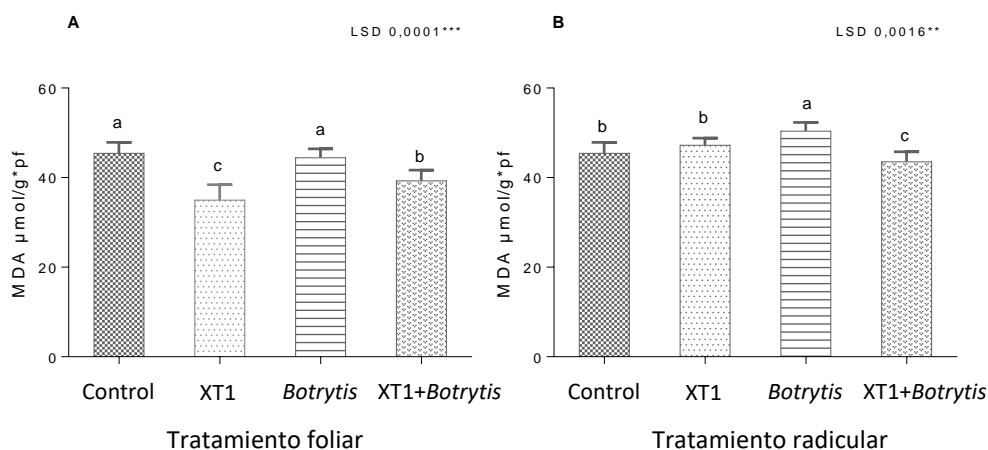


## 3.2 Ensayos en plantas de fresa.

### 3.2.1 Parámetros de estrés.

#### A) Contenido en malondialdehído (MDA)

Se evaluó el daño celular causado por la peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas mediante la medición por espectrofotometría del contenido en malondialdehído en hoja. La aplicación foliar de la cepa XT1 (Fig. 62A) redujo la concentración de MDA causada por la infección del fitopatógeno de forma significativa ( $p \leq 0,006$ ) en contraste con las plantas infectadas con *B. cinerea*. Además, la comparación entre el tratamiento control sin infección y el tratamiento XT1 revela que la aplicación del microorganismo redujo el estrés vegetal natural en plantas de fresa en un 23% ( $p \leq 0,0001$ ). Por otro lado, la administración radicular de la cepa XT1 previa a la infección con *B. cinerea* (Fig. 62B), fomentó la reducción de los valores de MDA de forma significativa ( $p \leq 0,0002$ ). Sin embargo, a diferencia del tratamiento foliar, la aplicación radicular de XT1 no tuvo efectos positivos en comparación con el tratamiento control.

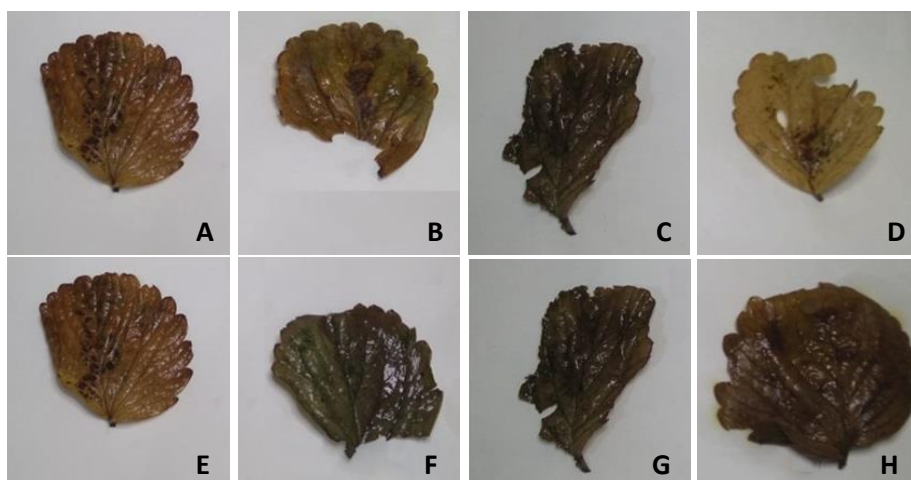


**Figura 562.** Contenido en malondialdehído (MDA) en plantas de fresa ( $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco). A) plantas tratadas con la cepa XT1 vía foliar y B) plantas con aplicación radicular de la cepa XT1. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

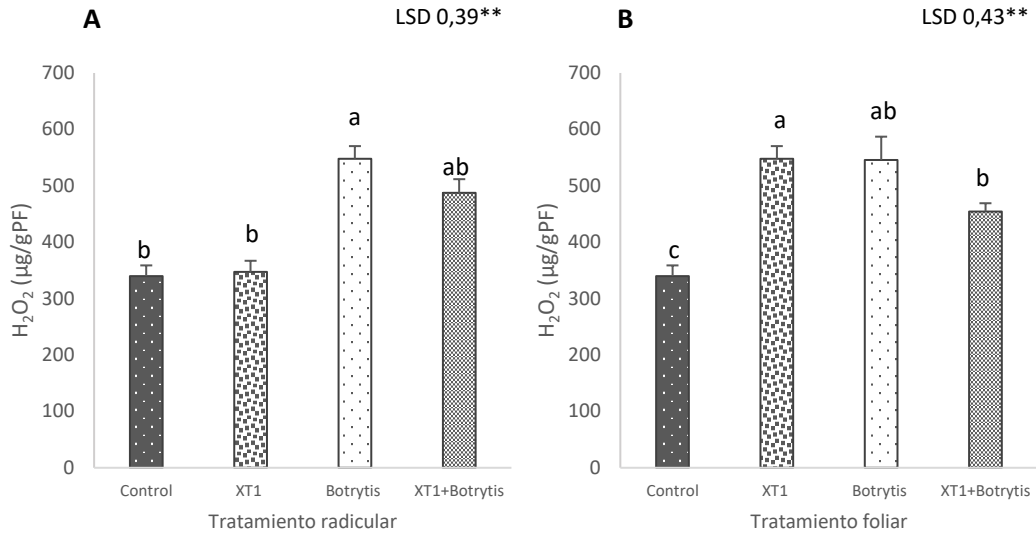
## **B) Determinación del contenido de especies reactivas de oxígeno:**

La determinación del contenido en especies reactivas de oxígeno (ROS) y su ubicación en la hoja de plantas de fresa, se llevó a cabo mediante técnicas espectrofotométricas y una tinción histoquímica, respectivamente. En el **tratamiento radicular** con la cepa XT1, las plantas infectadas con el fitopatógeno contenían mayores depósitos de especies reactivas de oxígeno en la superficie foliar que el resto de los tratamientos (Fig. 63A-D). Estos datos cualitativos se corresponden con los valores obtenidos mediante espectrofotometría (Fig.64A), donde el contenido en radicales libres alcanzó cifras más elevadas en las plantas infectadas con *B. cinerea*. El tratamiento con la cepa XT1, no sólo no incrementó la concentración de ROS en planta, sino que además, su aplicación radicular preventiva en plantas infectadas con *B. cinerea*, disminuyó significativamente los valores de ROS en comparación con las plantas infectadas sin ningún tratamiento.

Por otro lado, en la **aplicación foliar** de XT1 y de acuerdo a las imágenes obtenidas tras la tinción histoquímica, podría decirse que en plantas de fresa no tiene un efecto positivo, ya que las hojas de plantas tratadas con la cepa XT1 (Fig. 63F) tienen el mismo aspecto que las infectadas por el fitopatógeno (Fig. 63G). Sin embargo, los datos en contenido de peróxido de hidrógeno revelan una reducción leve en las plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas con XT1 respecto a aquellas tan sólo inoculadas con el patógeno (Fig. 64B).



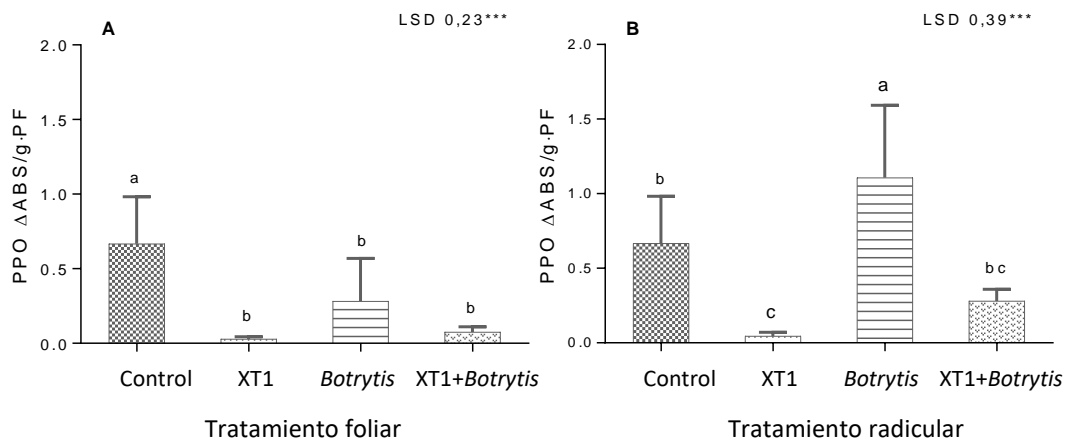
**Figura 63.** Tinción histoquímica de ROS realizada en plantas de fresa con aplicación radicular (A-D) y foliar (E-H) de la cepa XT1. De izquierda a derecha: A) control, B) tratamiento con XT1, C) infección con *Botrytis*: D) infectado con *Botrytis* y tratamiento con bacteria XT1.



**Figura 64.** Contenido foliar de peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{g/g}$  de peso fresco). A) Ensayo de aplicación de XT1 Radicular y B) Ensayo de aplicación de XT1 Foliar. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

### **C) Actividad polifenol oxidasa (PPO)**

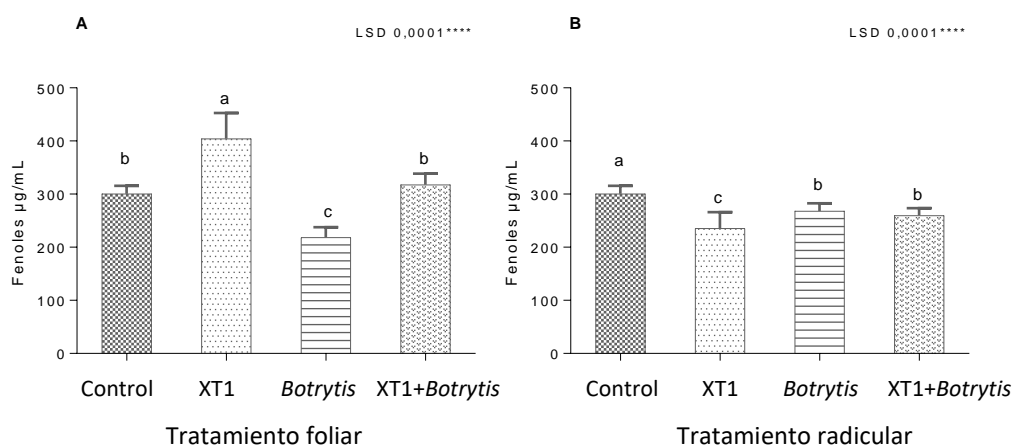
Para determinar el “estado de alerta” de la planta producido por el patógeno, se determinó el contenido en hoja de PPO en plantas de fresa. Tal y como se aprecia en la figura 65, tanto la aplicación foliar como la radicular de la cepa XT1 en plantas posteriormente infectadas con *B. cinerea* conllevó la reducción de los valores de PPO con respecto a las plantas tan solo infectadas con el patógeno. Además, la aplicación del agente de biocontrol disminuyó el contenido en este compuesto indicador de estrés con respecto a los valores obtenidos en el tratamiento control con ambas aplicaciones, radicular ( $p \leq 0,0298$ ) y foliar ( $p \leq 0,0367$ ).



**Figura 6557.** Actividad polifenol oxidasa (PPO) en plantas de fresa ( $A_{390}$ /minuto). A) Actividad PPO tras la aplicación foliar y B) Actividad PPO en la aplicación radicular.

#### **D) Determinación de compuestos fenólicos**

La cuantificación mediante espectrofotometría del contenido en compuestos fenólicos en plantas de fresa reveló diferencias significativas en respuesta al modo de aplicación de la cepa XT1. Tras la inoculación **vía foliar** con el agente de estudio, los valores obtenidos en el contenido en fenoles para el tratamiento con la cepa XT1 fueron un 25% superiores a la concentración alcanzada en el tratamiento control ( $p \leq 0,0001$ ) (Fig. 66A). Por otro lado, mientras que en las plantas infectadas con *B. cinerea* el contenido fenólico se redujo en un 21% con respecto al control ( $p \leq 0,0001$ ), el tratamiento con la cepa XT1 en plantas infectadas con el fitopatógeno palió esta reducción por completo.

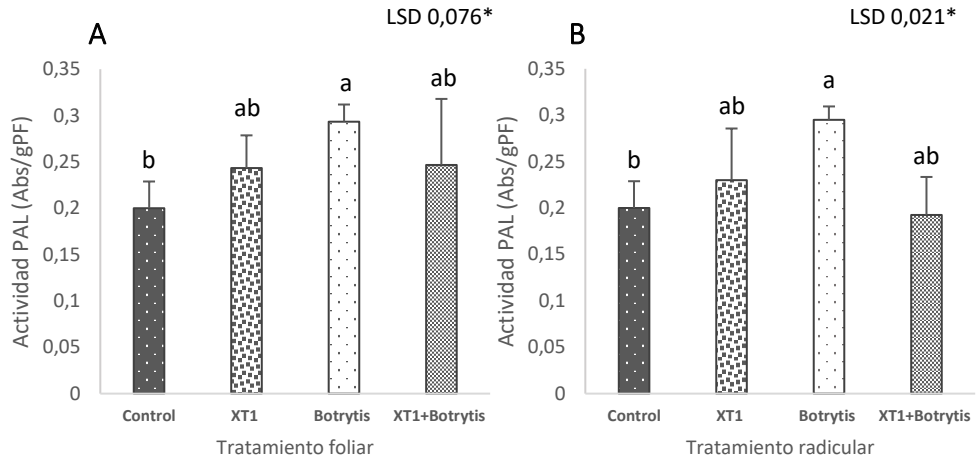


**Figura 66.** Contenido en fenoles en plantas de fresa ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). A) plantas tratadas con la cepa XT1 vía foliar y B) plantas con aplicación radicular de la cepa XT1. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

La **aplicación radicular** de la cepa XT1 (Fig. 66B) produjo resultados totalmente distintos a los obtenidos anteriormente. El tratamiento con XT1 redujo el nivel del contenido en fenoles en plantas de fresa en un 21% respecto al tratamiento control ( $p \leq 0,0001$ ). Además, la administración de la cepa XT1 en plantas posteriormente infectadas con *B. cinerea* no supuso ninguna diferencia respecto a las plantas infectadas con el fitopatógeno sin ningún tratamiento preventivo.

### **E) Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)**

Tanto la aplicación radicular como foliar de la cepa XT1 a plantas de fresa conllevaron una reducción de la actividad PAL en plantas infectadas con *B. cinerea* (Fig.67A y B).



**Figura 587.** Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de fresa. A) Plantas con aplicación foliar y B) plantas con aplicación radicular del tratamiento con la cepa XT1.. Nivel de significación \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ), ns (no significativo).

#### **F) Tinción de los depósitos de calosa**

Como se aprecia en la figura 68, la infección producida por *B. cinerea*, implica un pequeño aumento de los depósitos de calosa en hoja con respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con la cepa XT1, tanto vía foliar como radicular incrementa dichos depósitos en gran medida, tanto en plantas que habían sido inoculadas con el fitopatógeno como en plantas sin infectar. En este caso, el método de aplicación del agente de biocontrol no supone ninguna diferencia en la respuesta vegetal.

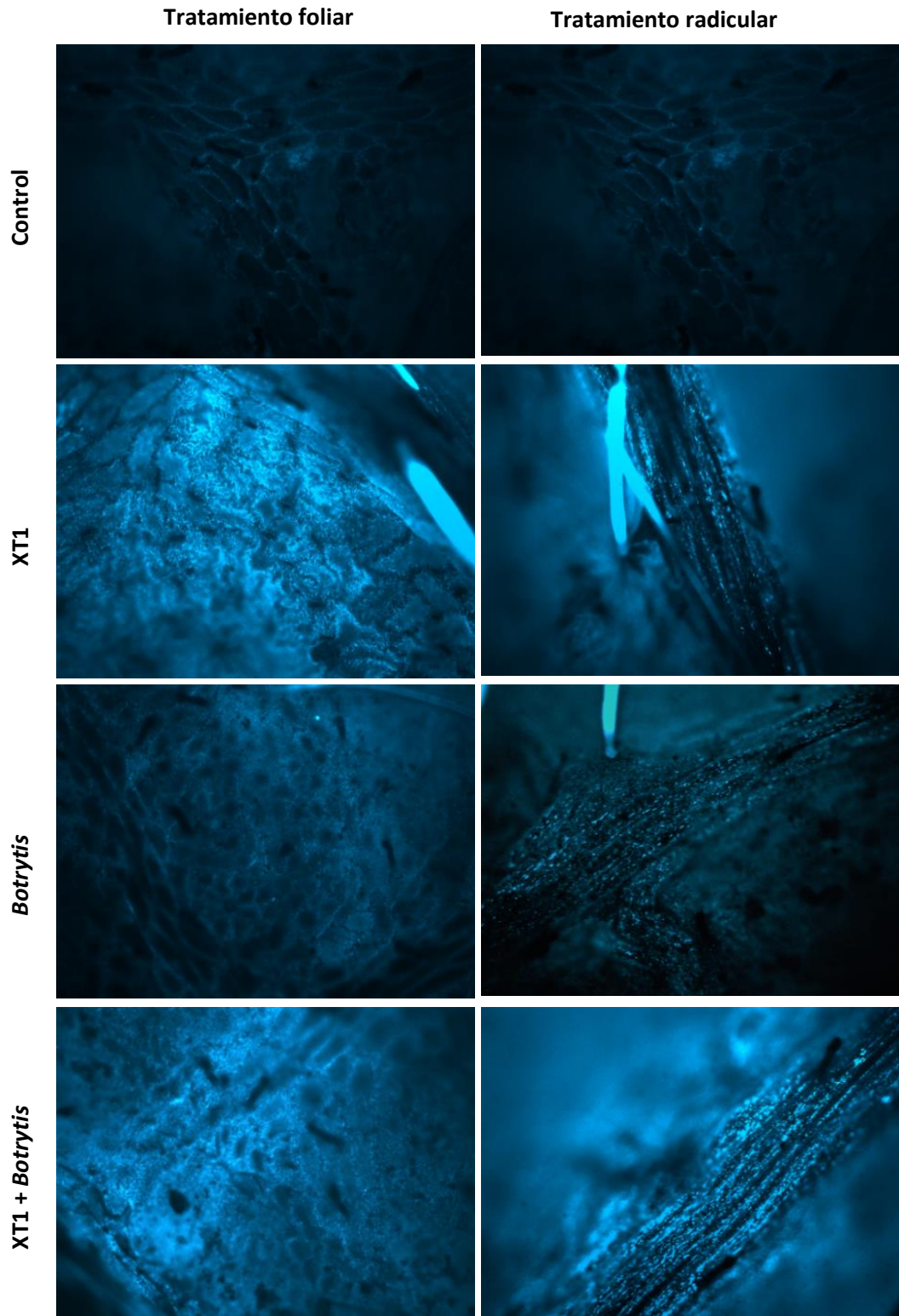


Figura 68. Microscopía de fluorescencia de los depósitos de calosa en hojas de fresa de plantas tratadas foliar y radicularmente con la cepa XT1, e infectadas con *B. cinerea*.

### 3.2.2 Contenido en fitohormonas vegetales

Tras el análisis mediante HPLC-MS en el contenido hormonal en plantas de fresa (Tabla 24), se observó que tanto el tratamiento foliar como el radicular con la cepa XT1 supuso un aumento leve en el contenido de **etileno**, en plantas sin infectar e infectadas con *B. cinerea*, con respecto a las plantas control, donde no se detectó ninguna traza de este compuesto. De igual forma, las plantas del tratamiento *Botrytis* sin ninguna aplicación preventiva incrementaron el contenido en este compuesto. En cuanto a las **citoquininas**, de los tres grupos pertenecientes a esta familia que se analizaron, tan sólo la trans-zeatina se vio incrementada con respecto al tratamiento control tras la aplicación de la cepa XT1 foliarmente, tanto en plantas sin infectar como en infectadas con *B. cinerea*. En el resto de los tratamientos no se apreciaron cambios en ninguno de los tres grupos de citoquininas con respecto al control. En lo referente al contenido en **giberelinas**, la aplicación foliar y radicular de la cepa XT1 mantuvo o incrementó levemente el contenido en los tres grupos analizados con respecto al tratamiento control. Las plantas infectadas con *B. cinerea* también mostraron valores superiores a los alcanzados en el tratamiento control. En la comparativa respecto al control en el contenido en auxinas, tan sólo la aplicación foliar de la cepa XT1 produce cambios, disminuyendo la concentración de este compuesto. El resto de los tratamientos mantienen valores similares al tratamiento control. Los valores en **ácido abscísico** (ABA) en las plantas tratadas foliarmente con la cepa XT1, tanto infectadas como no infectadas con *B. cinerea*, se vieron disminuidos a la mitad con respecto a los tratamientos control y *Botrytis*. Sin embargo, el tratamiento radicular no conllevó ninguna diferencia en el contenido en ABA. Los valores obtenidos para las hormonas **ácido salicílico** (SA) y **ácido jasmónico** (JA) siguieron el mismo patrón en ambos tipos de aplicación. En las plantas tratadas con la cepa XT1, el contenido en JA se cuadruplicó con respecto al control, mientras que en aquellas infectadas con *B. cinerea* estos valores tan sólo se duplicaron. Del mismo modo aunque con incrementos más moderados, la aplicación foliar de la cepa XT1 supuso un aumento en el contenido en SA del 62% en plantas sin infectar y del 96% en plantas con infectadas con *B. cinerea*, con respecto a l tratamientos control. Por otro lado, la aplicación radicular aumentó el contenido en plantas sin infectar e infectadas con el hongo en un 44% y 64%, respectivamente, en comparación con el tratamiento control. Por último, la infección con el fitopatógeno tan solo generó un aumento del 7% en este compuesto.



**Tabla 24.** Contenido de fitohormonas en plantas de fresa tras la aplicación de XT1, foliar y radicular, y posterior infección con *B. cinerea*. Datos expresados en ng/g PF.

Tratamiento		Control		XT1		<i>B. cinerea</i>		XT1+B. <i>cinerea</i>	
Grupo	Hormona	Foliar/Radicular	Foliar	Radicular	Foliar/Radicular	Foliar/Radicular	Foliar	Radicular	Radicular
Etileno	ACC	NI	0,002	0,003	0,015	0,009	0,005		
	Trans-zeatina	48,56	56,57	50,21	51,26	62,31	49,25		
	Ribósido zeatina	7,21	6,02	6,12	7,09	6,19	6,78		
Citoquininas	Isopentenil-adenina	4,16	3,12	4,12	3,98	3,16	4,09		
	GA1	NI	NI	0,004	NI	0,001	0,006		
	GA3	0,009	0,004	0,008	NI	NI	0,008		
Giberelinas	GA4	0,012	0,019	0,029	0,0250	0,068	0,015		
	AAI	75,62	65,24	71,42	81,26	60,51	78,92		
Auxinas	A. abscísico (ABA)	2,31	1,16	2,45	2,41	1,23	2,59		
Otras	A. salicílico (SA)	5,62	9,12	8,12	6,02	11,05	9,25		
	A. jasmónico (JA)	0,95	4,26	3,59	1,25	4,19	3,20		

NI: no identificado

## DISCUSIÓN

---



***Botrytis cinerea*** es un hongo necrotrófico causante del moho gris. Este fitopatógeno puede infectar más de 200 especies de plantas, incluyendo entre ellas, importantes cultivos de frutas y hortalizas (Gao y col., 2018). Además, una de las razones de su relevancia, estriba en las grandes pérdidas económicas derivadas de las mermas en cultivos y cosechas (Dean y col., 2012). La capacidad de producir conidióforos que contienen conidios, le otorga a este patógeno, la posibilidad de mantenerse en un estado quiescente hasta que las condiciones ambientales sean lo suficientemente favorables para infectar los tejidos vegetales (Gao y col., 2018). Por otro lado, la producción de enzimas líticas junto con otros metabolitos fitotóxicos, permite la inducción de la muerte celular en los tejidos vegetales, afectando en mayor medida a aquellos que se encuentran en estado senescente o dañados en la superficie (Finiti y col., 2014; Gonzalez-Fernández y col., 2015; Yu y col., 2015; Yahaya y col., 2016). La alta ubicuidad, junto con la capacidad de producir estructuras de resistencia y la elevada tasa de mutación convierten a *B. cinerea* en un difícil adversario contra el que luchar (Gonzalez-Fernández y col., 2015; Haidar y col., 2016).

Hoy día, los tratamientos empleados para combatir el moho gris causado por *B. cinerea*, se basan en el uso extensivo de pesticidas, sin embargo, las posibilidades de empleo se han visto recientemente limitadas debido a las restricciones impuestas a este tipo de productos por la Regulación de Pesticidas en el marco Europeo (CE) N° 1107/2009 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, entre otras (Villaverde y col., 2014; Lamichhane y col., 2016). Además, su uso conlleva la producción de residuos y contaminantes de las aguas subterráneas que incrementan el riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Pérez-García y col., 2011; Romanazzi y col., 2012; Finiti y col., 2014). Por todo esto, uno de los grandes retos de la agricultura sostenible, es el desarrollo de alternativas que respeten el medio ambiente y preserven la sanidad de la población. En la última década, se ha incrementado el empleo de cepas bacterianas como mecanismo de control biológico, éstas son de particular interés debido a la tan buscada naturaleza *eco-friendly* y a que cuentan con numerosos modos de acción contra fitopatógenos.

La cepa ***B. velezensis* XT1** fue originalmente clasificada como *B. methylotrophicus* XT1 CECT 8661 (depositada de acuerdo al Tratado de Bucarest para su patente y licenciada a la empresa Xtrem Biotech S.L.). Posteriormente, la especie *B. methylotrophicus* fue reclasificada y denominada *B. velezensis* (Dunlap y col., 2016). La cepa es un bacilo gram positivo, esporulado y halotolerante, con capacidad de desarrollarse en ambientes en un amplio rango de concentraciones de sal (0-12,5%), pH (4-10) y temperatura (15-40°C) (Béjar y col., 2014). Estas propiedades unidas a la alta viabilidad en el tiempo, consecuencia directa de su capacidad de esporulación, y la posibilidad de usar distintas

fuentes nutricionales, convierten a la cepa XT1 en un microorganismo con un gran potencial para sobrevivir bajo condiciones extremas en ambientes muy distintos.

Además de su elevada tolerancia a situaciones de estrés, los resultados de la caracterización bioquímica de la cepa XT1, aportan más razones para considerar a este microorganismo como un potencial PGPB. Su metabolismo aerobio, le permite crecer en la superficie de suelos y plantas, mientras que el uso de nitratos o nitritos como receptores de electrones cuando realiza respiración anaerobia posibilitan su desarrollo cerca de la zona radicular. Además, su capacidad de fijar nitrógeno le confiere por una parte la habilidad de crecer en suelos deficientes en este compuesto, y por otra suministrar a las plantas amonio como consecuencia de fijar  $N_2$  atmosférico (Riggs y col., 2001).

La cepa XT1 es capaz de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono gracias a la síntesis de enzimas como glucanasas, peptinasas, amilasas y lipasas. Además, se ha descrito la implicación de algunas de estas enzimas en la actividad antifúngica frente a diversos patógenos o en la degradación de microorganismos endofíticos de las paredes celulares vegetales durante la colonización de sus tejidos (Jadhav y Sayyed, 2016; Khan y col., 2018; Myo y col., 2019). Otras enzimas producidas por la cepa XT1 como fosfatasa o ACC desaminasa están también asociadas a la promoción del crecimiento en plantas. En primer lugar, la síntesis de ACC desaminasa está relacionada con la reducción de los niveles de etileno en plantas en condiciones de estrés. Además, la hidrólisis de ACC provee a la planta de fuentes de carbono como el amonio y el ácido  $\alpha$ -cetobutírico (Ruzzi y Aroca, 2015). Por otro lado, la cepa XT1 produce la enzima fosfatasa alcalina, la cual libera fosfatos de los compuestos orgánicos, y la enzima fosfatasa ácida, la cual solubiliza fosfato inorgánico (Rodríguez y Fraga, 1999). Mediante la mejora de absorción de fósforo por la planta, estas enzimas juegan un papel importante en la producción de cultivos (Marques y col., 2010; Witte, 2011; Anwar y col., 2016).

Por último, entre los compuestos sintetizados por la cepa XT1 que lo convierten en un potencial agente de biocontrol, se encuentran los sideróforos, moléculas que promueven la captura de hierro ( $Fe^{3+}$ ) del ambiente y su transformación en hierro disponible para las plantas ( $Fe^{2+}$ ), lo que mejora la calidad y productividad de los cultivos. Además, los microorganismos PGPR mediante la reducción del hierro disponible son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos bacterianos y fúngicos (Chen y col., 2007; Chowdhury y col., 2015; Saha y col., 2016; Rabbee y col., 2019).

En lo que respecta a la inhibición del crecimiento fúngico, muchas especies pertenecientes al género *Bacillus*, tales como *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* y *B. mycoides*, han sido descritas como

microorganismos inhibidores de hongos (Reddy, 2014; Gómez-Lama Cabanás y col., 2018; Grady y col., 2019; Luo y col., 2019; Pandin y col., 2019). La cepa XT1 ha demostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico en más de un 40% a un amplio espectro de fitopatógenos entre los que se encuentra *B. cinerea* (Torres y col., en revisión). En esta tesis, se ha confirmado el potencial de nuestra cepa de estudio en la inhibición de *B. cinerea*, alcanzando porcentajes de eficacia del 40% empleando el cultivo celular de XT1 y del 100% mediante el uso del sobrenadante.

El desarrollo de un agente de biocontrol y su uso en el manejo integrado de plagas puede estar condicionado por su incompatibilidad con los fungicidas químicos de uso rutinario en campo. Por ello, es necesario conocer la viabilidad y capacidad de crecimiento del microorganismo en presencia de los compuestos empleados frente a los patógenos de interés. Teniendo en cuenta futuros ensayos en campo, se testó el **crecimiento de la cepa XT1 en presencia de productos químicos** de uso común en viñedos. Se demostró la compatibilidad con un 73% de los productos testados, con los fungicidas Arius®, Collis®, Dynali®, Flint®, Luna Experience® y Systhane®; con el producto basado en azufre en polvo Cepsus Especial®; con los insecticidas Audace® y Runner® y con el acaricida Apache. La viabilidad con el fungicida Systhane® fue considerable aunque menor que con los anteriores. Los productos Droxicuper 50®, CLosar Le®, Armicarbe® y Karathane Star® inhiben el crecimiento de la cepa XT1 a concentraciones de uso en campo por lo que no sería viable su aplicación conjunta. En la actualidad, la información sobre la compatibilidad de cepas pertenecientes al género *Bacillus* con este tipo de productos es prácticamente inexistente. En uno de esos estudios existentes, se demostró que las cepas *B. subtilis* QST713 y *B. amyloliquefaciens* D747, son capaces de coexistir con un amplio espectro de agroquímicos (Rotolo y col., 2018). Otros autores describieron la tolerancia de la cepa *B. ginsengihumi* S38, no a productos químicos, pero sí a adyuvantes con elevada toxicidad para los microorganismos, empleados en el cultivo de la vid (Calvo-Garrido y col., 2018).

Entre los miembros del género *Bacillus*, uno de los factores más relevantes relacionados con la actividad antifúngica es la **producción de metabolitos secundarios** entre los que se incluyen los lipopéptidos NRPSs, como las iturinas, fengicinas y surfactinas, y los compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Romero y col., 2007; Ongena y Jacques, 2008; Meng y col., 2016; Pérez-Flores y col., 2017; Pramudito y col., 2018). Por ello, uno de los objetivos de esta tesis ha sido describir la actividad antifúngica de la cepa *Bacillus velezensis* XT1 CECT 8661 y de su fracción lipopeptídica frente al hongo *B. cinerea*. Además, se ha optimizado su producción, se han identificado dichos lipopéptidos, se ha determinado su CMI y CMF y se ha demostrado su implicación en la actividad antifúngica

*in vivo*, determinando la alteración de las estructuras fúngicas y la activación de la resistencia sistémica inducida en frutos afectados por el patógeno.

Los lipopéptidos se producen como una amalgama de macromoléculas pertenecientes a la misma familia o clase. El análisis genómico mediante PCR de la cepa XT1, indicó que ésta contiene un *cluster* de genes codificador de lipopéptido sintetasa no ribosomales relacionadas con la producción de surfactina, iturina, fengicina y bacilomicina. La detección de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas de alta definición (UPLC-HDMS Q-TOF), demostrándose que dicha cepa produce todos los lipopéptidos excepto la iturina. Otros estudios demostraron previamente, que algunas de éstas macromoléculas son producidas igualmente por distintos miembros de la especie *B. methylotrophicus* así como de *B. velezensis* (Frikha-Gargouri y col., 2017; Al-ali y col., 2018).

Con el fin de determinar la influencia del medio de cultivo en la biosíntesis de lipopéptidos por la cepa de estudio, se testaron diferentes fuentes nutricionales. Los datos revelaron la importancia decisiva que tiene el tipo de medio de cultivo para la producción de lipopéptidos. Ahimou y col. (2000) describieron un medio óptimo para la producción de lipopéptidos (medio MOLP) por *B. subtilis*. En el presente trabajo se concluyó también, que el medio MOLP es el más indicado para incrementar la producción de lipopéptidos en *B. velezensis* XT1. La influencia ejercida por las condiciones de cultivo en la producción de lipopéptidos fue previamente descrita para otras cepas del género *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, quedando reflejadas la relevancia de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas para el cultivo de las cepas así como las proporciones de cada uno de los compuestos empleados (Monteiro y col., 2005; Medeot y col., 2017). Además, se ha descrito que el uso de un medio de cultivo favorecedor del crecimiento bacteriano implica un considerable incremento en la producción de metabolitos secundarios (Qian y col., 2015; Lu y col., 2016). Concretamente, se ha demostrado que existe una relación directa entre la generación de biomasa celular y la producción de lipopéptidos, como es el caso de la bacilomicina y la fengicina (Lu y col., 2016). En términos de estabilidad, la naturaleza termoestable de los lipopéptidos de la cepa XT1, así como el hecho de que éste tipo de compuestos se ven afectados por valores de pH extremadamente alcalinos, también han sido observados en la evaluación de la actividad de los biosurfactantes producidos por *B. subtilis* (Ghribi y col., 2012).

Por otro lado, numerosos estudios han descrito el efecto antagonista de los metabolitos NRPSs, como los lipopéptidos, frente a distintos patógenos (Chowdhury y col., 2015; Mnif y Ghribi, 2015). Como ejemplo, se ha demostrado que el biocontrol ejercido por cepas del género *Bacillus* frente a diferentes bacterias y hongos patógenos como *Magnaporthe*

*oryzae* y *Pseudomonas syringae* es posible gracias a lipopéptidos como la surfactina (Bais y col., 2004; Rahman y col., 2015). De acuerdo a la bibliografía descrita para el género *Bacillus*, la mayor parte de las investigaciones refieren la inhibición de *B. cinerea* por metabolitos NRPSs producidos por *B. subtilis*, sin embargo, estos no demuestran directamente la implicación de éstas moléculas en dicha antibiosis, sino que describen su participación indirecta mediante ensayos de antibiosis empleando el cultivo bacteriano o a través de la activación de la resistencia sistémica de la planta (Farace y col., 2015; Wang y col., 2015;). Lo mismo ocurre con distintas cepas de *B. amyloliquefaciens*, (Ji y col., 2013; Pretorius y col., 2015; Tanaka y col., 2015; Zhang y col., 2017), y otras especies de *Bacillus* actualmente reclasificadas como *B. velezensis* (Ge y col., 2016; Romero y col., 2016; Gao y col., 2017) cuya actividad antifúngica descrita frente a *B. cinerea* se ha realizado a partir del cultivo celular completo, del sobrenadante extraído de éste o de los compuestos volátiles excretados, y no específicamente de la fracción lipopeptídica. En nuestro caso, y como se detalla más adelante, demostramos la capacidad de inhibición del crecimiento fúngico expresamente de la fracción lipopeptídica extraída de la cepa XT1.

Con respecto a la actividad antifúngica de los lipopéptidos, Romano y col. (2013) reportaron la ausencia de efecto inhibitor de los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* frente a *B. cinerea* a una concentración 0,1 mg/mL. Tareq y col. (2014) establecieron un rango comprendido entre los valores 0,5 y 300 µg/mL, en el cual los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* mostraron actividad y Zhang y col. (2017) cuantificaron en 30 mg/mL el punto de mayor actividad para los lipopéptidos de *B. amyloliquefaciens*. Nuestro estudio testó un rango de concentraciones entre 0,5 y 20 mg/mL y confirmó que la actividad fungistática y fungicida de los lipopéptidos producidos por XT1 se produce a concentraciones de 8 mg/mL (CMI y CMF). Este hecho unido a la elevada producción de compuestos lipopeptídicos en medio MOLP (10 g/L) ratificaron la elevada actividad fungicida de la cepa XT1 *in vitro* frente a *B. cinerea*.

Diversos estudios muestran que los lipopéptidos de las cepas de *Bacillus* producen daños en las hifas y en las estructuras de resistencia de hongos patógenos (Souto y col., 2004). Chitarra y col. (2003) sugirieron que los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* YM 10-20 podrían permeabilizar las esporas fúngicas e inhibir su germinación. Otros estudios mostraron la tumefacción y deformación en las hifas del hongo *Pestalotiopsis eugeniae* cuando fueron tratadas con los lipopéptidos sintetizados por *B. subtilis* BS-99-H (Lin y col., 2010). Los efectos de los lipopéptidos producidos por la cepa XT1 se evaluaron mediante microscopía SEM revelándose una elevada formación de estructuras de resistencia (conidióforos y conidios) en respuesta al contacto directo del fitopatógeno con los metabolitos. Las imágenes de las hifas obtenidas mediante microscopía TEM



(*transmission electron microscopy*) confirmaron la degeneración de los orgánulos celulares de *B. cinerea* probablemente debido a la entrada de los metabolitos producidos por la cepa de estudio. Los mismos resultados se observaron en estudios previos donde se analizó la actividad antifúngica de los lipopéptidos de *B. amyloliquefaciens* frente a *Fusarium solani* (Torres y col., 2017). Gong y col. (2014) estudiaron el efecto del lipopéptido bacilomicina D de *B. subtilis* en *Aspergillus flavus* y concluyeron que debido a su naturaleza anfipática, este compuesto pudo penetrar en las esporas e hifas del patógeno, causando la formación de poros en la membrana, permitiendo así la fuga de los contenidos celulares.

Se investigó también la actividad antifúngica preventiva de los lipopéptidos de XT1 frente a la enfermedad del moho gris producida por *B. cinerea* en diferentes frutos. Los resultados revelaron la reducción significativa de dicha afección en frutos de uva, fresa y tomate tratados con la fracción lipopeptídica. Estudios previos han descrito la participación de los lipopéptidos de *B. subtilis* en la activación de las defensas y de mecanismos de resistencia en plantas de viñedo frente a *B. cinerea* (Farace y col., 2015). Dichos estudios demostraron también, que las células de la vid son capaces de percibir los lipopéptidos gracias al flujo de iones que generan al insertarse en la membrana de las células, y activar así distintas vías de señalización, siendo predominante en vides la activación de la vía regulada por la hormona jasmónico. Calvo-Crespo y col. (2018) demostraron el efecto inhibitorio de la iturina A producida por *B. amyloliquefaciens* frente a *Botrytis* en frutos de fresa; sin embargo, no hay referencias de estudios anteriores a éste sobre el empleo de los lipopéptidos producidos por *B. velezensis* directamente en post-cosecha, como mecanismo de control de *B. cinerea* en el almacenaje y transporte de los frutos.

En relación a la producción de metabolitos secundarios por la cepa *B. velezensis* XT1, el segundo objetivo de esta tesis fue el **estudio de la producción y la caracterización de los compuestos orgánicos volátiles (COVs)**. Para ello, se analizó la actividad antifúngica de los COVs frente a *B. cinerea* y se determinó la alteración producida en las estructuras del hongo. Además, se testó su capacidad *in vivo* de proteger a plantas de *Arabidopsis thaliana* frente al fitopatógeno y se identificaron los componentes principales de dicha fracción evaluando posteriormente la implicación de algunos de ellos en la actividad antifúngica y PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*). Todos estos análisis se realizaron en paralelo con la cepa *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>, con el fin de caracterizar y diferenciar a nuestra cepa de la cepa tipo de *B. methylotrophicus* por ser esta la más relacionada desde el punto de vista taxonómico. Los COVs de origen microbiano son moléculas de bajo peso molecular y poca complejidad. La composición de los COVs bacterianos está generalmente dominada por alcanos, alcoholes, terpenos,

benzenoides, pirazinas, ácidos y ésteres, y se producen como consecuencia del metabolismo por oxidación de la glucosa (Schmidt y col., 2015; Bailly y Weisskopf, 2017).

En la última década, ha crecido el interés por la actividad antifúngica producida por los COVs sintetizados por microorganismos PGPR frente a distintos fitopatógenos, y en especial por los pertenecientes al género *Bacillus*. Algunos de estos estudios han descrito la actividad antifúngica de los volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens* PP19 y *B. pumilus* PI26 frente a *Peronophythora litchii* (Zheng y col., 2019), de *B. subtilis* CF-3 frente a *Monilinia fructicola* (Zhou y col., 2019), de *B. amyloliquefaciens* (UQ154) y *B. velezensis* (UQ156) frente a *Phytophthora capsici* (Syed-Ab-Rahman y col., 2019) o de *B. stratosphericus* y *B. acidiceler* frente a *Fusarium oxysporum* (Guevara-Avenidaño y col., 2019).

Del mismo modo que con en el resto de los fitopatógenos, el biocontrol de *B. cinerea* por COVs está muy ligado al género *Bacillus*. Es el caso de *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* CPA-8, cuyos COVs tienen la capacidad de inhibir en un 61% y 86%, respectivamente al fitopatógeno (Sharifi y Ryu, 2016; Gotor-Vila y col., 2017). Además, dentro del género *Bacillus*, los COVs producidos por cepas pertenecientes a *B. velezensis* han tomado un gran protagonismo en el control de *B. cinerea*. En ensayos *in vitro*, las cepas *B. velezensis* ZSY-1, G341, UCMB 5113, y NKG-2 inhibieron al hongo en un 92%, 58%, 50% y 46% respectivamente (Asari y col., 2016; Gao y col., 2017; Lim y col., 2017; Myo y col., 2019). En los ensayos antifúngicos frente a *B. cinerea* llevados a cabo con los COVs producidos por la cepa XT1, se alcanzaron porcentajes de inhibición del 93% y el 91% cuando fue cultivada en medio MOLP (líquido y sólido, respectivamente). Estos valores descendieron drásticamente para los medios SG y MM. Del mismo modo, en la cepa *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>, la actividad antifúngica de los COVs se vio influenciada por el medio de cultivo, aunque en este caso el porcentaje de máxima inhibición en medio MOLP líquido tan sólo fue del 75%. En este último caso, parece ser que además el estado físico del sustrato influye en la producción de COVs, pues los porcentajes de inhibición obtenidos en medio MOLP sólido tan sólo fueron del 2% Fiddaman y Rossall (1994) ya describieron la importancia de los carbohidratos en el medio de cultivo en la producción de COVs para *B. subtilis*. De igual manera, Gotor-Vila y col. (2017) obtuvieron distintos porcentajes de inhibición fúngica dependiendo de la fuente nutricional empleada, siendo más elevados con los compuestos volátiles de *B. amyloliquefaciens* CPA-8 obtenidos en medios ricos en nitrógeno. En lo que respecta al estado del medio, anteriormente a nuestro estudio, únicamente Khan y col. (2018) relacionaron el cultivo en medio líquido con una mayor efectividad de los COVs. Todos estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, pues el medio MOLP tiene una

concentración de carbohidratos y de fuente de nitrógeno, respectivamente, diez y seis veces superior a la del medio SG.

El análisis mediante cromatografía GC-TOF-MS de los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> permitió la detección de dieciséis compuestos mayoritarios y la identificación de 9 de ellos: tres de ellos pertenecientes a la familia de los hidrocarburos (nonano, 4-metiloctano y pentadieno), tres de la familia de las cetonas (acetoína, 4-metil-2-hexanona y 2-heptanona), un alcohol (2,3 butanodiol), un éster (butil acetato) y un compuesto azufrado (disulfuro de dimetilo). El análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos por cromatografía, permitió generar dos clúster bien definidos entre las bacterias estudiadas de acuerdo a las variables simplificadas. Aunque ambas cepas producen los 16 compuestos, en la cepa XT1 aparecen de forma más abundante permitiendo discriminarla y singularizarla con un alto grado de significancia respecto de la cepa tipo *B. methylotrophicus* LMG 27586<sup>T</sup>.

Comparar los COVs excretados por ambas cepas con otros ya descritos por microorganismos de la misma especie es complejo, pues como ya se ha indicado anteriormente y como demuestran Asari y col. (2016), el medio de cultivo empleado en el crecimiento de la bacteria influye directamente en la amalgama de componentes mayoritarios obtenidos. No obstante, estos autores señalan la existencia de una composición basal independiente del sustrato usado. A pesar de todo, en lo referente a la actividad antifúngica cabe destacar la relación de similitud entre los porcentajes de inhibición alcanzados y los compuestos mayoritarios identificados tanto por Gotor-Vila y col. (2017) como en este trabajo. En ambos estudios, la eficacia de los COVs frente al crecimiento fúngico fue superior al 90%, y a diferencia del resto de trabajos señalados hasta ahora, entre los compuestos mayoritarios de los COVs producidos por *B. amyloliquefaciens* CPA-8 y *B. velezensis* XT1 se encuentran la acetoína, el pentadieno y un compuesto orgánico azufrado (disulfuro de dimetilo). De acuerdo a lo descrito por estos autores, todos estos compuestos están implicados en la actividad antifúngica frente a *B. cinerea*, siendo el más relevante el compuesto azufrado. Otros autores atribuyen la actividad de *B. velezensis* ZSY-1 a la producción de pirazinas y benzotiazol, este último de nuevo un compuesto de base azufrada (Gao y col., 2017). En nuestro caso, lo que es evidente es que la acetoína no tiene actividad frente a *B. cinerea* dados los escasos resultados obtenidos en nuestros experimentos con el uso de este compuesto de síntesis artificial. Sin embargo, numerosos estudios destacan la participación de la acetoína y el 2,3-butanodiol en la activación de la resistencia sistémica inducida de la planta (ISR) a través de las vías de señalización hormonales jasmónico/etileno, relacionadas con la protección frente a patógenos necrotróficos como *B. cinerea* (Ryu y col., 2004; Chowdhury y col., 2015; González-Bosch, 2018; Wu y col., 2018; Wu y col., 2019). En

nuestro caso la evaluación de la actividad protectora de los COVs producidos por la cepa XT1 en plantas de *A. thaliana*, permitió determinar la capacidad de estos compuestos de inhibir por completo el desarrollo de la enfermedad fúngica en la zona radicular de las plantas. Aunque se necesitan más ensayos que lo confirmen, es posible que la activación de los sistemas de defensa mediante la acetoina y el 2,3-butanodiol producidos por la cepa XT1 contribuyan, junto con la demostrada actividad antifúngica directa, a la capacidad protectora de los COVs. Sharifi y Ryu (2016) demostraron, que los compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* GB03, entre los que se incluyen la acetoina y el 2,3-butanodiol, inducen la ISR en *A. thaliana* y son responsables en un 90,63% de su actividad frente a *B. cinerea*. Otros ensayos de naturaleza similar se han llevado a cabo con distintos patógenos y microorganismos y en su mayor parte en post-cosecha (Bailly y Weisskopf, 2017; Jiang y col., 2018; Zheng y col., 2019); sin embargo, no hay referencias de COVs producidos por *B. velezensis* que tengan actividad directa e indirecta frente a *B. cinerea* en *A. thaliana*.

Por último, en lo que a metabolitos secundarios respecta, los análisis de microscopía SEM, revelaron que la exposición de *B. cinerea* a los COVs producidos por las cepas XT1 y LMG 27586<sup>T</sup> producía alteraciones en el micelio del hongo. En concreto, en el tratamiento con los compuestos volátiles de la cepa XT1, se aprecia una disminución acusada de la densidad de hifas y una degeneración del exopolisacárido producido por *B. cinerea*. Dicho polisacárido ( $\beta$ -1(1,3)(1,6)-D-glucano), está relacionado, entre otras funciones, con la protección del fitopatógeno en condiciones adversas y con la virulencia durante el periodo de infección (El Oirdi y col., 2011; Fesel y Zuccaro, 2016) . Por tanto, es posible, que la pérdida de este compuesto éste relacionada con la eficacia de la cepa XT1 en la inhibición y protección *in vivo* de XT1 frente a *B. cinerea*. Las imágenes obtenidas con microscopía TEM del micelio del hongo, confirman que los COVs producido por ambas bacterias llevan a la degeneración y muerte celular del contenido de las hifas del patógeno. Hasta la fecha, se han realizado estudios similares en los que se describen la destrucción de las estructuras fúngicas y la muerte celular provocada por los COVs producidos, por ejemplo, por *B. subtilis* CF-3 frente a *M. fructicola* o por compuestos de síntesis frente a *B. cinerea*, sin embargo no hay datos similares de los efectos de *B. velezensis* en *B. cinerea* (Liu y col., 2016; Zhou y col., 2019).

En lo que respecta al estudio de la **actividad PGPR de la cepa XT1 y posteriormente el análisis de la actividad antifúngica *in vivo***, se determinó en primer lugar la **concentración más idónea de la cepa XT1** para ser utilizada como inóculo en diferentes tipos de plantas.

En diferentes estudios previos se ha probado la tolerancia *in vitro*, a cepas pertenecientes al género *Bacillus*, de distintas especies vegetales entre la que se encuentran *A. thaliana* y *Solanum lycopersicum* L (Rashid y col., 2017; Xie y col., 2017; Al-Ali y col., 2018; Liu y

col., 2018). En nuestros experimentos, en el caso de *A. thaliana*, el empleo de la cepa *B. velezensis* XT1 a concentraciones  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  UFC/mL no supuso ningún detrimento para las plantas. Sin embargo, con una concentración igual o superior a  $10^6$  UFC/mL, se redujo el índice de supervivencia en un 40%. Otros autores obtienen resultados discordantes, así en los ensayos realizados por Xie y col. (2017) y Rashid y col. (2017) con plantas de *A. thaliana*, se emplearon satisfactoriamente concentraciones de *B. velezensis* de  $10^9$  y  $10^7$  UFC/mL, respectivamente. La explicación de esta discrepancia, podría deberse al método experimental seguido, nuestros ensayos se llevaron a cabo *in vitro* con plántulas de 10 días sumergidas en medio MS 0,3% p/v (200  $\mu$ l), sin embargo, los autores mencionados anteriormente usaron plantas de 4 semanas crecidas en 100 g de suelo. Es posible que, en nuestro caso, la disminución de la viabilidad de *A. thaliana* a elevadas concentraciones de la cepa *B. velezensis* XT1, se deba a que la inoculación demasiado temprana de la bacteria en un volumen reducido de sustrato líquido, favorece el crecimiento del microorganismo sobre las raíces de la planta impidiendo su desarrollo.

En el caso de los ensayos realizados en plantas de tomate, nuestros resultados coinciden con los previamente indicados por Meng y col. (2016) y Myo y col. (2019), que analizan el efecto de diferentes concentraciones de bacteria de *B. velezensis* BAC03 y NKG-2 en dichas plantas. Al igual que lo encontrado por dichos autores, las plantas de tomate no se vieron afectadas por las concentraciones crecientes de la cepa XT1.

Además, en nuestras experiencias, tras el procesamiento de la raíz procedente de ensayos *in vitro* en plantas de tomate tratadas con la cepa XT1, se demuestra la **colonización eficiente de la zona radicular** por la cepa XT1 e incluso, la capacidad de penetrar en su interior. Numerosos estudios ponen en relieve la importancia de la colonización de la raíz para poder llevar a cabo una buena actividad PGPR y desarrollar un papel fundamental en el control de enfermedades fitopatógenas (Fan y col., 2011; Salvatierra-Martínez y col., 2018; Wu y col., 2019). Entre los factores que determinan la colonización, se encuentran la naturaleza de los exudados producidos por la planta, la capacidad del microorganismo de producir *biofilms* y la producción de surfactinas por la bacteria (Al-ali y col., 2018). Por ejemplo, Cawoy y col. (2014), usando como sustrato los exudados producidos por plantas de tomate, encontraron que la cepa *B. amyloliquefaciens* S499 es capaz de producir una mayor cantidad de surfactinas que las cepas *B. velezensis* FZB42 y *B. subtilis*, colonizando en mayor medida la raíz de las plantas. Por lo tanto, la demostrada capacidad *in vitro* de la cepa *B. velezensis* XT1 de producir exopolisacáridos (EPS) y formar *biofilms* (Torres y col., en revisión), unida a la producción de surfactinas como componente mayoritario de la fracción lipopeptídica, podrían ser los responsables de la colonización radicular mencionada anteriormente.

Una vez establecida la dosis de XT1 a utilizar en los análisis *in vivo* y determinada su capacidad de colonizar la raíz de las plantas, se procedió a analizar su **capacidad para promover el crecimiento vegetal y a estudiar su actividad antifúngica *in vivo***. Las aplicaciones de XT1 se hicieron foliar y radicularmente en fresa, tomate y en vid únicamente se realizó la aplicación foliar en los campos de Bodegas San Valero (Zaragoza), dada la imposibilidad de hacerlo radicularmente.

La capacidad promotora del crecimiento ha sido ampliamente demostrada en los miembros del género *Bacillus* (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Erturk y col., 2012; Myresiotis y col., 2012; Meng y col., 2016; Fan y col., 2018; Zhao y col., 2018). En particular, nuestros resultados concuerdan con los previamente observados por Salvatierra-Martínez y col. (2018), quienes tras testar ambos tipos de aplicaciones (foliar y radicular) con *B. subtilis* BBC023 y BBC047, demostraron su capacidad para aumentar la producción de biomasa tan sólo tras la aplicación radicular. En nuestro estudio, mientras que la inoculación radicular de la cepa XT1 induce un incremento similar en la biomasa total tanto de plantas de fresa como de tomate respecto al control, la inoculación foliar, tan sólo muestra diferencias significativas en la biomasa aérea de plantas de fresa. Tal y como revelaron Esitken y col. (2010) en su estudio experimental en plantas de fresa, no todas las cepas PGPR del género *Bacillus* actúan de igual manera. Según sus resultados la estimulación de la producción del cultivo de fresa, en unos casos fue consecuencia de la aplicación radicular de la cepa *Bacillus* M3 y en otros de la aplicación foliar de *Bacillus* OSU142.

En lo que respecta al **estudio de la actividad antifúngica *in vivo***, se ha evaluado la actividad de la cepa XT1 sobre tres cultivos que se ven afectados frecuentemente por *B. cinerea*: tomate, fresa y vid, cultivos muy relevantes en el territorio español (Berrada y col., 2012; Sylla y col., 2015; Fernández-Ortuno y col., 2016; Marín y col., 2016; Calvo-Garrido y col., 2019; Petrasch y col., 2019).

En primer lugar, la realización de **ensayos en campo en plantas de vid** nos ha dado la oportunidad de hacer un **seguimiento de la viabilidad** de nuestro microorganismo en condiciones de uso reales. La evaluación de un potencial agente de control biológico debe contemplar también dicha viabilidad en el tiempo en condiciones desfavorables. La estabilidad de la cepa *B. velezensis* XT1 se ha determinado mediante recuento en placa durante toda la campaña. Al igual que en los estudios realizados con *B. subtilis* QST713 por Pertot y col. (2017) y por Myresiotis y col. (2012) con *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE34 y *B. subtilis* FZB24, la cepa XT1 mantuvo estable su población desde su aplicación al comienzo de la floración hasta la cosecha. Por lo tanto, tal y como han demostrado diversos autores tales como Rotolo y col. (2015), Escribano-Viana y col. (2018), Ji y col. (2019), y como se ha confirmado en esta tesis, una

considerable cantidad de especies pertenecientes al género *Bacillus* son capaces de resistir condiciones de estrés hídrico, alta radiación y elevadas temperaturas y mantener una población estable en los cultivos.

En lo que se refiere a nuestro estudio en los viñedos de las Bodegas San Valero relativos a analizar la prevención frente a *B. cinerea* en vides tratadas con XT1, hay que destacar que la campaña vitícola del año 2018 se caracterizó por una incidencia moderada del fitopatógeno debido a las condiciones climatológicas de extrema sequía registradas durante ese año en la zona de estudio (datos no mostrados). Sin embargo, a pesar de esas circunstancias, se pudo ver el efecto preventivo de la aplicación de la cepa XT1 frente a *B. cinerea*. Así, tras cuatro aplicaciones de *B. velezensis* XT1, cada una de ellas en un estado fenológico distinto (inicio-plena floración, cuajado, cierre de racimo e inicio de envero), la incidencia y el índice de daño de *Botrytis* disminuyeron en un 65% y 50% respectivamente, con respecto a los viñedos sin tratamiento en la finca de la variedad *Garnacha*. Además, los resultados obtenidos son considerablemente mejores que los alcanzados con los tratamientos químicos convencionales, donde los valores de incidencia y severidad fueron 43% y 38%, respectivamente. En las fincas de la variedad *Syrah*, no se observó reducción de la enfermedad en ninguno de los casos, ya que la gran afectación de oidio acusada en estas parcelas hizo imposible obtener resultados válidos. En estudios previos en viñedos, Aziz y col. (2015) obtuvieron porcentajes de reducción de la enfermedad producida por *B. cinerea* del 85% aplicando la cepa *B. subtilis* PTA-271, no obstante, estos resultados no son totalmente equiparables a los nuestros ya que la aplicación del microorganismo fue vía radicular y no foliar como en nuestro caso. Las tasas de reducción alcanzadas en nuestro estudio tras cuatro aplicaciones de la cepa XT1, son comparables a las obtenidas por Calvo-Garrido y col. (2018, 2019) tras cinco aplicaciones de la cepa *B. ginsengihumi* S38 en los momentos de floración, cuajado, envero, maduración y pre-cosecha o por Rotolo y col. (2018) tras once aplicaciones en todas las etapas de desarrollo, con las cepas comerciales *B. subtilis* QST713 y *B. amyloliquefaciens* D747. Sin embargo, como ya señalaron Calvo-Garrido y col. (2019), la variabilidad de los resultados obtenidos tras el empleo de estos productos microbiológicos en distintas regiones y momentos es muy alta, fluctuando entre valores de reducción de severidad entre el 35% y el 95% (Bay y col., 2010; Pertot y col., 2017; Rotolo y col., 2018).

A la luz de los resultados obtenidos en viñedos y de la bibliografía existente, parece fundamental establecer el momento fenológico vegetal idóneo de aplicación del biofungicida, de acuerdo al momento de mayor susceptibilidad al fitopatógeno y el modo de acción del microorganismo, para así optimizar el número de aplicaciones a emplear, fomentar la actividad inhibitoria frente a *B. cinerea* y homogeneizar los resultados

obtenidos con una misma cepa (Pertot y col., 2017; Gao y col., 2018; Rotolo y col., 2018; Calvo-Garrido y col., 2019).

En cuanto a los **resultados en condiciones controladas de fresa y tomate**, tanto la aplicación radicular como foliar de la cepa XT1, redujo la incidencia del moho gris y la severidad de los daños producidos por *B. cinerea* en torno al 50-60% en ambos cultivos. Además, en el caso del **tomate**, en experimentos realizados *in vitro* en condiciones de esterilidad, la cepa XT1 inhibió el desarrollo de *B. cinerea* en la raíz e incrementó la supervivencia de las plantas en un 40%.

En estudios realizados por Salvatierra-Martínez y col. (2018) en plantas de tomate, los mayores porcentajes de reducción de la severidad alcanzados tras la aplicación de las cepas *Bacillus* BBO23 y BB047 fueron del 10,8 y el 9,8% respectivamente, valores inferiores a los alcanzados en nuestros ensayos con la cepa XT1. Cabe destacar que, de acuerdo a sus resultados, la aplicación foliar de los microorganismos tiene mayor efectividad frente a *Botrytis* que el tratamiento radicular. Wang y col. (2018) obtuvieron buenos resultados en tomate tras la aplicación radicular de la cepa *B. subtilis* WXCDD105 frente a *B. cinerea* con un porcentaje de reducción de la enfermedad del 74%. Por otro lado, Lee y col. (2006) describieron reducciones del 90% de *B. cinerea* con el tratamiento foliar con la cepa *B. licheniformis* N1, aunque los datos no son totalmente comparables con los nuestros ya que su microorganismo estaba formulado con otros productos naturales entre los que se incluían la maicena y el aceite de oliva.

Por otro lado, hasta la fecha, prácticamente no existen estudios sobre la influencia del tratamiento radicular en el biocontrol de *B. cinerea* en plantas de **fresa** ya que en su mayoría se han llevado a cabo empleando los biofungicidas foliarmente. Es el caso de Sylla y col. (2013, 2015), los cuales no obtuvieron una reducción significativa de la incidencia tras la aplicación de *B. amyloliquefacines* FZB42. Sin embargo, existe un elevado número de especies pertenecientes al género *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. megaterium*, cuya actividad foliar frente a *B. cinerea* ha sido demostrada en cultivos de fresa (Ilhan y Karabulut, 2013; Shternshis y col., 2015).

En el género *Bacillus*, cepas de distintas especies con similares y prometedoras características antifúngicas han manifestado distintos grados de biocontrol debido a diferentes niveles de resistencia y mantenimiento de sus capacidades en condiciones reales (Rotolo y col., 2018; Salvatierra-Martínez y col., 2018; Calvo-Garrido y col., 2019). La comprobada alta estabilidad en campo de la cepa XT1 no la convierte inmediatamente en buen agente de biocontrol, además debe conservar su habilidad para producir metabolitos secundarios en situaciones de estrés, pues como en otras especies del



género *Bacillus*, la actividad antifúngica de la cepa XT1 está basada en la producción de dichos metabolitos (Aziz y col., 2015; Pertot y col., 2017; Escribano-Viana y col., 2018). La eficacia obtenida en los tratamientos foliares frente a *B. cinerea*, podría demostrar la capacidad de *B. velezensis* XT1 de sintetizar compuestos como lipopéptidos y volátiles en campo. Como sugiere Zeriuoh y col. (2014) para *B. amyloliquefaciens*, dicha capacidad podría deberse a la formación de *biofilms* en la superficie foliar. En estudios previos que hemos realizado con la cepa XT1 (Torres y col. 2019, en revisión), hemos demostrado que este microorganismo es capaz de producir exopolisacáridos y *biofilms* que podrían favorecer su unión a la planta (datos no mostrados). Por otro lado, y de acuerdo a los efectivos resultados antifúngicos obtenidos tras la aplicación radicular de la cepa XT1 así como a su capacidad PGPR, se puede inferir que su actividad no está únicamente definida por la acción directa de los metabolitos frente al fitopatógeno, si no que en mayor o menor medida ambas vías de inoculación juegan un papel importante en el control de *B. cinerea*. Durante la última década, numerosos estudios han destacado el papel crucial de las surfactinas o el 2-3 butanodiol, en la activación de los sistemas de resistencia (ISR, *induced systemic resistance*) y la promoción del crecimiento en plantas (Ongena y Jacques, 2008; Fan y col., 2011; Cawoy y col., 2014; Chowdhury y col., 2015; Meng y col., 2016; Al-Ali y col., 2018; Mihalache y col., 2018; Myo y col., 2019; Wu y col., 2019). La cepa XT1 produce estos compuestos lo que justifica su actividad antifúngica y su papel como PGPR, además y como veremos más adelante activa los sistemas ISR.

La infección por *B. cinerea* ocasiona una pérdida de **pigmentos fotosintéticos**, que conlleva una disminución de la capacidad fotosintética de la planta y un aumento de la fluorescencia, lo que se traduce en un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). Elevadas condiciones de estrés, pueden producir daños en los pigmentos fotosintéticos contenidos en los fotosistemas y como consecuencia, reducir la eficiencia de absorción lumínica (Ashraf y Harris., 2013). El estudio de los pigmentos es importante desde el punto de vista ecofisiológico ya que aporta información sobre productividad y eventos de estrés. La exposición a condiciones de estrés como patógenos víricos, bacterianos o fúngicos, pueden afectar negativamente al transporte de electrones dentro del aparato fotosintético y disminuir las reacciones metabólicas, estos cambios a su vez conducen a cambios en la fluorescencia de la clorofila (Ivanov y Bernards, 2016). Tanto en plantas de fresa como de tomate la aplicación de la cepa XT1, en plantas no infectadas e infectadas con *B. cinerea*, no parece suponer una mejora en el contenido fotosintético *chl a/chl b*. Sin embargo, si se aprecia que los tratamientos realizados únicamente con la cepa XT1 contienen mayor contenido en pigmentos fotoprotectores, como son los carotenoides, que los tratamientos no inoculados con XT1 e infectados con el patógeno. En lo que respecta a los carotenoides, estos tienen un papel fundamental, no sólo como pigmento fotosintético, sino también como mecanismo de

liberación de estrés oxidativo reduciendo la producción de radicales libres de oxígeno (Stahl y Sies, 2003; Meng y col., 2019). En nuestro caso, aunque no hay mayor capacidad fotosintética, en los casos de tratamiento con XT1 e infección con *B. cinerea*, si se detecta un aumento en los carotenoides, lo que indica que hay una protección frente al fitopatógeno otorgada por XT1. En otros estudios en plantas de tomate, Ali y col. (2017) obtuvieron resultados similares tras la aplicación de *B. pumilus*. Por otra parte, también se ha demostrado que *Bacillus aryabhattai* H19-1 y otras cepas con capacidad ACC desaminasa inoculadas en plantas de tomate, así como *Pseudomonas fluorescens* 19Fv1t inoculada en plantas de fresa, fomentan la producción de *chl a* y carotenoides (Hassan y col., 2014; Todeschini y col., 2018; Yoo y col., 2019).

Entre los sistemas de control biológico desarrollados por las plantas, que juegan un papel importante en la protección contra las infecciones producidas por patógenos, se encuentra la activación de distintas vías de transducción de señales conocidas como **resistencia sistémica inducida (ISR)** (Van Loon y col., 1998). Numerosas especies de rizobacterias no patogénicas, tienen la capacidad de desencadenar el sistema de resistencia inducido ISR (PGPR-ISR) mediante la producción de elicitores que son percibidos por las plantas y que conllevan el refuerzo de su sistema defensivo (Conrath y col., 2006; Cawoy y col., 2014; Pertot y col., 2013). Por ejemplo, el uso de las cepas del género *Bacillus* KFP-5, KFP-7 and KFP-17, minimiza los daños causados por *Pyricularia oryzae* en cultivos de arroz entre un 40% y 52% por activación del sistema ISR (Rais y col., 2018). En plantas de tomate, la inoculación radicular de *Micromonospora*, reduce la infección producida por *B. cinerea* mediante la activación de un estado de *priming* en planta; dicho fenómeno se basa en la preparación de los mecanismos de defensa de la planta para combatir de una forma más rápida y efectiva las infecciones por patógenos (Martínez-Hidalgo y col., 2015).

Entre las respuestas de defensa activadas por el ISR, se encuentra la acumulación de compuestos fenólicos y depósitos de calosa en las paredes celulares (Luna y col., 2011; Rahman y col., 2015), la producción de especies reactivas de oxígenos ( $H_2O_2$ ) (Pastor y col., 2013; Gonzalez-Bosch, 2018) y el aumento en la expresión de enzimas como la polifenol oxidasa (PPO) o fenilalanina amonio liasa (PAL) (Chowdhury y col., 2015; Nie y col., 2017).

Para evaluar la capacidad de mejorar los mecanismos de defensa en plantas de fresa y tomate mediante el uso preventivo de la cepa *B. velezensis* XT1, se evaluó el **contenido en calosa, peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos totales, malondialdehído (MDA) y la actividad polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa** en plantas con y sin infección por *B. cinerea*.

La **calosa** es un polisacárido vegetal ( $\beta$ -(1,3)-glucano), con capacidad de reforzar las paredes celulares y contener compuestos antimicrobianos, cuya acumulación tiene una función fundamental en la respuesta frente a *B. cinerea* (Luna y col., 2011; Rahman y col., 2015; Mengiste, 2012). La aplicación preventiva de la cepa XT1 en plantas de tomate y fresa infectadas con *B. cinerea*, tanto foliar como radicularmente, provoca un aumento considerable de los depósitos de calosa en hoja con respecto a las plantas infectadas con el fitopatógeno y no tratadas con XT1. Este incremento también es acusado en plantas que tan sólo han sido tratadas con XT1. Según Nie y col. (2017) el pretratamiento con la cepa *B. cereus* AR156 dispara la producción de calosa en *A. thaliana* frente al patógeno *B. cinerea* favoreciendo su defensa. López-Cruz y col. (2017), demostraron que el equilibrio entre los niveles de calosa y  $H_2O_2$ , en plantas de tomate, tiene un papel decisivo en la defensa frente al hongo. En plantas de fresa, Tomas-Grau y col. (2018) determinaron la relevancia del refuerzo de las paredes celulares mediante el incremento de los niveles de calosa para detener el desarrollo de *B. cinerea*. Sin embargo, la información sobre la capacidad de las especies pertenecientes al género *Bacillus* de inducir la producción de calosa en plantas de tomate y fresa frente a *B. cinerea* es casi inexistente desde nuestro conocimiento (Nie y col., 2017; Tomas-Grau y col., 2018).

La determinación del contenido en **peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ), revela que el tratamiento preventivo con la cepa *B. velezensis* XT1, en plantas de tomate y fresa infectadas con el fitopatógeno, alcanza valores similares en el contenido de  $H_2O_2$  a los obtenidos en las plantas tan sólo infectadas con *B. cinerea*. No obstante, sí que se aprecia como la aplicación de la cepa XT1 foliar, en el caso de la fresa, y radicular para el tomate, incrementa dichos valores en los tratamientos con XT1 sin infección con el fitopatógeno. Aunque está ampliamente demostrado que la acumulación de peróxido de hidrógeno contribuye a la defensa frente a patógenos, distintos estudios sostienen que entre los factores de virulencia de organismos necrotróficos como *B. cinerea* se encuentra inducir la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS) (López-Cruz y col., 2017; Meng y col., 2019). En lo que respecta a *B. cinerea* y otros hongos necrotróficos, el análisis de la cinética del peróxido de hidrógeno es mejor indicador de la resistencia o la patogenicidad que el contenido absoluto. Mientras que la activación temprana de  $H_2O_2$  induce la resistencia en planta, la producción continua y tardía puede aumentar la muerte celular y por tanto la susceptibilidad a patógenos necrotróficos (Mengiste, 2012). No obstante, en plantas de fresa y de tomate se ha probado que la activación temprana de los sistemas de defensa y, por tanto, la acumulación de  $H_2O_2$  fomenta la resistencia frente a *B. cinerea* (Asselbergh y col., 2007; Meng y col., 2019). Silva y col. (2004) y Tomas-Grau y col. (2018) describieron la importancia del  $H_2O_2$  en la resistencia frente a *B. cinerea* en plantas de tomate y fresa. Niu y col. (2016) y Nie y col. (2017) demostraron que el incremento en la producción de  $H_2O_2$  mediada por *B. cereus* AR156, mejora la resistencia

frente a *B. cinerea* y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* en *A. thaliana*. Por otro lado, es interesante el papel que parecen desempeñar las surfactinas en la activación de los mecanismos que desencadenan la producción de peróxido de hidrógeno. Cawoy y col. (2014) observaron, en células de planta de tabaco, que hay una relación directa entre la concentración de surfactina sintetizada por distintas especies del género *Bacillus* y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producida. Resultados muy similares han sido descritos por Rahman y col. (2015) empleando las surfactinas producidas por *B. amyloliquefacines* en *Lolium perenne* L. De acuerdo a la bibliografía descrita y los resultados mostrados en este trabajo, se podría sugerir que la elevada producción de surfactina por la cepa XT1, podría estar relacionada con el aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas de tomate y fresa infectadas con *B. cinerea*.

La producción de **compuestos fenólicos** y su acumulación en los tejidos inhiben el desarrollo de hongos patógenos a través de distintos mecanismos impidiendo la germinación de esporas y el desarrollo de hifas (Chérif y col., 2007; Ashry y Mohamed, 2011). Aunque estudios previos determinaron que el contenido en fenoles no es un factor determinante en la resistencia frente a *B. cinerea* en plantas de fresa, se ha visto que la acumulación de este compuesto juega un papel fundamental en la resistencia frente a *B. cinerea* en otro tipo de cultivos como el kiwi (Wurms y col., 2003; Men y col., 2019). En plantas de tomate el empleo de cepas pertenecientes al género *Bacillus* o *Streptomyces*, se ha relacionado con un aumento en compuestos fenólicos de la planta y una mayor resistencia a *Alternaria solani* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, respectivamente (Dias y col., 2017; Shoaib y col., 2019). Por otro lado, se ha descrito la acumulación de compuestos fenólicos, promovida por surfactinas de *B. amyloliquefaciens*, en los puntos de infección de *Magnaporthe oryzae* (Rahman y col., 2015). En nuestro caso, los resultados obtenidos en plantas de tomate y fresa infectadas con *B. cinerea*, reflejan que la aplicación preventiva de la cepa *B. velezensis* XT1 fomenta la producción de fenoles. No obstante, y al igual que en el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el tipo de aplicación (foliar o radicular) implica resultados distintos en fresa y tomate. Mientras que el incremento en el contenido fenólico es mayor tras el tratamiento foliar en plantas de fresa, en plantas de tomate es producido por la inoculación vía radicular.

El **malondialdehído** (MDA) es un compuesto orgánico que se produce cuando hay un estrés oxidativo en la planta. Este compuesto determina la peroxidación lipídica producida por las especies reactivas de oxígeno que afectan directamente a la membrana lipídica de las células, causando una degradación oxidativa que provoca la lisis de la célula (Lian y col., 2017; Khanna y col., 2019). La aplicación preventiva de la cepa *B. velezensis* XT1, tanto foliar como radicular, conlleva una disminución en el contenido en MDA en plantas de tomate y fresa infectadas con *B. cinerea*. Elevadas concentraciones de MDA

suponen la muerte celular y por tanto la pérdida de la hoja, lo que conllevaría a una disminución de biomasa en planta. Estudios en plantas de tomate y fresa afectadas por *B. cinerea* demostraron que la aplicación de agentes de biocontrol como *Paenibacillus polymixa* RC05 y RC35, *P. fluorescens*, *Rhodococcus erythropolis* y *Streptomyces pratensis*, tienen la capacidad de reducir el contenido en MDA (Erdogan y col., 2016; Lian y col., 2017). Sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay referencias de estudios anteriores a este que demuestren la capacidad preventiva de *B. velezensis* de reducir los niveles de MDA en plantas de fresa y tomate afectadas por *B. cinerea*.

Finalmente, y en relación a las enzimas activadas por el ISR, se determinó la expresión de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO).

La **polifenol oxidasa** es una proteína encargada de la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales tienen una alta capacidad de reaccionar y atacar a los componentes celulares del patógeno inhibiendo la formación de enzimas necesarias para su colonización (Ashry y Mohamed, 2011). Por otro lado, entre los metabolitos producidos como consecuencia de la actividad **fenilalanina amonio liasa (PAL)** destacan antibióticos vegetales denominados fitoalexinas y el ácido cinámico, relacionado con la lignificación celular (Silva y col., 2004; Rodríguez-Pedroso y col., 2006). Aunque habitualmente, la infección producida por patógenos implica un incremento en la actividad de estas enzimas (Lian y col., 2017), el uso de PGPR también está relacionado con la inducción de PPO y PAL en el hospedador y el aumento de la resistencia a patógenos (Dias y col., 2017; Shoab y col., 2019).

La relevancia del incremento en cultivos de tomate, fresa, lino y cebolla, de PPO y PAL frente a patógenos, mediada o no por PGPR como *B. subtilis*, *B. pumilus* o *Streptomyces pratensis* LMM15, ha sido demostrada por diferentes autores (Ashry y Mohamed, 2011; Ali y col., 2017; Dias y col., 2017; Lian y col., 2017; Khanna y col., 2019; Shoab y col., 2019). En nuestro caso, tras la aplicación de la cepa *B. velezensis* XT1, tanto en plantas de fresa como de tomate infectadas con *B. cinerea*, en general, se observa una reducción significativa en la actividad PPO y PAL. De acuerdo a la cinética realizada por Li y col. (2008), la cepa *B. subtilis* AR12 alcanza su momento de mayor actividad PAL y PPO frente a *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate 48h post-infección, disminuyendo radicalmente tras 96 h. En nuestro trabajo, y teniendo en cuenta la ya demostrada reducción de la infección producida por la cepa XT1 y el aumento del contenido en compuestos fenólicos, se podría especular que había transcurrido demasiado tiempo (7 días) entre la inoculación del agente de biocontrol/patógeno y el procesamiento de la muestra, lo que explicaría la no concordancia de nuestros resultados con los autores previamente mencionados. Silva y col. (2004), obtuvieron resultados similares a los nuestros tras la aplicación de *Bacillus cereus* B101R; así, al igual que en nuestro caso,

determinaron el contenido en PAL transcurridos 7 días tras el tratamiento/infección en plantas de tomate observando una disminución de dichos valores. Por lo tanto, es posible que los bajos niveles detectados en plantas XT1+*Botrytis* se deba a la elevada actividad y degradación de la enzima llevada a cabo en etapas anteriores. Como segunda hipótesis, y tal y como observaron Cawoy y col. (2014), tras el empleo de *B. subtilis* en plantas de tomate infectadas con *B. cinerea*, se podría determinar que el fomento de la capacidad de resistencia al hongo otorgado por *B. velezensis* XT1 no está relacionado con las actividades PPO y PAL.

Como último punto de estudio se ha analizado el **contenido en fitohormonas** en plantas de fresa y tomate afectadas por *B. cinerea* y tratadas preventivamente con la cepa *B. velezensis* XT1. La discusión de los resultados se realiza siendo conscientes de la necesidad de ampliar el estudio realizado y de lo limitado, aunque prometedor, de nuestros resultados preliminares

Tal y como se ha descrito en este documento, las plantas cuentan con un amplio abanico de mecanismos de defensa frente a patógenos. El papel fundamental de las fitohormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico y etileno (ET) en la iniciación y regulación de dichos mecanismos se ha demostrado ampliamente (Pieterse y col., 2009; Blanco-Ulate y col., 2013; Martínez-Hidalgo y col., 2015). Generalmente, la coordinación de las defensas frente a patógenos biotróficos se encuentra mediada por la actuación del SA, mientras que el tándem JA/ET está asociado a la protección contra patógenos necrotróficos entre los que se incluye *Botrytis* (Bari y Jones, 2009). Incluso, se ha descrito que la regulación de ambos sistemas SA y JA/ET tiene un efecto antagónico, de tal forma que la activación del SA conlleva un aumento de la susceptibilidad a patógenos necrotróficos (el Oirdi y col., 2011).

En los últimos años ha crecido el interés por el desarrollo y uso de bacterias con capacidad de fomentar el ISR en plantas frente a diversos patógenos. Por ejemplo, Niu y col. (2011) documentaron la capacidad de la cepa *B. cereus* AR156 de activar el ISR en *A. thaliana* y como consecuencia acelerar la activación de respuestas de defensa celular tras la infección con *P. syringae* pv *tomato* DC3000. Resultados muy similares obtuvieron Nie y col. (2017) o Ahn y col. (2007), quienes señalaron el papel fundamental de la vía de señalización mediada por las fitohormonas JA/ET en la actividad frente a *B. cinerea* y *P. syringae* pv *tomato*. Entre los elicitores sintetizados por microorganismos PGPR capaces de activar el ISR se encuentran los lipopéptidos (surfactinas, bacilomicinas y fengicinas) y los compuestos orgánicos volátiles (2,3-butanodiol) (Chowdhury y col., 2015; Rahman y col., 2015; Al-Ali y col., 2018; Myo y col., 2019).

En consonancia con estudios previos, nuestros resultados revelan que la infección por *B. cinerea*, en plantas de tomate y fresa, desencadena la producción de ABA, ET, JA y SA. El aumento de estos niveles puede atribuirse a la activación del sistema de resistencia adquirida (SAR) de la planta, el cual fomenta los mecanismos que regulan los sistemas de defensa frente a patógenos (Nie y col., 2017). Por otro lado, el fitopatógeno es capaz de manipular las señales hormonales y la cascada oxidativa; entre los factores de virulencia de *B. cinerea* se encuentra un exopolisacarido ( $\beta$ -1(1.3)(1.6)-D-glucano) capaz de inducir la producción de ácido salicílico, reconocido antagonico en la defensa frente a fitopatógenos necrotróficos (El Oirdi y col., 2011).

De una forma incluso más acusada que en el caso anterior, la aplicación de la cepa XT1, tanto foliar como radicular en plantas de fresa y tomate, produce un aumento en los niveles de ABA, ET, JA y SA. Estos valores son muy similares a los obtenidos en plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas de forma preventiva con la cepa XT1. Teniendo en cuenta la capacidad del agente de biocontrol de reducir la infección provocada por el fitopatógeno y la activación de los mecanismos de defensa detallados anteriormente, se podría inferir que el aumento en los niveles hormonales en plantas sin infección y tratadas con XT1 se podría deber al denominado *priming* (Conrath y col., 2002; Conrath y col., 2006; Pieterse y col., 2014).

Para confirmar la hipótesis que clasificaría a la cepa *B. velezensis* XT1 como elicitador del ISR en plantas, se han realizado ensayos en hojas tomadas de las plantas de tomate, fresa y vid en las que se aplicó de forma preventiva el agente de biocontrol. En todos los casos, la severidad de los daños producidos tras la infección con *B. cinerea* fue mucho menor en las plantas tratadas con la cepa XT1. Por tanto, se confirma la capacidad de la cepa *B. velezensis* XT1, de activar los mecanismos de defensa que le otorgan resistencia frente al fitopatógeno *B. cinerea*. A pesar de que nuestros resultados en el contenido en fitohormonas sugieren la participación del sistema JA/ET en la mejora de dichos sistemas de defensa, tal afirmación tan sólo sería posible mediante un análisis más detallado de los mecanismos de señalización desencadenados por este agente de biocontrol.

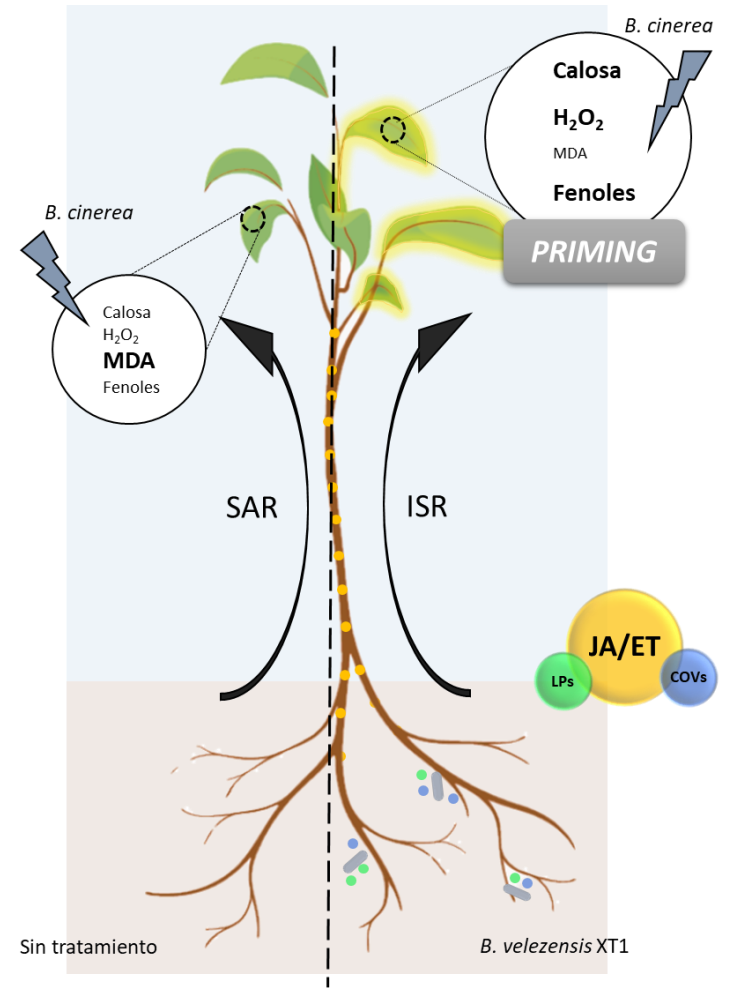
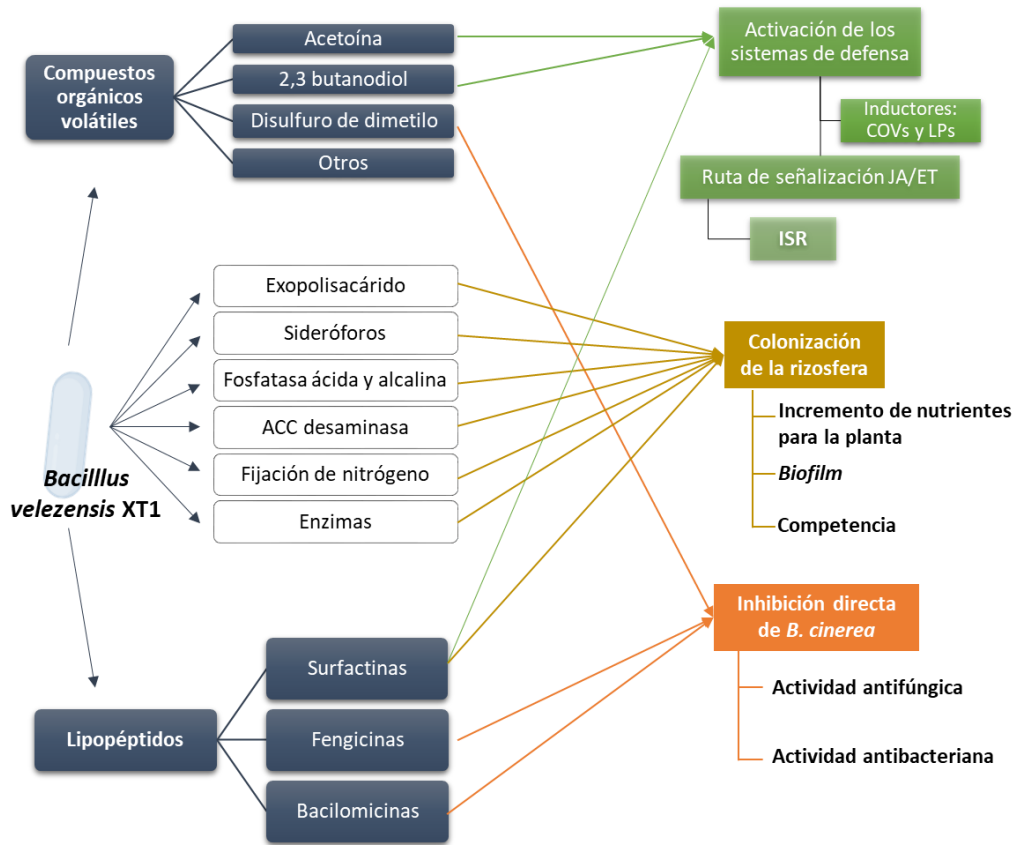


Figura 69. Esquema de los metabolitos producidos por la cepa XT1 y su capacidad como activador de la resistencia sistémica inducida (ISR).



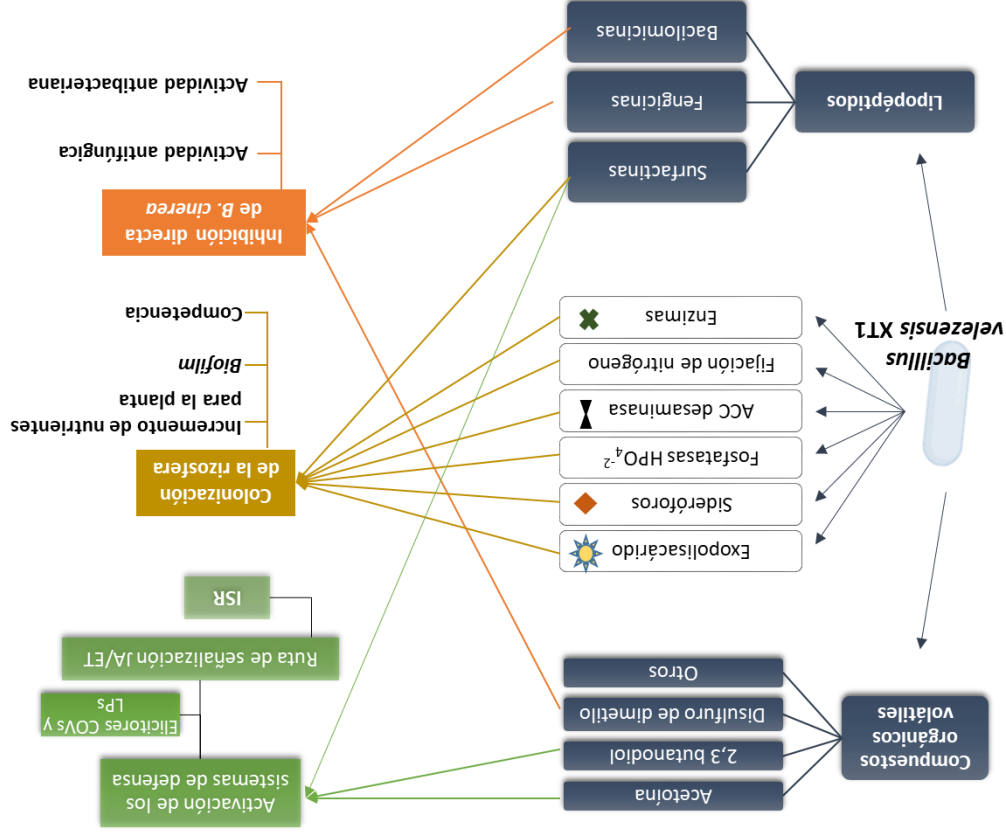
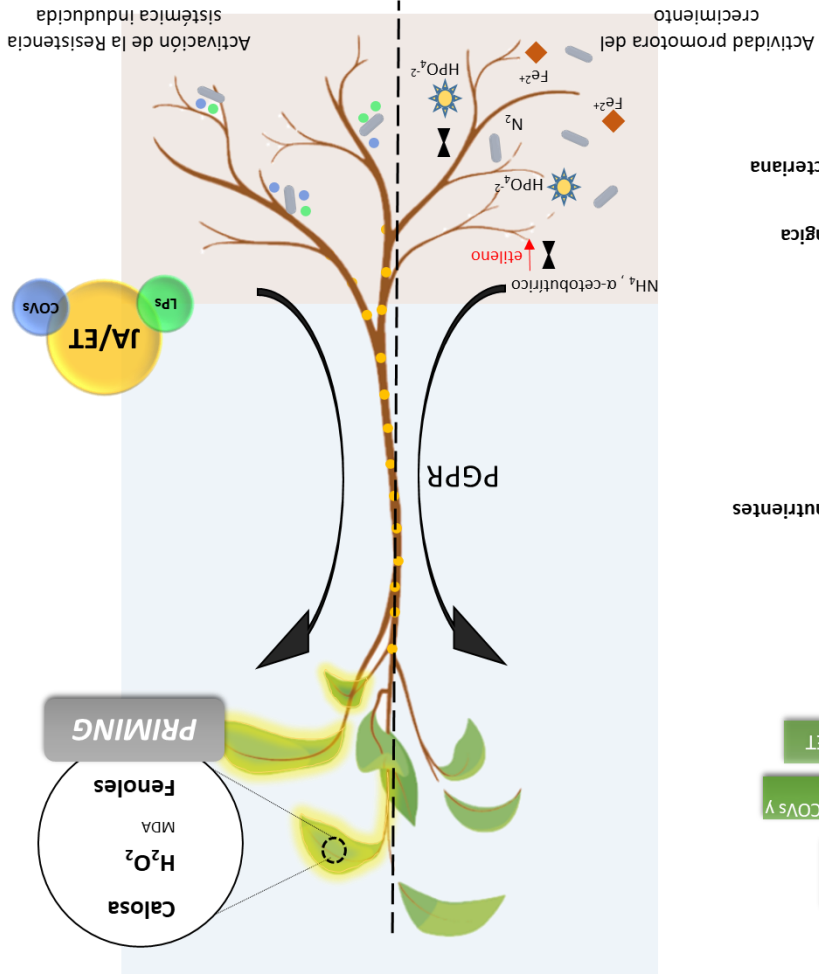


Figura 70. Esquema de los metabolitos producidos por la cepa XT1 y su implicación en la activada PGPR y la inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR).

## **CONCLUSIONES**

---



1. La cepa *Bacillus velezensis* XT1 , aislada de un hábitat salino y debido a su resistencia frente a factores químicos y físicos, capacidad de esporulación y a la elevada producción de enzimas y metabolitos, presenta una alta estabilidad en presencia de compuestos agroquímicos y un elevado potencial PGP. Entre los metabolitos secundarios producidos por la cepa XT1, destaca la síntesis de lipopéptidos: surfactinas, fengicinas y bacilomicinas y compuestos orgánicos volátiles entre los que se detectan como mayoritarios: hidrocarburos, ésteres, cetonas, compuestos azufrados y butanodiol. Ambas fracciones, lipopeptídica y volátil, han demostrado tener una elevada actividad antifúngica frente al fitopatógeno *B. cinerea*, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*.
2. Los estudios en invernadero, en plantas de tomate y fresa, y en campo, en viñedos, confirman que la aplicación preventiva de la cepa XT1 es capaz de reducir la incidencia y severidad de los daños producidos por *B. cinerea* en más de un 50%. Además, los resultados obtenidos en plantas de fresa y tomate, revelan que el tratamiento con la cepa XT1 fomenta el crecimiento y desarrollo vegetal.
3. La evaluación de los diferentes modos de aplicación de la cepa XT1, foliar o radicular, sugiere que este parámetro tiene un papel fundamental sobre la efectividad del agente de biocontrol. De acuerdo a nuestros resultados, mientras que la aplicación foliar de la cepa XT1 implica tan sólo una elevada actividad antifúngica, la aplicación radicular de la cepa XT1 fomenta, tanto el incremento de la biomasa de la planta, como la protección frente a *B. cinerea*.
4. El análisis de los parámetros de estrés y el contenido en fitohormonas, indican que la aplicación preventiva de la cepa XT1, en plantas posteriormente infectadas con *B. cinerea*, fomenta la activación de los mecanismos de defensa en plantas de fresa y tomate. Además y de acuerdo a los valores hormonales obtenidos, posiblemente la ruta de señalización y activación de dichos mecanismos de defensa esté mediada por las hormonas jasmónico y etileno.

Por lo tanto, los datos aportados en esta Tesis Doctoral avalan que, las características fenotípicas, la producción de metabolitos secundarios y la activación de los mecanismos de defensa de plantas, justifican las propiedades de biocontrol de *Botrytis cinerea* y de promoción de crecimiento de *B. velezensis* XT1, haciendo de esta cepa un excelente agente biológico para ser aplicado en agricultura.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abdel-Rahim, I.R. y Abo-Elyousr, K.A.M. (2018). *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiological Research*. 212-213, 1-9. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.004.
- Adeniji, A.A., Loots, D.T. y Babalola, O.O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(9), 3669-3682. doi: 10.1007/s00253-019-09710-5.
- Agrios, G.N. (2006). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Sixth Edition.
- Ahimou, F., Jacques, P. y Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(10), 749-754. doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7.
- Ahn, I.P., Lee, S.W. y Suh, S.C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(7), 759-768. doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0759.
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Bechet, M., Ongena, M. y Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(30), 29910-29920. doi: 10.1007/s11356-017-0469-1.
- Ali, A., Shahzad, R., Khan, A.L., Halo, B.A., Al-Yahyai, R., Al-Harrasi, A. y col. (2017). Endophytic bacterial diversity of *Avicennia marina* helps to confer resistance against salinity stress in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Interactions*. 12(1), 312-322. doi: 10.1080/17429145.2017.1362051.
- Alori, E.T., Glick, B.R. y Babalola, O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers Microbiol.* 8, 971. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971.
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lecuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J.F., Garneau, D. y col. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio*. 7(6). doi: 10.1128/mBio.01664-16.
- Ambrico, A. y Trupo, M. (2017). Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology*. 134, 5-10. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.001.
- Anwar, S., Ali, B. y Sajid, I. (2016). Screening of rhizospheric actinomycetes for various *in-vitro* and *in-vivo* plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive



- compounds. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1334. doi.org/10.3389/fmicb.2016.01334.
- Aquino-Bolaños, E.N. y Mercado-Silva, E. (2004). Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology*. 33(3), 275-283. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.03.009.
- Asari, S., Matzen, S., Petersen, M.A., Bejai, S. y Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol Ecology*. 92(6), fiw070. doi: 10.1093/femsec/fiw070.
- Ashraf, M. y Harris, P.J.C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*. 51(2), 163-190. doi: 10.1007/s11099-013-0021-6.
- Ashry, N.A. y Mohamed, H.I. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World Journal of Agricultural Sciences*. 7(1), 78-85. doi.org/10.5897/AJB11.1023.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. y col. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*. 144(4), 1863-1877. doi: 10.1104/pp.107.099226.
- Aziz, A., Verhagen, B., Magnin-Robert, M., Couderchet, M., Clément, C., Jeandet, P. y col. (2015). Effectiveness of beneficial bacteria to promote systemic resistance of grapevine to gray mold as related to phytoalexin production in vineyards. *Plant and Soil*. 405(1-2), 141-153. doi: 10.1007/s11104-015-2783-z.
- Bailly, A. y Weisskopf, L. (2017). Mining the volatilomes of plant-associated microbiota for new biocontrol solutions. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1638. doi: 10.3389/fmicb.2017.01638.
- Baird-Parker, A. (1963). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *Microbiology*. 30(3), 409-427. doi.org/10.1099/00221287-30-3-409.
- Bais, H.P., Fall, R. y 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 Physiology*. 134(1), 307-319. doi: 10.1104/pp.103.028712.

- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M. y col. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*. 6, 566. doi: 10.3389/fpls.2015.00566.
- Bari, R. y Jones, J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69(4), 473-488. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- Barna, B., Fodor, J., Harrach, B.D., Pogany, M. y Kiraly, Z. (2012). The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*. 59, 37-43. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.01.014.
- Bay, I.S., Eynard, J. y Gubler, W.D. (2010). Evaluation of fungicide programs for management of *Botrytis* bunch rot of grapes: 2010 field trial. UC Davis: Department of Plant Pathology. Disponible online at: <https://escholarship.org/uc/item/8gs9k471> (Mayo 30, 2018).
- Béjar, V., Llamas, I., Ruíz-García, C., y Quesada, E. (2014). Uso de *Bacillus methylotrophicus* como estimulante del crecimiento vegetal y medio de control biológico, y cepas aisladas de dicha especie. EP. Patent No 3178325A1, U.S. Patent No 20170215429. Granada: Universidad de Granada, Xtrem Biotech S.L. Patent and Trademark Office.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. y Passaglia, L.M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35(4), 1044-1051 doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020.
- Benzie, I.F.F. y Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. Academic Press. 299, 15-27. doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5.
- 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. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7.
- Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N. y Amar, M. (2012). Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologia Mediterranea*. 51(3), 625-630. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-10627

- Bhattacharyya, P.N. y Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbioly & Biotechnology*. 28(4), 1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9.
- Blanco-Ulate, B., Vincenti, E., Powell, A.L. y Cantu, D. (2013). Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*. 4, 142. doi: 10.3389/fpls.2013.00142.
- Borah, S.N., Goswami, D., Sarma, H.K., Cameotra, S.S. y Deka, S. (2016). Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1505. doi: 10.3389/fmicb.2016.01505.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, ed. D.K. Maheshwari. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 41-76.
- Calvo-Garrido, C., Haidar, R., Roudet, J., Gautier, T. y Fermaud, M. (2018). Pre-selection in laboratory tests of survival and competition before field screening of antagonistic bacterial strains against *Botrytis* bunch rot of grapes. *Biological Control*. 124, 100-111. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.05.006.
- Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S. y Fermaud, M. (2019). Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in Plant Science*. 10, 105. doi: 10.3389/fpls.2019.00105.
- Calvo Crespo, H., Mendiara, I., Arias, E., Parmo, D. y Venturini, M. (2019). The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiology*. 82. doi: 10.1016/j.fm.2019.01.010.
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H. y col. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*. 8(1), 4360. doi: 10.1038/s41598-018-22782-z.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. y Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*. 10, 302. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P. y col. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27(2), 87-100. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0262-R.

- Conrath, U., Beckers, G., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F. y col. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*. 19, 1062-1071. doi: 10.1094/MPMI-19-1062.
- Conrath, U., Pieterse, C.M. y Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7(5), 210-216. doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02244-6.
- Chakraborty, S. y Newton, A.C. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*. 60(1), 2-14. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D.J., Selvakumar, G. y Sundaram, S.P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*. 95, 38-53. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.05.011.
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C. y col. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*. 119(2), 487-499. doi: 10.1111/jam.12847.
- Checinska, A., Paszczynski, A. y Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual Review of Food Science and Technology*. 6, 351-369. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092332.
- Chen, L., Heng, J., Qin, S. y Bian, K. (2018a). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS One*. 13(6), e0198560. doi: 10.1371/journal.pone.0198560.
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D. y Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological Research*. 218, 41-48. doi: 10.1016/j.micres.2018.10.002.
- Chen, P.H., Chen, R.Y. y Chou, J.Y. (2018b). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*. 46(1), 33-46. doi: 10.1080/12298093.2018.1454013.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I. y col. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*. 25(9), 1007-1014. doi: 10.1038/nbt1325.
- Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K. y col. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in

- Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of Bacteriology*. 188(11), 4024-4036. doi: 10.1128/JB.00052-06.
- Chérif, M., Arfaoui, A. y Rhaïem, A. (2007). Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 2, 7-21.
- Chitarra, G., Breeuwer, P., Nout, M., Van Aelst, A., Rombouts, F. y Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2), 159-166. doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x,
- Choudhary, D.K. y Johri, B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants--with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164(5), 493-513. doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X. y Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*. 6, 780. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. y col. (2008). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(1), 115-123. doi: 10.1007/s00253-008-1520-4.
- Danish, S. y Zafar-Ul-Hye, M. (2019). Co-application of ACC-deaminase producing PGPR and timber-waste biochar improves pigments formation, growth and yield of wheat under drought stress. *Scientific Reports*. 9(1), 5999. doi: 10.1038/s41598-019-42374-9.
- Das, K. y Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
- De Silva, N.I., Brooks, S., Lumyong, S. y Hyde, K.D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*. 33(2), 133-148. doi: 10.1016/j.fbr.2018.10.001.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D. y col. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(4), 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Deng, Q., Wang, W., Sun, L., Wang, Y., Liao, J., Xu, D. y col. (2017). A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS.

- Analytical and bioanalytical chemistry*. 409(1), 179-191. doi: 10.1007/s00216-016-9984-z.
- Dias, M.P., Bastos, M.S., Xavier, V.B., Cassel, E., Astarita, L.V. y Santarem, E.R. (2017). Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 118, 479-493. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.07.017.
- Diomande, S.E., Nguyen-The, C., Guinebretiere, M.H., Broussolle, V. y Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*. 6, 813. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813.
- Ditengou, F.A., Muller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., van Doorn, M.M. y col. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications*. 6, 6279. doi: 10.1038/ncomms7279.
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W. y Rooney, A.P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 66(3), 1212-1217. doi: 10.1099/ijsem.0.000858.
- Edwards, S. y Seddon, B. (2001). Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Letters in Applied Microbiology*. 32(2), 63-66. doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00857.x.
- Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodríguez-Padilla, C., Gonzalez-Ochoa, G. y Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive products from plant-endophytic Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 10, 463. doi: 10.3389/fmicb.2019.00463.
- El Oirdi, M., El Rahman, T.A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodríguez, M.C., Daayf, F. y col. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*. 23(6), 2405-2421. doi: 10.1105/tpc.111.083394.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M. y Stewart, A. (2016). Plant Hosts of *Botrytis* spp. *Botrytis: the Fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (editor(s) Fillinger, S.; Elad, Y.): Springer: 413-486. doi: 10.1007/978-3-319-23371-0\_20.
- Elmer, P. y Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55(2), 155-177. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x.

- Erdogan, Ü., Çakmakçı, R., Varmazyari, A., Turan, M., Erdogan, Y. y Kitir, N. (2016). Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberries under water deficit stress. *Zemdirbyste-Agriculture*. 103(1), 67-76. doi: 10.13080/z-a.2016.103.009.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 1, 117. doi: 10.1038/nrmicro750.
- Erturk, Y., Ercisli, S. y Cakmakci, R. (2012). Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. *Journal of Plant Nutrition*. 35(6), 817-826. doi: 10.1080/01904167.2012.663437.
- Escribano-Viana, R., Lopez-Alfaro, I., Lopez, R., Santamaria, P., Gutierrez, A.R. y Gonzalez-Arenzana, L. (2018a). Impact of chemical and biological fungicides applied to grapevine on grape biofilm, must, and wine microbial diversity. *Frontiers in Microbiology*. 9, 59. doi: 10.3389/fmicb.2018.00059.
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., Gutiérrez, A.R., Santamaría, P., López-Alfaro, I. y col. (2018b). Evaluating a preventive biological control agent applied on grapevines against *Botrytis cinerea* and its influence on winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(12), 4517-4526. doi: 10.1002/jsfa.8977.
- Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Figen Donmez, M., Turan, M. y Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*. 124(1), 62-66. doi: 10.1016/j.scienta.2009.12.012.
- Essghaier, B., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., Jijakli, H. y col. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 106(3), 833-846. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04053.x.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.P. y Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*. 8, 22. doi: 10.3389/fmicb.2017.00022.
- Fan, B., Borriss, R., Bleiss, W. y Wu, X. (2012). Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. *Journal of Microbiology*. 50(1), 38-44. doi: 10.1007/s12275-012-1439-4.
- Fan, B., Chen, X.H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J. y Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*. 151(4), 303-311. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.022.

- Fan, B., Wang, C., Song, X.F., 2018 #193}, Ding, X., Wu, L., Wu, H. y col. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2491. doi: 10.3389/fmicb.2018.02491.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P. y col. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 16(2), 177-187. doi: 10.1111/mpp.12170.
- Fernandez-Ortuno, D., Tores, J.A., Chamorro, M., Perez-Garcia, A. y de Vicente, A. (2016). Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberry in Spain. *Plant Disease*. 100(11), 2234-2239. doi: 10.1094/PDIS-03-16-0280-RE.
- Fesel, P.H. y Zuccaro, A. (2016). Beta-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetic and Biology*. 90, 53-60. doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.004.
- Fiddaman, P. y Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 76(4), 395-405. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x
- Finiti, I., de la, O.L.M., Vicedo, B., Gomez-Pastor, R., Lopez-Cruz, J., Garcia-Agustin, P. y col. (2014). Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. *Molecular Plant Pathology*. 15(6), 550-562. doi: 10.1111/mpp.12112.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43, 337-359. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
- Frikha-Gargouri, O., Ben Abdallah, D., Ghorbel, I., Charfeddine, I., Jlaiel, L., Triki, M.A. y col. (2017). Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest Management Science*. 73(3), 568-574. doi: 10.1002/ps.4331.
- Fu, J. y Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 45(2), 105-114. doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00084-8.
- Funes Pinter, M.I., Salomon, M.V., Berli, F., Gil, R., Bottini, R. y Piccoli, P. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria alleviate stress by AsIII in grapevine. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 267, 100-108. doi: 10.1016/j.agee.2018.08.015.



- Gao, P., Qin, J., Li, D. y Zhou, S. (2018). Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLoS One*. 13(1), e0190932. doi: 10.1371/journal.pone.0190932.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J. y Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 105, 27-39. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.11.007.
- García-Cristobal, J., García-Villaraco, A., Ramos, B., Gutierrez-Manero, J. y Lucas, J.A. (2015). Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. *Journal of Plant Physiology*. 188, 72-79. doi: 10.1016/j.jplph.2015.09.011.
- García de Salamone, I., Hynes, R. y Nelson, L. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*. 47, 404-411. doi: 10.1139/cjm-47-5-404.
- Ge, B., Liu, B., Nwet, T.T., Zhao, W., Shi, L. y Zhang, K. (2016). *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *PLoS One*. 11(11), e0166079. doi: 10.1371/journal.pone.0166079.
- Ghribi, D., Elleuch, M., Abdelkefi, L. y Ellouze-Chaabouni, S. (2012). Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. *Journal of Stored Products Research*. 48, 68-72. doi: 10.1016/j.jspr.2011.10.002.
- Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*. 2012, 963401. doi: 10.6064/2012/963401.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169(1), 30-39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J. y McConkey, B. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26(5-6), 227-242. doi: 10.1080/07352680701572966.
- Gómez-Lama Cabanás, C., Ruano-Rosa, D., Legarda, G., Pizarro-Tobías, P., Valverde-Corredor, A., Triviño, J. y col. (2018). Bacillales members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating

- pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture*. 8(7), 90. doi:10.3390/agriculture8070090.
- Gong, Q., Zhang, C., Lu, F., Zhao, H., Bie, X. y Lu, Z. (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control*. 36(1), 8-14. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.034.
- Gonzalez-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine*. 122, 171-180. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.028.
- Gonzalez-Fernandez, R., Valero-Galvan, J., Gomez-Galvez, F.J. y Jorriñ-Novó, J.V. (2015). Unraveling the *in vitro* secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. *Frontiers in Plant Science*. 6, 839. doi: 10.3389/fpls.2015.00839.
- Gotor-Vila, A., Teixido, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R. y col. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*. 64, 219-225. doi: 10.1016/j.fm.2017.01.006.
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S. y Patra, J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206, 131-140. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.016.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Ho, M.T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O. y col. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*. 19(1), 5. doi: 10.1186/s12866-018-1380-8.
- Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolivar, A.A., Kiel-Martinez, A.L., Ramirez-Vazquez, M., Mendez-Bravo, A., von Wobeser, E.A. y col. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*. 219, 74-83. doi: 10.1016/j.micres.2018.11.009
- Haas, D. y Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*. 3(4), 307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129.
- Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P. y col. (2016a). Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major

- pathogens of grapevine. *Biological Control*. 92, 55-65. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.09.003.
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J. y Deschamps, A. (2016b). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*. 55(3), 301-322. doi: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-18079.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J. y Collado, I.G. (2011). Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*. 74(4), 893-899. doi: 10.1021/np100853e.
- Han, Q., Wu, F., Wang, X., Qi, H., Shi, L., Ren, A. y col. (2015). The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environmental microbiology*. 17(4), 1166-1188. doi: 10.1111/1462-2920.12538.
- Hashem, A., Tabassum, B. y Fathi Abd Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biocall Sciences*. 26(6), 1291-1297. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
- Hassan, W., David, J. y Bashir, F. (2014). ACC-deaminase and/or nitrogen-fixing rhizobacteria and growth response of tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium* Mill.). *Journal of Plant Interactions*. 9(1), 869-882. doi: 10.1080/17429145.2014.964785.
- Heath, R.L. y Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1), 189-198. doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- Hewitt, E.J. (1952). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*.
- Ibort, P., Imai, H., Uemura, M. y Aroca, R. (2018). Proteomic analysis reveals that tomato interaction with plant growth promoting bacteria is highly determined by ethylene perception. *Journal of Plant Physiology*. 220, 43-59. doi: 10.1016/j.jplph.2017.10.008.
- Ilhan, K. y Karabulut, O.A. (2013). Efficacy and population monitoring of bacterial antagonists for gray mold (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.) infecting strawberries. *BioControl*. 58(4), 457-470. doi: 10.1007/s10526-012-9503-x.
- Ines, M. y Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*. 71, 100-112. doi: 10.1016/j.peptides.2015.07.006.

- Ivanov, D.A. y Bernards, M.A. (2016). Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to monitor the progress of a root pathogen in a perennial plant. *Planta*. 243(1), 263-279. doi: 10.1007/s00425-015-2427-9.
- Jadhav, H. y Sayyed, R. (2016). Hydrolytic enzymes of rhizospheric microbes in crop protection. *MedCrave Online Journal of Cell Science & Report*. 3(5), 135-136. doi: 10.15406/mojcsr.2016.03.00070.
- Jemil, N., Manresa, A., Rabanal, F., Ben Ayed, H., Hmidet, N. y Nasri, M. (2017). Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1060, 374-386. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.06.013.
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S. y Yu, S.H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*. 41(4), 234-242. doi: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- Ji, X., Li, J., Meng, Z., Zhang, S., Dong, B. y Qiao, K. (2019). Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. *Plant Disease*. PDIS-01-19-0143-RE. doi: 10.1094/PDIS-01-19-0143-RE.
- Jiang, C.H., Liao, M.J., Wang, H.K., Zheng, M.Z., Xu, J.J. y Guo, J.H. (2018). *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 126, 147-157. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.07.017.
- Kaspar, F., Neubauer, P. y Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of Natural Products*. 82(7), 2038-2053. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00110.
- Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vilchez, J.I., Sansinenea, E., Lally, R.D. y col. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of the Total Environment*. 690, 841-852. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.046.
- Khan, N., Martinez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N. y col. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2363. doi: 10.3389/fmicb.2018.02363.
- Khanna, K., Jamwal, V.L., Kohli, S.K., Gandhi, S.G., Ohri, P., Bhardwaj, R. y col. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria induced Cd tolerance in *Lycopersicon*

- esculentum* through altered antioxidative defense expression. *Chemosphere*. 217, 463-474. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.005.
- Kim, Y.H., Choi, Y., Oh, Y.Y., Ha, N.C. y Song, J. (2019). Plant growth-promoting activity of beta-propeller protein YxaL secreted from *Bacillus velezensis* strain GH1-13. *PLoS One*. 14(4), e0207968. doi: 10.1371/journal.pone.0207968.
- Kkan, A., Jilani, G., Saleem Akhtar, M., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M., Ali Khan, A. y col. (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural Biological and Sciences*. 1(1), 48-58.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. y Schroth, M.N. (1980). *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*. 4(5), 317-320.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P. y col. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*. 186(4), 1084-1096. doi: 10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004.
- Lamichhane, J.R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P. y Messean, A. (2016). Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*. 100(1), 10-24. doi: 10.1094/PDIS-05-15-0574-FE.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. y Gelfand, D.H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*. 264(11), 6427-6437.
- Lee, J.P., Lee, S.-W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y. y col. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 37(3), 329-337. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.01.001.
- Li, Z., Tian, Y., Xu, J., Fu, X., Gao, J., Wang, B. y col. (2018). A tomato ERF transcription factor, SlERF84, confers enhanced tolerance to drought and salt stress but negatively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiology and Biochemistry*. 132, 683-695. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.022.
- Lian, Q., Zhang, J., Gan, L., Ma, Q., Zong, Z. y Wang, Y. (2017). The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in tomato. *BioMed Research International*. 2017, 1-11. doi: 10.1155/2017/9486794.

- Lichtenthaler, H.K. (1987). "[34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes," in *Methods in enzymology*. Elsevier, 350-382.
- Lim, S.M., Yoon, M.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S. y col. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*. 33(5), 488-498. doi: 10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073.
- Lin, H., Chen, T. y Liu, S. (2010). Bioactivity of antifungal substance iturin A produced by *Bacillus subtilis* strain BS-99-H against *Pestalotiopsis eugeniae*, a causal pathogen of wax apple fruit rot. *Plant Pathology Bulletin*. 19(3), 225-233.
- Liu, C., Cui, Z., Yan, X., Qi, Z., Ji, M. y Li, X. (2016). Synthesis, fungicidal activity and mode of action of 4-phenyl-6-trifluoromethyl-2-aminopyrimidines against *Botrytis cinerea*. *Molecules*. 21(7). doi: 10.3390/molecules21070828.
- Liu, K., McInroy, J.A., Hu, C.H. y Kloepper, J.W. (2018). Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Disease*. 102(1), 67-72. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0478-RE.
- Lopez-Cruz, J., Oscar, C.S., Emma, F.C., Pilar, G.A. y Carmen, G.B. (2017). Absence of Cu-Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Molecular Plant Pathology*. 18(1), 16-31. doi: 10.1111/mpp.12370.
- López-Escudero, F., Del Río, C., Caballero, J. y Blanco-López, M. (2004). Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*. 110(1), 79-85.
- Lu, H., Qian, S., Muhammad, U., Jiang, X., Han, J. y Lu, Z. (2016). Effect of fructose on promoting fengycin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmb-60. *Journal of Applied Microbiology*. 121(6), 1653-1664. doi: 10.1111/jam.13291.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63, 541-556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Luna, E., Beardon, E., Ravnskov, S., Scholes, J. y Ton, J. (2016). Optimizing chemically induced resistance in tomato against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 100(4), 704-710. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0347-RE.

- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. y Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(2), 183-193. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0149.
- Luo, W., Liu, L., Qi, G., Yang, F., Shi, X. y Zhao, X. (2019). Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(9), e03128-03118. doi: 10.1128/AEM.03128-18
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S.W. y Sa, T.M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(Pt 10), 2490-2495. doi: 10.1099/ijs.0.015487-0.
- Marín, A., Cháfer, M., Atarés, L., Chiralt, A., Torres, R., Usall, J. y col. (2016). Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Biological Control*. 96, 108-119. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.02.012.
- Marques, A.P., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O. y Castro, P.M. (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. doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.014
- Martínez-Hidalgo, P., García, J.M. y Pozo, M.J. (2015). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology*. 6, 922. doi: 10.3389/fmicb.2015.00922.
- Marvasi, M., Visscher, P.T. y Casillas Martínez, L. (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters*. 313(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x.
- Maughan, H. y Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection Genetics and Evolution*. 11(5), 789-797. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.001.
- Medeot, D.B., Bertorello-Cuenca, M., Liaudat, J.P., Álvarez, F., Flores-Cáceres, M.L. y Jofré, E. (2017). Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biological Control*. 115, 119-128. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.10.002.
- Meng, L., Höfte, M. y Van Labeke, M.-C. (2019). Leaf age and light quality influence the basal resistance against *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 157, 35-45. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.09.025.

- Meng, Q., Jiang, H. y Hao, J.J. (2016). Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*. 98, 18-26. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.03.010.
- Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology*. 50, 267-294. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172955.
- Menzel, C.M., Gómez, A. y Smith, L.A. (2016). Control of grey mould and stem-end rot in strawberry plants growing in a subtropical environment. *Australasian Plant Pathology*. 45(5), 489-498. doi: 10.1007/s13313-016-0440-5.
- Mihalache, G., Balaes, T., Gostin, I., Stefan, M., Coutte, F. y Krier, F. (2018). Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(30), 29784-29793. doi: 10.1007/s11356-017-9162-7.
- Mnif, I. y Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*. 77, 52-64. doi: 10.1016/j.cropro.2015.07.017.
- Monteiro, L., Mariano, R.d.L.R. y Souto-Maior, A.M. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(1), 23-29. doi: 10.1590/S1516-89132005000100004.
- Mora, I., Cabrefiga, J. y Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*. 14(4), 213-223. doi: 10.2436/20.1501.01.151.
- Mori, T., Sakurai, M. y Sakuta, M. (2000). Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 62(2), 135-139. doi: 10.1023/A:1026560223795.
- Mourey, A. y Kilbertus, G. (1976). Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *Journal of Applied Bacteriology*. 40(1), 47-51. doi: 10.1111/j.1365-2672.1976.tb00589.x.
- Mukherjee, S. y Choudhuri, M. (1983). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*. 58(2), 166-170. doi: 10.1111/j.1399-3054.1983.tb04162.x.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3), 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.



- Myo, E.M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K. y col. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*. 134, 23-31. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.03.017.
- Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S., Vryzas, Z. y Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Management Science*. 68(3), 404-411. doi: 10.1002/ps.2277.
- Nakajima, M. y Akutsu, K. (2013). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*. 80(1), 15-23. doi: 10.1007/s10327-013-0492-0.
- Nicholas, P., Magarey, P. y Wachtel, M. (1994). *Grape Production Series number 1: Diseases and pests*. Adelaide: Winetitles.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. y Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(3), 548-572. doi: 10.1128/mmb.64.3.548-572.2000.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H. y 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*. *Frontiers in Plant Science*. 8, 238. doi: 10.3389/fpls.2017.00238.
- Niu, D.-D., Liu, H.-X., Jiang, C.-H., Wang, Y.-P., Wang, Q.-Y., Jin, H.-L. y col. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate-and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(5), 533-542. doi: 10.1094/MPMI-09-10-0213.
- Niu, D., Wang, X., Wang, Y., Song, X., Wang, J., Guo, J. y col. (2016). *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1-and SA-dependent signaling pathway. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 469(1), 120-125. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.081.
- Olishevskaya, S., Nickzad, A. y Deziel, E. (2019). *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(3), 1189-1215. doi: 10.1007/s00253-018-9541-0.
- Ongena, M. y Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16(3), 115-125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009.

- Palazzini, J.M., Dunlap, C.A., Bowman, M.J. y Chulze, S.N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*. 192, 30-36. doi: 10.1016/j.micres.2016.06.002.
- Pandin, C., Darsonval, M., Mayeur, C., Le Coq, D., Aymerich, S. y Briandet, R. (2019). Biofilm formation and synthesis of antimicrobial compounds by the biocontrol agent *Bacillus velezensis* QST713 in an *Agaricus bisporus* compost micromodel. *Applied and environmental microbiology*. 85(12), e00327-00319. doi: 10.1128/AEM.00327-19.
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S. y Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*. 10(4), 719-734. doi: 10.1111/1751-7915.12693.
- Pastor, V., Luna, E., Ton, J., Cerezo, M., García-Agustín, P. y Flors, V. (2013). Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 26(11), 1334-1344. doi: 10.1094/mpmi-04-13-0117-r.
- Peng, G., Zhao, X., Li, Y., Wang, R., Huang, Y. y Qi, G. (2019). Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research*. 227, 126297. doi: 10.1016/j.micres.2019.126297.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P. y col. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*. 254(6), 2201-2213. doi: 10.1007/s00709-017-1109-9.
- Pérez-García, A., Romero, D. y de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(2), 187-193. doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Tellez, R., Zamudio-Rivera, L.S. y Fernández, F.J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 70(1), 127-131. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.023.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M.S. y col. (2017a). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*. 97, 70-84. doi: 10.1016/j.cropro.2016.11.025.

- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V. y Mugnai, L. (2017b). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*. 97, 85-93. doi: 10.1016/j.cropro.2017.01.010.
- Pertot, I., Puopolo, G., Hosni, T., Pedrotti, L., Jourdan, E. y Ongena, M. (2013). Limited impact of abiotic stress on surfactin production in planta and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean. *FEMS Microbiology Ecology*. 86(3), 505-519. doi: 10.1111/1574-6941.12177.
- Petrasch, S., Knapp, S.J., van Kan, J.A.L. y Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. 20(6), 877-892. doi: 10.1111/mpp.12794.
- Pickett, M.J., Greenwood, J.R. y Harvey, S.M. (1991). Tests for detecting degradation of gelatin: comparison of five methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(10), 2322-2325.
- Pieterse, C.M., León-Reyes, A., Van der Ent, S. y Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5(5), 308-316. doi: 10.1038/nchembio.164.
- Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C. y Bakker, P.A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 52, 347-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. y Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*. 51(4), 403-415. doi: 10.1007/s00374-015-0996-1.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17, 362-370.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M. y 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. *Plant and Soil*. 286(1-2), 167-180. doi: 10.1007/s11104-006-9035-1.
- Pozo, M.J., Verhage, A., García-Andrade, J., García, J.M. y Azcón-Aguilar, C. (2009). "Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi," in *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact*, eds. C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea, S. Gianinazzi y V. Gianinazzi-Pearson. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 123-135.

- Pramudito, T.E., Agustina, D., Nguyen, T.K.N. y Suwanto, A. (2018). A novel variant of narrow-spectrum antifungal bacterial lipopeptides that strongly inhibit *Ganoderma boninense*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10(1), 110-117. doi: 10.1007/s12602-017-9334-2.
- Pretorius, D., van Rooyen, J. y Clarke, K.G. (2015). Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnology*. 32(2), 243-252. doi: 10.1016/j.nbt.2014.12.003.
- Qian, S., Lu, H., Meng, P., Zhang, C., Lv, F., Bie, X. y col. (2015). Effect of inulin on efficient production and regulatory biosynthesis of bacillomycin D in *Bacillus subtilis* fmbJ. *Bioresource Technology*. 179, 260-267. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.086.
- Raaijmakers, J.M. y Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 50, 403-424. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172908.
- Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C. y Baek, K.H. (2019). *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. 24(6). doi: 10.3390/molecules24061046.
- Rahman, A., Uddin, W. y Wenner, N.G. (2015). Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Molecular Plant Pathology*. 16(6), 546-558. doi: 10.1111/mpp.12209.
- Rais, A., Shakeel, M., Malik, K., Hafeez, F.Y., Yasmin, H., Mumtaz, S. y col. (2018). Antagonistic *Bacillus* spp. reduce blast incidence on rice and increase grain yield under field conditions. *Microbiological Research*. 208, 54-62. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.009.
- Randall Simpson, D., Ravi Natraj, N., McInerney, M. y Duncan, K. (2011). Biosurfactant-producing *Bacillus* are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91 (4), 1083. doi: 10.1007/s00253-011-3326-z.
- Simpson, D.R., Natraj, N.R., McInerney, M.J. y Duncan, K.E. (2011). Biosurfactant-producing *Bacillus* are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(4), 1083-93. doi: 10.1007/s00253-011-3326-z.
- Rashid, M.H., Khan, A., Hossain, M.T. y Chung, Y.R. (2017). Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing PHYTOALEXIN DEFICIENT4 in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 8, 211. doi: 10.3389/fpls.2017.00211.

- Reddy, P.P. (2014). *Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection*. India: Springer.
- Ribéreau-Gayon, G. (1968). Etude des mecanismes de synthese et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera* L. *Phytochemistry*. 7(9), 1471-1482. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88592-1.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. y Triplett, E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*. 28(9), 829-836. doi: 10.1071/PP01045.
- Rivero, R.M., Ruíz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E. y Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*. 160(2), 315-321. doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2.
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.Á., Cárdenas-Travieso, R.M., Falcón-Rodríguez, A. y Bautista-Baños, S. (2006). Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(1), 1-7.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. 17(4-5), 319-339. doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M. y Smilanick, J.L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 63(1), 141-147. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.06.013.
- Romano, A., Vitullo, D., Senatore, M., Lima, G. y Lanzotti, V. (2013). Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *Journal of Natural Products*. 76(11), 2019-2025. doi: 10.1021/np400119n.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Davila, J.C. y Pérez-García, A. (2007). Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*. 103(4), 969-976. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03323.x.
- Romero, F.M., Marina, M. y Pieckenstain, F.L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research Microbiology*. 167(3), 222-233. doi: 10.1016/j.resmic.2015.11.001.

- Rotolo, C., De Miccolis Angelini, R.M., Dongiovanni, C., Pollastro, S., Fumarola, G., Di Carolo, M. y col. (2018). Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Management Science*. 74(3), 715-725. doi: 10.1002/ps.4767.
- Rotolo, C., De Miccolis Angelini, R.M., Pollastro, S. y Faretra, F. (2015). A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. *BioControl*. 61(1), 91-101. doi: 10.1007/s10526-015-9701-4.
- Ruíz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I. y Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(1), 191-195. doi: 10.1099/ijs.0.63310-0.
- Ruzzi, M. y Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 196, 124-134. doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.042.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. y Pare, P.W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 134(3), 1017-1026. doi: 10.1104/pp.103.026583.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S. y Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(5), 3984-3999. doi: 10.1007/s11356-015-4294-0.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. y col. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839), 487-491. doi: 10.1126/science.2448875.
- Salvatierra-Martínez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J. y col. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity-An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*. 166(9), 601-612. doi: 10.1111/jph.12718.
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J.J., García-Agustín, P. y col. (2015). Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*. 81(2), 304-315. doi: 10.1111/tpj.12728.

- Schaeffer, P., Millet, J. y Aubert, J.P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 54(3), 704-711. doi: 10.1073/pnas.54.3.704.
- Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*. 50(1), 1-17. doi: 10.1139/w03-076.
- Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J. y Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *ISME Journal*. 9(11), 2329-2335. doi: 10.1038/ismej.2015.42.
- Schneider, K., Chen, X.-H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R. y col. (2007). Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Natural Products*. 70(9), 1417-1423. doi: 10.1021/np070070k.
- Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süßmuth, R.D. y col. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*. 193(1), 215-224. doi: 10.1128/jb.00784-10.
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K. y col. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology*. 196(10), 1842-1852. doi: 10.1128/JB.01474-14.
- Sessitsch, A., Howieson, J., Perret, X., Antoun, H. y Martínez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21(4), 323-378. doi: 10.1080/0735-260291044278.
- Sharifi, R. y Ryu, C.M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in Microbiology*. 7, 196. doi: 10.3389/fmicb.2016.00196.
- Sharma, E. y Kapoor, R. (2017). Insights into the molecular interplay of virulence factors in *Botrytis cinerea*. *Australasian Plant Pathology*. 46(6), 551-561. doi: 10.1007/s13313-017-0519-7.
- Shoaib, A., Awan, Z.A. y Khan, K.A. (2019). Intervention of antagonistic bacteria as a potential inducer of disease resistance in tomato to mitigate early blight. *Scientia Horticulturae*. 252, 20-28. doi: 10.1016/j.scienta.2019.02.073.
- Shternshis, M.V., Belyaev, A.A., Shpatova, T.V. y Lelyak, A.A. (2015). Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease.

*Contemporary Problems of Ecology.* 8(3), 390-396. doi: 10.1134/s1995425515030130.

Silva, H.S.A., Romeiro, R.d.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.d.A., Pereira, M.C.B. y Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control.* 29(2), 288-295. doi: 10.1016/s1049-9644(03)00163-4.

Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2.* Williams & Wilkins.

Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M. y col. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology.* 97(6), 1247-1256. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x.

Stahl, W. y Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine.* 24(6), 345-351. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.

Stevens, G.A. y Berry, A.M. (1988). Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFP Ar13 in defined medium. *Plant physiology.* 87(1), 15-16. doi: 0032-0889/88/87/0015/02/\$01.00/0.

Subramanian, S. y Smith, D.L. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome - from an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science.* 6, 909. doi: 10.3389/fpls.2015.00909.

Sylla, J., Alsanus, B.W., Krüger, E., Reineke, A., Strohmeier, S. y Wohanka, W. (2013). Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology.* 103(10), 1001-1011. doi: 10.1094/phyto-01-13-0014-r.

Sylla, J., Alsanus, B.W., Krüger, E. y Wohanka, W. (2015). Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *European Journal of Plant Pathology.* 143(3), 461-471. doi: 10.1007/s10658-015-0698-4.

Tanaka, K., Amaki, Y., Ishihara, A. y Nakajima, H. (2015). Synergistic effects of [Ile(7)]Surfactin homologues with Bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63(22), 5344-5353. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01198.

Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B. y Jacques, P. (2010). New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by



- polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(5), 1521-1531. doi: 10.1007/s00253-009-2176-4.
- Tareq, F.S., Lee, M.A., Lee, H.S., Lee, Y.J., Lee, J.S., Hasan, C.M. y col. (2014). Non-cytotoxic antifungal agents: isolation and structures of gageopeptides A-D from a *Bacillus* strain 109GGC020. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(24), 5565-5572. doi: 10.1021/jf502436r.
- Tenberge, K.B. (2007). "Morphology and Cellular Organisation in Botrytis Interactions with Plants," en *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, eds. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. y Delen N. (Dordrecht: Springer Netherlands), 67-84.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. y Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal*. 11(6), 1187-1194. doi: 10.1046/j.1365-3113X.1997.11061187.x.
- Thurlow, C.M., Williams, M.A., Carrias, A., Ran, C., Newman, M., Tweedie, J. y col. (2019). *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication. *Aquaculture*. 503, 347-356. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.051.
- Todeschini, V., AitLahmidi, N., Mazzucco, E., Marsano, F., Gosetti, F., Robotti, E. y col. (2018). Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatilome. *Frontiers in Plant Science*. 9, 1611. doi: 10.3389/fpls.2018.01611.
- Tomás-Grau, R.H., Requena-Serra, F.J., Hael-Conrad, V., Martínez-Zamora, M.G., Guerrero-Molina, M.F. y Díaz-Ricci, J.C. (2018). Soft mechanical stimulation induces a defense response against *Botrytis cinerea* in strawberry. *Plant Cell Reports*. 37(2), 239-250. doi: 10.1007/s00299-017-2226-9.
- Torres, M., Béjar, V., Llamas, I., Torres, B., Toral, L. y Sampedro, I. (2019). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*. En revisión
- Torres, M.J., Pérez Brandan, C., Sabaté, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R. y Audisio, M.C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*. 105, 93-99. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.12.001.
- Uttley, A.H.C. y Collins, C.H. (1993). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3ª ed. Barrow, G.I. y Feltham, R.K.A., editores. Cambridge: Cambridge University Press. *Journal of Hospital Infection*. 24:332

- van Kan, J.A., Shaw, M.W. y Grant-Downton, R.T. (2014). *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*. 15(9), 957-961. doi: 10.1111/mpp.12148.
- Van Loon, L., Bakker, P. y Pieterse, C. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36(1), 453-483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453
- Veloso, J. y van Kan, J.A.L. (2018). Many shades of grey in *Botrytis*-host plant interactions. *Trends in Plant Science*. 23(7), 613-622. doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.016.
- Villaverde, J.J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, P., López-Goti, C. y Alonso-Prados, J.L. (2014). Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science*. 70(1), 2-5. doi: 10.1002/ps.3663.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. y col. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J. y col. (2018a). A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* cooke and promote the growth of seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(5), 1371. doi: 10.3390/ijms19051371.
- Wang, J., Guo, R., Wang, W., Ma, G. y Li, S. (2018b). Insight into the surfactin production of *Bacillus velezensis* B006 through metabolomics analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 45(12), 1033-1044. doi: 10.1007/s10295-018-2076-7.
- Wang, J., Xing, J., Lu, J., Sun, Y., Zhao, J., Miao, S. y col. (2019). Complete genome sequencing of *Bacillus velezensis* WRN014, and comparison with genome sequences of other *Bacillus velezensis* strains. *Journal of microbiology and biotechnology*. 29(5), 794-808. doi: 10.4014/jmb.1901.01040.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J. y Kuo, H.-P. (2008). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 58(3), 671-675. doi: 10.1099/ijms.0.65191-0.
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J. y Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 23(4), 744-754. doi: 10.1016/j.cjche.2014.05.020.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different

- resolution. *Journal of plant physiology*. 144(3), 307-313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Whetzel, H.H. (1945). A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes. *Mycologia*. 37(6), 648-714. doi: 10.1080/00275514.1945.12024025.
- Wilson, P.W. y Knight, S.G. (1952). *Experiments in bacterial physiology*. Minnesota : Burgess Publishing Co.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y van Kan, J.A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8(5), 561-580. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Witte, C.-P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*. 180(3), 431-438. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.010.
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q. y Zhang, R. (2018a). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31(5), 560-567. doi: 10.1094/MPMI-11-17-0273-R.
- Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J.P. y Shabala, S. (2018b). It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant and Soil*. 431(1-2), 1-17. doi: 10.1007/s11104-018-3770-y.
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C. y Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiologyopen*. 8(8), e00813. doi: 10.1002/mbo3.813.
- Xie, S., Jiang, H., Xu, Z., Xu, Q. y Cheng, B. (2017). Small RNA profiling reveals important roles for miRNAs in *Arabidopsis* response to *Bacillus velezensis* FZB42. *Gene*. 629, 9-15. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.064.
- Xu, Z., Zhang, H., Sun, X., Liu, Y., Yan, W., Xun, W. y col. (2019). *Bacillus velezensis* wall teichoic acids are required for biofilm formation and root colonization. *Applied Environmental Microbiology*. 85(5). doi: 10.1128/AEM.02116-18.
- Yahaya, S., Fagwalawa, L., Ali, M., Abdullahi, H., Umma, M., Lawan, M. y col. (2016). Symptomless transmission of seed borne *Botrytis cinerea* into the seed of next generation lettuce plant (*Lactuca Sativa*). *Journal of Plant Science and Research*. 3(1).

- Yazgan, A., Özcengiz, G. y Marahiel, M.A. (2001). Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1518(1), 87-94. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00182-8.
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F. y col. (2018). Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*. 13(3), 500-505. doi: 10.1021/acschembio.7b00874.
- Yoo, S.-J., Weon, H.-Y., Song, J. y Sang, M.K. (2019a). Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhatai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(7), 1124-1136. doi: 10.4014/jmb.1904.04026.
- Yoo, Y., Seo, D.H., Lee, H., Cho, E.S., Song, N.E., Nam, T.G. y col. (2019b). Inhibitory effect of *Bacillus velezensis* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Biotechnology*. 298, 57-63. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.04.009.
- Yu, D., Wang, J., Shao, X., Xu, F. y Wang, H. (2015). Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*. 119(5), 1253-1262. doi: 10.1111/jam.12939.
- Yu, Y., Jiao, L., Fu, S., Yin, L., Zhang, Y. y Lu, J. (2016). Callose synthase family genes involved in the grapevine defense response to downy mildew disease. *Phytopathology*. 106(1), 56-64. doi: 10.1094/PHYTO-07-15-0166-R.
- Zerrouh, H., de Vicente, A., Perez-Garcia, A. y Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology*. 16(7), 2196-2211. doi: 10.1111/1462-2920.12271.
- Zhang, Q.X., Zhang, Y., Shan, H.H., Tong, Y.H., Chen, X.J. y Liu, F.Q. (2017). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(32), 25000-25009. doi: 10.1007/s11356-017-0179-8.
- Zhao, D., Zhao, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Duan, Y. y col. (2018). Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. *Biological Control*. 119, 12-19. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.01.004.
- Zheng, L., Situ, J.-j., Zhu, Q.-f., Xi, P.-g., Zheng, Y., Liu, H.-x. y col. (2019). Identification of volatile organic compounds for the biocontrol of postharvest litchi fruit pathogen *Peronophythora litchii*. *Postharvest Biology and Technology*. 155, 37-46. doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.05.009.

Zheng, Y., Wang, X., Liu, S., Zhang, K., Cai, Z., Chen, X. y col. (2018). The endochitinase of *Clonostachys rosea* expression in *Bacillus amyloliquefaciens* enhances the *Botrytis cinerea* resistance of tomato. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(8). doi: 10.3390/ijms19082221.

Zhou, M., Li, P., Wu, S., Zhao, P. y Gao, H. (2019). *Bacillus subtilis* CF-3 volatile organic compounds inhibit *Monilinia fructicola* growth in peach fruit. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1804. doi: 10.3389/fmicb.2019.01804.