

TED BIO
007135



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

**“Desarrollo de estrategias biotecnológicas para
aumentar la tolerancia en la planta de papa frente a
salinidad, sequía y a la infección por *Phytophthora
infestans*”**

**Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Cecilia Eugenia María Grossi

91039

Director de tesis: Dra. Rita María Ulloa

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y
Biología Molecular “Héctor N. Torres” (INGEBI – CONICET)

Buenos Aires, Abril 2022

"En algún lugar, algo increíble está esperando ser descubierto"

Carl Sagan

Parte de los resultados de la presente Tesis para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Fisiología y Biología Celular y Molecular; fueron incluidos en las siguientes publicaciones científicas:

- **Grossi CEM**, Santin F, Quintana SA, Fantino E, y Ulloa RM (2021) Calcium - dependent protein kinase 2 plays a positive role in the salt stress response in potato. Plant Cell Rep. doi:10.1007/s00299-021-02676-7.
- **Grossi CEM**, Fantino E, Serral F, Zawoznik MS, Fernandez Do Porto DA, y Ulloa, RM (2020) *Methylobacterium* sp. 2A Is a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Has the Potential to Improve Potato Crop Yield Under Adverse Conditions. Front. Plant Sci. 11, 1–15. doi:10.3389/fpls.2020.00071.
- **Grossi CEM** y Ulloa RM (2019) Ficha microbiológica: *Methylobacterium* spp. Boletín N° 223 de la Asociación Argentina de Microbiología, publicado en Marzo-Mayo 2019 (ISSN-0325-6480).

Otras contribuciones realizadas en el período de beca doctoral:

- Sciorra MD, Fantino E, **Grossi CEM**, Ulloa RM (2021) Characterization of two group III potato CDPKs, StCDPK22 and StCDPK24, that contain three EF-Hand motifs in their CLDs. Plant Physiol Biochem. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.008>.
- Quintana SA, **Grossi CEM**, Espinoza R, Ulloa RM (2021) Plántico, un paquete en R para análisis estadístico de variables biométricas de plantas. Revista Cubana de Ciencias Informáticas 15:45–60. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2227-18992021000400045

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron comenzar y finalizar mi doctorado. A la UBA por permitir mi formación de posgrado.

A las autoridades del INGEBI por haberme concedido un lugar de trabajo. Me emociona haber podido trabajar durante estos años en el mismo lugar en el que trabajaron el Dr. Leloir y el Dr. Torres, dos grandes científicos por los que tengo una profunda admiración.

A mi directora, Dra. Rita Ulloa, por la confianza que depositó en mí al elegirme como becaria y por recibirme en su grupo de trabajo. Rita, las palabras no me alcanzan para agradecerte todo el apoyo que me diste durante estos años, y la paciencia y el tiempo que dedicaste a mi formación. Gracias por acompañarme en este camino, por haber compartido conmigo tus conocimientos y tu pasión por la ciencia. Por permitirme aprender de vos y con vos. Por haber estado siempre que necesité ayuda, un consejo, o una palabra de aliento.

A mis compañeros de grupo: A Eli y Vero, por los mates, los abrazos y por siempre impulsarme a seguir. A Franco, Marce, Andy, Iván y Edgar por el apoyo constante. A mis compañeras del Lab 217: Rosario López y las Dras. Mariana Obertello y Josefina Ocampo por estar en el día a día. Al Dr. Diego Wengier por su infinita curiosidad y sus ideas, muchas de las cuales quedaron plasmadas en esta tesis.

A mis compañeros de instituto: becarios, personal de apoyo e investigadores que desde distintos lugares contribuyeron al desarrollo de mi doctorado. A todo el Lab 201, especialmente a Marce, Fede, Cata, Caro, Noe y Julián por el apoyo y la amistad que me brindaron en el día a día. A los Dres. Fernando Bravo, Ma. Eugenia Segretín, Ma. Noelia Muñiz García y Daniela Capiati de los que tuve la oportunidad de aprender y compartir ideas. A Marina por haber cuidado los ensayos en invernadero que se incluyen en esta tesis y por haberme transmitido sus conocimientos sobre el mantenimiento de plantas. A Norma, Graciela, Rubén y Adrián por todas las veces que me brindaron su ayuda.

A los miembros del comité de seguimiento de tesis, los Dres. Jorge Muschietti y Sebastián Asurmendi por sus valiosos aportes.

A las personas que, cuando era estudiante, me inspiraron y me impulsaron a perseguir mi vocación: A la Dra. Myriam Zawoznik por contagiarme su curiosidad y amor por la

microbiología. Por ser mi ejemplo y mi guía en este camino. Al Dr. Francisco Pantuso porque gracias a él pude entrar por primera vez a un laboratorio de investigación, por la confianza que depositó en mí cuando me eligió para trabajar en los proyectos de la Universidad de Morón.

A mis padres, ejemplos de honestidad, trabajo y amor. A mi mamá, por siempre tener una palabra de aliento y por empujarme constantemente a que pueda superarme. Por nunca rendirse, y por haberme acompañado incondicionalmente. Por ser mi guía en esta vida. A mi papá porque este camino recorrido también fue gracias a él. Por haberme dejado los más hermosos recuerdos, esos que me hicieron amar la biología desde pequeña.

A mi tío Daniel, por ser mi apoyo y mi faro.

A los hermanos que me dio la vida. A Rocío, por estar dispuesta a pipetear conmigo si así lo necesitaba. Por escucharnos y guiarnos mutuamente en este camino que elegimos. A Belu, Juli, Flor, Lucho, Jeannie y Daro por ser grandes amigos. Gracias a todos por distraerme y hacerme reír.

A Fernando, porque desde que coincidimos en el mismo tiempo y lugar no nos dejamos nunca de acompañar.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN GENERAL	14
Demanda alimentaria y problemática ambiental.....	14
Características del cultivo de papa.....	15
Salinidad	19
Sequía.....	20
<i>Phytophthora infestans</i>	22
Aumento de la tolerancia del cultivo de papa a estrés mediante el abordaje de estrategias biotecnológicas.....	24
OBJETIVOS.....	28
CAPITULO I: “Generación de plantas de papa sobreexpresantes de <i>StCDPK2</i> como una estrategia para obtener papas tolerante a sequía y salinidad o con mayor resistencia a patógenos”	30
INTRODUCCIÓN.....	31
Transducción de señales en plantas.....	31
Quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), proteínas sensoras.....	32
CDPKs e implicancia en estrés abiótico y biótico	34
Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de las CDPKs.....	36
CAPÍTULO I, PARTE I: “Estudio de la expresión de <i>StCDPK2</i> en condiciones de estrés”	40
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	40
Estrés abiótico	40
Cultivo y tratamientos <i>in vitro</i>	40
Cultivo y tratamientos en invernadero	41
Infección con <i>P. infestans</i> <i>in vitro</i>	42
Análisis histoquímico y fluorométrico de la actividad GUS (actividad β -glucuronidasa)	42
Extracción del ARN y síntesis del cDNA	43
Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR cuantitativa.....	43
RESULTADOS	44
Estudio del rol de <i>StCDPK2</i> en la respuesta temprana al estrés salino y al estrés por sequía	44
Estudio del rol de <i>StCDPK2</i> y de los efectos de la sal sobre plantas de papa crecidas en invernadero	46
Estudio del rol de <i>StCDPK2</i> frente a la infección con <i>P. infestans</i>	51
CAPÍTULO I, PARTE II: “Análisis de plantas de papa sobreexpresantes del gen <i>StCDPK2</i> frente a estrés abiótico y biótico”	53
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	53
Chequeo de la presencia y expresión del transgén en plantas <i>35S:StCDPK2</i>	54
Estrés abiótico	55
Cultivo y tratamientos <i>in vitro</i>	55
Cultivo y tratamientos en invernadero	56
Infección con <i>P. infestans</i>	60
RESULTADOS	62
Evaluación de la tolerancia frente a salinidad de las plantas <i>35S:StCDPK2</i>	62
Evaluación de la tolerancia frente a sequía de las plantas <i>35S:StCDPK2</i>	67
Evaluación de la tolerancia frente a la infección con <i>P. infestans</i> de las plantas <i>35S:StCDPK2</i>	74

DISCUSIÓN	77
CAPÍTULO II: “Inoculación de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A como una estrategia para promover el crecimiento de las plantas de papa y para controlar a patógenos”	83
INTRODUCCIÓN	84
Rizosfera	84
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	84
Tolerancia al estrés abiótico asociada con PGPR	86
PGPRs como antagonistas y agentes de biocontrol	88
Inoculación con PGPR	89
El género <i>Methylobacterium</i>	89
CAPÍTULO II, PARTE I: “Caracterización de una bacteria con potencial PGPR perteneciente al género <i>Methylobacterium</i> que fue aislada a partir de las raíces de una planta de papa”	92
MATERIALES Y MÉTODOS	92
Obtención del aislamiento <i>Methylobacterium</i> sp. 2A	92
Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y caracterización fenotípica	92
Extracción de ADN genómico bacteriano	92
Alineamiento e inferencia filogenética mediante la secuencia ADN ribosomal 16S	93
Secuenciación del genoma: Ensamblaje <i>de novo</i> y anotación	93
Filogenia del genoma completo	94
Predicción de islas genómicas	94
Cálculo del pangenoma	94
Predicción de rutas metabólicas asociadas a la capacidad PGP	94
Ensayos para la detección de habilidades PGP	95
RESULTADOS	97
Características generales de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A	97
Inferencia filogenética mediante la secuencia ADN ribosomal 16S	98
Características generales del genoma de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A	100
Inferencia filogenética mediante la comparación del genoma completo contra otros representantes del género <i>Methylobacterium</i>	101
Predicción de islas genómicas	103
Genómica comparativa de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A y familiares cercanos a través del enfoque pangenómico	104
Atributos asociados a la promoción del crecimiento vegetal en el genoma de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A y validación de habilidades PGP	105
Efecto de la inoculación de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A en plantas de tomate con la construcción DR5: <i>GUS</i> y de <i>Arabidopsis</i> <i>iaa19</i>	110
CAPÍTULO II, PARTE II: “Estudio de la promoción del crecimiento vegetal y de su acción biocontroladora”	113
MATERIALES Y MÉTODOS	113
Material vegetal y condiciones de crecimiento	113
Inoculación de plantas de papa y de <i>Arabidopsis</i> con <i>Methylobacterium</i> sp. 2A y tratamiento de estrés salino	113
Ensayos de confrontación dual en placa	114
Inoculación de plantas de papa con <i>Methylobacterium</i> sp. 2A y posterior infección con <i>P. infestans</i>	114
RESULTADOS	116
Efecto de la inoculación de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A en condiciones de salinidad	116
Efecto antagonista de <i>Methylobacterium</i> sp. 2A	120
DISCUSIÓN	125
BIBLIOGRAFÍA	129

ANEXO.....142

 Tablas142

 Figuras150

 Software153

 Materiales biológicos154

 Composición de los medios de cultivo utilizados155

RESUMEN

La producción mundial de alimentos debe incrementarse en un 70% para satisfacer las demandas alimenticias de la población en 2050. Sin embargo, factores abióticos, entre ellos la salinidad y la escasez de agua y factores bióticos (patógenos y plagas) limitan de forma severa la productividad de las plantas. En este contexto, se requieren innovaciones tecnológicas para mejorar la producción de cultivos. En la presente tesis doctoral se abordaron dos estrategias biotecnológicas para hacer frente a limitaciones abióticas y bióticas del cultivo de papa. Por un lado, se generaron plantas transgénicas que sobreexpresan la quinasa de proteínas dependiente de calcio *StCDPK2* (*35S:StCDPK2*), y por otro se probó la inoculación de una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR).

Las CDPKs son sensores-transductores que decodifican las firmas de Ca^{2+} desencadenadas por estímulos y las transducen en respuestas fisiológicas. El promotor de la isoforma *StCDPK2* contiene numerosos sitios de respuesta a estrés; la actividad GUS aumentó en plantas de papa *Pro_{StCDPK2}:GUS* expuestas a 150 mM NaCl o manitol y la expresión de *StCDPK2* se indujo en plantas WT tratadas con alta sal por lo que se propuso evaluar si su sobreexpresión podía tener un efecto positivo frente a la salinidad. Los datos biométricos, de contenido de clorofila, contenido de peróxido y de actividad catalasa indicaron que las plantas *35S:StCDPK2* fueron más tolerantes que las plantas WT en ensayos *in vitro* en presencia de sal (50 mM NaCl). En condiciones control, las líneas *35S:StCDPK2* presentaron mayor expresión de los factores de transcripción *WRKY6* y *ERF5* que se inducen en respuesta a sal. Las plantas *35S:StCDPK2* cultivadas en invernadero presentaron mayor contenido de clorofila y produjeron tubérculos más grandes que las WT al estar sometidas a una CE de 9-10 dS/m. Al ser expuestas a sequía, las sobreexpresantes tuvieron un mejor desempeño que las WT y al regarse se recuperaron más rápidamente, pero al finalizar el ensayo la sobrevida y el rendimiento en tubérculos fue similar. El análisis de los datos obtenidos hasta el momento indicó que la sobreexpresión de *StCDPK2* no confiere mayor resistencia o tolerancia a la infección por el oomiceto *Phytophthora infestans*.

Además, se aisló un bacilo gran negativo (denominado 2A) a partir de plantas de papa cultivadas *in vitro* que mostraban una coloración rosada en la superficie de las raíces. Estas plantas presentaban mayor densidad de pelos radiculares y mayor biomasa que otras líneas de papa de la misma edad. La secuencia de ADN ribosomal 16S, indicó que el aislamiento 2A pertenece al género *Methylobacterium*. La

secuenciación del genoma completo reveló vías metabólicas asociadas con su capacidad promotora del crecimiento vegetal, entre ellas dos rutas de biosíntesis de ácido indol acético (AIA). La identidad de nucleótidos entre el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A y otros miembros del género sugiere que esta especie no fue descrita hasta el momento. *Methylobacterium* sp. 2A solubiliza fosfato mineral, puede crecer en un medio libre de N₂ y produce altos niveles de AIA. Su inoculación en plantas DR5:GUS de tomate y de Arabidopsis indujo la actividad GUS y, en la mutante *iaa19* incrementó (44%) la formación de raíces laterales. Plantas de Arabidopsis WT inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A cultivadas en condiciones control o de estrés salino (75 mM NaCl), mostraron una mayor densidad de raíces laterales que las plantas no inoculadas. Además, bajo estrés salino, presentaron mayor número de hojas y mayor diámetro de roseta. A su vez, *in vitro*, las plantas de papa inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A tuvieron un mejor rendimiento cuando se crecieron en NaCl (50 mM). En ensayos de confrontación dual en placa, *Methylobacterium* sp. 2A mostró actividad de control biológico contra *P. infestans*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium graminearum*. En ensayos de infección con *P. infestans* realizados en plantas de papa de invernadero que fueron previamente inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A, el tamaño de las lesiones necróticas y la clorosis fue significativamente menor en las plantas inoculadas.

Nuestros resultados sugieren que ambas estrategias biotecnológicas pueden mejorar el rendimiento del cultivo de papa: *StCDPK2* es un actor temprano en la respuesta al estrés salino y existe una correlación positiva entre su sobreexpresión y la tolerancia a la salinidad y la sequía. Por otra parte, *Methylobacterium* sp. 2A es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) que alivia el estrés salino y restringe la infección por *P. infestans*.

Palabras clave: Salinidad • Sequía • *Phytophthora infestans* • Quinasas de proteínas dependientes de calcio (CDPK) • Plantas transgénicas de papa • *Methylobacterium* • Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

ABSTRACT

Global food production needs to be increased by 70% to meet population food demands by 2050. However, abiotic factors such as salinity and water scarcity, and biotic factors (pathogens and pests) severely limit plant productivity. In this context, novel agricultural technologies are required to improve food production. In this PhD thesis, two biotechnological strategies were developed to face the abiotic and biotic limitations of potato culture. For this, transgenic plants that overexpress the calcium-dependent protein kinase *StCDPK2* (*35S:StCDPK2*) were generated. Furthermore, the inoculation of a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) was tested.

CDPKs are sensor-transducers that decode stimulus-triggered Ca^{2+} signatures and transduce them into physiological responses. *StCDPK2* promoter contains numerous stress-responsive sites; GUS activity increased in *Pro_{StCDPK2}:GUS* potato plants exposed to 150 mM NaCl or mannitol and the expression of *StCDPK2* was induced in WT plants treated with high salt, therefore it was proposed to evaluate whether its overexpression could have a positive effect against salinity. Biometric data, chlorophyll content, peroxide content, and catalase activity indicated that *35S:StCDPK2* plants were more tolerant than WT plants in the presence of salt (50 mM NaCl) in *in vitro* assays. Under control conditions, *35S:StCDPK2* lines showed higher expression of *WRKY6* and *ERF5* transcription factors which are induced in response to salt. *35S:StCDPK2* plants grown in the greenhouse presented higher chlorophyll content and produced bigger tubers than the WT when subjected to an EC of 9-10 dS/m. When exposed to drought, the overexpressing plants had a better performance than the WT and they recovered more quickly after rewatering, but survival and tuber yield were similar at the end of the assay. Analysis of the obtained data indicated that *StCDPK2* overexpression does not confer greater resistance or tolerance upon infection with the oomycete *Phytophthora infestans*.

In addition, a Gram-negative pink-pigmented bacillus (named 2A) was isolated from potato plants grown *in vitro* that showed a pink pigmentation on the surface of the roots. These plants presented increased root hair density and higher biomass than other potato lines of the same age. The 16S ribosomal DNA sequence indicated that strain 2A belongs to the genus *Methylobacterium*. Whole-genome sequencing revealed metabolic pathways associated with its plant growth-promoting ability, including two indole acetic acid (IAA) biosynthesis pathways. Nucleotide identity between *Methylobacterium* sp. 2A sequenced genome and the rest of the species that belong to the genus suggested that this species has not been described so far. *Methylobacterium*

sp. 2A solubilizes mineral phosphate, can grow in N₂-free medium and produces high levels of IAA. Upon inoculation, GUS activity was induced in the roots of *DR5::GUS* tomato and Arabidopsis plants, and lateral root formation was improved in *iaa19* plants (44%). Arabidopsis WT plants inoculated with *Methylobacterium* sp. 2A grown under control or saline stress conditions (75 mM NaCl) displayed a higher density of lateral roots than non-inoculated plants. Moreover, under salt stress, they presented a higher number of leaves and larger rosette diameter. In turn, *in vitro* potato plants inoculated with *Methylobacterium* sp. 2A had a better performance when grown under 50 mM NaCl. In dual confrontation assays, *Methylobacterium* sp. 2A displayed biological control activity against *P. infestans*, *Botrytis cinerea*, and *Fusarium graminearum*. In addition, we observed that *Methylobacterium* sp. 2A diminished the size of necrotic lesions and reduced chlorosis when greenhouse potato plants were infected with *P. infestans*.

Our results suggest that both biotechnological strategies can improve potato crop yield: *StCDPK2* is an early player in the salt-stress response and there is a positive correlation between its overexpression and the tolerance towards salt and drought stress. On the other hand, *Methylobacterium* sp. 2A is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) that alleviates salt stress and restricts *P. infestans* infection.

Keywords: Salinity • Drought • *Phytophthora infestans* • Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) • Potato transgenic plants • *Methylobacterium* • Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

ABREVIATURAS

35S:StCDPK2: plantas transgénicas sobreexpresantes de la isoforma 2 de CDPK de *Solanum tuberosum*.

A: Tasa de asimilación neta con irradiancia de saturación.

ABA: Ácido abscísico.

ADNg: ADN genómico.

ADNr 16S: ADN ribosomal 16S.

AIA: Ácido indolacético.

ANI: *Average nucleotide identity*, identidad media de nucleótidos.

ANOVA: *Analysis of variance*, análisis de la varianza.

BLAST: *Basic local alignment search tool*, alineamiento local de secuencias.

CAT: Catalasa.

CDPK: *Calcium-dependent protein kinase*, quinasa de proteínas dependiente de calcio.

CDS: *Coding sequence*, secuencia codificante.

CE: Conductividad eléctrica.

C_i: Concentración intercelular de CO₂.

DL: Fotoperíodo de día largo.

dpi: Días post infección/inoculación de acuerdo al microorganismo utilizado.

E: Tasa de transpiración.

EF-1 α : *Elongation factor 1 α* , factor de elongación 1 α .

ETR: *Electron transport rate*, tasa de transporte de electrones.

FT: Factor de transcripción.

GAPDH: gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa.

gs: Conductancia estomática.

GUS: β -Glucuronidasa.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

IG: Islas Genómicas.

ML: *Maximum Likelihood*, máxima verosimilitud.

MS: Medio Murashige y Skoog.

P5CS: Delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa.

PAL: *Phenylalanine ammonia lyase*, fenilalanina amonio liasa.

PCR: *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

PDH: Prolina deshidrogenasa.

PF: Peso fresco.

PGPR: *Plant growth-promoting rhizobacteria*, rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

PhiPS2: Eficiencia fotoquímica del PSII.

PR-1b: *Pathogenesis-related 1b*, gen relacionado a la patogénesis.

Pro_{StCDPK2}:GUS: plantas transgénicas conteniendo el gen reportero *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa (*GUS*) bajo la dirección del promotor de la isoforma 2 de CDPK de *Solanum tuberosum*.

ROS: *Reactive oxygen species*, especies reactivas del oxígeno.

RT-qPCR: Transcripción reversa "*Reverse Transcription*" seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real "*Polimerase Chain Reaction*".

INTRODUCCIÓN GENERAL

Demanda alimentaria y problemática ambiental

El desarrollo de sociedades humanas saludables depende de la disponibilidad de alimentos, lo cual es una necesidad básica para los seres humanos. La población mundial se está incrementando rápidamente y según un informe publicado en 2019 por las Naciones Unidas (<https://www.un.org/en/desa/world-population-prospects-2019-highlights>, *World Population Prospects*) se espera que aumente en 2 billones de personas en los próximos 30 años excediendo los 9 mil millones para 2050. Para satisfacer las demandas alimenticias futuras se estima que la producción mundial de alimentos debe incrementarse en un 70% (Zhang et al. 2021). Sin embargo, debido al cambio climático y a la limitada disponibilidad de tierras cultivables, la producción de cultivos se encuentra estable o incluso en declive (Springmann et al. 2018). Según la Base de datos estadística FAO (<https://www.fao.org>), el 50% de la tierra habitable se dedica actualmente a la agricultura, la mayor parte se utiliza para la cría de ganado y sólo el 23% (11 millones de km²) se destina a la producción de cultivos alimentarios. Estos 11 millones de km² aportan más calorías y proteínas para la población mundial que el área casi cuatro veces mayor dedicada a la ganadería (Our World in Data; <https://ourworldindata.org>).

Nuestro desafío actual es aumentar la productividad de los cultivos a un ritmo más rápido que el crecimiento de la población. La mayoría de los países alcanzaron este objetivo en las últimas décadas utilizando una combinación de tecnologías agrícolas: riego, mejoras en las variedades de los cultivos, fertilizantes y plaguicidas para aumentar los rendimientos (Roser y Ritchie, 2017). Sin embargo, en las próximas décadas, dicha ganancia en el rendimiento puede ser compensada por el crecimiento poblacional. Por ende, en un futuro próximo, habrá que destinar más zonas marginales con tierras áridas y semiáridas a la agricultura (Coleman-Derr y Tringe, 2014).

La disponibilidad de agua es esencial para mantener las funciones celulares y la presión de turgencia de las plantas. La escasez de agua provocada por la sequía, limita la productividad de los cultivos de forma severa y genera una pérdida de rendimiento que excede las pérdidas por todas las demás causas (Farooq et al. 2009). Asimismo, la salinidad es uno de los principales estreses del suelo que provoca la pérdida de tierras cultivables y afecta al desarrollo de los cultivos en el campo (Isayenkov y Maathuis, 2019). Ambos estreses abióticos, cuya gravedad depende de su intensidad y duración, conducen a la deshidratación o al estrés osmótico y también

generan una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Marco et al. 2015).

Además, los cultivos están sujetos a enfermedades tanto en el campo como después de la cosecha. Los principales grupos de patógenos son: virus, bacterias, oomicetos, hongos, nematodos y plantas parásitas. Estas limitaciones bióticas pueden, en ocasiones, comprometer gravemente la seguridad alimentaria. Por ejemplo, el tizón tardío de la papa, causado por *Phytophthora infestans*, golpeó a Europa en la década de 1840 y fue especialmente grave en Irlanda donde gran parte de la población dependía de este cultivo para su sustento. Debido a la falta de resistencia de la planta al patógeno y a las condiciones climáticas favorables al desarrollo de la epidemia, alrededor de un millón de personas murieron de hambre en Irlanda y más de un millón intentaron emigrar.

Para garantizar la seguridad alimentaria futura se necesitan avances científicos e innovaciones tecnológicas que permitan mejorar aún más el rendimiento de los cultivos y desarrollar variedades que puedan adaptarse a entornos hostiles y resistir a patógenos (Gao, 2021). Uno de los cultivos cuya producción y rendimiento deberían aumentar es el cultivo de papa ya que proporciona la fuente más barata y fácil de proteínas, aminoácidos esenciales, carbohidratos, minerales, antioxidantes y vitaminas. La planta de papa está bien adaptada a una serie de condiciones ambientales, pero ciertos estreses abióticos y bióticos provocan reducciones significativas en su crecimiento y rendimiento. Muchas áreas de producción de papa en los países en desarrollo están ubicadas en zonas semiáridas, donde los períodos de sequía representan grandes pérdidas de cosecha amenazando la sostenibilidad de la industria agrícola. A nivel mundial, se estima que la sequía disminuirá el rendimiento potencial de papa en un 18-32% en el período proyectado de 2040 a 2069 (Hijmans, 2003).

Características del cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.), perteneciente a la familia de las Solanáceas, es una planta dicotiledónea que puede medir hasta 1 m de altura, herbácea anual, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos y caducifolia perdiendo sus hojas y tallos aéreos en la estación fría. Posee hojas compuestas, con siete a nueve folíolos, de forma lanceolada. A medida que crece la planta, sus hojas compuestas fabrican almidón que es transferido a las terminaciones de sus tallos subterráneos (estolones). Los estolones se van engrosando para formar los tubérculos cerca a la superficie del

suelo (**Figura 1**). Al término de la temporada de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan a nivel del suelo y los nuevos tubérculos se desprenden de sus estolones. Los tubérculos cumplen una doble función para la planta como órgano de reserva y de propagación vegetativa o asexual, lo que le permite sobrevivir a las condiciones desfavorables y rebrotar. Cada tubérculo puede tener hasta 10 yemas axilares u “ojos” alrededor de su superficie; cuando las condiciones son favorables las yemas axilares dormidas se reactivan y generan una planta genéticamente idéntica a la planta madre. Además, las plantas de papa pueden multiplicarse de forma sexual ya que producen flores y frutos que contienen entre 100 a 400 semillas (CIP, Centro Internacional de la Papa, <https://cipotato.org>; Dimitri 1972). El ciclo total de la papa es de alrededor de 120 días.

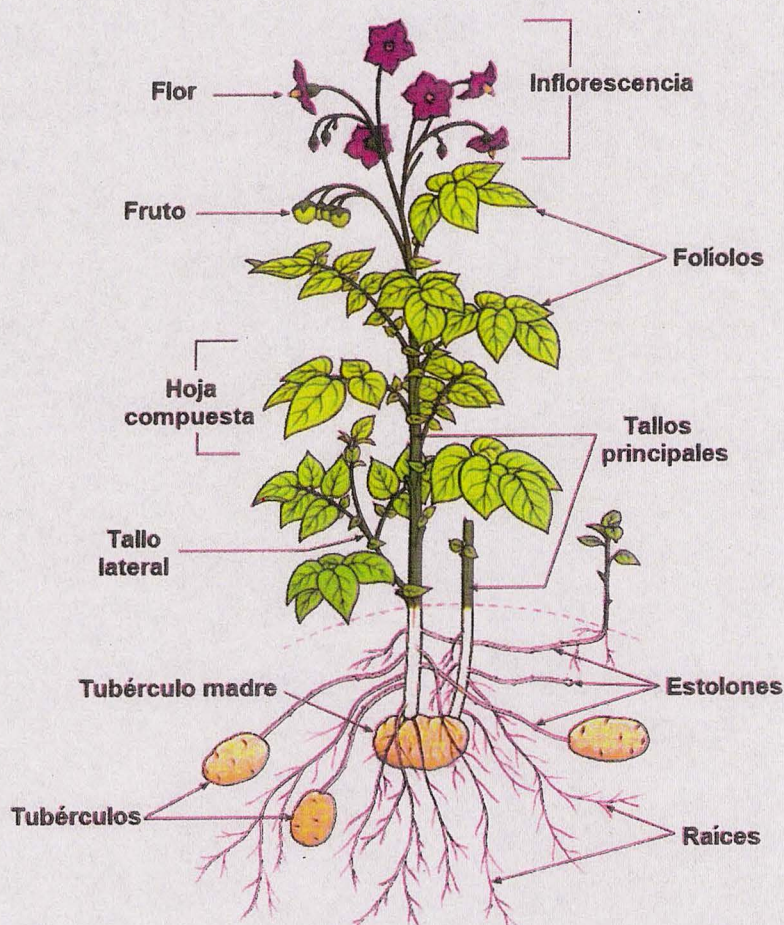
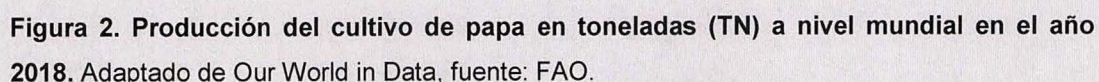


Figura 1. Descripción morfológica de la planta de papa. Adaptado del CIP.

Los tubérculos de papa tienen un alto contenido de compuestos que incluyen ascorbato, β -caroteno, ácidos orgánicos y polipéptidos ricos en cisteína que promueven la biodisponibilidad mineral. Además, la papa es baja en antinutrientes

La papa ocupa el cuarto lugar en volumen de producción después del arroz, el trigo y el maíz en el mundo. La producción geográfica mundial de papa muestra su adaptabilidad a diferentes condiciones ya que se cultiva en el 79% de los países del mundo (FAO, 2015) y su producción mundial alcanza, aproximadamente, los 370 millones de toneladas con un área total de 17 millones de hectáreas siendo China, India, Rusia, Ucrania y Estados Unidos los principales productores (FAO, 2019) (Figura 2).



Página | 17

tubérculos (Informe elaborado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 2021).

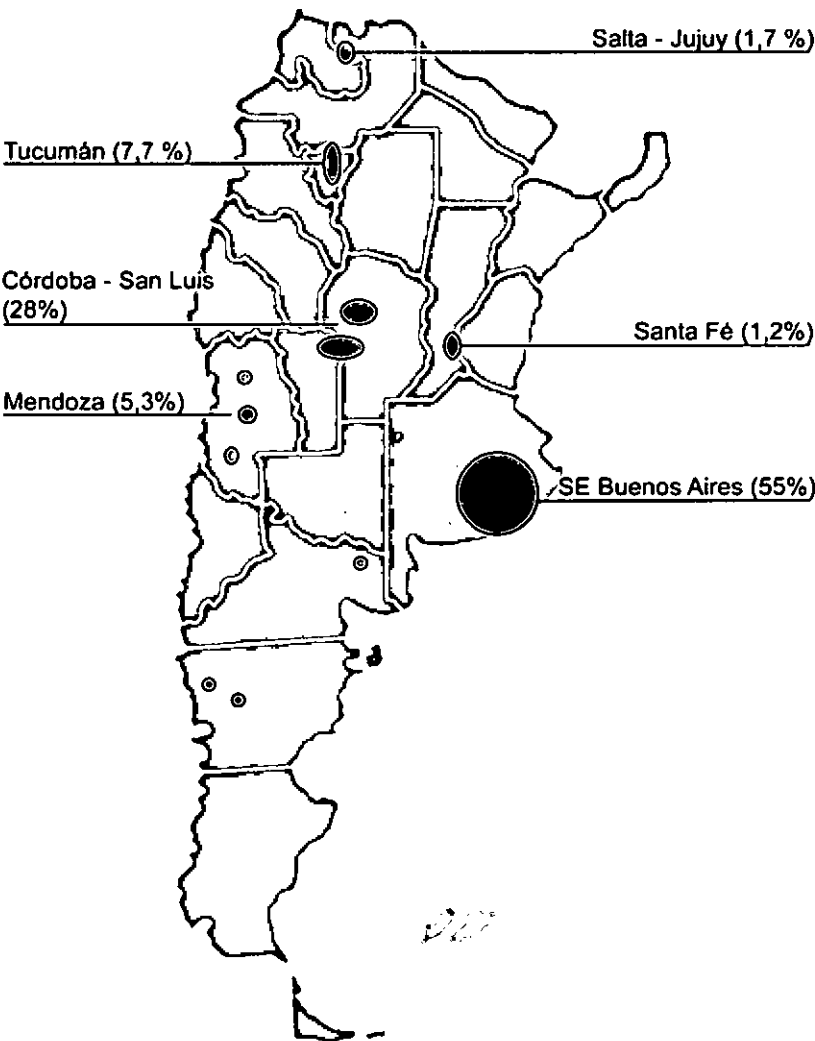


Figura 3. Principales zonas productoras de papa en Argentina y porcentajes de superficie sobre el total del país al año 2020. Adaptado del Informe elaborado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2021).

Los valores de rendimiento del cultivo de papa son de alrededor de 30 a 35 TN/ha, y la producción total es de 2,1 a 2,5 millones de TN por año (Garzón y Young, 2016). Sin embargo, se estimó que el rendimiento productivo de la papa es solo del 40% al 76% o del 47% al 81% del rendimiento potencial, dependiendo del método utilizado para estimar el rendimiento potencial, el año y la región (Cantos de Ruiz et al. 1989; de la Casa et al. 2014). Los rendimientos potenciales se calculan asumiendo que no hay limitaciones abióticas ni factores bióticos que reduzcan el crecimiento.

Salinidad

Como se mencionó anteriormente, la salinidad es uno de los principales estreses del suelo que provoca la pérdida de tierras cultivables (Isayenkov y Maathuis, 2019). Los suelos se consideran salinos cuando su conductividad eléctrica (CE) alcanza 4 dS/m o más (Marschner, 1995). En la región pampeana de Argentina, los suelos halomórficos (sódicos y salino-sódicos) comprenden un total de 160.000 km², incluyendo el Río Salado y sus sistemas circundantes dentro de la unidad geomorfológica conocida como la Pampa Deprimida, el noroeste y sudeste de la provincia de Buenos Aires, el norte de Santa Fe y parte de La Pampa y Córdoba. Los procesos de salinización están estrechamente relacionados con las condiciones climáticas de esta zona y con la llanura, la cual impide el drenaje después de lluvias abundantes (Imbellone et al. 2010).

El estrés por salinidad implica cambios en la morfología y en varios procesos bioquímicos y metabólicos de la planta, los cuales dependen de la severidad y duración del estrés. Existe una gran diversidad en la tolerancia a la sal entre las especies y cada especie tiene un umbral de salinidad específico (Ilangumaran y Smith, 2017). La respuesta más temprana es la reducción de la tasa de producción de nuevas células, lo que causa una disminución en el crecimiento de las raíces y los tallos, por consiguiente, estas plantas presentan una menor acumulación de biomasa seca. Además, la reducción en la acumulación de peso seco podría atribuirse al aumento de la rigidez de la pared celular porque su estructura se ve alterada. El estrés salino en la zona de la raíz provoca estrés osmótico ya que altera la homeostasis de los iones celulares. En plantas sometidas a estrés salino hay una deficiencia de nutrientes como el K⁺ porque hay mayor absorción de Na⁺. La acumulación de los iones Na⁺ y Cl⁻ en las células provoca un desequilibrio iónico grave y toxicidad. Además, las plantas sometidas a estrés salino muestran un nivel más bajo de contenido de clorofila en las hojas, una menor apertura estomática, disminución de la síntesis de proteínas y aumento de la acumulación de prolina. Al verse alteradas las actividades de las enzimas antioxidantes se produce un aumento de la acumulación de ROS (**Figura 4**) (revisado en Gupta y Huang, 2014 y en Kibria y Hoque 2019).

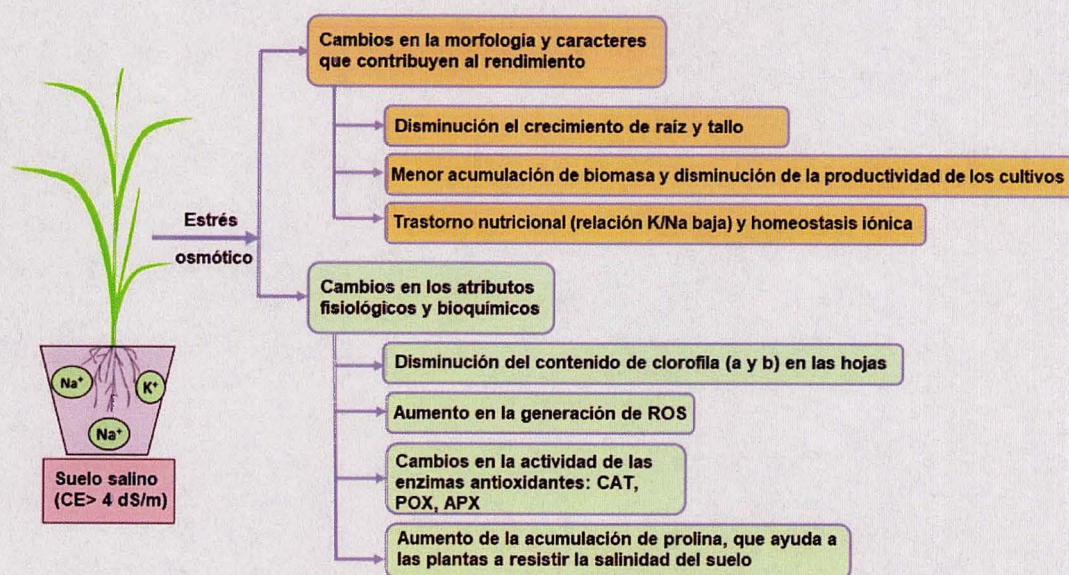


Figura 4. Respuestas de las plantas al estrés salino. Cuando las plantas son sometidas a suelos con una CE >4 dS/m se producen cambios en su morfología como la disminución del crecimiento de raíces y tallos y cambios en sus atributos fisiológicos y bioquímicos como disminución del contenido de clorofila de las hojas, aumento de ROS y disminución de la actividad de enzimas antioxidantes. Adaptado de Kibria y Hoque, 2019.

Las plantas de papa son glicófitas moderadamente sensibles al estrés salino; todos los cultivares muestran una reducción en la longitud del vástago, en el desarrollo del sistema radicular y en el rendimiento de los tubérculos al ser sometidas a salinidad (Elkhatib et al. 2004; Khenifi et al. 2011).

Sequía

La sequía es una de las limitaciones más importantes para el crecimiento de las plantas y la productividad de los ecosistemas terrestres. La severidad de la sequía es impredecible ya que puede ser resultado de precipitaciones bajas e irregulares, de una baja capacidad de retención de agua del suelo y debida a situaciones en las que la tasa de transpiración excede la tasa de absorción de agua.

En un contexto de sequía, las plantas reducen el potencial hídrico de las hojas y la presión de turgencia. Esto conduce al cierre de los estomas, lo cual ayuda a conservar el agua y mantener un estado hídrico adecuado en las hojas pero que a su vez reduce tanto la concentración de CO₂ interno de las hojas como la tasa fotosintética haciendo que el metabolismo de las plantas se ralentice y que se produzca el cese de las reacciones enzimáticas (Fahad et al. 2017; Farooq et al. 2009). En respuesta a esta situación, la planta desencadena procesos celulares y

metabólicos que incluyen la inhibición de la expansión celular, de la síntesis de la pared celular, de la síntesis de proteínas, de la conductancia estomática y de la actividad fotosintética. Además, la planta desencadena mecanismos de adaptación que incluyen la biosíntesis de la hormona ácido abscísico (ABA) y la producción de solutos compatibles así como también de productos génicos involucrados en el ajuste osmótico y en la protección/repación de estructuras celulares (Marco et al. 2015).

La reducción en el crecimiento de las hojas impacta directamente en el área fotosintética e influye negativamente en los pigmentos fotosintéticos (clorofila a y b). También, hay daño oxidativo en los tilacoides por la producción de ROS. Esto tiene un impacto en la clorofila y en los carotenoides y causa la degradación de los complejos centrales de los fotosistemas I (PSI) y II (PSII), inhibiendo así los procesos fotoquímicos esenciales (Roach y Krieger-Liszkay, 2014). El rendimiento de los cultivos es el producto final de la fotosíntesis y otros procesos fisiológicos interrelacionados y su reducción depende de la severidad y duración del período de sequía, y de la fase de crecimiento de la planta afectada por el déficit hídrico (Farooq et al. 2009). El cultivo de papa es sumamente sensible a sequía, lo cual se puede producir a pesar de contar con riegos periódicos (Cantos de Ruiz et al. 1989). La **Figura 5** detalla las diferentes etapas de crecimiento de la papa y cómo la escasez de agua puede influir en su crecimiento y desarrollo y, finalmente, en el rendimiento.

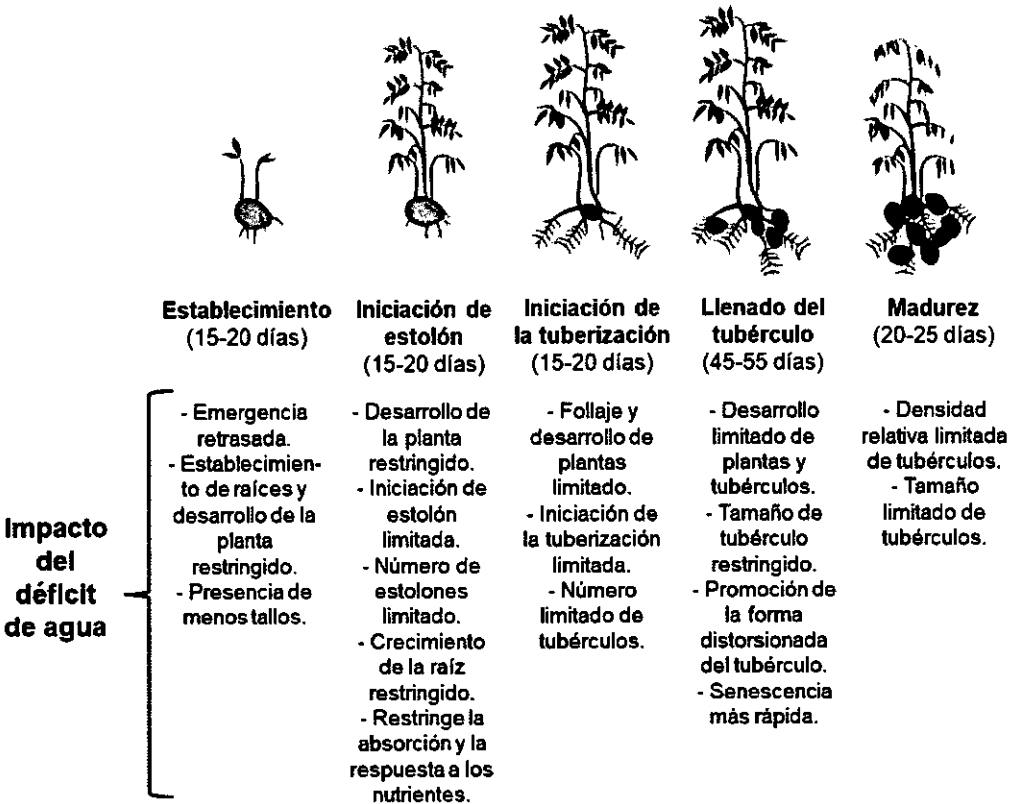


Figura 5. Efecto del déficit de agua en diferentes estadios de crecimiento en papa.
Adaptado de Obidiegwu et al. 2015.

La sequía en la papa no solo reduce el rendimiento sino que también puede dañar la calidad del producto, por ejemplo, al aumentar la incidencia de enfermedades en el tubérculo (Mane et al. 2008).

Phytophthora infestans

Los microorganismos fitopatógenos, al igual que los estreses abióticos, están amenazando la producción agrícola mundial. Los oomicetos, como *P. infestans*, son los agentes causales de algunas de las enfermedades vegetales más devastadoras conocidas por el hombre. *P. infestans*, el agente causal del tizón tardío de la papa, tiene ahora un alcance casi global (Birch et al. 2012) y es posiblemente la más destructiva de las enfermedades de las plantas tanto en términos de daño económico como en pérdidas alimentarias (Hashemi et al. 2021). Sin duda, es la enfermedad más devastadora en el cultivo de papa (Agrios, 2005).

La mayoría de las infecciones durante una temporada son iniciadas por esporangios asexuales. *P. infestans* produce esporangios a partir de los esporangióforos que se liberan fácilmente dispersándose cuando el ambiente es favorable (son dehiscentes); la esporulación requiere mucha humedad y es suprimida por la luz, por lo que ocurre principalmente durante la noche. Los esporangios pueden germinar para producir zoosporas biflageladas. La liberación de zoosporas de los esporangios requiere agua libre y temperaturas frescas ya que las zoosporas nadan a través o hacia el tejido huésped, sobre el cual se produce el enquistamiento y la germinación a través de un tubo germinal. A su vez, el mismo zoosporangio puede actuar como una espora, germinando e ingresando al tejido. Este tubo germinativo puede entrar en las hojas y los tallos a través de los estomas pero más a menudo forma un apresorio que rompe la cutícula y la pared celular epidérmica. El crecimiento dentro de la planta implica principalmente la extensión de hifas intercelulares, que insertan haustorios en las células huésped (Leesutthiphonchai et al. 2018). Los oomicetos secretan dos clases de efectores que se dirigen a sitios distintos en la planta: los efectores apoplásticos que se secretan en el espacio extracelular del tejido, donde interactúan con las proteínas de defensa del huésped y receptores de superficie; y los efectores citoplasmáticos que se translocan dentro de la célula vegetal a través de estructuras como vesículas de infección y haustorios (Kamoun, 2006) (Figura 6).

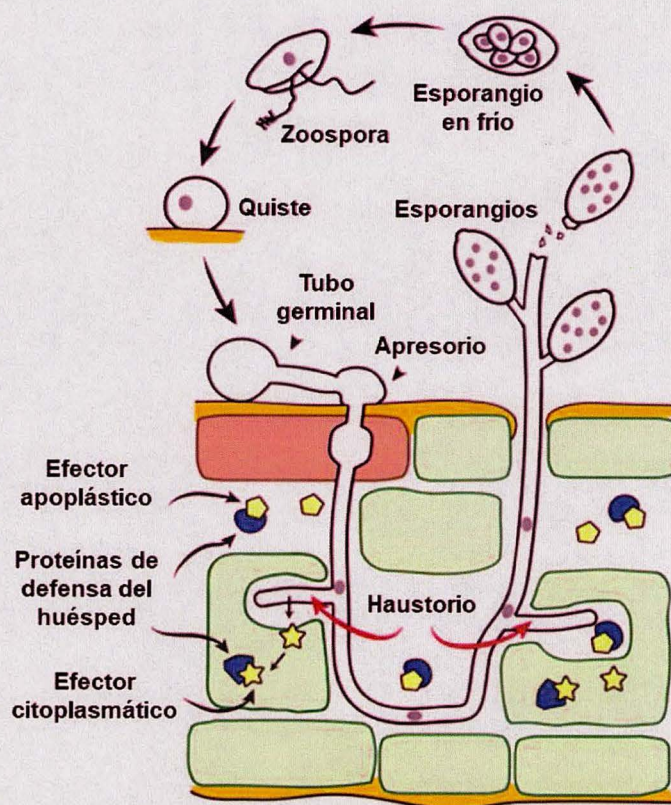


Figura 6. Ciclo de vida de *P. infestans* en el follaje. Este ciclo puede ocurrir también en tubérculos almacenados. Adaptado de Leesutthiphonchai et al. 2018.

Como hemibiótrofo, *P. infestans* solo infecta tejido vivo extrayendo nutrientes del apoplasto o espacio extrahaustorial durante la mayor parte del ciclo de la enfermedad. La etapa terminal de la infección se asocia con la necrosis del huésped y la esporulación, la cual ocurre a partir de las lesiones y es estimulada por las condiciones de humedad y temperatura (15 a 22°C). Una sola lesión puede producir varios cientos de miles de esporangios, formándose diariamente nuevas esporas durante varios días, lo que resulta en la destrucción de un campo completo en sólo una semana. Si no encuentran un sustrato vivo al cual infectar, las zoosporas pueden enquistarse endureciendo su pared y así se mantienen viables por un par de días para luego reinfectar (Dou y Zhou, 2012). También pueden ocurrir pérdidas poscosecha si durante el cultivo las condiciones fueron demasiado húmedas. El ingreso de los tubérculos se produce principalmente a través de yemas, heridas o aberturas naturales como las lenticelas (Fry et al. 2008; Leesutthiphonchai et al. 2018).

En caso de encontrarse dos talos genéticamente compatibles, la reproducción sexual puede llevarse a cabo, originando oosporas, la espora de resistencia. La capacidad de la espora de sobrevivir en el suelo, su supervivencia en tubérculos, sus

diferentes formas de penetración y los rearrreglos genéticos que generan rápidamente nuevas cepas convierten a *P. infestans* en una amenaza para la seguridad alimentaria mundial (Fry et al. 2015). Además, en Argentina el 80% de la superficie de papa cultivada pertenece a las variedades Spunta y Kennebec, las cuales son susceptibles a *P. infestans* (Cicore et al. 2012).

Los oomicetos pueden desarrollar rápidamente la resistencia a los fungicidas sintéticos; superan los genes de resistencia que se han introducido en las plantas de cultivo (Vleeshouwers et al. 2011) y se sabe que despliegan una amplia gama de efectores para facilitar la destrucción de sus huéspedes (Bozkurt et al. 2012). Para manejar la enfermedad se aplican fungicidas químicos bajo un sistema de alarma, pero esto es insostenible a largo plazo debido al mal uso de los fungicidas y a los efectos secundarios desfavorables en el ambiente.

Aumento de la tolerancia del cultivo de papa a estrés mediante el abordaje de estrategias biotecnológicas

El cambio climático, el aumento de la población mundial y la erosión genética son los principales factores que indican la necesidad de mejorar la adaptación, la tolerancia y la productividad de los cultivos. Existe un requisito continuo de nuevos cultivares mejor adaptados a diferentes biomas con mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico y rendimiento y calidad superiores (Arzani y Ashraf, 2016). Además, en los últimos años se han utilizado de forma intensiva fertilizantes y pesticidas químicos para disminuir las pérdidas en el rendimiento de los cultivos, pero su uso incontrolado y generalizado ha planteado una grave amenaza para la sostenibilidad de la agricultura y la estabilidad de los ecosistemas. Estos químicos se acumulan en el suelo, drenan hacia los cursos de agua y se emiten al aire donde persisten durante décadas (Hakim et al. 2021). Además, la aplicación continua y abusiva de pesticidas se ha asociado con efectos secundarios dañinos que han llevado a problemas ambientales y de salud humana (Baker et al. 2020). En este escenario, el énfasis debe estar enfocado en la búsqueda de sustitutos de los fertilizantes y pesticidas químicos para aumentar el rendimiento de los cultivos de manera sostenible. Dentro de las posibles estrategias para lograr dicho objetivo se encuentra la modificación de los cultivos mediante ingeniería genética y la selección de microorganismos benéficos para ser utilizados como inoculantes.

Aunque el mejoramiento convencional es actualmente el enfoque más utilizado, requiere de mucha mano de obra y, por lo general, lleva varios años avanzar desde las primeras etapas de selección de fenotipos y genotipos hasta los primeros cruces en

variedades comerciales. Los estreses abióticos como la sequía y la salinidad son las principales limitaciones ambientales que afectan la producción y la productividad de casi todos los cultivos hortícolas y, hasta ahora, el mejoramiento convencional no ha demostrado ser tan exitoso para abordar la mitigación del estrés abiótico. Desde la perspectiva del productor, cualquier mejora genética que pudiera reducir el costo de la aplicación de productos químicos sería de gran beneficio (Parmar et al. 2017).

En este aspecto, la biotecnología ha ofrecido un enorme alcance y potencial a los métodos convencionales de mejora y protección de cultivos mediante el desarrollo de cultivos genéticamente modificados, en el que se introducen genes (transgenes) o elementos genéticos de función conocida a variedades de cultivos de élite, lo que conduce a mayores rendimientos, menor uso de pesticidas y una mejor nutrición (Gao, 2021; Zhang et al. 2018). La transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una de las formas más comunes de introducir ADN heterólogo (Altpeter et al. 2016). La sobreexpresión constitutiva de genes individuales que codifican FTs, enzimas relacionadas con la acumulación de osmolitos, proteínas que funcionan como transportadores de iones y depuradores de especies reactivas de oxígeno (ROS) ha sido la estrategia más común para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Reguera et al. 2012). En este aspecto, nuestro grupo analiza el efecto de la sobreexpresión de genes vinculados con la transducción de estímulos ambientales.

Las plantas son organismos sésiles, incapaces de desplazarse a ambientes adecuados, que han desarrollado mecanismos de transducción de señales eficientes a lo largo de la evolución que les permiten percibir los cambios en su entorno y adaptar su fisiología rápidamente por períodos de tiempo variables. La capacidad de una especie determinada de sobrevivir a condiciones adversas depende de cada especie y de la extensión de la condición adversa, y se relaciona con una serie de respuestas moleculares, fisiológicas y bioquímicas que las plantas pueden activar (Arce et al. 2008). Entender cómo las plantas perciben las señales de estrés y se adaptan a entornos adversos es fundamental para mejorar su tolerancia y, por ende, para mejorar la productividad agrícola.

Las evidencias aportadas por numerosos grupos de investigación, que se desarrollan en profundidad en el Capítulo I, permiten proponer que las quinasas dependientes de calcio (CDPKs) son reguladores centrales en los procesos mediados por Ca^{2+} que se desencadenan en respuesta a los desafíos ambientales y a los cambios internos. Nuestro grupo caracterizó la familia CDPK de la planta de papa y

datos preliminares sugieren que la isoforma *StCDPK2* está involucrada en la cascada de transducción de señales gatillada en respuesta al estrés abiótico y a la infección por *P. infestans*. Nuestra hipótesis es que la sobreexpresión de *StCDPK2* podría ser una estrategia biotecnológica interesante para combatir diferentes estreses.

Por otra parte, una estrategia alternativa para aliviar los efectos adversos inducidos por el estrés en el crecimiento de las plantas es la utilización de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés, *plant growth promoting rhizobacteria*). Estas bacterias benéficas colonizan la rizosfera, el rizoplaneo (la superficie de la raíz) o el interior de los tejidos radiculares (Gray y Smith, 2005), estimulan el crecimiento y aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, suprimen el crecimiento de patógenos y mejoran la estructura del suelo. La identificación de estas bacterias capaces de conferir tolerancia al estrés y de estimular el crecimiento vegetal tiene un gran potencial para proporcionar soluciones económicas y sostenibles a los desafíos agrícolas actuales.

Plantas de papa de una semana de edad que habían sido micropropagadas *in vitro* atrajeron nuestra atención debido a que presentaban una pigmentación rosada en sus raíces (**Figura 7 A**). El medio de cultivo no estaba contaminado y una fuerte asociación entre las raíces y un microorganismo era evidente a ojo desnudo; un mes después estas plantas presentaban un mayor desarrollo (**Figura 7 B**) y mayor densidad de los pelos radiculares (**Figura 7 C**) que otras plantas de papa de la misma edad. A partir de dichas raíces se logró aislar un bacilo Gram negativo al cual denominamos "aislamiento 2A". Nuestra hipótesis es que el mayor desarrollo de estas plantas podría atribuirse a que este aislamiento perteneciente al género *Methylobacterium* es un microorganismo promotor del crecimiento.

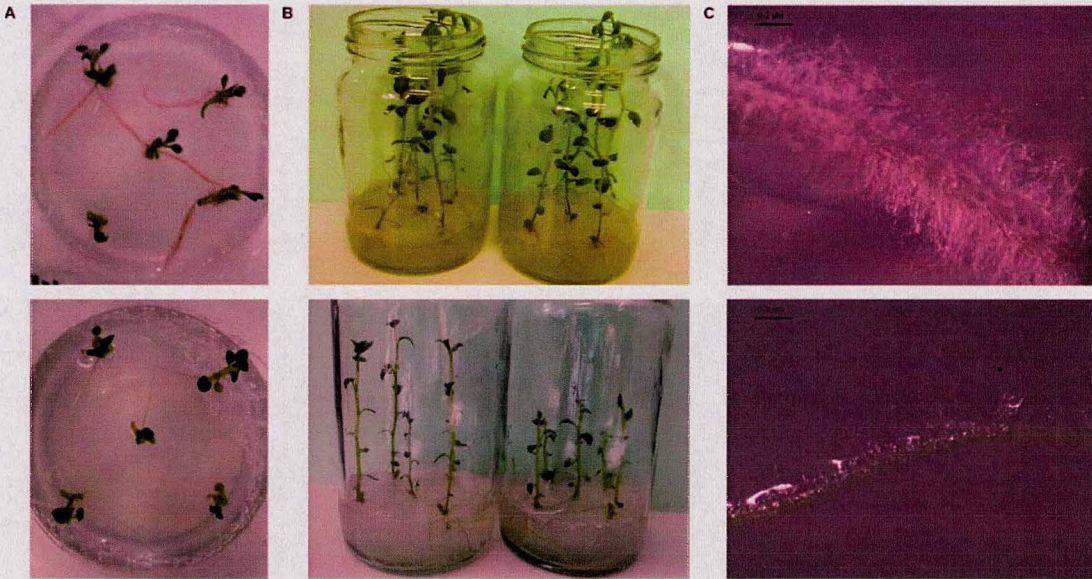


Figura 7. *Methylobacterium* sp. 2A fue encontrado asociado a las raíces de plantas de papa establecidas *in vitro*. (A) La pigmentación rosada en las raíces de las plantas de papa de una semana de edad evidenciaba la presencia de un microorganismo. **(B)** Plantas de un mes de edad exhibieron mayor crecimiento y **(C)** una mayor densidad de pelos radiculares al estar asociadas con *Methylobacterium* sp. 2A. Las plantas que se micropropagaron simultáneamente y que no presentaban asociación con *Methylobacterium* sp. 2A se muestran en los paneles inferiores como referencia. Escala: 0,2 μm .

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es analizar dos posibles estrategias biotecnológicas para combatir las limitaciones abióticas y bióticas:

1. **Generación de plantas de papa transgénicas que sobreexpresan *StCDPK2* como una estrategia para obtener papas tolerantes a sequía y salinidad o con mayor resistencia a patógenos.**

Se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1.1 **Elucidar el rol de *StCDPK2* en la respuesta temprana y tardía a los estreses por salinidad, sequía y *P. infestans*.**

- 1.1.1 Analizar mediante histoquímica y fluorometría plantas transgénicas *Pro_{StCDPK2}:GUS* expuestas a NaCl (salinidad), manitol (estrés osmótico) y a infección con *P. infestans*.

- 1.1.2 Estudiar la expresión de *StCDPK2* en plantas WT expuestas durante 2 a 6 h (tiempos cortos) o días (tiempos largos) a la sal y a manitol.

- 1.2 **Analizar si la sobreexpresión del gen *StCDPK2* confiere tolerancia a la planta de papa frente a salinidad, sequía y frente a la infección con *Phytophthora infestans*.**

- 1.2.1 Analizar *in vitro* el desempeño de plantas transgénicas sobreexpresantes de *StCDPK2* (*35S:StCDPK2*) frente a salinidad y frente a la infección con *P. infestans*.

- 1.2.2 Estudiar el desempeño de las plantas *35S:StCDPK2* en condiciones de salinidad y sequía al ser cultivadas en invernadero y de hojas aisladas al ser infectadas con *P. infestans*.

2. **Inoculación de *Methylobacterium* sp. 2A como una estrategia para promover el crecimiento de las plantas de papa y para controlar patógenos**

Es esencial comprender las características de los inoculantes PGPR antes de aplicarlos en las prácticas agrícolas intensivas, es por esto que se plantean los siguientes objetivos específicos:

2.1 Caracterizar a una bacteria con potencial PGPR perteneciente al género *Methylobacterium* que fue aislada a partir de las raíces de una planta de papa.

2.1.1 Caracterizar fenotípicamente al aislamiento.

2.1.2 Explorar su filogenia a través de la secuenciación del gen ADNr 16S y de su genoma.

2.1.3 Predecir mediante el análisis de su genoma distintas rutas metabólicas y genes asociados a su capacidad promotora del crecimiento vegetal y validar algunos de dichos atributos.

2.2 Estudiar la capacidad de *Methylobacterium* sp. 2A de promover el crecimiento vegetal en condiciones control o frente a salinidad y su acción biocontroladora.

2.2.1 Determinar las variables biométricas de plantas de papa y de *Arabidopsis* inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A crecidas en condiciones control o salinas.

2.2.2 Estudiar la acción biocontroladora del aislamiento ante diferentes patógenos mediante ensayos de confrontación en placa y en plantas de papa inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A y luego infectadas con *P. infestans*.

CAPITULO I: "Generación de plantas de papa sobreexpresantes de *StCDPK2* como una estrategia para obtener papas tolerante a sequía y salinidad o con mayor resistencia a patógenos"

INTRODUCCIÓN

Transducción de señales en plantas

Tras la percepción de un estímulo ambiental se activan varias vías de transducción de señales, lo que deriva en cambios fisiológicos en la célula vegetal (Ludwig et al. 2004). El calcio (Ca^{2+}) representa probablemente el ión más versátil en las células vegetales. Está involucrado en casi todos los aspectos del desarrollo de la planta; es un segundo mensajero ubicuo que posee un rol central en las vías de transducción de señales regulando varios procesos de adaptación y desarrollo. La mayoría de los estreses bióticos y abióticos provocan alteraciones estímulo-específicas y dinámicas de la concentración citosólica de Ca^{2+} libre. Estos "flujos" de Ca^{2+} , de concentración, duración, amplitud frecuencia y distribución espacial variable, condujeron a plantear el concepto de "firmas de Ca^{2+} " (Webb et al. 1996). Estas "firmas de Ca^{2+} " son interpretadas a través de un conjunto de proteínas sensoras que transmiten y amplifican esta información río abajo a proteínas efectoras logrando respuestas específicas a diferentes estímulos. Entre las moléculas efectoras se encuentran enzimas, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción (FTs) y transportadores que conforman la maquinaria celular responsable de generar la respuesta fisiológica apropiada (**Figura 8**) (DeFalco et al. 2009).

Cuatro familias principales de proteínas que unen Ca^{2+} han sido identificadas en plantas: calmodulinas (CaM), proteínas similares a la calmodulina (CML, *calmodulin-like*), proteínas similares a la calcineurina B (CBL, *calcineurin B-like*) y quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs, *calcium-dependent protein kinases*) (Ludwig et al. 2004).

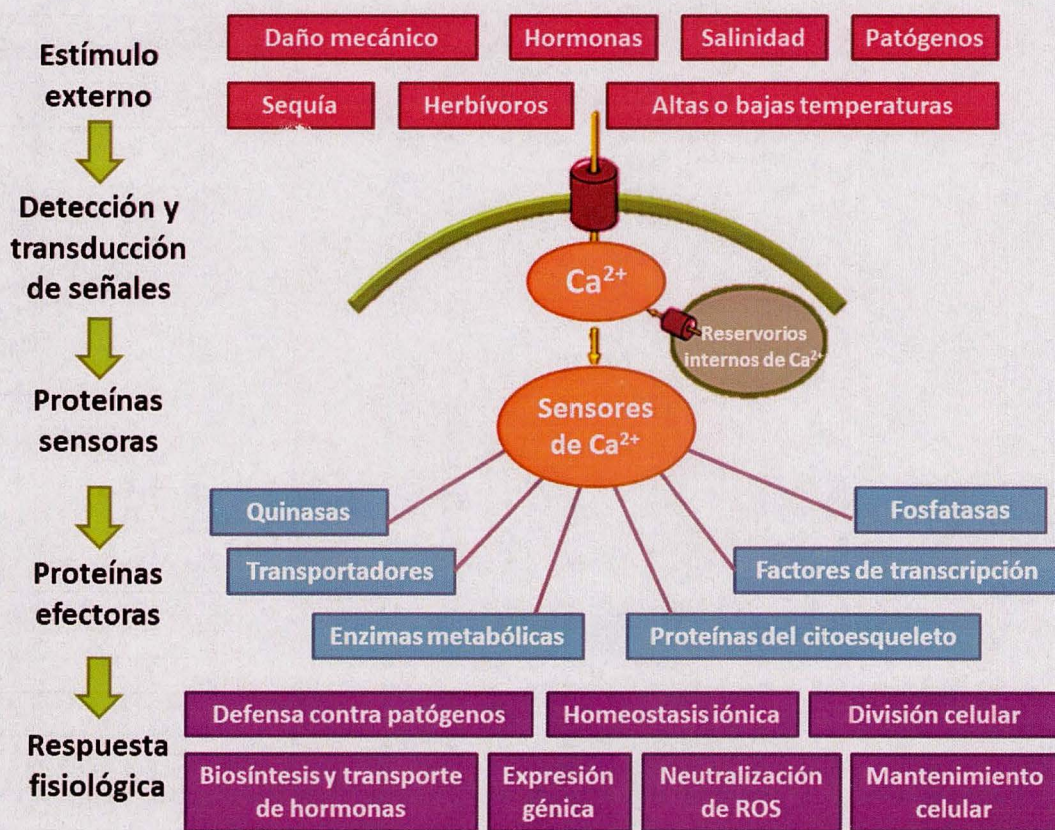


Figura 8. Frente a un estímulo, las plantas inician cascadas de señalización que se entrecruzan y combinan. Los estímulos ambientales son percibidos en la superficie celular o intracelularmente e inducen aumentos transitorios de Ca^{2+} (firmas) que son decodificados por proteínas sensoras que transmiten la señal río abajo a través de proteínas efectoras desencadenando la respuesta. Adaptado de DeFalco et al. 2009.

Quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), proteínas sensoras

Las CDPKs son una de las subfamilias más grandes de proteínas quinasas vegetales cuyos miembros se agrupan en 4 subgrupos según la similitud de secuencia (Boudsocq et al. 2010). Las CDPKs son las únicas que combinan la unión de Ca^{2+} y la capacidad de señalización dentro de un solo producto genético. Esta combinación probablemente surgió tras la fusión de un gen de proteína quinasa (PK) y un gen CaM, permitiendo la transducción inmediata y eficiente de las señales de Ca^{2+} en eventos de fosforilación (Hamel et al. 2014). Estas proteínas monoméricas presentan 5 dominios: albergan un dominio N-terminal variable (NTV) seguido de un dominio quinasa de serina/treonina (Ser/Treo) altamente conservado (KD), un dominio autoinhibitorio (AD) que está vinculado al dominio regulatorio similar a CaM (CLD) y un dominio C-terminal de longitud variable (CTV) (Figura 9 A) (Yip Delormel y Boudsocq, 2019; Harmon,

2003). El dominio NTV difiere en longitud y secuencia de aminoácidos incluso dentro de la misma especie (Ito et al. 2010) y participa en la especificidad del reconocimiento de sustrato. Además, contiene sitios de N-miristoilación y S-palmitoilación, lo que determina su asociación a las membranas lipídicas (Schulz et al. 2013; Hamel et al. 2014).

En condiciones de reposo (basales), las CDPKs se autoinhiben mediante la interacción intramolecular entre el AD y el sitio activo de KD. La estructura se estabiliza aún más mediante interacciones entre el AD y el lóbulo C del CLD, mientras que el lóbulo N del CLD interactúa con el lóbulo N del KD. Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta, tanto el lóbulo N como el lóbulo C del CLD interactúan con el AD, induciendo un gran cambio conformacional que libera el sitio activo. El lóbulo C del CLD ahora interactúa con el NTV y el lóbulo N del KD, mientras que el lóbulo N del CLD está cerca del lóbulo C del KD (**Figura 9 B**) (Yip Delormel y Boudsocq, 2019).

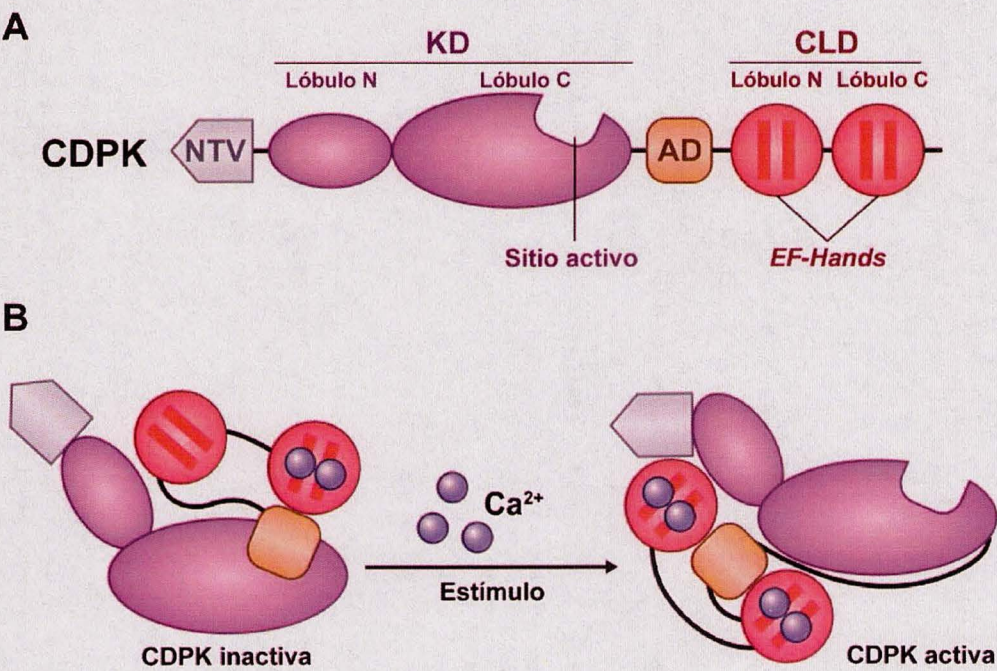


Figura 9. Estructura de la CDPKs (A) y mecanismo de activación (B). Adaptado de Yip-Delormel y Boudsocq, 2019.

Las CDPKs componen familias multigénicas y sus diferentes miembros pueden desempeñar funciones específicas o compartir una misma vía de señalización.

En particular, la familia CDPK de papa se compone de 27 miembros agrupados en cuatro subgrupos. La mayoría de ellos presentan cuatro motivos *EF-hand* en el

CLD, excepto las isoformas *StCDPK22/23/24/27* del subgrupo III que presentan tres motivos funcionales *EF-hand* (Fantino et al. 2017; Sciorra et al. 2021).

La evidencia acumulada indica que las CDPKs regulan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, las respuestas hormonales, adaptación a estreses bióticos y abióticos e inmunidad vegetal (Kobayashi et al. 2012).

CDPKs e implicancia en estrés abiótico y biótico

Las CDPKs participan en la transducción de señales de Ca^{2+} inducidas por estímulos de estrés abiótico y son identificadas a menudo como reguladores positivos de las respuestas al estrés. Una de las respuestas clave de las plantas al estrés abiótico es el cierre de estomas mediado en particular por ABA, inducible por sequía, para limitar la pérdida de agua; las CDPKs están implicadas en la señalización mediada por ABA. En *Arabidopsis* se han detectado veinte *AtCPKs* en las células oclusivas del estoma con niveles de expresión bastante variables (Figura 10).

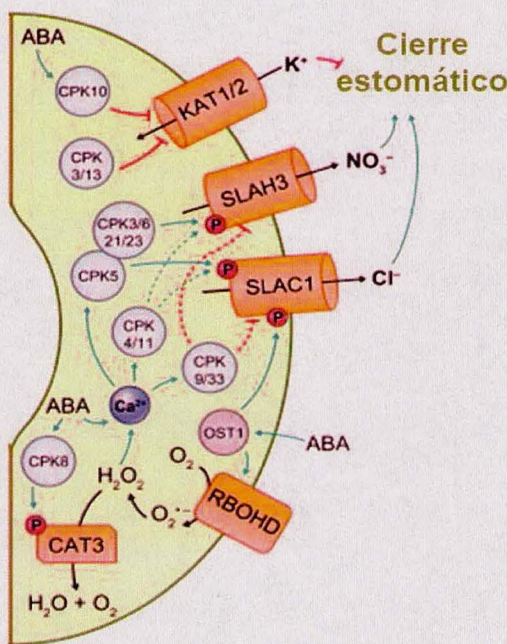


Figura 10. Las CPKs regulan el cierre estomático a través de regulaciones positivas o negativas de corrientes de iones y homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ROS).
Adaptado de Yip Delormel y Boudsocq, 2019.

En particular, las isoformas *AtCPK4* y *AtCPK11* fosforilan a los factores de transcripción (FTs) *ABF1* y *ABF4*, e inducen la expresión génica varias horas después de la inducción de ABA. Este cambio en la expresión génica se correlaciona con la

hipersensibilidad a ABA y al aumento de la tolerancia a la sequía y la sal en plantas que sobreexpresan AtCPK4 o AtCPK11 (Zhu et al. 2007). Los mutantes de *cpk10* exhiben alteraciones de la apertura estomática en respuesta a ABA y Ca^{2+} por lo que CPK10 puede desempeñar un papel importante en la regulación de los movimientos estomáticos mediada por ABA y Ca^{2+} (Zou et al. 2010). Se demostró que CPK3 y CPK6 están implicadas en la regulación del cierre estomático regulada por ABA en experimentos que utilizan mutantes con pérdida de función de Arabidopsis, lo que sugiere un papel adicional en la inmunidad estomática para impedir la entrada de patógenos (Mori et al. 2006). Además, las plantas que sobreexpresan CPK6 tienen una mayor tolerancia al estrés por sal y sequía (Xu et al. 2010).

Se ha demostrado que la sobreexpresión de distintas CDPKs contribuye a la tolerancia al estrés abiótico. En arroz, la sobreexpresión de OsCDPK7 mejora la tolerancia al estrés por frío, sal y sequía (Saijo et al. 2000) y es probable que OsCPK21 participe en la regulación positiva de las vías de señalización de ABA y sal ya que su sobreexpresión aumenta la tolerancia al estrés salino y la sensibilidad a ABA (Asano et al. 2011).

El estrés abiótico induce la acumulación de ROS. Las ROS son moléculas tóxicas que causan daño oxidativo, aunque algunas ROS funcionan como moléculas de transducción de señales en muchos procesos biológicos. Varios estudios han demostrado que las enzimas detoxificadoras de ROS, como la ascorbato peroxidasa (APX), la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa, están involucradas en la tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Berridge et al. 2000). En Arabidopsis, AtCPK8 modula la homeostasis de ROS al fosforilar *in vivo* la catalasa CAT3 (Zou et al. 2015) (**Figura 10**) y OsCPK12 regula positivamente la desintoxicación de ROS ya que su sobreexpresión confiere mayor tolerancia al estrés salino y disminuye la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plantas de arroz en condiciones de alta salinidad. Los genes que codifican para ascorbato peroxidasa (OsAPX2 y OsAPX8) se expresaron más en plantas que sobreexpresan OsCPK12 que en plantas de tipo WT (Asano et al. 2012).

Además, las CDPKs pueden interactuar con FTs implicados en la regulación génica inducida por estrés tales como miembros de las familias *WRKY* (Wen et al. 2020), *bHLH* (*basic hélix-loop-helix*) (Wang et al. 2017), *bZIP* (*basic leucine zipper*) (Lynch et al. 2012; Choi et al. 2005), *NAC* (Vivek et al. 2017) y *ERF* (Weckwerth et al. 2015) los cuales juegan un papel clave en la respuesta al estrés abiótico (Khan et al. 2018; Baillo et al. 2019). Se demostró que AtCPK4/5/11 fosforila los *WRKY* *in vitro*,

aumentando su capacidad de unión al ADN. La fosforilación de WRKY28 inducida por un factor avirulento se suprimió en *cpk5,6*, lo que sugiere que las CPK regulan los WRKY *in vivo* para controlar la expresión génica durante la inmunidad activada por efectores (ETI, *effector-triggered immunity*) (Gao y He, 2013).

Con respecto al rol de las CDPKs en la respuesta a los estímulos bióticos, se informó anteriormente que las CDPKs de diferentes especies de plantas se regulan positivamente en la transcripción en respuesta a los elicitores microbianos (Romeis y Herde, 2014). Datos de RNAseq disponibles en el SPUD DB indican que las isoformas StCDPK4/5/6/7/17/18 se inducen frente a estrés biótico. En particular, StCDPK7 se regula positivamente frente a la infección con *P. infestans* fosforilando específicamente a la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Fantino et al. 2017). En papa, la sobreexpresión de StCDPK5 confirió resistencia a *P. infestans* pero aumentó la susceptibilidad al patógeno necrotrófico *Alternaria solani* (Kobayashi et al. 2012). Los ortólogos de StCDPK7 en Arabidopsis (*AtCPK1*) y tabaco (*NtCDPK2*) son actores importantes en las respuestas de defensa desencadenadas por los elicitores de hongos; la sobreexpresión de AtCPK1 en Arabidopsis aumentó la resistencia frente a patógenos (Coca y San Segundo, 2010) y un enfoque VIGS en *N. benthamiana* mostró que NtCDPK2 desempeñó un papel esencial en la defensa vegetal (Romeis et al. 2001).

Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de las CDPKs

Tres miembros de la familia de CDPKs de papa, pertenecientes al subgrupo II-a, StCDPK1, StCDPK2 y StCDPK3 fueron caracterizados en profundidad por nuestro laboratorio (Santin et al. 2017; Grandellis et al. 2016; Giammaria et al. 2011; Raíces et al. 2003). Estas isoformas son estrictamente dependientes de Ca^{2+} pero difieren en sus parámetros cinéticos; en particular, StCDPK2 es la isoforma que presentó la mayor velocidad máxima y requirió la menor concentración de Ca^{2+} para su activación completa (Grandellis et al. 2016; Giammaria et al. 2011).

Se desarrollaron plantas de papa transgénicas con los promotores de las tres isoformas de CDPKs dirigiendo la expresión del gen reportero GUS (*Pro_{StCDPK1}:GUS*, *Pro_{StCDPK2}:GUS* y *Pro_{StCDPK3}:GUS*) (Figura 11). Todas las plantas mostraron actividad GUS en los pecíolos y las nervaduras de las hojas, pero ésta fue mucho mayor en la lámina de la hoja de las plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS*. Además, en *Pro_{StCDPK2}:GUS* se detectó una fuerte tinción en las puntas de las raíces y en los primordios de las raíces

laterales (Grossi et al. 2021). En ensayos de RT-qPCR en tejidos, *StCDPK2* mostró una expresión ubicua que fue mayor en hojas (Giammaria et al. 2011).

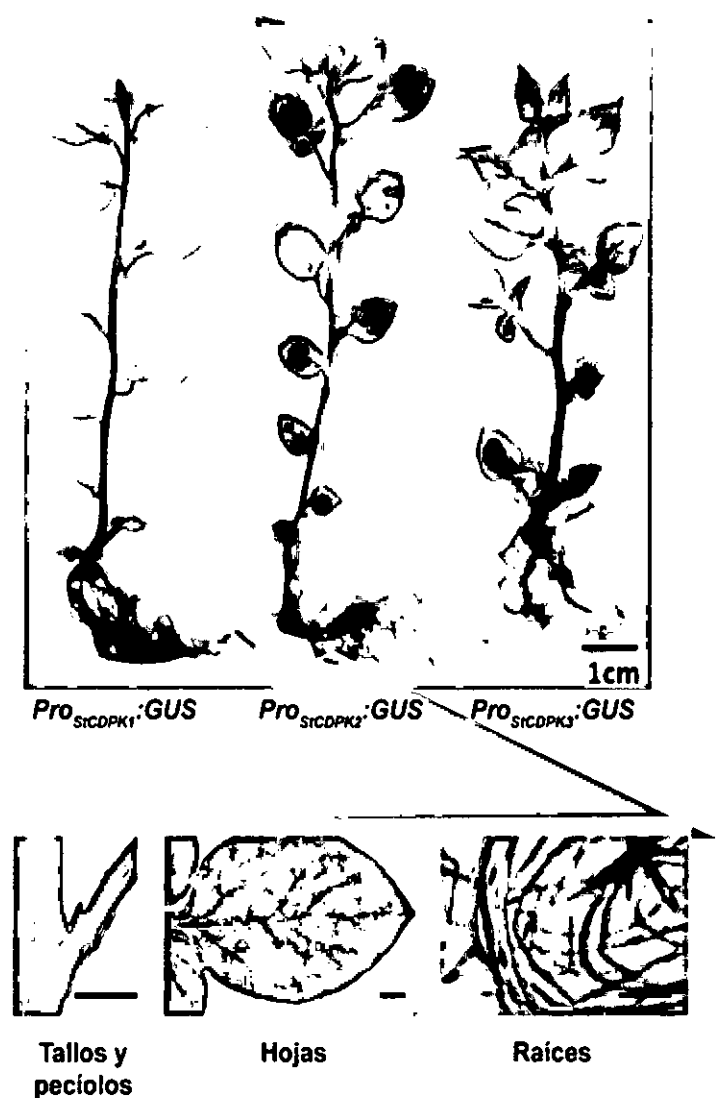


Figura 11. Actividad GUS en plantas *S. tuberosum* cv. Désirée *Pro_{StCDPK1}::GUS*, *Pro_{StCDPK2}::GUS* y *Pro_{StCDPK3}::GUS* (panel superior) y detalle de tallos y peciolo, hojas y raíces de *Pro_{StCDPK2}::GUS* (panel inferior, barra: 2 mm).

Se identificaron los elementos *cis*-regulatorios y los sitios de unión de factores de transcripción en las regiones promotoras de *StCDPK1/2/3* (Grossi et al. 2021). Los tres promotores presentaron sitios de unión para el FT *MYb/SANT* involucrado en la respuesta a estrés abiótico (Li et al. 2019). Detectamos elementos sensibles a estrés en los tres promotores, sin embargo, fueron predichos más sitios relacionados a estrés en *Pro_{StCDPK2}* (**Figura 12**) tales como elementos relacionados con la expresión inducible por ácido jasmónico y ácido salicílico (*JASE1* y un *TCA-1*), un elemento B

sensible a ABA (ABRE B) y tres cajas MADS;MIKC, entre otros. La familia de FT MADS-box;MIKC modula la plasticidad del desarrollo de la planta en respuesta a las variables ambientales (Castelán-Muñoz et al. 2019).

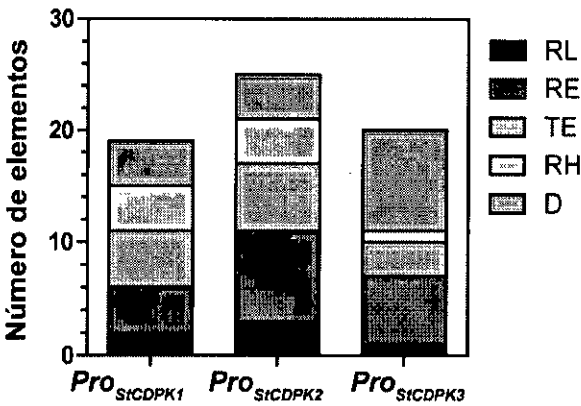


Figura 12. Análisis in silico de los elementos *cis*-regulatorios encontrados en *Pro_{StCDPK1}*, *Pro_{StCDPK2}* y *Pro_{StCDPK3}*. El histograma presenta la clasificación funcional de los elementos *cis*-regulatorios presentes en los tres promotores. Los sitios de unión de FT se agruparon en cinco categorías funcionales: RL: Respuesta a Luz, RE: Respuesta a Estrés, TE: Tejido-específico, RF: Respuesta a Fitohormonas, D: Desarrollo.

Estos elementos, junto con el sitio MYB/SANT, sugirieron que *StCDPK2* podría desempeñar un papel en la respuesta al estrés abiótico. Además, ensayos *in vitro* demostraron que *StCDPK2* interactúa y fosforila a *StABF1* (Muñiz García et al. 2012) un factor de unión a elementos sensible a ABA que ha sido implicado en la señalización de estrés en condiciones de sal y sequía (Jakoby et al. 2002).

Recientemente, hemos analizado datos de RNAseq disponibles en SPUD DB (<http://spuddb.uga.edu>) de cultivares de papa con genotipos susceptibles o resistentes a *P. infestans* (Mosquera et al. 2016). Estos datos indicaron que, de las 27 isoformas de la familia de papa, *StCDPK2* es la que más fuertemente se induce en cultivares con genotipo resistente a dicho patógeno a los 2 días post-infección (dpi). También se indujo en los cultivares susceptibles a *P. infestans* y en muestras de planta entera expuestas a manitol. Contrariamente, no se observó inducción de esta isoforma en los datos de RNAseq en otras condiciones de estrés abiótico tales como estrés salino, calor o ABA (**Figura 13**).

Por lo expuesto anteriormente consideramos que *StCDPK2* podría estar involucrada en la cascada de señalización frente a los estreses abióticos y bióticos y que su sobreexpresión podría ser una estrategia biotecnológica interesante.

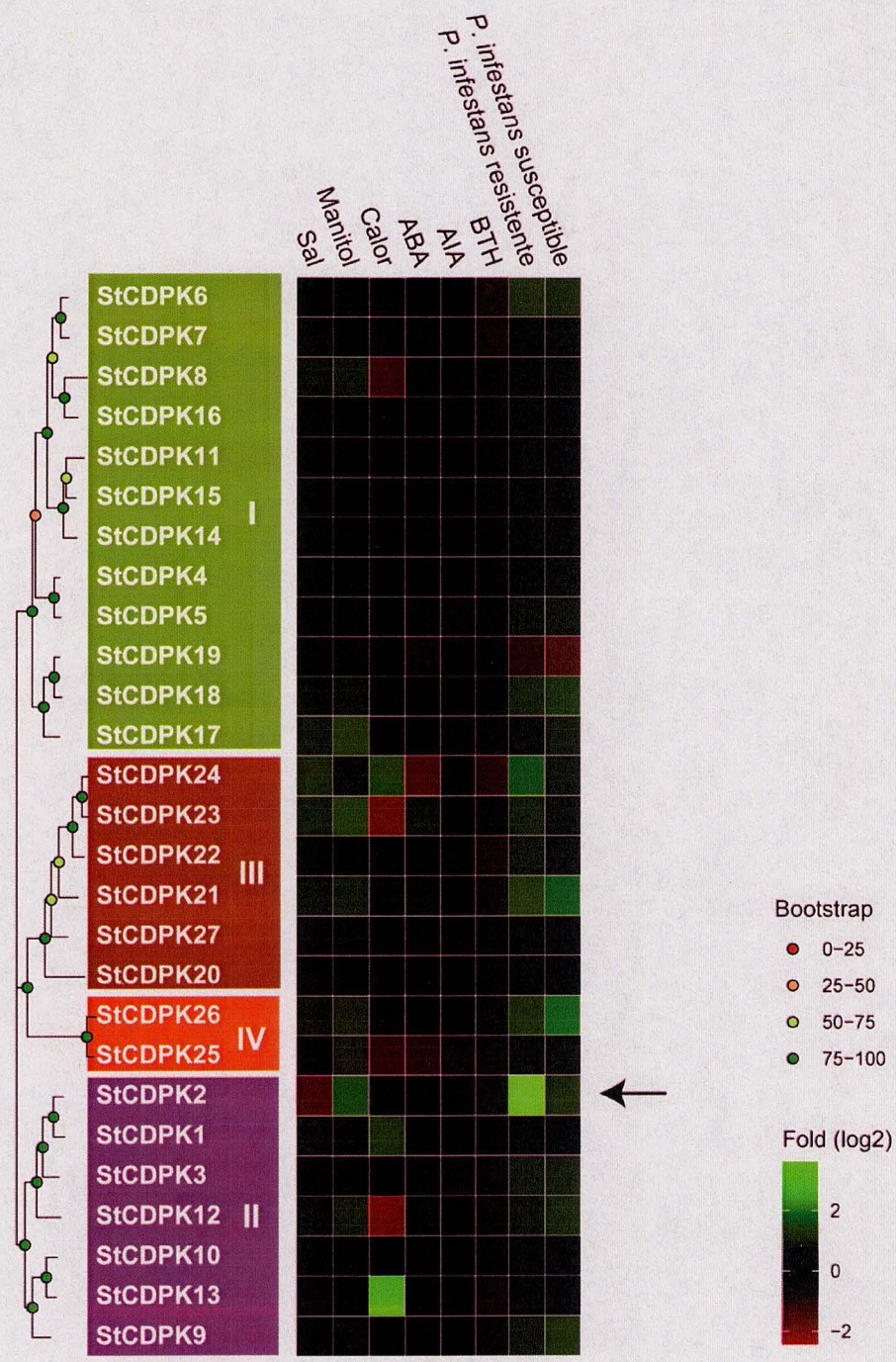


Figura 13. Inducción de las 27 isoformas de CDPKs frente a estreses de tipo biótico y abiótico. Las CDPKs se agrupan en los subgrupos I a IV de acuerdo a la homología de su secuencia. *StCDPK2*, perteneciente al grupo II, se encuentra señalada con una flecha.

CAPÍTULO I, PARTE I: “Estudio de la expresión de *StCDPK2* en condiciones de estrés”

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de papa *S. tuberosum* L var Spunta (libres de virus; Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata) y *S. tuberosum* L var. Desirée *wild-type* (WT). Además, se utilizaron plantas de *S. tuberosum* L var. Desirée transgénicas (*Pro_{StCDPK2}:GUS*) que fueron generadas previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Franco Santín, las cuales expresan el gen reportero *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa (*GUS*) río abajo de la secuencia promotora de *StCDPK2*. La construcción con la cual fueron transformadas dichas plantas se puede observar en la Figura 14 (Grossi et al. 2021).

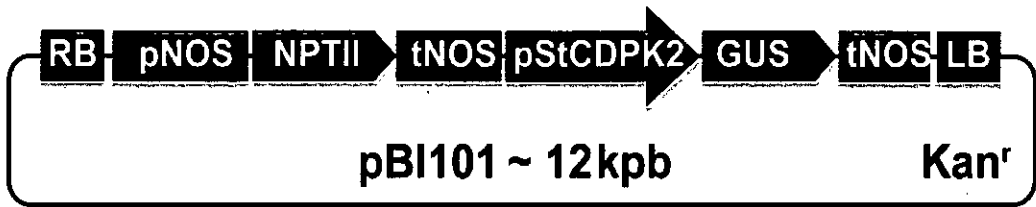


Figura 14. Producción de las líneas transgénicas *Pro_{StCDPK2}:GUS*. Mapa del plásmido pBI101 que contiene la construcción *Pro_{StCDPK2}:GUS* utilizada para la transformación mediada por *Agrobacterium* de las líneas de papa. La región promotora de *StCDPK2* (2.644 pb) dirige la expresión del gen de la enzima β -glucuronidasa.

Estrés abiótico

Cultivo y tratamientos *in vitro*

Las plantas de *S. tuberosum* var. Desirée *Pro_{StCDPK2}:GUS* y WT se micropropagaron *in vitro* en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962), para ello se utilizaron las porciones del tallo que contuvieran yemas meristemáticas. Las plantas se colocaron en tubos de vidrio con tapones de gasa y algodón previamente autoclavados y se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de día largo (DL, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) durante tres semanas. Transcurrido ese período, se transfirieron a medio MS líquido durante 24 h para su aclimatación y luego se trataron con una solución de 150 mM NaCl (estrés

salino) o de 150 mM manitol (estrés osmótico) durante 2, 4 y 6 h. Como control se utilizaron plantas transferidas a MS líquido sin el agregado de NaCl o manitol.

Cultivo y tratamientos en invernadero

Minitubérculos libres de patógenos de la var. Spunta se sembraron en macetas de 1 litro utilizando el sustrato comercial MultiPro™ (GrowMix®, Terrafertil S.A., Bs. As., Argentina). Se dejaron crecer en el invernadero en condiciones de fotoperiodo DL con una temperatura de entre 20 y 25°C. Se regaron con agua corriente (controles) o con una solución de NaCl cada 3 días. Dado que las diferentes concentraciones de NaCl y los tiempos de exposición a la sal tienen diferentes efectos en las plantas, se realizaron tres tratamientos diferentes: T1: 50 mM NaCl durante 4 semanas; T2: 150 mM NaCl durante 4 semanas; T3: agua corriente durante la primera 3 semanas y 150 mM NaCl la última semana. La conductividad eléctrica (CE) del suelo se cuantificó con un medidor HI98331 Soil Test™ (Hanna Instruments, RI, EE. UU.). Después del último riego se evaluaron los parámetros fotosintéticos y biométricos (longitud y biomasa de la raíz y del tallo) de las plantas control y de aquellas tratadas con sal (T1, T2, T3). Los parámetros fotosintéticos se cuantificaron con un LICOR 6800 IRGA (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska) en una hoja completamente expandida de cada planta (seis plantas por tratamiento). El intercambio de gases se midió bajo 1500 mmol m⁻² s⁻¹ PPFD; la luz saturada fue proporcionada por la cámara de hojas 6800-01A (área de 6 cm²) usando una mezcla de 80% luz roja y 20% azul y se configuró el flujo de medición a 500 µmol s⁻¹, con concentración de CO₂ fijada en la celda de referencia a 400 ppm. La temperatura del aire y la humedad relativa se establecieron a 25°C y 40%, respectivamente. Además, las plantas de invernadero de 3 semanas de edad se regaron con agua (controles) o con 150 mM NaCl cada semana durante 2 meses (T4) y se determinó el peso fresco (PF) de los tubérculos (Figura 15).

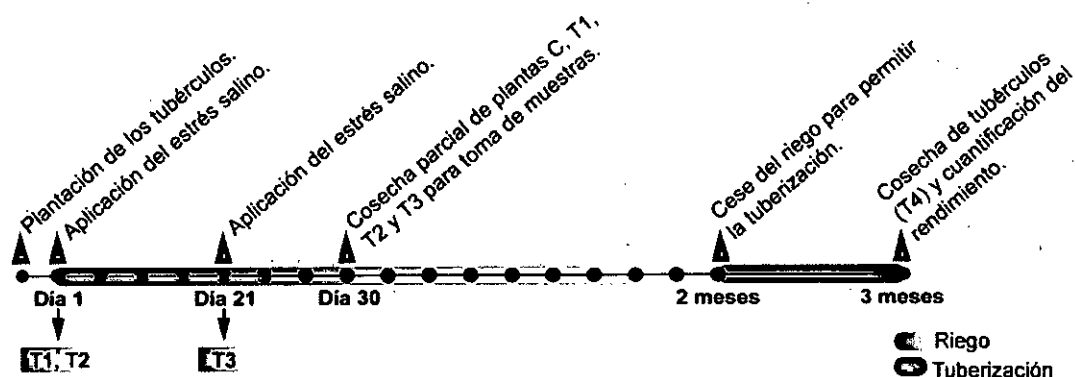


Figura 15. Cronología del ensayo realizado en plantas de invernadero. Los tubérculos fueron plantados en macetas y regados cada 3 días con agua corriente (control, C), o con soluciones de 50 y 150 mM NaCl (T1 y T2, respectivamente). En el día 21, un grupo de plantas control comenzaron a ser tratadas con la solución de 150 mM NaCl (T3). En el día 30 se procedió a la cosecha de las plantas (C, T1, T2, T3) con el fin de obtener muestras para analizar la expresión de genes y de cuantificar parámetros biométricos. Algunas plantas control (C) y T3 continuaron su ciclo de crecimiento hasta tuberizar.

Infección con *P. infestans* *in vitro*

Plantas var. Desirée *Pro_{SlCDPK2}:GUS* fueron crecidas *in vitro* durante 21 días en frascos con cinco plantas cada uno. Se infectaron las tres hojas más grandes de cada plántula con una gota de 10 µl de una suspensión de zoosporas de $2,5 \times 10^4$ zoosp/ml en el envés de cada hoja de acuerdo a Huang et al. (2005). La preparación del inóculo se llevó a cabo en esterilidad. A los 3 dpi se llevó a cabo el análisis histoquímico de las hojas infectadas.

Análisis histoquímico y fluorométrico de la actividad GUS (actividad β -glucuronidasa)

Para evaluar la actividad β -glucuronidasa del gen reportero *uidA* se utilizaron muestras de tejido radicular de las líneas transgénicas de papa *Pro_{SlCDPK2}:GUS* crecidas *in vitro*. Estas muestras fueron incubadas durante 16 h en oscuridad a 37°C en buffer GUS. El mismo consistió en: NaHPO₄ 0,1 M pH 7,0, X-GLUC 1 mM (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-GlcUA), EDTA 10 mM, Ferricianuro de potasio 0,5 mM, Ferrocianuro de potasio 0,5 mM y Triton X-100 0,1%. Las raíces fueron decoloradas en lavados sucesivos con etanol 70% y, tras ser montadas en un portaobjetos, se observaron y fotografiaron con un microscopio Olympus.

Para el análisis fluorométrico se homogeneizaron los tips de las raíces (NaCl) o la raíz entera (manitol) de plantas *Pro_{SlCDPK2}:GUS* utilizando 500 µl de buffer de extracción conteniendo Buffer fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), EDTA 10 mM, N-lauril-sarcosina 0,1%, Triton X-100 0,1% y β -mercaptoetanol 10 mM. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g por 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína mediante Bradford. Los extractos de proteína (10 µg) se incubaron durante el tiempo indicado a 37°C en 500 µl de buffer de extracción conteniendo 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido 2,0 mM (MUG). La reacción se detuvo al transferir alícuotas de 20 µl a 1,98 ml de una solución *stop* (Na₂CO₃ 0,2 M). La fluorescencia relativa se midió utilizando un fluorometro Hoefer

DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, San Francisco, CA) con una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión a 460 nm. La actividad específica de GUS se estimó utilizando una curva de calibración para 4-metilumbeliferona (4-MU).

Extracción del ARN y síntesis del cDNA

El ARN total se extrajo de hojas de plantas de invernadero o de plantas enteras que se cultivaron *in vitro* en condiciones control o bajo estrés utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de ARN utilizando un Nanodrop y se corroboraron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Los ARN totales (1 µg) se pre-trataron con ADNasa (ADNsa libre de ARNasa RQ1, Promega) y se retro-transcribieron con la M-MLV-Transcriptasa reversa (Promega) usando oligo-dT y hexámeros aleatorios.

Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR cuantitativa

Los niveles de expresión de *StCDPK2*, del gen *delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS)* y del gen *prolina deshidrogenasa (PDH)* se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los ensayos se realizaron en un termociclador de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) con los oligonucleótidos correspondientes (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina) (**Anexo, Tabla 1**) utilizando el reactivo FastStart Universal SYBR Green Master Rox (Roche). Se utilizaron como genes de referencia al *factor de elongación 1α (EF-1α)* o *gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GADPH)*. Las reacciones de PCR se incubaron a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 10 s y 60°C durante 1 min. Se verificó la especificidad de la PCR mediante el análisis de las curvas de *melting*. Se analizaron los datos de expresión utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen y Livak, 2008). El nivel de cambio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) se estimó como $[(CT \text{ gen de interés} - CT \text{ control interno})_{\text{tratamiento}} - (CT \text{ gen de interés} - CT \text{ control interno})_{\text{control}}]$.

RESULTADOS

Estudio del rol de *StCDPK2* en la respuesta temprana al estrés salino y al estrés por sequía

Se analizó la actividad del promotor de *StCDPK2* tras exponer a plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS* a NaCl o manitol durante 2, 4 y 6 horas. La actividad del promotor aumentó tanto en las plantas tratadas con sal como en aquellas tratadas con manitol. Se observó una intensa coloración en las puntas de las raíces, especialmente en la región de la cofia, tras 4 horas de tratamiento con 150 mM NaCl (Figura 16 A). Además, el análisis fluorométrico de esta porción de la raíz reveló un aumento de dos veces en la actividad específica de GUS bajo estrés salino con respecto a las plantas en condiciones control (Figura 16 B).

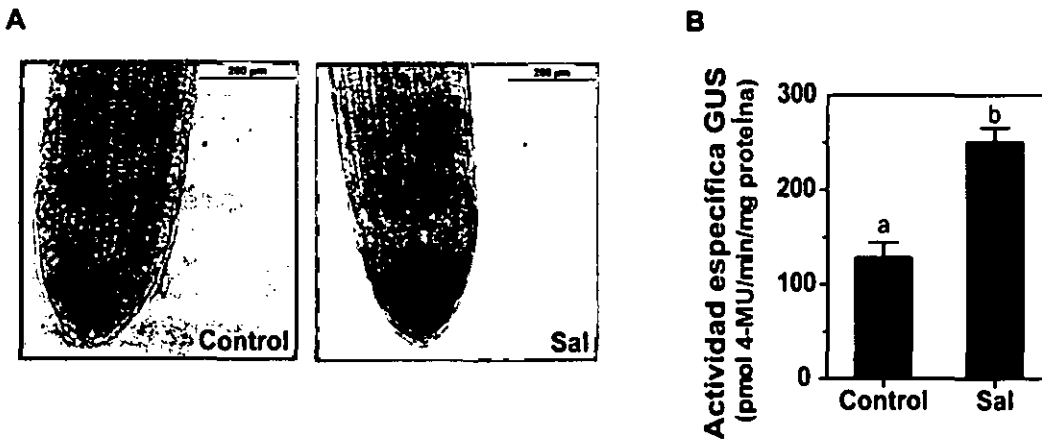
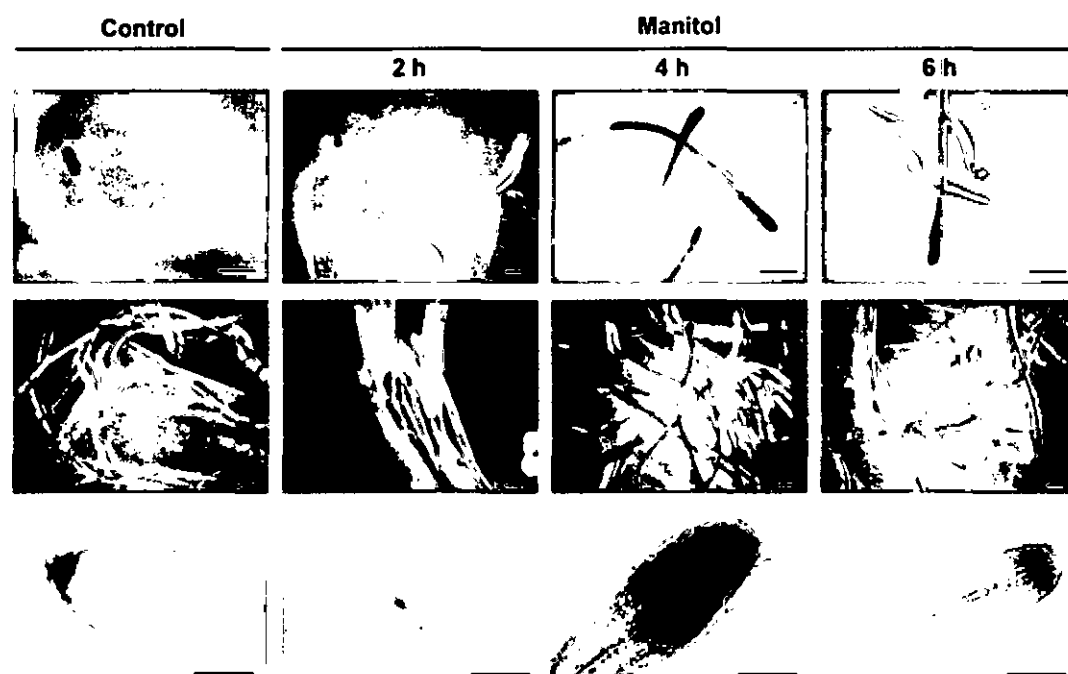


Figura 16. La inducción de *StCDPK2* es un evento temprano en la respuesta al estrés salino. (A) Análisis histoquímico de las raíces de plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS* de 3 semanas de edad que fueron expuestas durante 4 horas a 150 mM NaCl. Barra: 200 µm. (B) Cuantificación de la actividad específica de GUS (pmol 4-MU/min/mg proteína). El análisis estadístico se realizó mediante prueba t. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El análisis histoquímico y fluorométrico de la actividad del promotor de *StCDPK2* frente a la exposición con manitol reveló un incremento en la actividad específica de GUS tras 4 y 6 horas de estrés osmótico, registrándose un pico a las 4 horas. La misma se intensificó en las puntas de las raíces y se prolongó a lo largo del sistema vascular de la raíz (Figura 17).

A



B

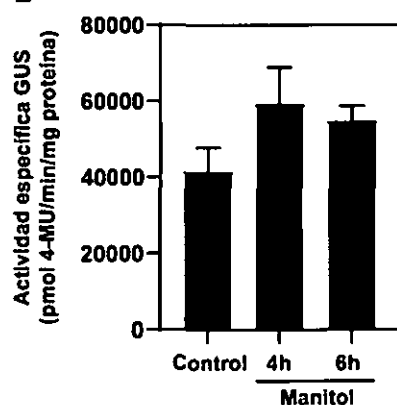


Figura 17. *StCDPK2* tiene un pico de inducción luego de 4 horas de exposición a manitol. (A) Análisis histoquímico de las raíces de plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS* de 3 semanas de edad que fueron expuestas o no a manitol 150 mM durante 2, 4 y 6 horas. Barras: 1 mm (panel superior) y 500 nm (panel inferior). (B) Cuantificación de la actividad específica de GUS (pmol 4-MU/min/mg proteína).

Asimismo, se cuantificó la expresión de *StCDPK2* mediante RT-qPCR en muestras de plantas WT expuestas durante 2, 4 o 6 horas a MS líquido suplementado con 150 mM NaCl. Se observó un rápido incremento en el nivel del transcripto de *StCDPK2*; cuyo máximo (5 veces más en el tratamiento salino en comparación a la condición control) se detectó tras 2 horas de iniciado el tratamiento. La expresión disminuyó a las 4 horas de tratamiento, pero aun así los niveles de transcripto de

StCDPK2 eran altos en comparación a los controles ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$). A las 6 horas, el nivel de expresión de *StCDPK2* regresó a los niveles del control ($2^{-\Delta\Delta Ct} \sim 1$) (**Figura 18**).

La expresión de genes involucrados en la síntesis (*P5CS1*) y degradación de prolina (*PDH*) aumenta o se reprime, respectivamente, en plantas de papa expuestas a estrés salino (Jaarsma et al. 2013); por esto usamos estos genes como marcadores de estrés salino. La expresión de *StP5CS* se incrementó en las plantas expuestas a sal, alcanzando un aumento de 4,5 veces a las 6 h. Por el contrario, la expresión de *StPDH* se vio reprimida ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$) en todos los períodos de exposición a la sal analizados (**Figura 18**). El cambio en los niveles de expresión de *StP5CS* y *StPDH* confirmó que se desencadenó una respuesta frente al estrés salino.

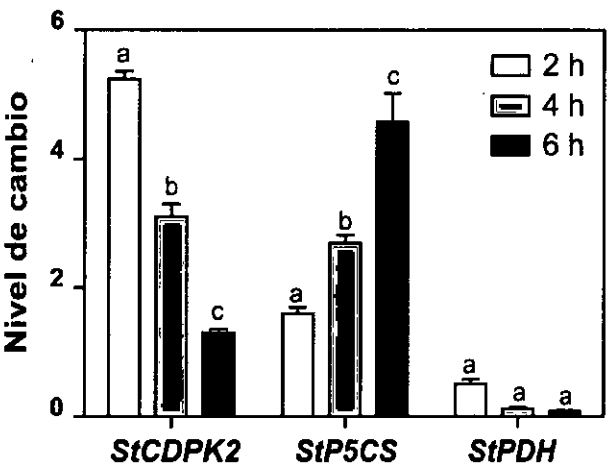


Figura 18. Se analizó la expresión de los genes *StCDPK2*, *StP5CS* y *StPDH* en plantas WT que fueron expuestas durante 2, 4 y 6 horas a 150 mM NaCl. Se utilizó *EF-1 α* como gen de referencia. En el histograma se muestra graficada la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas por tratamiento con tres réplicas técnicas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores con pos-test de Bonferroni. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Por otro lado, la expresión de *StCDPK2* estaba reprimida ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,2$) en aquellas plantas que se cultivaron durante 3 semanas en medio MS suplementado con 50 mM NaCl. A partir de estos resultados se infirió que la inducción de *StCDPK2* es un evento temprano en la respuesta al estrés salino.

Estudio del rol de *StCDPK2* y de los efectos de la sal sobre plantas de papa crecidas en invernadero

Los niveles de expresión de *StCDPK2* también se evaluaron en plantas de papa crecidas en invernadero que se sometieron a diferentes tratamientos de estrés

salino. Los tratamientos realizados fueron los siguientes: T1, riego con una solución de 50 mM NaCl durante 4 semanas; T2: riego con una solución de 150 mM NaCl durante 4 semanas; T3: riego con agua corriente durante las primeras 3 semanas y luego con una solución de 150 mM NaCl durante la última semana. Al día 30 de iniciado el ensayo se cosecharon parte de las plantas con el fin de determinar sus parámetros biométricos y fotosintéticos, también se guardaron muestras de tejidos para realizar determinaciones bioquímicas y para cuantificar la expresión de determinados genes mediante RT-qPCR (ver Figura 15 en Materiales y Métodos).

Como se muestra en la Figura 19, la CE del suelo fue ~ 0,3 dS/m en los controles, y alcanzó ~ 5 dS/m o ~ 10 dS/m tras doce o nueve días de riego con 50 mM o 150 mM de NaCl, permaneciendo constante desde entonces (T1 y T2). Por otro lado, en T3, la CE aún se encontraba en aumento al momento del muestreo. Podemos asumir que las plantas expuestas a los tratamientos T1 y T2, estuvieron expuestas a una condición estacionaria de estrés ya que los valores de CE habían alcanzado una meseta, mientras que en T3, las plantas enfrentaron una condición de estrés dinámica al momento de la cosecha, ya que la CE continuaba incrementándose.

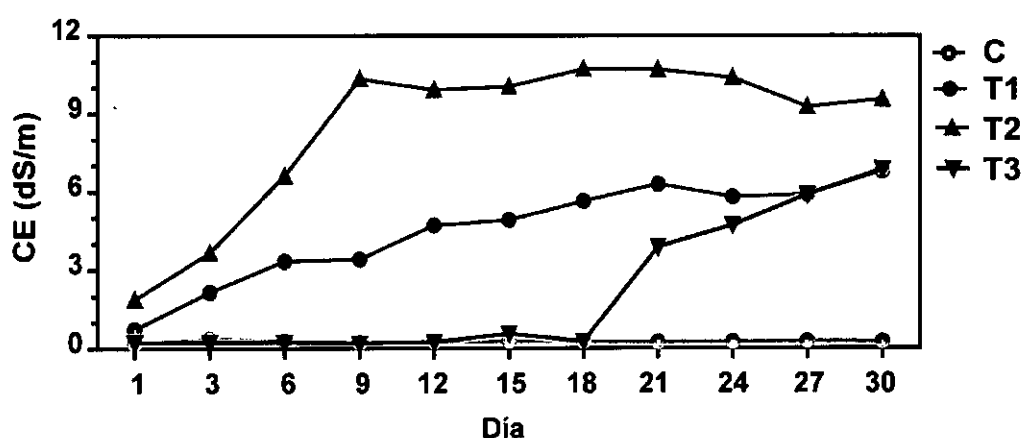


Figura 19. Los datos de CE fueron tomados con un medidor de conductividad de suelo en cada maceta cada 3 días hasta el día 30.

En aquellas plantas que se cultivaron en presencia de estrés salino desde el día 1 (T1 y T2) la expresión de *StCDPK2* disminuyó ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$) en comparación a los controles; sin embargo, aumentó significativamente (13 veces) en plantas que fueron expuestas a 150 mM NaCl durante sólo una semana (T3) (**Figura 20 A**). La relación de expresión de *StP5CS/StPDH* fue 12,6 y 78 en plantas T1 y T2, respectivamente, lo que indica que la acumulación de prolina se indujo como consecuencia del estrés salino aplicado. *StP5CS*, que codifica el paso limitante de la biosíntesis de prolina,

alcanzó un aumento de 170 veces en las plantas T2 en comparación con los controles. Sin embargo, en plantas tratadas con 150 mM NaCl durante solo una semana (T3), la relación de expresión de *StP5CS/StPDH* fue de 1,24. En este caso, la expresión de *StP5CS* se incrementó 50 veces en comparación con las plantas de control, pero también se indujo la expresión de *StPDH* (Figura 20 B).

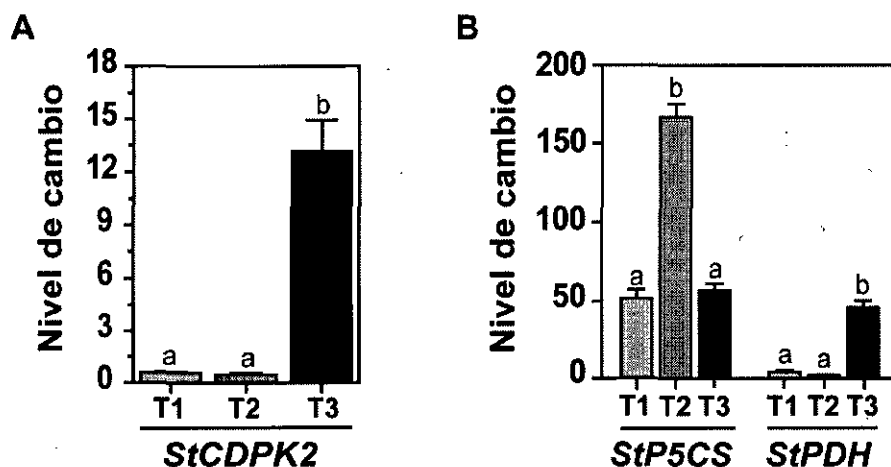


Figura 20. Análisis de la expresión de los genes (A) *StCDPK2*, (B) *StP5CS* y *StPDH* mediante RT-qPCR en plantas de papa crecidas en invernadero en condiciones control, T1, T2 y T3. *EF-1 α* fue utilizado como gen de referencia. Se muestra graficada la media \pm error estándar de tres réplicas biológicas por tratamiento con tres réplicas técnicas ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores con pos-test de Bonferroni. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas en el nivel de expresión de los transcritos entre los tratamientos ($p < 0,001$).

Se evaluaron los parámetros biométricos y fotosintéticos de las plantas C, T1, T2 y T3. Tanto la longitud como la biomasa del tallo y de la raíz mostraron una reducción significativa en aquellas plantas que fueron tratadas con sal desde el día 1, en especial, la biomasa de las plantas T2 que se redujo 10 veces en comparación a las plantas control. La sal impactó en menor medida en las plantas T3 donde la longitud del tallo fue el 66% y la longitud de la raíz fue el 50% de las plantas control, pero no se observaron diferencias significativas en la biomasa de las raíces (Figura 21).

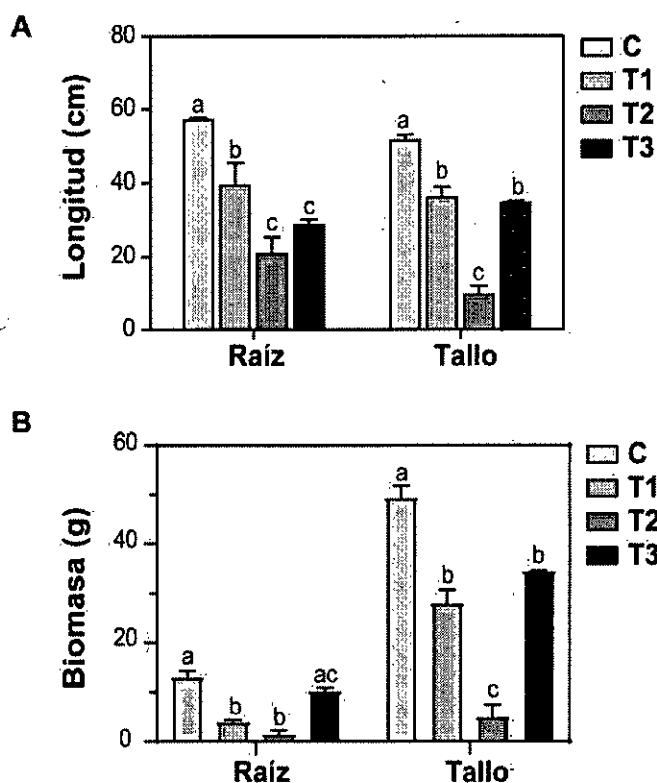


Figura 21. Efecto de la sal sobre el crecimiento y rendimiento de plantas cultivadas en invernadero. Tanto la longitud (cm) como la biomasa (g) de la raíz y del tallo fueron los parámetros cuantificados en las distintas condiciones ensayadas (C, T1, T2 y T3).

Al comparar las plantas control contra las tratadas con sal, la caída observada en los parámetros biométricos fue dosis dependiente (**Figura 21**). Sin embargo, como resultado del cierre estomático, se observó una respuesta “todo o nada” en los parámetros fotosintéticos cuantificados; en todos los tratamientos salinos ensayados se observó una caída similar en comparación al control. Las plantas cierran sus estomas con el fin de mitigar la deshidratación causada por la alta concentración salina, afectando a los parámetros fotosintéticos (Goidack et al. 2014). Se observó una disminución de 30 veces en la tasa de transpiración (E) y en la conductancia estomática (g_s), mientras que la tasa de asimilación neta con irradiancia de saturación (A) y la concentración intercelular de CO_2 (C_i) se redujeron seis veces y de tres a diez veces, respectivamente (**Figura 22 A-D**).

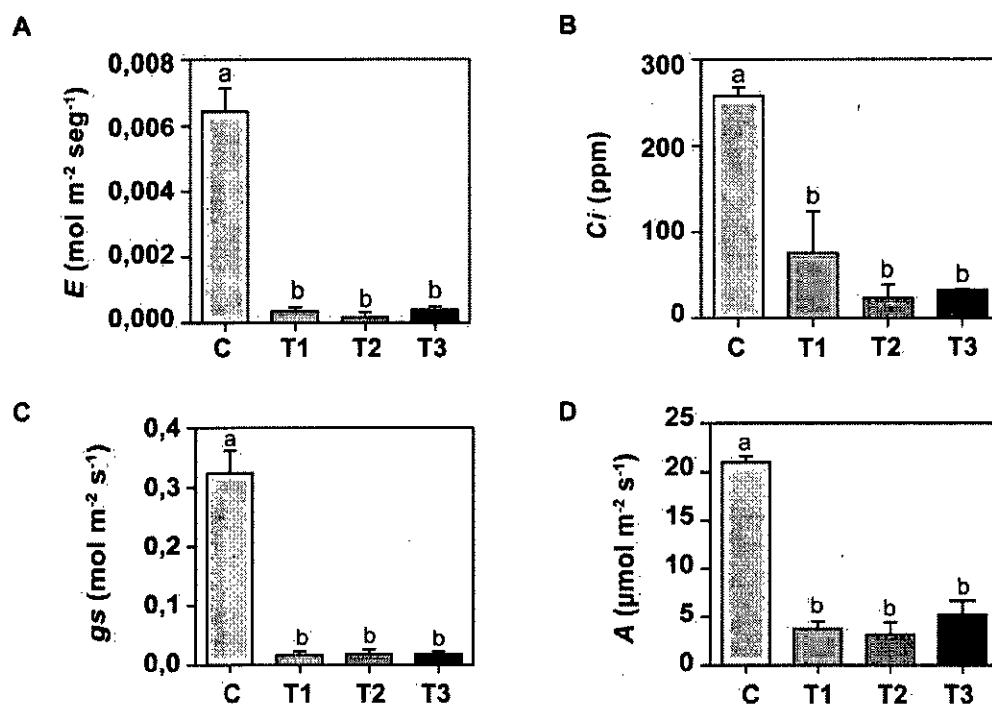


Figura 22. Medición de los parámetros fotosintéticos. (A) La tasa de transpiración (E , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (B) la concentración intercelular de CO_2 (C_i , ppm), (C) la conductancia estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y (D) la tasa de asimilación neta con irradiancia de saturación (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron los parámetros cuantificados al día 30 en hojas completamente expandidas de plantas control (C) y tratadas (T1, T2 y T3). En los histogramas se muestra graficada la media \pm error estándar de cuatro réplicas biológicas por tratamiento. Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores con pos-test de Bonferroni. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (a-c) ($p < 0,001$).

Todos los cultivares de papa muestran una reducción en el rendimiento de tubérculos debido a la salinidad (Elkhatib et al. 2004; Khenifi et al. 2011); de hecho, en este trabajo, observamos una disminución de 4 veces en la biomasa de los tubérculos cuando las plantas fueron regadas con 150 mM NaCl cada semana durante dos meses (T4) (**Figura 23 A**). Se produjo un número similar de tubérculos en ambas condiciones pero éstos fueron significativamente más pequeños en las plantas tratadas con sal. Sólo el 25,6% de los tubérculos de las plantas tratadas con sal pesaron más de 5 g y sólo uno alcanzó un peso fresco (PF) de 16 g, mientras que el 52% de los tubérculos de las plantas de control pesaron más de 5 g y el PF máximo/tubérculo fue 74 g (**Figura 23 B-C**).

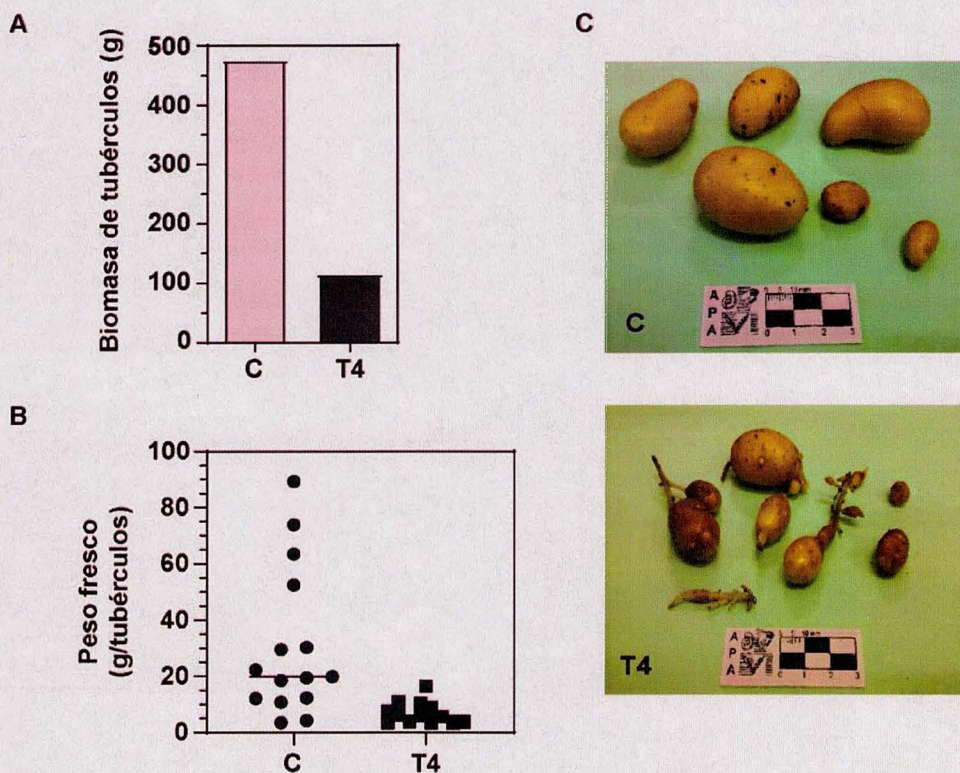


Figura 23. Tubérculos generados bajo condiciones control (C) y salinas (T4). (A) Biomasa total de tubérculos (g). **(B)** Gráfico que representa el PF de los tubérculos. **(C)** Imágenes ilustrativas de los tubérculos obtenidos al finalizar el ensayo.

Estudio del rol de *StCDPK2* frente a la infección con *P. infestans*

Los datos de expresión de plantas susceptibles y resistentes a *P. infestans* en el SPUD DB mostraron una clara inducción de *StCDPK2* en cultivares resistentes a dicho patógeno (ver “Antecedentes de nuestro grupo en el estudio de las CDPKs” en la Introducción del Capítulo I). Es por esto que se decidió analizar la actividad del promotor de *StCDPK2* en hojas de plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS* infectadas con *P. infestans*.

A los 3 dpi se analizó la actividad mediante tinción histoquímica y se observó un leve incremento en la coloración de los nervios principales y secundarios circundantes al sitio donde se evidenció la necrosis (**Figura 24**).

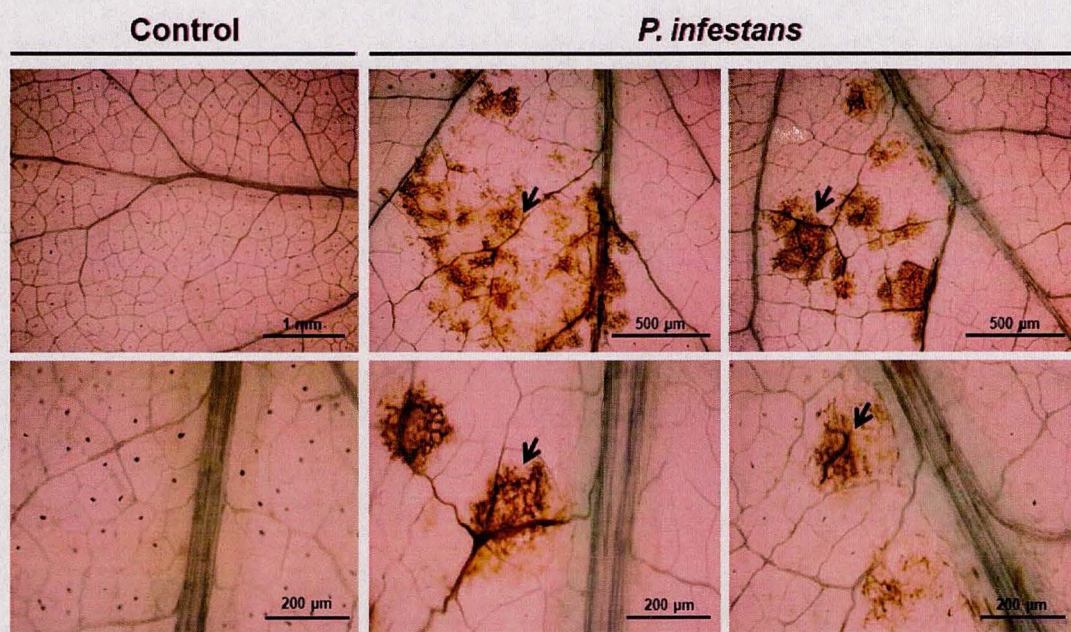


Figura 24. Actividad GUS en las hojas de plantas *Pro_{StCDPK2}:GUS* infectadas con *P. infestans* a los 3 dpi. Las manchas marrones señaladas con una flecha en las imágenes de hojas infectadas con *P. infestans* corresponden a la necrosis producida por el patógeno. El tamaño de las barras está mostrado en cada imagen.

CAPÍTULO I, PARTE II: “Análisis de plantas de papa sobreexpresantes del gen *StCDPK2* frente a estrés abiótico y biótico”

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este capítulo se utilizaron cuatro líneas transgénicas 35S:*StCDPK2* (2A, 2B, 2D y 2E) de *S. tuberosum* L var. Desirée generadas previamente por el Dr. Franco Santín. Estas plantas contienen la isoforma *StCDPK2* etiquetada con 6 histidinas en el C-terminal de la proteína bajo un promotor 35S *CaMV* (Figura 25 A). Las líneas 35S:*StCDPK2* 2A, 2B, 2D y 2E no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las no transformadas (WT) (Figura 25 B).

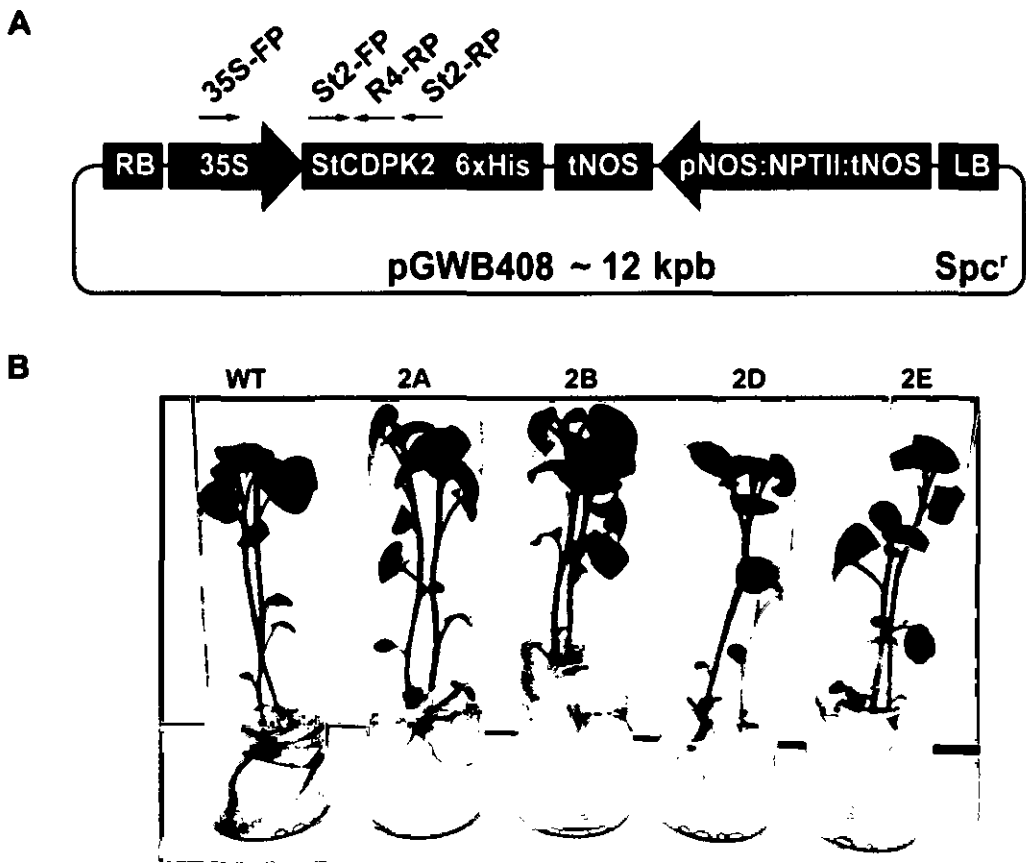


Figura 25. Líneas transgénicas 35S:*StCDPK2* 2A, 2B, 2D y 2E. (A) Construcción utilizada para la producción de las líneas. Mapa de pGWB408 que contiene la construcción 35S:*StCDPK2* utilizada para la transformación mediada por *Agrobacterium* de las líneas de papa. El gen *StCDPK2* se clonó bajo el control del promotor *CaMV* 35S y en marco con una etiqueta 6xHis C-terminal. (B) Plantas cultivadas *in vitro* en MS 2% de 21 días.

Chequeo de la presencia y expresión del transgén en plantas 35S:StCDPK2

El tejido foliar (100-200 mg), proveniente de plantas transgénicas o WT cultivadas *in vitro*, se trituró en un tubo eppendorf con un vástago. El ADN genómico (ADNg) se extrajo de acuerdo al método de Costa y Moura (2001). Brevemente, se adicionó buffer de extracción (650 µL) y se incubó 10 min a 65°C. Luego, se agregaron 650 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. Se agregaron 500 µL de etanol 70% y se centrifugó durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 35 µL de agua con ARNasa. Se cuantificó el ADNg obtenido mediante Nanodrop y se utilizaron 100 ng como molde de reacción de PCR.

Se constató la presencia del transgén en las plantas 35S:StCDPK2 líneas 2A, 2B, 2D y 2E mediante amplificación por PCR utilizando como templado el ADNg obtenido de cada una de las líneas junto con los oligonucleótidos 35S-FP y R4-RP (**Anexo, Tabla 1**) (**Figura 26 A**). Además, se constató la sobreexpresión de StCDPK2 en dichas plantas mediante RT-qPCR (de acuerdo a lo mencionado en el Capítulo 1) utilizando ADNg y los oligonucleótidos St2-FP y ST2-RP (**Anexo, Tabla 1**); el nivel de expresión de dicho transgen fue de 13,2, 14,8, 14,63 y 16,73 veces para las líneas 2A, 2B, 2D y 2E, respectivamente (**Figura 26 B**).

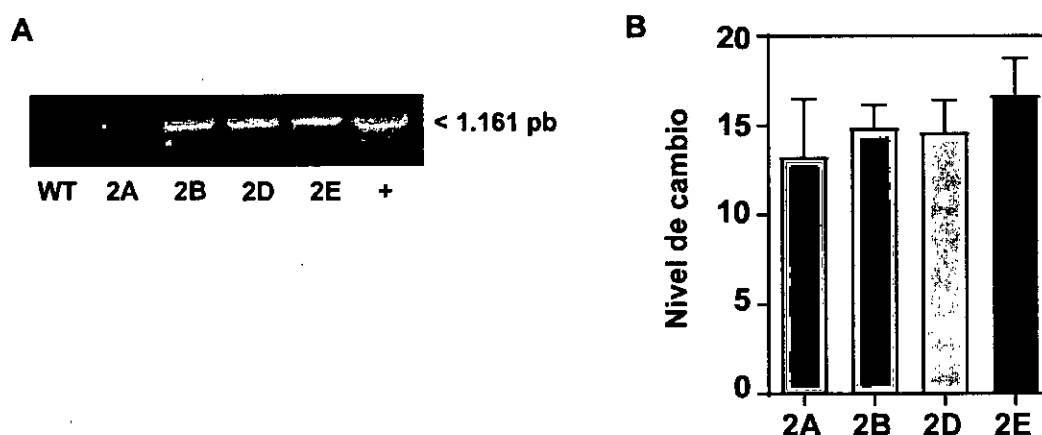


Figura 26. Confirmación de la presencia del transgén y de la sobreexpresión de StCDPK2 en las líneas transgénicas 2A, 2B, 2D y 2E. (A) La exitosa incorporación del transgén se comprobó mediante PCR utilizando como templado ADNg de plantas cultivadas *in vitro* y los oligonucleótidos específicos 35S-FP y R4-RP. Se obtuvo el fragmento esperado (1.161 pb) en las cuatro líneas transgénicas analizadas. Se utilizó el plásmido pGWB408 conteniendo la construcción 35S:StCDPK2 como control positivo y ADNg de plantas WT como control

negativo. **(B)** El análisis mediante RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) reveló aumentos de 13,2, 14,8, 14,63 y 16,73 veces en la expresión de *StCDPK2* en las líneas 2A, 2B, 2D y 2E en comparación con las plantas WT. *GAPDH* fue el gen de referencia utilizado. En el histograma se encuentra graficada la media \pm el error estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una. Los oligonucleótidos utilizados se enumeran en **Anexo, Tabla 1**.

Estrés abiótico

Cultivo y tratamientos *in vitro*

Se cultivaron entrenudos de plantas WT y *35S:StCDPK2* en medio de multiplicación MS solo (control) o con la adición de 50 mM NaCl (salinidad) durante 21 días con el fin de evaluar el efecto del estrés salino sobre dichas plantas. Se eligió esta concentración salina luego de someter a plantas WT a tres concentraciones distintas de NaCl: 50, 100 y 200 mM. Se buscó aquella concentración que evidenciara un estrés significativo a través de la reducción de los parámetros biométricos estudiados, pero donde el crecimiento de las raíces fuese posible (**Figura 27**).

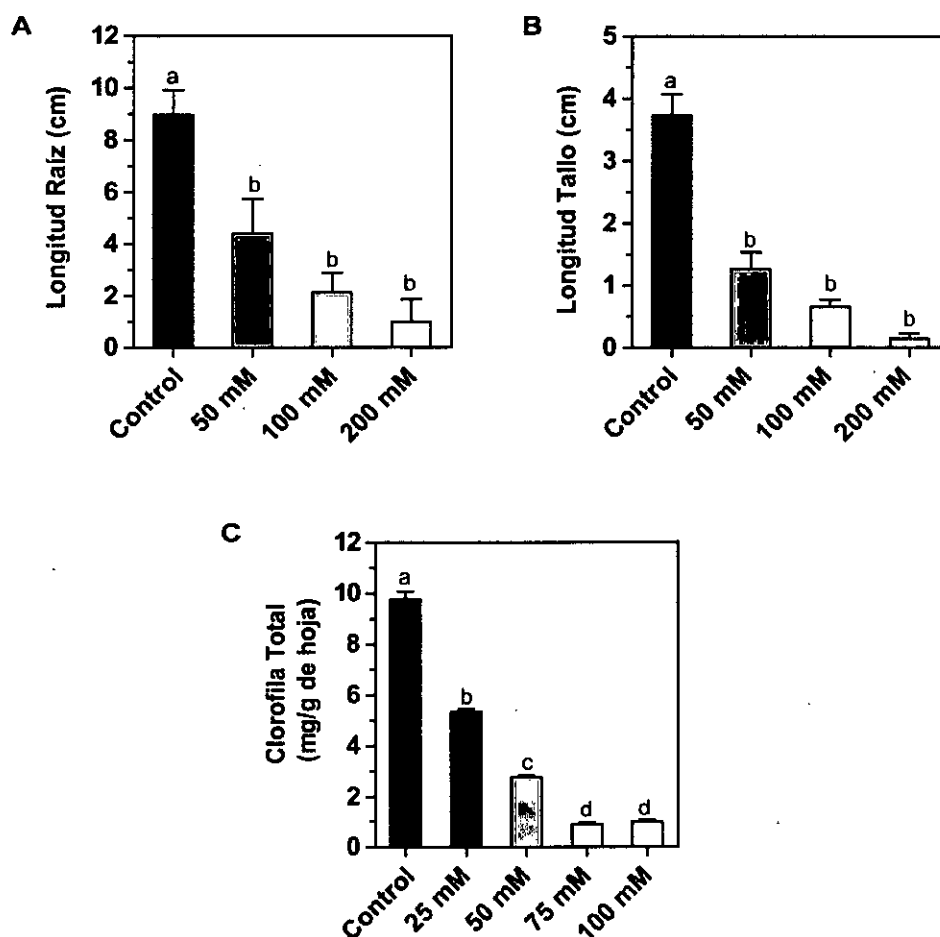


Figura 27. Entrenudos de plantas de papa se cultivaron en concentraciones crecientes de NaCl. Se midió la longitud de la raíz (**A**), la longitud del tallo (**B**) y la clorofila total (mg/g de hoja) (**C**) para encontrar una concentración de sal donde se evidenciara el estrés. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

Al momento de la cosecha se determinó el número de hojas, la longitud de la raíz primaria y del tallo y la biomasa total de cada planta. Se midió el contenido de clorofila en hojas completamente expandidas como unidades SPAD (por sus siglas en inglés, "*Soil Plant Analysis Development*") empleando un espectrofotómetro de clorofila portátil (Cloroflio®, Cavadevices, Argentina). La actividad CAT y el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se determinaron de acuerdo a Aebi 1984 y Junglee et al. 2014, respectivamente.

Cultivo y tratamientos en invernadero

Plantas de la var. Desiree WT y las líneas 35S:StCDPK2 se crecieron *in vitro* durante 30 días y luego se traspasaron a macetas de 500 ml utilizando el sustrato comercial MultiPro™ (GrowMix®, Terrafertil S.A., Bs. As., Argentina). Se dejaron crecer en el invernadero durante 3 semanas en condiciones de fotoperiodo DL con una temperatura de entre 20 y 25°C. De este modo, al momento de iniciar los tratamientos (salinidad o sequía), contábamos con una población de plantas WT y sobreexpresantes muy similares entre sí.

Salinidad

Un grupo de plantas WT o sobreexpresantes se regaron cada 3 días con agua corriente (condición control) o con una solución de 150 mM NaCl (condición salina) hasta alcanzar una CE: ~10 dS/m. Luego, se realizó un riego con 100 mM NaCl, dos con 50 mM NaCl y riego normal con agua. Antes de cada riego se evaluó la longitud del tallo, la cantidad de hojas y el contenido de clorofila de las plantas crecidas en condiciones control o salinas. El contenido de clorofila se cuantificó con el medidor de clorofila portátil en una hoja completamente expandida de cada planta. Al finalizar el ensayo se determinó el PF de los tubérculos (**Figura 28**).

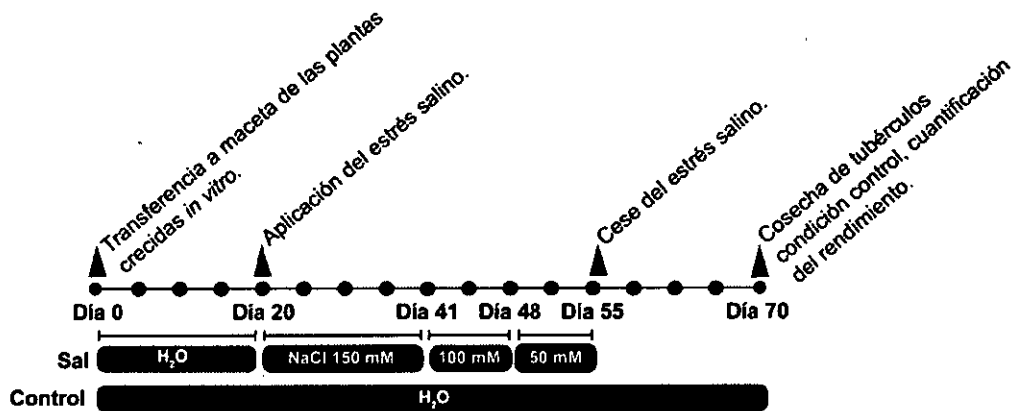


Figura 28. Cronología del ensayo de salinidad realizado en plantas de invernadero. Plantas de papa WT o sobreexpresantes fueron regadas cada 3 días con agua corriente (control, C), o con soluciones salinas (150, 100 y 50 mM NaCl) durante los periodos detallados en la figura. El día 70 se procedió a la cosecha de las plantas con el fin de calcular el rendimiento de los tubérculos.

La CE del suelo fue $\sim 0,5$ dS/m en los controles, y alcanzó ~ 10 dS/m tras doce o quince días de riego con sal. Al disminuir la concentración salina del riego, la CE disminuyó a ~ 9 dS/m (Figura 29).

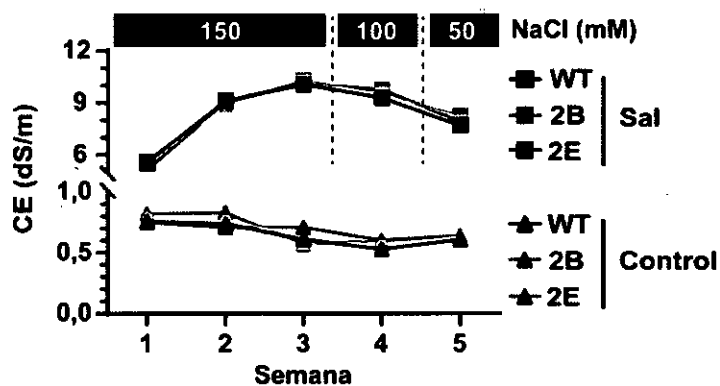


Figura 29. Los datos de CE fueron tomados con un medidor de conductividad de suelo en cada maceta durante 5 semanas tanto en el set de plantas sometidas a salinidad como en las plantas regadas con agua (control). En las plantas sometidas a salinidad, entre la semana 1 a 3, el riego se realizó con 150 mM NaCl, en la semana 4 con 100 mM NaCl y durante la última semana con 50 mM NaCl.

Sequía moderada

A un grupo de plantas (WT y 35S:StCDPK2) se las sometió a un primer ensayo de dos periodos de sequía de 9 días cada uno (sequía moderada). Cada periodo de

sequía fue terminado con un riego, el cual es denominado “*rewatering*”. En la condición control, el grupo de plantas WT o 35S:*StCDPK2* 2A, 2B y 2E se regó con agua corriente cada 3 días. Durante todo el ensayo se cuantificó la longitud del tallo y el contenido de clorofila en la 1°, 3° y 5° hoja de cada planta. Al día 80 se procedió a la cosecha con el fin de calcular su rendimiento en término de tubérculos (**Figura 30**).

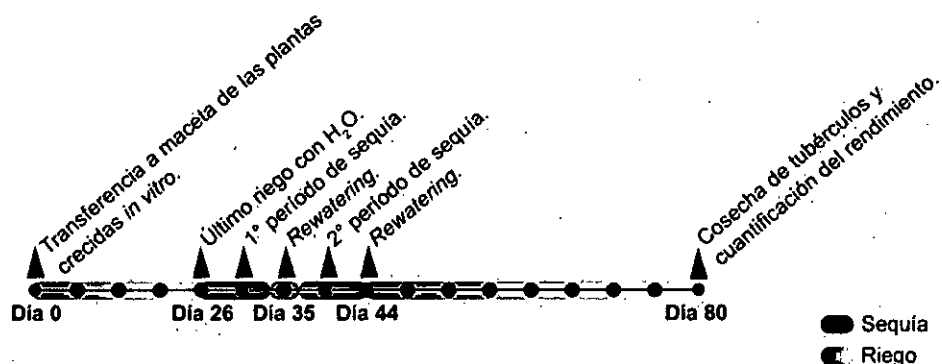


Figura 30. Cronología del primer ensayo de sequía moderada realizado en plantas de invernadero. Plantas WT o 35S:*StCDPK2* 2A, 2B y 2E cultivadas *in vitro* durante 1 mes se transfirieron a macetas (día 0 del ensayo). Luego de 26 días de rusticadas, se suspendió el riego de un grupo de plantas (primer período de sequía de 9 días). Al día 35 se realizó el *rewatering* de dicho lote y se sometieron a un segundo período de sequía (otros 9 días).

Actualmente está en curso un segundo ensayo de sequía moderada en el cual se aplicaron 14 días corridos de sequía a un grupo de plantas WT y 35S:*StCDPK2* 2A, 2B y 2E (**Figura 31**).

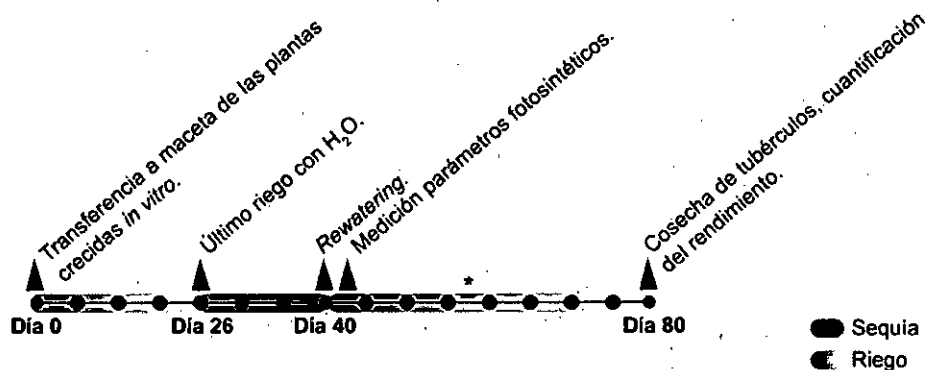


Figura 31. Cronología del segundo ensayo de sequía moderada realizado en plantas de invernadero. Plantas WT o 35S:*StCDPK2* 2A, 2B y 2E cultivadas *in vitro* durante 1 mes se transfirieron a macetas (día 0 del ensayo). Luego de 26 días de rusticadas, se suspendió el riego de un grupo de plantas. Al día 14 se realizó el *rewatering* de dicho lote. (*) Al momento de entrega de esta tesis el ensayo va por el día 55.

Al día 14 se regaron las plantas sometidas a sequía con 100 ml de agua de red (*rewatering*). Luego de 16 h se cuantificaron los parámetros fotosintéticos con un LICOR 6800 IRGA (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska) en tres hojas completamente expandidas (superior, media e inferior) de las plantas cultivadas en condiciones control o expuestas a sequía. El intercambio de gases se midió bajo 1500 mmol m⁻² s⁻¹ PPFD; la luz saturada fue proporcionada por la cámara de hojas 6800-01A (área de 6 cm²) usando una mezcla de 80% luz roja y 20% azul y se configuró el flujo de medición a 500 μmol s⁻¹, con concentración de CO₂ fijada en la celda de referencia a 400 ppm. La temperatura del aire y la humedad relativa se establecieron a 25°C y 40%, respectivamente. Luego de realizadas estas determinaciones se regaron las plantas abundantemente y 24 h más tarde se cosecharon hojas para determinar la actividad de CAT, el contenido de H₂O₂ y la expresión de los genes de biosíntesis y degradación de prolina *P5CS* y *PDH* (en curso). A partir de ese momento, se espaciaron los riegos de todas las plantas para cosechar los tubérculos y evaluar el rendimiento (en curso).

Para evaluar la severidad de la sequía en ambos ensayos se evaluó el aspecto de las plantas antes y después del *rewatering* y se las clasificó en tres grupos de acuerdo a la turgencia de sus hojas: 1) Hojas expandidas y turgentes, 2) Hojas semi-enrolladas y 3) Hojas enrolladas (**Figura 32**).



Figura 32. La respuesta a sequía se evaluó en cada planta a través de una escala de severidad. Se muestran imágenes representativas de cada condición.

Sequía severa

Se realizó un segundo ensayo en el que se aplicaron 25 días corridos de sequía (sequía severa) a un grupo de plantas WT y 35S:*StCDPK2* 2B, 2D y 2E (**Figura 33**). La cosecha de los tubérculos y la cuantificación del rendimiento se realizó

a los días 56 y 84 para las plantas en condiciones de sequía y control, respectivamente.

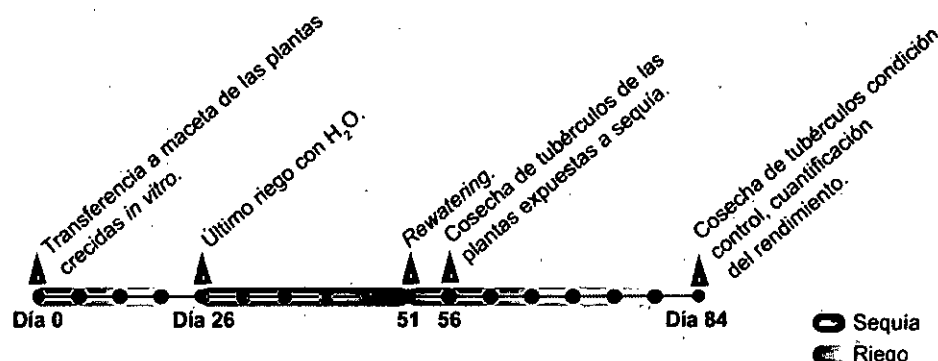


Figura 33. Cronología del ensayo de sequía severa realizado en plantas de invernadero. Un grupo de plantas (WT y 35S:StCDPK2) dejaron de ser regadas durante 25 días. Al día 51 se realizó el *rewatering* de dicho lote. El grupo control fue regado con agua corriente cada tres días.

Infección con *P. infestans*

Los ensayos se realizaron usando plantas de papa var. Desirée WT y 35S:StCDPK2 2B y 2E crecidas *in vitro* durante 21 días o con hojas aisladas de plantas crecidas en invernadero.

In vitro

Las plantas se infectaron de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I, parte I. A los 5 dpi se evaluó la tolerancia de las plantas 35S:StCDPK2 2B y 2E con respecto a las plantas WT. Se usaron tres frascos con cinco plantas cada uno para cada condición (WT control, 2B control, 2E control, WT-*P. infestans*, 2B-*P. infestans*, 2E-*P. infestans*).

Hojas aisladas

Se cortó la 3°, 4° y 5° hoja (contando desde la parte superior) de plantas de papa WT o 35S:StCDPK2 (líneas 2B, 2D y 2E) cultivadas en invernadero durante cuatro semanas y se las colocó en vasos con agua. Se inoculó el envés de la hoja con gotas de 10 µl de una suspensión de zoosporas de $2,5 \times 10^4$ zoosp/ml. Las bandejas se cubrieron luego con tapas transparentes y se transfirieron a una cámara climática donde fueron incubadas con un fotoperiodo de DL a 18°C. A los 4 dpi se tomaron fotos

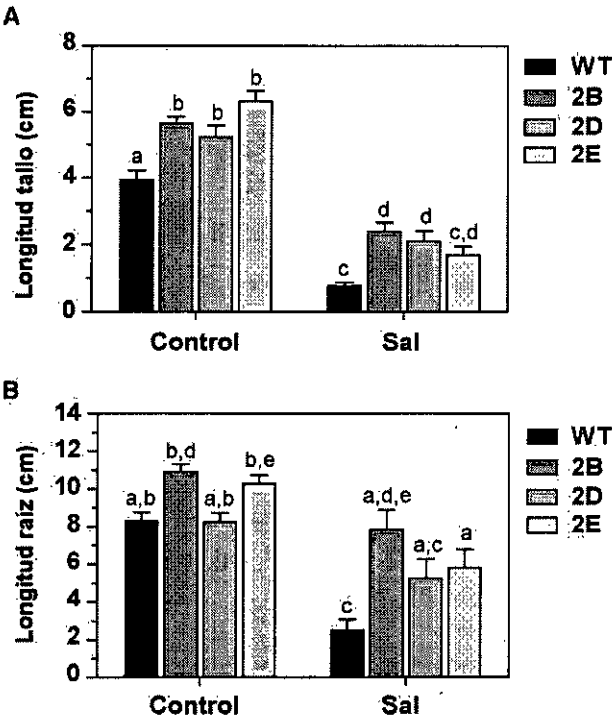
y se cuantificó mediante ImageJ (Schindelin et al. 2012) el porcentaje de área necrótica.

RESULTADOS

Evaluación de la tolerancia frente a salinidad de las plantas 35S:StCDPK2

Las plantas WT y 35S:StCDPK2 líneas 2B, 2D y 2E fueron cultivadas *in vitro* en medio MS con o sin la adición de 50 mM NaCl. Luego de tres semanas de desarrollo, hubo una fuerte inhibición en el crecimiento del tallo y de las raíces, y un menor número de hojas, junto con una disminución significativa en el contenido de clorofila (cuantificado en unidades SPAD) (**Figura 34 A-D**) en las plantas WT bajo estrés salino en comparación a aquellas en condiciones control.

Sin embargo, la inhibición observada en condiciones salinas fue menos severa en las tres líneas transgénicas 35S:StCDPK2 (2B, 2D y 2E) que mostraron un aumento significativo en la longitud del tallo (**Figura 34 A**) y en el contenido de clorofila (**Figura 34 D**) respecto de las plantas WT. Además, la longitud de la raíz de las líneas transgénicas 2B y 2E fue significativamente mayor respecto de las plantas WT (**Figura 34 B**).



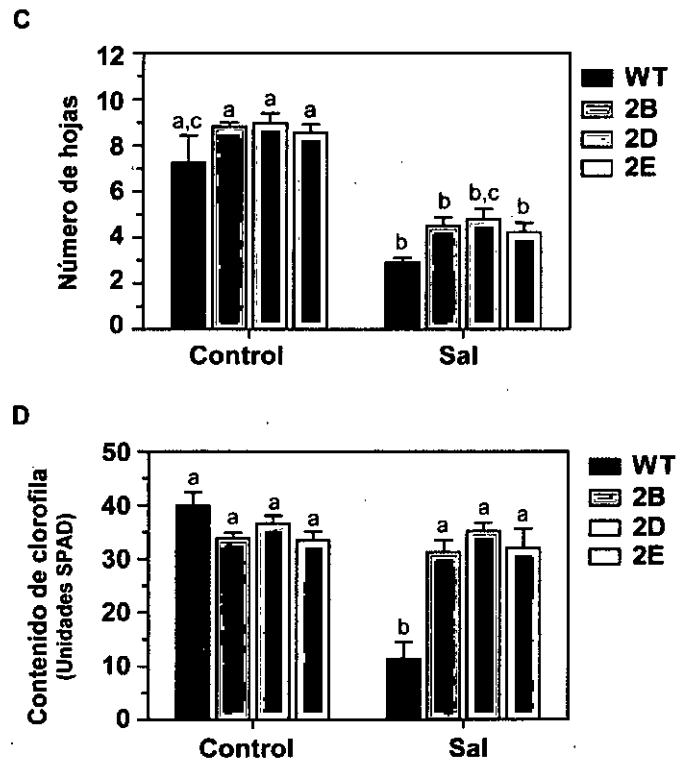


Figura 34. Las líneas transgénicas *35S:StCDPK2* 2B, 2D y 2E fueron más tolerantes al estrés salino que las plantas WT. Los entrenudos de plantas WT y transgénicas fueron cultivados *in vitro* en medio MS sólido con la adición de 50 mM NaCl (salinidad) o no (control). La longitud del tallo (A) y de la raíz (B), el número de hojas (C) y el contenido de clorofila (D) fueron los parámetros cuantificados.

El estrés salino aumenta el contenido de ROS causando daño oxidativo a muchos componentes celulares y degradando la clorofila. Numerosos estudios han demostrado una correlación entre la resistencia a los estreses ambientales y la eficiencia del sistema antioxidante (Hasanuzzaman et al. 2012). Por lo tanto, decidimos evaluar el contenido de H_2O_2 y la actividad CAT en plantas WT y en dos de las líneas *35S:StCDPK2* (2B y 2E). Interesantemente, en condiciones control, dichas líneas mostraron una actividad CAT elevada con respecto a las plantas WT. Al ser expuestas a condiciones salinas, la actividad CAT se mantuvo a los mismos niveles que en condiciones control y esto se tradujo en una acumulación significativamente menor de H_2O_2 en comparación con las plantas WT (Figura 35).

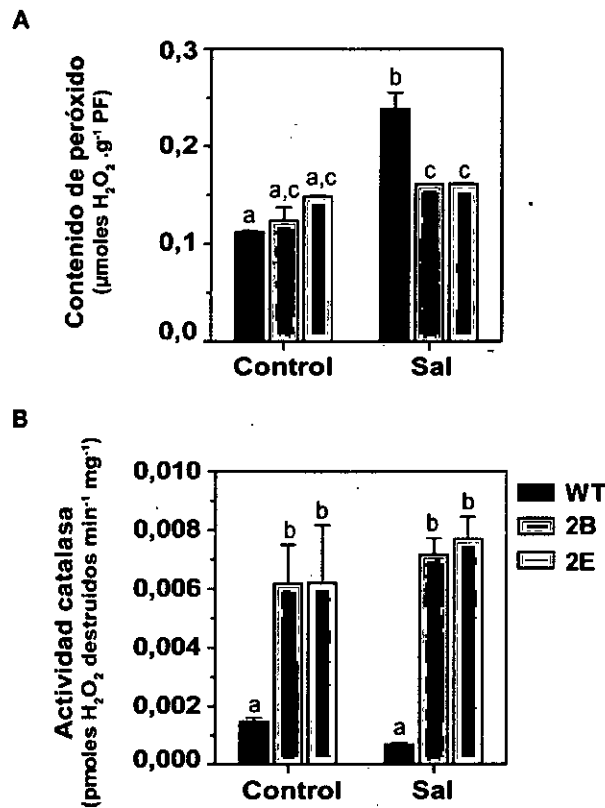


Figura 35. Las líneas transgénicas *35S:StCDPK2* 2B y 2E presentaron menor contenido de H_2O_2 y mayor actividad de CAT en comparación a las plantas WT. El contenido de peróxido ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$) (**A**) y la actividad CAT ($\text{pmoles H}_2\text{O}_2 \text{ destruidos min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (**B**) fueron cuantificados en hojas de plantas WT y en las líneas *35S:StCDPK2*.

De acuerdo al SPUD DB, *WRKY6* y *ERF5* son dos factores de transcripción cuya expresión aumenta significativamente en respuesta a la sal (Quintana Arrúa 2019, Tesis de Maestría), por lo que decidimos evaluar su expresión en las plantas *35S:StCDPK2* 2B y 2E. Se observó un aumento en el nivel de expresión de los genes *StWRKY6* y *StERF5* en las líneas sobreexpresantes, en comparación con las plantas WT, cultivadas en condiciones control (**Figura 36**). Este aumento podría contribuir en parte a la tolerancia observada en las líneas *35S:StCDPK2* frente a estrés salino.

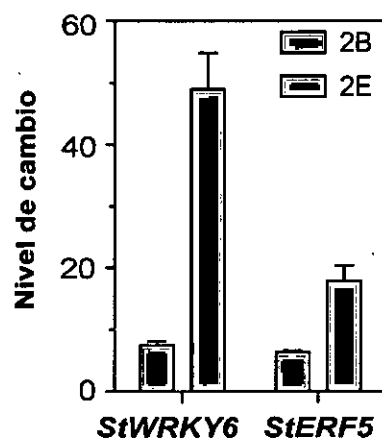


Figura 36. Análisis mediante RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los FTs *WRKY6* y *ERF5* en plantas WT y líneas *35S:StCDPK2* 2B y 2E cultivadas *in vitro* durante 3 semanas en condiciones control. El $\Delta\Delta Ct$ se calculó como: [(CT del gen de interés – CT del gen de referencia) línea *35S:StCDPK2* – (CT del gen de interés – CT del gen de referencia) WT]. Se utilizó *EF-1 α* como gen de referencia. Se graficó la media \pm el error estándar de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con pos test de Bonferroni. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas entre las líneas WT y *35S:StCDPK2* ($p < 0,0001$).

Además, se realizaron ensayos de salinidad utilizando plantas de invernadero WT y *35S:StCDPK2* (2B y 2E) (ver **Figura 28 en Materiales y Métodos**). Durante el tratamiento, cada semana se evaluó la longitud del tallo, la cantidad de hojas y la concentración de clorofila de las hojas nacientes (1° hoja). Si bien fue evidente la inhibición del crecimiento en condiciones salinas, no se observaron diferencias significativas en el número de hojas (datos no mostrados) ni en la longitud del tallo entre las plantas WT y las líneas *35S:StCDPK2* 2B y 2E tanto en condiciones control como bajo estrés salino (**Figura 37 A**). En general, se observó un aumento en el contenido de clorofila en las plantas cultivadas en condiciones de estrés salino respecto de la condición control. Sin embargo, ambas líneas transgénicas mostraron mayor contenido de clorofila que las WT en condiciones de estrés, siendo significativa esta diferencia entre la línea 2E y las plantas WT luego de 3 semanas de tratamiento salino cuando la CE alcanzó un valor entre 9 y 10,1 dS/m (**Figura 37 B**).

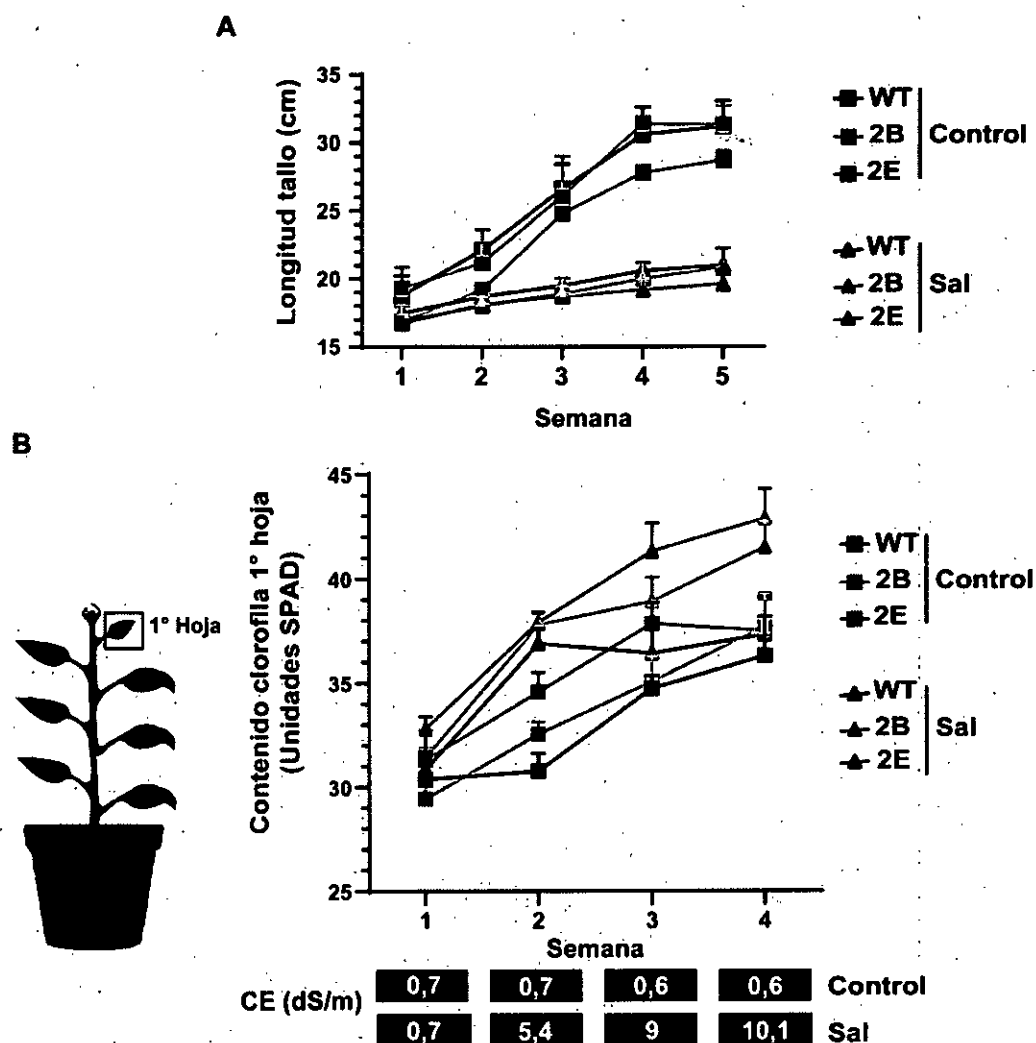


Figura 37. Desempeño de las plantas WT y líneas transgénicas 35S:StCDPK2 frente a estrés salino en ensayos de invernadero. (A) Evaluación de la longitud del tallo (cm) y (B) del contenido de clorofila en la 1° hoja (unidades SPAD) en las plantas WT y las líneas 35S:StCDPK2 2B y 2E en condiciones control y de estrés salino. Se muestra la CE (dS/m) del suelo a cada semana.

Las plantas que fueron sometidas a estrés salino enfrentaron una condición de estrés crítica que las hizo susceptibles a la infección por patógenos por lo que no se pudo evaluar la producción de tubérculos bajo esta condición. Sin embargo, en la condición control observamos que las líneas transgénicas produjeron menos tubérculos que en promedio presentaron mayor tamaño que los de las plantas WT (Figura 38).

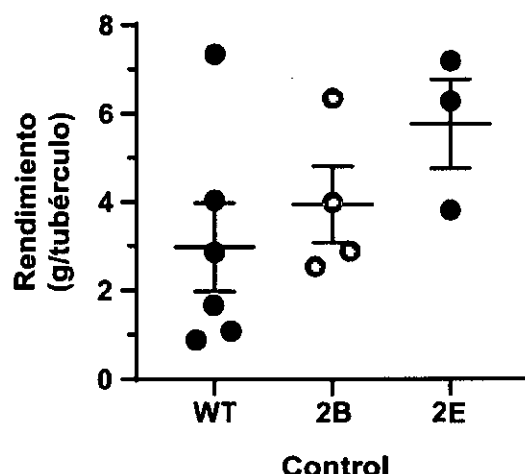


Figura 38. Evaluación del rendimiento de las plantas WT y 35S:StCDPK2 2B y 2E en condiciones control. Se muestra graficada la media y el error estándar correspondiente a cada set de plantas. Cada punto muestra el peso (g) de un tubérculo.

Evaluación de la tolerancia frente a sequía de las plantas 35S:StCDPK2

Como fuera mencionado en Materiales y Métodos, se realizaron tres ensayos de sequía: dos de sequía moderada (uno de dos periodos de sequía de 9 días cada uno y otro de un periodo de 14 días de sequía que está en curso al momento de entregar esta Tesis) y otro ensayo de sequía extrema (un solo periodo de 25 días).

En el primer ensayo de sequía moderada se utilizaron plantas de invernadero WT y 35S:StCDPK2 (2A, 2B y 2E) (ver Figura 30 en Materiales y Métodos). Durante seis semanas se evaluó la longitud del tallo, la cantidad de hojas y el contenido de clorofila de la 1° (hoja naciente), 3° y 5° hoja de cada planta. En la semana 1, en condiciones control, se observa que las plantas de la línea 35S:StCDPK2 2A eran significativamente más altas que las WT. Además, en condiciones de sequía, las plantas 35S:StCDPK2 2A y 2E mostraron diferencias significativas con las WT durante todo el ensayo (Figura 39 A).

En base a lo observado en condiciones de salinidad, se determinó el contenido de clorofila (en unidades SPAD) de la 1°, 3° y 5° hoja de las plantas sometidas a sequía o crecidas en condiciones control. Al igual que antes, se observó que el contenido de clorofila es mayor en las hojas de las plantas sometidas a estrés que en las irrigadas. A lo largo del ensayo, esto fue más evidente en la 1° hoja, pero en la semana 6 se observó en todas las hojas estresadas (Figura 39 B).

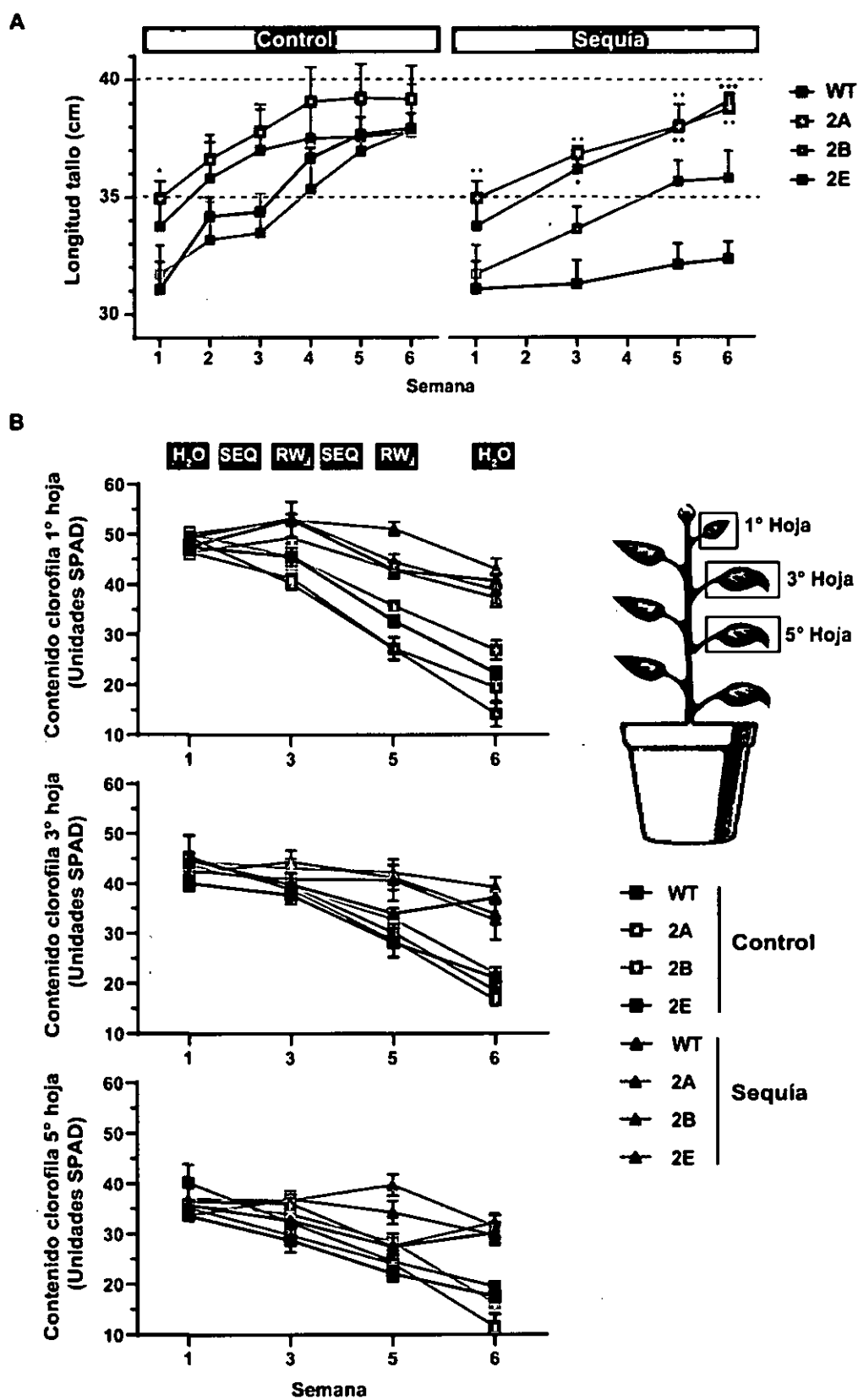


Figura 39. Desempeño de las plantas WT y líneas transgénicas 35S:StCDPK2 frente a sequía en ensayos de invernadero. Evaluación de la longitud del tallo (cm) (A) y contenido

de clorofila en la 1°, 3° y 5° hoja (unidades SPAD) **(B)** en las plantas WT y las líneas 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E en condiciones control y de sequía. A saber: SEQ, sequía; RW, rewatering.

A los 9 días de sequía y a las 3 y 48 h después del *rewatering* se evaluó la marchitez o severidad en cada planta WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E. Tras el 1° período de sequía, todas las plantas WT presentaron hojas completamente enrolladas (índice de severidad 3). Contrariamente, las plantas 35S:StCDPK2 mostraron en promedio un mejor desempeño (**Figura 40**). A 3 h de ocurrido el *rewatering*, las líneas transgénicas se recuperaron más rápidamente que las plantas WT. A las 48 h todas las plantas recuperaron la turgencia y presentaron hojas expandidas excepto una planta WT que no se recuperó del 1° período de sequía. Durante el 2° período de sequía las líneas 35S:StCDPK2 no tuvieron un desempeño uniforme, la línea 2E fue la que presentó mayor tolerancia; mantuvo hojas expandidas y semi-enrolladas y se recuperó más rápido luego del *rewatering*. Contrariamente, sólo un porcentaje de las plantas WT y de las líneas 2A y 2B se recuperaron a las 3 h del *rewatering*. Estas plantas demoraron casi 72 h en recuperar la turgencia y una planta 2A no sobrevivió.

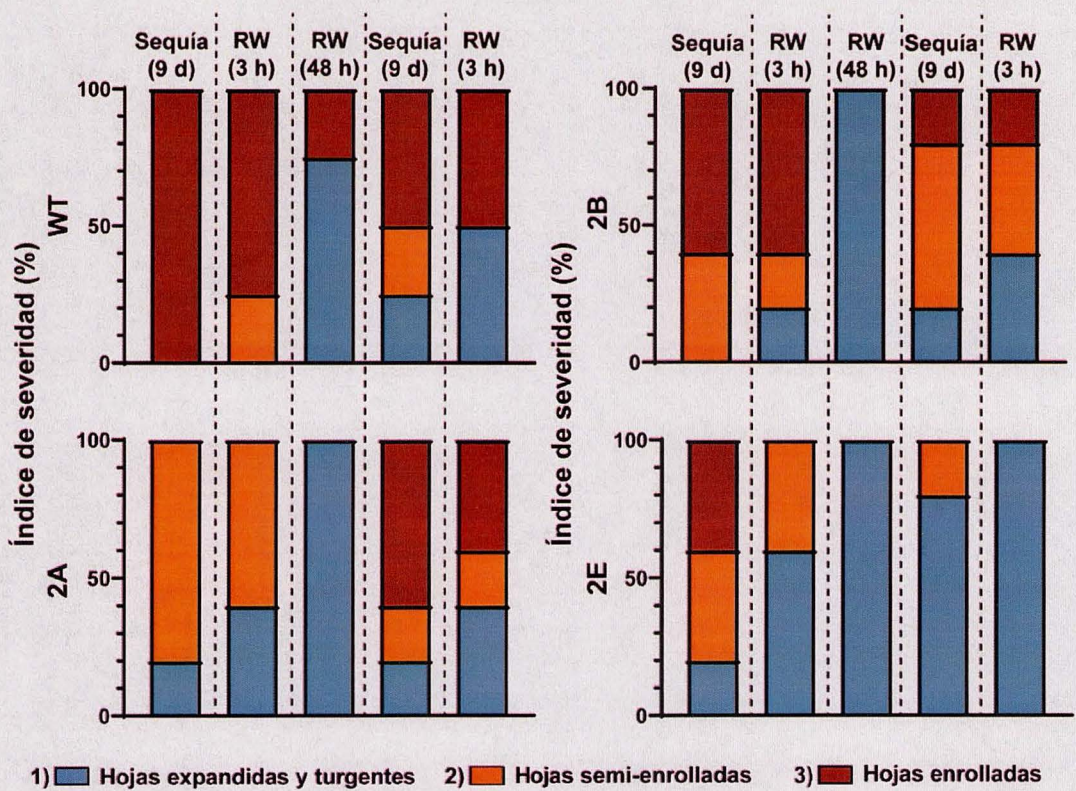


Figura 40. Índice de severidad (%) de las plantas WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E. La turgencia de las hojas se evaluó en cada planta a través de la escala presentada en la **Figura 32** a los 9 días de comenzado el primer período de sequía, a las 3 y 48 h de realizado el

rewatering (RW), a los 9 días de comenzado el segundo período de sequía y a las 3 h de realizado el segundo rewatering.

Al día 80 del ensayo se evaluó la cantidad y el tamaño de los tubérculos producidos por las plantas WT y las líneas 35S:StCDPK2 cultivadas en condiciones control o expuestas a sequía. Como se observa en la **Figura 41 A**, las plantas control y tratadas produjeron un número similar de tubérculos pero la sequía redujo el tamaño de los mismos en todos los casos. Por otra parte, no hay diferencias en la biomasa total entre las WT y las líneas 35S:StCDPK2 en condiciones control, pero en condiciones de sequía las plantas WT tuvieron una menor biomasa total (**Figura 41 B**).

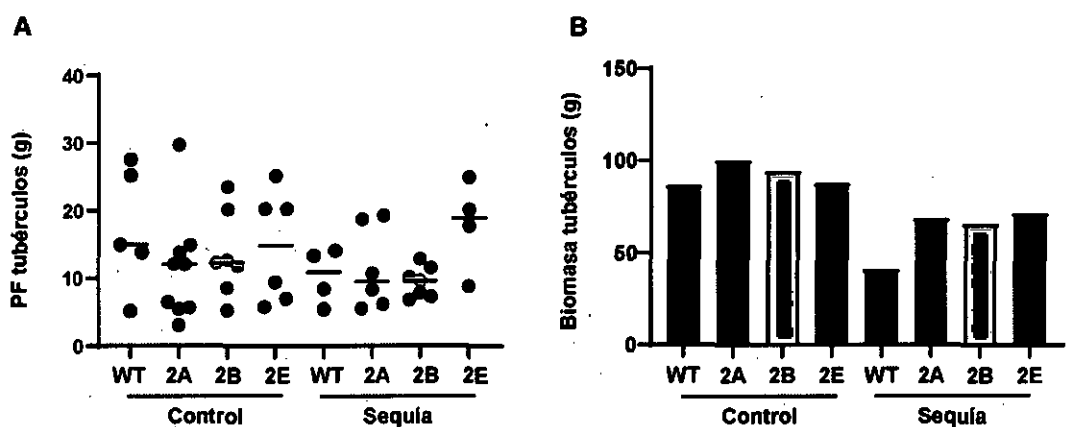


Figura 41. Evaluación del rendimiento de las plantas WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E en condiciones control y expuestas a dos periodos de 9 días de sequía. (A) Se muestra graficado el PF de los tubérculos (g) de más de 5 g y la media. Cada punto muestra el peso (g) de un tubérculo. (B) Biomasa total (g) de tubérculos obtenidos para el set de plantas WT y transgénicas.

Se realizó un segundo ensayo de sequía moderada que está actualmente en curso (ver **Figura 31** en **Materiales y Métodos**). Se evaluó la marchitez o severidad en cada planta WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E tras 14 días de sequía. Todas las plantas WT presentaron hojas completamente enrolladas (índice de severidad 3). Contrariamente, el 40% de las plantas de cada línea 35S:StCDPK2 presentaban aún hojas expandidas y turgentes (**Figura 42**). A las 16 h de ocurrido el rewatering todas las plantas recuperaron la turgencia y presentaron hojas expandidas, pero en promedio las líneas transgénicas mantuvieron un mayor número de hojas vivas (2A: 10,75; 2B: 8,8; 2E: 9,5) que las WT (6,8).

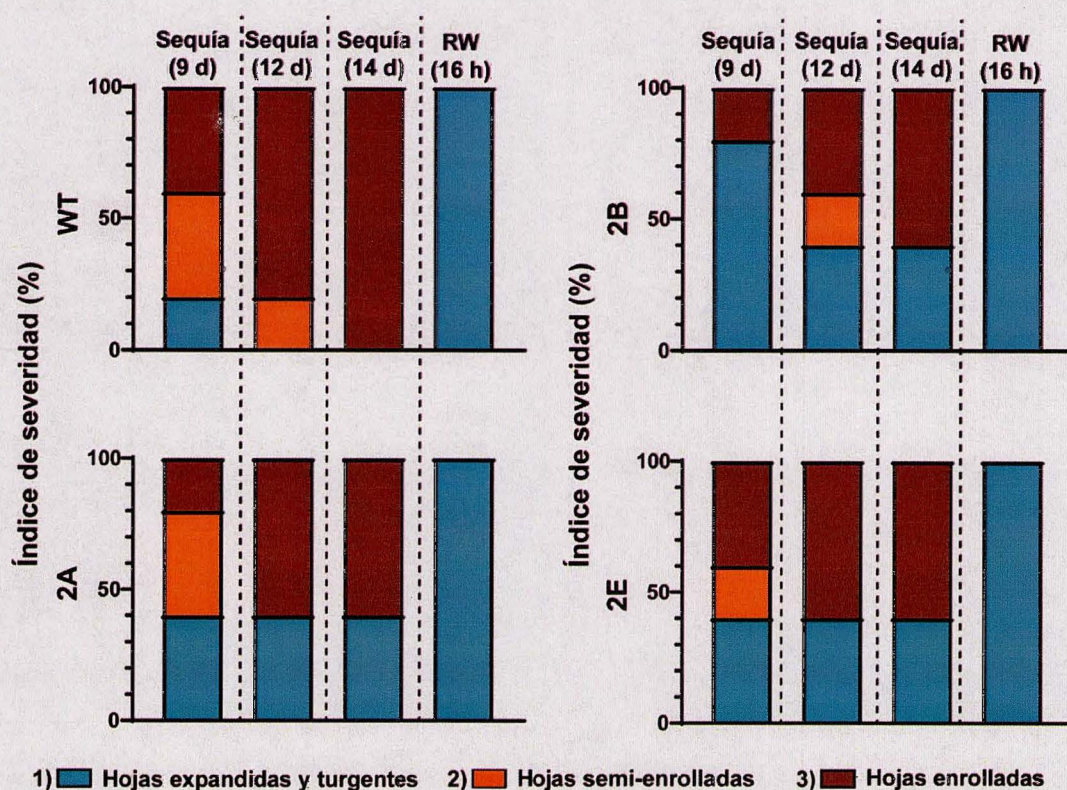


Figura 42. Índice de severidad (%) de las plantas WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E. La turgencia de las hojas se evaluó en cada planta a través de la escala presentada en la Figura 32 a los 9, 12 y 14 días de comenzado el período de sequía y a las 16 h de realizado el *rewatering* (RW).

Se determinaron los parámetros fotosintéticos de las plantas estresadas y de las plantas control utilizando un LICOR 6800 IRGA. Se realizaron tres mediciones por planta seleccionando una hoja superior, una media y una inferior. A pesar de que las determinaciones se realizaron luego del *rewatering*, el efecto nocivo de la sequía fue evidente y se observó una caída significativa ($p < 0,01$) en todos los parámetros (E , C_i , g_s , A , Φ_iPS2 , ETR) de las plantas tratadas respecto de las control. Los más afectados fueron la conductancia estomática (g_s), la tasa de transpiración (E) y la tasa de asimilación (A) cuyos valores alcanzaron el 20, 29,5 y 53% de las plantas en condición control respectivamente, mientras que la eficiencia del PSII, la tasa de transferencia de electrones (ETR) y el contenido intercelular de CO_2 (C_i) estuvieron entre el 70 y el 78%. Esta reducción se correlaciona con la caída en la longitud del tallo y del área foliar (datos no mostrados).

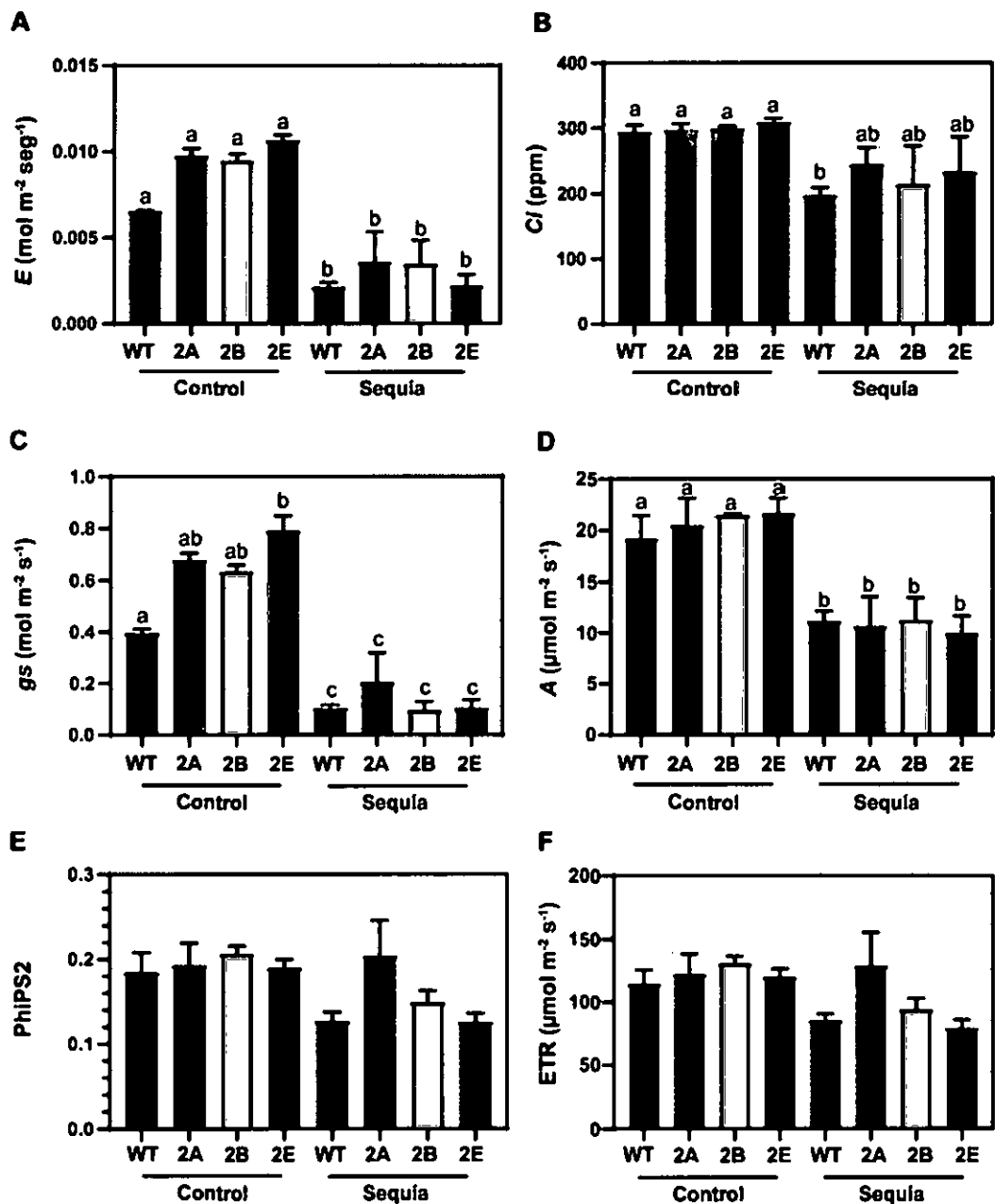


Figura 43. Medición de los parámetros fotosintéticos de plantas WT y sobreexpresantes 2A, 2B y 2E. (A) La tasa de transpiración (E , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (B) la concentración intercelular de CO_2 (C_i , ppm), (C) la conductancia estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (D) la tasa de asimilación neta con irradiancia de saturación (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (E) la eficiencia fotoquímica del PSII (ΦPS2) y (F) la tasa de transporte de electrones (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron los parámetros cuantificados luego del *rewatering* en hojas completamente expandidas superiores de plantas control y sometidas a sequía. En los histogramas se muestra graficada la media \pm error estándar. Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores con Test de Tukey. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas.

En general, al comparar las plantas transgénicas con las WT no se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos. Sin embargo, se observa un leve incremento en la tasa de transpiración (E) y una mayor conductancia estomática (g_s) (diferencia significativa en la línea 2E) en condiciones control (**Figura 43 A y C; Anexo, Figura A1**). Por otro lado, la caída en la concentración intercelular de CO_2 (C_i) fue mayor en las plantas WT que en las líneas 35S:StCDPK2 en condiciones de sequía (**Figura 43 B**). Además, la tasa de asimilación (A), la eficiencia fotoquímica del PSII (PhiPS2) y la tasa de transporte de electrones (ETR) fue mayor en las hojas media e inferior de las líneas 2A y 2E en condiciones control (**Anexo, Figura A1 C, D, E**). Una tendencia similar se observa en condiciones de sequía en las hojas inferiores de las líneas transgénicas (**Anexo, Figura A1**).

Luego de las determinaciones, las plantas fueron regadas nuevamente y a las 24 h se cosecharon hojas para realizar determinaciones bioquímicas y moleculares que se encuentran en curso. Al día 80 de este ensayo se cosecharán los tubérculos para evaluar el rendimiento.

El ensayo de sequía severa (**ver Figura 33 en Materiales y Métodos**) fue realizado durante diciembre de 2021 y enero de 2022 cuando la temperatura máxima mensual fue de 33 y 30,5°C, respectivamente (**ver Anexo, Figura A2**). El 11 de enero, la Ciudad de Buenos Aires registró la segunda temperatura máxima al momento desde que existen registros sistemáticos, con 41,1°C. Ese día, se produjo un corte de luz por lo que las plantas estuvieron expuestas durante 2 h a temperaturas de casi 48°C en el invernadero. Sólo 3 plantas se recuperaron luego del *rewatering*, por lo que se decidió cosechar los tubérculos de las plantas estresadas en ese momento y un mes después se cosecharon los tubérculos de las plantas control. Como se observa en la **Figura 44**, la sequía impactó muy negativamente en el rendimiento (número y tamaño de los tubérculos y en la biomasa total obtenida). Aunque la biomasa fue menor en las plantas WT que en las 35S:StCDPK2 en condiciones de sequía, se deben realizar nuevos ensayos para confirmar esta tendencia.

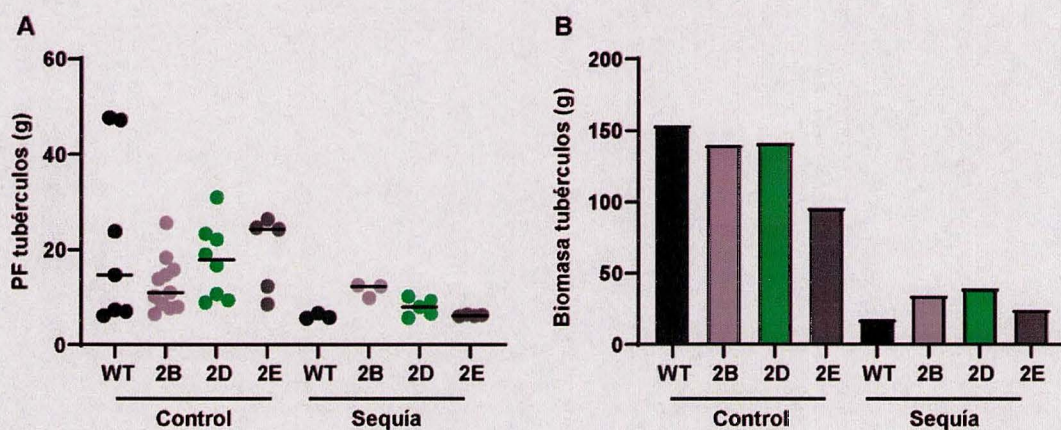


Figura 44. Evaluación del rendimiento de las plantas WT y 35S:StCDPK2 2B, 2D y 2E en condiciones control y expuestas a un periodo de 25 días de sequía. (A) Se muestra graficado el PF de los tubérculos (g) de más de 5 g y la media. Cada punto muestra el peso (g) de un tubérculo. (B) Biomasa total (g) de tubérculos obtenidos para el set de plantas WT y sobreexpresantes.

Evaluación de la tolerancia frente a la infección con *P. infestans* de las plantas 35S:StCDPK2

Se evaluó la tolerancia frente a la infección con *P. infestans* de las líneas 35S:StCDPK2 2B y 2E con respecto a las plantas WT *in vitro*. A los 5 dpi se evidenció el crecimiento y la esporulación del oomiceto tanto en las plantas WT como en las líneas 35S:StCDPK2 2B y 2E (Figura 45) y no se observaron diferencias significativas en el desarrollo del patógeno.

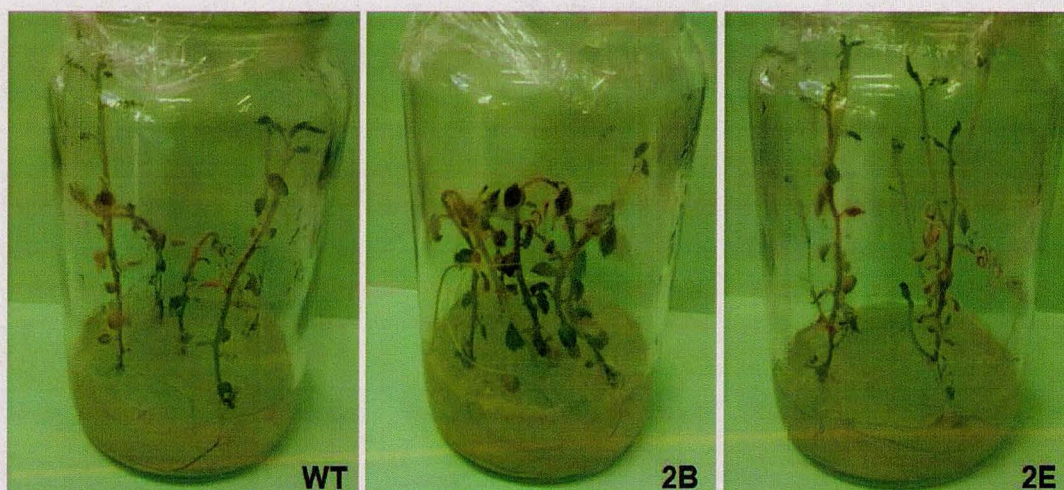


Figura 45. Imágenes representativas de los cultivos *in vitro* de plantas WT y líneas 35S:StCDPK2 2B y 2E inoculadas con *P. infestans* a los 5 dpi.

También se infectaron hojas de plantas WT y 35S:StCDPK2 2B, 2D y 2E y se mantuvieron en cámara húmeda por 4 días. Tras ese período, se tomaron fotos y se cuantificó el porcentaje de área necrótica producida por el patógeno mediante la herramienta ImageJ (**Figura 46**).

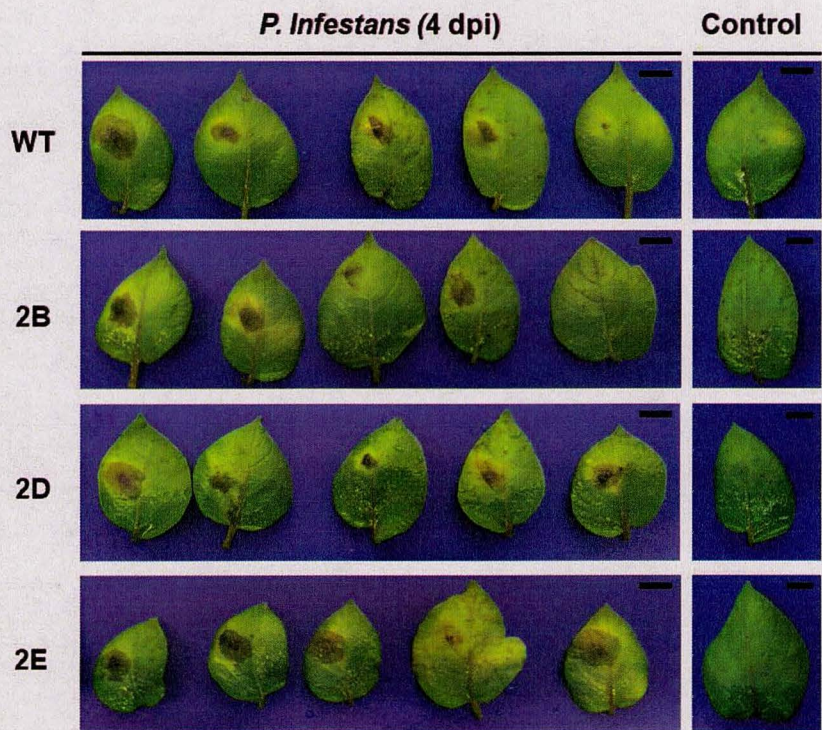


Figura 46. Imágenes representativas de la cara adaxial de las hojas de plantas WT y 35S:StCDPK2 líneas 2B, 2D y 2E infectadas (panel izquierdo) o no (control, inoculadas con agua, panel derecho).

No se observaron diferencias significativas en el tamaño del área necrótica entre las plantas transgénicas y las plantas WT infectadas (**Figura 47**).

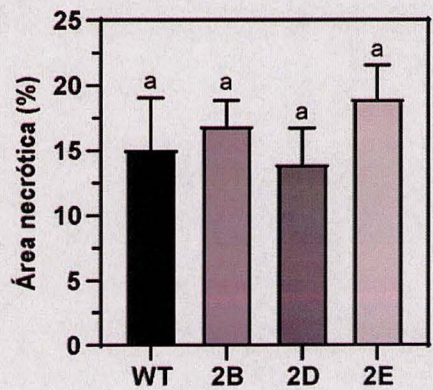


Figura 47: Porcentaje de área necrótica en hojas aisladas infectadas con *P. infestans* y mantenidas en cámara húmeda durante 4 días. Histograma que muestra el % de área necrótica cuantificado en la cara abaxial de las hojas. Se realizó un análisis de ANOVA de un factor y comparación múltiple con Test de Tukey. Las letras iguales encima de las barras indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

El análisis de los datos obtenidos hasta el momento indicó que la sobreexpresión de *StCDPK2* no confiere mayor resistencia o tolerancia a la infección por el oomycete *P. infestans*.

DISCUSIÓN

La percepción de estrés salino da como resultado aumentos en el Ca^{2+} citosólico originado dentro de las raíces (Tracy et al. 2008); se forma una señal inicial de Ca^{2+} cerca del ápice de la raíz, que se dispersa a la zona basal de este órgano (Moore et al. 2002) y puede desencadenar elevaciones sistémicas de Ca^{2+} en forma de onda en las hojas de las plantas (Xiong et al. 2014). *StCDPK2* es un candidato probable para decodificar estas señales de Ca^{2+} por su distribución ubicua en hojas, ápices de raíces y puntos de ramificación de raíces laterales. Los resultados obtenidos de expresión en plantas WT *in vitro* expuestas durante 2 h a una concentración alta de NaCl y en plantas de invernadero que se enfrentaban a una condición de estrés dinámico muestran que *StCDPK2* se induce en respuesta al estrés salino. Además, la actividad del promotor de *StCDPK2* se incrementó en la cofia de la raíz luego del shock salino, y también en presencia de manitol que simuló un shock osmótico lo que condice con los numerosos elementos relacionados con el estrés abiótico presentes en el promotor. La cofia es la primera interfaz que detecta estímulos ambientales beneficiosos o adversos en el suelo, controlando así la dirección del crecimiento de la raíz hacia o lejos de estas señales (Kumpf y Nowack, 2015). Las respuestas tempranas al estrés por sal y el inicio del halotropismo incluyen cambios en el metabolismo y/o en el transporte de auxinas (Han et al. 2017). En vista de los elementos sensibles a auxina identificados en su promotor, la expresión de *StCDPK2* podría ser modulada por auxinas, contribuyendo a la respuesta halotrópica. Deberían realizarse experimentos futuros para apoyar esta hipótesis.

Tras el *shock* salino, el aumento transitorio en la expresión de *StCDPK2* es anterior a la inducción de *StP5CS1* o de *StWRKY6* y *StERF5* (Quintana Arrúa 2019, Tesis de Maestría; Grossi et al. 2021) lo que indica que la inducción de *StCDPK2* es un evento temprano en la respuesta al estrés salino en plantas de papa. Las plantas WT expuestas a tratamientos salinos a largo plazo mostraron una inhibición significativa en los parámetros de crecimiento y del contenido de clorofila y se observó que la expresión de *StCDPK2* está reprimida. La disminución de los niveles de clorofila en plantas sometidas a estrés salino se ha considerado un síntoma típico del estrés oxidativo (Smirnoff, 1996). Las plantas de papa 35S:*StCDPK2* tuvieron mejor desempeño que las WT cuando se cultivaron en presencia de sal *in vitro*; mostraron un mayor contenido de clorofila y mayor actividad CAT mientras que el contenido de H_2O_2 fue menor. Existe una correlación entre la resistencia al estrés ambiental y la eficiencia del sistema antioxidante (Hasanuzzaman et al. 2012). La sobreexpresión de *CDPKs*

dio como resultado una mayor tolerancia al estrés abiótico en diferentes especies de plantas al reprimir la acumulación o mejorar la degradación de ROS (Asano et al. 2012; Ding et al. 2013). En *Arabidopsis*, CPK8 fosforila a CAT3 aumentando su actividad, y las líneas sobreexpresantes de CPK8 tuvieron menor acumulación de ROS en comparación con las plantas WT en condiciones de sequía (Zou et al. 2015). La sobreexpresión de ZmCPK12 y ZmCPK11 en *Arabidopsis* también condujo a un mayor contenido de clorofila en plantas sometidas a estrés salino (Wang y Song, 2013; Borkiewicz et al. 2020). Se propuso que el papel protector de ZmCPK11 está conectado con la estabilización del sistema fotosintético. Una mutación con cambio del marco de lectura en *OsCPK12* fue responsable del fenotipo senescente temprano en plantas *es4* que presentan un elevado contenido de ROS y un reducido contenido de clorofila, actividad CAT y tasa fotosintética. En las plantas *es4* se alteró significativamente la expresión de genes involucrados en la senescencia, en la biosíntesis de clorofila y en la fotosíntesis. Por otro lado, la sobreexpresión de *OsCPK12* en arroz mejoró la tasa fotosintética neta y el contenido de clorofila (Wang et al. 2019). *StCDPK2*, así como *OsCPK12*, pertenece al grupo II-a y se expresa principalmente en órganos verdes (Giammaria et al. 2011); además, la clorofila total y las clorofilas a y b son más altas en los discos foliares de plantas *35S:StCDPK2* crecidas en invernadero en comparación con las plantas WT bajo condiciones de control y de estrés salino (Quintana Arrúa 2019, Tesis de Maestría; Grossi et al. 2021), por lo que es tentador proponer que *StCDPK2* podría estar involucrada en vías similares a las de su contraparte de arroz.

La sobreexpresión de *CDPKs* también puede conducir a una reprogramación transcripcional. Muchos genes de respuesta a ABA se indujeron en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan AtCPK4 y AtCPK11 (Zhu et al. 2007) o AtCPK32 (Choi et al. 2005); las primeras mostraron una mayor capacidad de retención de agua y las otras mayor tolerancia al estrés salino. Las plantas transgénicas de arroz con mayor expresión de *OsCDPK7* u *OsCPK21* mostraron la inducción de genes sensibles al estrés en respuesta a la salinidad (Saijo et al. 2000; Asano et al. 2011) y se reportó la regulación positiva de numerosos genes sensibles a la sal en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *ZmCPK11* (Borkiewicz et al. 2020). En las líneas *35S:StCDPK2* la expresión de los genes *StWRKY6* y *StERF5* es mayor en comparación con las plantas WT en condiciones control. Según los estudios de RNAseq disponibles en SPUD DB, estos FT se inducen frente al tratamiento con NaCl, y observamos lo mismo en plantas WT *in vitro*. Los homólogos de tomate de ambos FT, *SIWRKY3* (Solyc09g015770.2.1; NP_001266272.1; 93% de identidad) y *SIERF5*

(Soly03g093560.1.1; AY559315; 80% de identidad), están involucrados en la adaptación de la planta al estrés salino (Pan et al. 2012; Hichri et al. 2017). Por lo tanto, el aumento en la expresión de estos FT como resultado de la sobreexpresión de *StCDPK2* podría ser otro mecanismo que conduzca a la tolerancia a la sal.

Las plantas de papa expuestas a altos niveles de sal en invernadero presentaron una inhibición significativa del crecimiento en el tallo y en la raíz que fue más evidente cuando el estrés salino se produjo desde el inicio del ensayo (T1 y T2) y tuvo un impacto menor cuando el estrés se aplicó a plantas de tres semanas (T3). En la naturaleza las plantas crecidas en suelos salinos están expuestas durante todo su ciclo de vida a un estrés constante y raramente ocurren cambios súbitos en el nivel de salinidad, por eso los tratamientos desde el inicio reflejan mejor su incidencia natural (Shavrukov, 2013). Los cultivares de papa muestran una reducción en el rendimiento debido a la salinidad (Elkhatib et al. 2004; Khenifi et al. 2011); de hecho, observamos una disminución de 4 veces en la biomasa de tubérculos cuando las plantas de *S. tuberosum* var. Spunta se regaron con 150 mM NaCl cada semana durante dos meses (T4). Se produjo un número similar de tubérculos en condiciones de sal o de control, pero estos fueron significativamente más pequeños en las plantas tratadas con sal (**Figura 23**).

Para evitar o tolerar el déficit hídrico impuesto por la salinidad o sequía, las plantas deben mantener un elevado estado hídrico ya sea absorbiendo agua en forma más eficiente por las raíces o disminuyendo la evapotranspiración en las partes aéreas. El déficit hídrico induce el cierre de estomas mediado por ABA, esto mejora la economía del agua pero restringe la absorción de CO₂ del ambiente, disminuyendo la conductancia estomática y limitando las tasas de fotosíntesis y respiración (Chaves et al. 2009). Una estrategia biotecnológica para mejorar el desempeño de las plantas frente al déficit hídrico fue reducir la tasa de transpiración como se reportó en plantas de arroz que sobreexpresan el FT NAC (Liu et al. 2014), y en tomates transgénicos que expresan el FT de *Arabidopsis* ATHB-7 (*homeodomain-leucine zipper*, *HD-Zip*) (Mishra et al. 2012). Estos tomates resistentes a sequía mostraron diferencias con las plantas WT en algunos parámetros de fluorescencia de la clorofila como el quenching no fotoquímico, la eficiencia cuántica efectiva del PSII y el rendimiento cuántico máximo del PSII (Mishra et al. 2012).

La determinación de los parámetros fotosintéticos (*E*, *g_s*, *A* y *C_i*) en plantas de papa cultivar Spunta crecidas en condiciones control o expuestas a salinidad mostró

una respuesta de todo o nada independientemente de la concentración de sal o del período de duración del estrés. Esta reducción es el resultado del cierre estomático para limitar la pérdida de agua y el transporte de Na⁺ por transpiración hacia el tallo (Munns y Tester, 2008). Las plantas WT Desirée en condiciones control (**Figura 43**) mostraron valores de *E*, *gs*, *A* y *Ci* similares a los obtenidos con las plantas WT Spunta (**Figura 22**). La sequía también afectó negativamente los parámetros fotosintéticos pero en este caso no se observó el efecto todo o nada porque la determinación se realizó 16 h después del *rewatering*.

Para identificar si efectivamente la sobreexpresión de *StCDPK2* brinda una mayor tolerancia a estreses abióticos decidimos evaluar su sobrevivencia, desempeño y rendimiento en términos de producción de tubérculos en condiciones de estrés, y además, determinar las emisiones de fluorescencia de la clorofila como medida de actividad fotosintética. La medición de la fluorescencia de la clorofila es un método de diagnóstico rápido y no destructivo que muestra el destino de la energía de excitación en el aparato fotosintético de la hoja y permite detectar y cuantificar el daño en hojas provocado por bajas temperaturas, salinidad y estrés hídrico (Palta 1992; Sestak y Stiffel 1997). Para los experimentos en maceta, se utilizaron plantas WT y 35S:*StCDPK2* (líneas 2A, 2B, 2D y 2E) rusticadas que fueron crecidas en invernadero a 24°C, en condiciones de DL y con riego con agua de red cada 3 días (condiciones control) o expuestas a riego con sal (150 mM NaCl), a sequía moderada (2 períodos de 9 días cada uno; 1 período de 14 días) o a sequía severa (1 período de 25 días). Por razones de disponibilidad de espacio y del tiempo necesario para obtener una población homogénea de plantas rusticadas, la cantidad de plantas de invernadero expuestas a los tratamientos fue menor que la usada en los ensayos de salinidad *in vitro*. Debido a este n reducido, en general las diferencias entre las líneas transgénicas y las plantas WT no fueron significativas aunque se observa una tendencia bastante clara en algunos aspectos.

En los tratamientos control y salino, el fenotipo de las plantas WT y 35S:*StCDPK2* fue similar. En particular, la inhibición del crecimiento del tallo provocada por la salinidad fue muy evidente en todas las plantas. Sin embargo, al igual que *in vitro*, las sobreexpresantes mostraron mayor contenido de clorofila (en unidades SPAD) que las WT en ambas condiciones (**Figura 37 y Figura 39**) lo que confirma que la sobreexpresión de *StCDPK2* podría afectar la estabilidad de la clorofila. Una observación llamativa fue que las unidades SPAD de las hojas de las plantas WT y de las líneas transgénicas fue mayor en condiciones de estrés salino que

en condiciones control. Las mediciones de unidades SPAD se obtienen a través de la transmitancia de la hoja, por lo que una posible explicación para este incremento en el valor de dichas unidades puede ser debido a los cambios estructurales internos de la hoja causados por la salinidad (Liu et al. 2014). Los estreses ambientales suelen reducir el contenido de clorofila (Turan et al. 2007), sin embargo algunos estudios han informado que en plantas tolerantes a la sal aumenta el contenido de clorofila en condiciones de salinidad (Huang et al. 2015; Qiu et al. 2017). En consecuencia, se considera que una mayor acumulación de clorofila es un indicador potencial de la tolerancia a la salinidad (Akram et al. 2011).

En los tratamientos de sequía, la reducción en el rendimiento fue evidente tanto en las plantas WT como en las plantas 35S:StCDPK2. Esta reducción fue mayor cuando el estrés fue más severo (ensayo de sequía de 1 período de 25 días). En los ensayos de sequía moderada, las líneas sobreexpresantes mostraron mayor longitud del tallo y un mejor desempeño frente a la sequía determinado por el índice de severidad, el número de hojas residual, una recuperación más rápida luego del *rewatering* y un mayor rendimiento en término de biomasa total de tubérculos. Las líneas transgénicas en condiciones control mostraron una mayor conductancia estomática y tasa de transpiración que permitiría un mayor enfriamiento evaporativo y una mejor absorción de nutrientes y entrada de dióxido de carbono. Además en las líneas 2A y 2E se observó un aumento en la eficiencia fotoquímica del PSII, en el transporte de electrones y en la tasa de asimilación de las hojas medias e inferiores. Todo esto podría contribuir a que las plantas transgénicas lleguen en mejores condiciones a enfrentar la sequía.

Fue notorio que en el ensayo de dos períodos consecutivos de sequía, las plantas WT toleraron mejor el segundo período que el primero, posiblemente debido a que ciertas vías (síntesis de prolina o degradación de ROS) ya estaban encendidas. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la mayor tolerancia observada en las líneas 35S:StCDPK2 frente al estrés salino en ensayos *in vitro* podría lograrse mediante la acción de múltiples vías tales como la eliminación de ROS, la estabilidad de la clorofila y la inducción de genes que responden al estrés. Si se extrapolan los resultados obtenidos con las plantas *in vitro* frente a salinidad a las plantas de invernadero expuestas a sequía, se puede especular que la activación temprana de estas vías de acción les permitió a las plantas 35S:StCDPK2 tolerar mejor una sequía moderada. Para confirmar este supuesto se evaluarán parámetros bioquímicos y

- moleculares (contenido de ROS, actividad de CAT y síntesis de prolina) en las muestras tomadas y se realizarán nuevos ensayos de sequía.

CAPÍTULO II: “Inoculación de *Methylobacterium* sp. 2A como una estrategia para promover el crecimiento de las plantas de papa y para controlar a patógenos”

INTRODUCCIÓN

Para garantizar la producción de alimentos a largo plazo, debemos desarrollar prácticas agrícolas sostenibles con un impacto adverso mínimo en el medio ambiente. En este contexto, el uso de inoculantes microbianos tiene varias ventajas en la agricultura, que incluyen: 1) la restauración de suelos no fértiles en suelos fértiles, 2) la reducción del uso de fertilizantes químicos disminuyendo el costo de producción y los problemas de contaminación y degradación de la tierra asociados a su uso, 3) la mejora del crecimiento, la calidad y el rendimiento de las plantas mediante la restricción del crecimiento de patógenos (Bhise y Dange, 2019; García et al. 2017; Singh y Jha, 2017; Cordero et al. 2018).

Rizosfera

La rizosfera es la estrecha zona de tierra que rodea a la raíz de la planta y alberga numerosos grupos microbianos que tienen el potencial de influir significativamente en el crecimiento, la nutrición y la salud de las plantas (Philippot et al. 2013). Dentro de esta zona de interacción planta-suelo, la rizosfera es un área dinámica de comunicaciones entre especies e intra especies que impactan significativamente en el flujo y la transformación del carbono. La rizosfera está fuertemente influenciada por el metabolismo de las plantas, ya que las raíces liberan/secretan diferentes compuestos como carbohidratos, metabolitos secundarios, ácidos orgánicos y aminoácidos que sirven como fuente de energía para los microorganismos y actúan como atrayentes y repelentes químicos. Esto permite a los microorganismos colonizar y multiplicarse tanto en la rizosfera como en el rizoplaneo (Gray y Smith, 2005; Ahkami et al. 2017). Se sabe que los fenoles, flavonoides y ácidos orgánicos secretados por las raíces actúan como señales químicas para la quimiotaxis bacteriana, la secreción de exopolisacáridos, el quorum sensing y la formación de biofilms durante la colonización de la rizosfera (Bauer y Mathesius, 2004; Badri et al. 2009; Narula et al. 2009). En suelos sanos, normalmente hay alrededor de 10^8 a 10^9 bacterias por gramo de suelo, y este número desciende a 10^4 en suelos estresados (Schoenborn et al. 2004).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias asociadas a las plantas pueden clasificarse en beneficiosas, deletéreas y neutrales según sus efectos sobre el crecimiento vegetal (Dobbelaere et al. 2003). Las bacterias beneficiosas que colonizan la rizosfera son las rizobacterias

promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), este grupo de bacterias de vida libre coloniza la rizósfera y contribuye a aumentar el crecimiento y el rendimiento de las plantas cultivadas mediante diversos mecanismos (Kloepper y Schroth, 1978) (**Figura 48**). Algunos de ellos son endófitos facultativos que invaden los espacios intercelulares de los tejidos del huésped y prosperan como endófitos para establecer una asociación mutuamente beneficiosa (Ilangumaran y Smith, 2017). La mayoría de las PGPR colonizan la superficie de la raíz y prosperan en los espacios entre los pelos de la raíz y las capas rizodérmicas, mientras que algunos no están físicamente en contacto con las raíces (Gray y Smith, 2005). Estos microorganismos benéficos son de interés para la agricultura ya que pueden ser utilizados como biofertilizantes o como pesticidas.

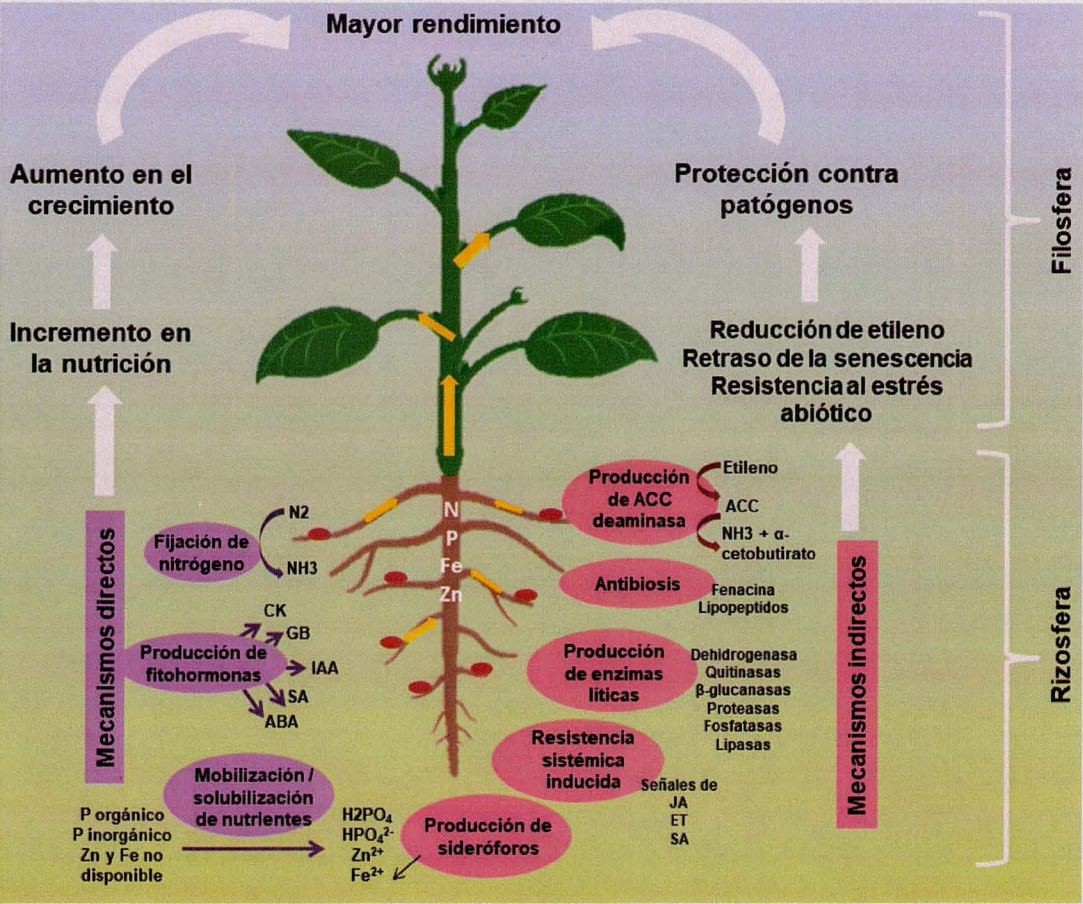


Figura 48. Las PGPR pueden incrementar el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos directos e indirectos. Figura adaptada de Hakim et al. 2021.

La promoción directa del crecimiento de las plantas funciona a través de la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas vegetales como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico y ácido abscísico. Varios géneros bacterianos tienen la capacidad de producir la auxina ácido indol-3-acético (AIA). Además, las

PGPR pueden transformar nutrientes esenciales presentes en el suelo (como nitrógeno, fósforo, hierro y zinc) en formas disponibles para las plantas.

La promoción indirecta del crecimiento vegetal incluye la protección contra patógenos. Esto se puede lograr mediante la producción de sideróforos (pequeñas moléculas que se unen a metales), la síntesis de antibióticos, la producción de enzimas líticas celulares tales como quitinasas, proteasas, fosfatasa, lipasas, etc. También producen compuestos para aliviar el estrés, como la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa que hidroliza al etileno en amoníaco (NH_3) y α -cetobutirato, y al reducir los niveles de etileno promueven el crecimiento de las raíces.

Tolerancia al estrés abiótico asociada con PGPR

La presencia de estrés ambiental es el principal problema que influye en la productividad agrícola (Singh, 2015). El papel de los microorganismos benéficos está ganando importancia en el manejo del estrés y el desarrollo de una agricultura resiliente al cambio climático ya que su inoculación puede mejorar el rendimiento de las plantas frente a estas condiciones (Forni et al. 2017). Se sabe que la inoculación con PGPR modula la regulación del estrés a través de mecanismos directos e indirectos que inducen la tolerancia sistémica. La interacción planta-PGPR mejora la salud y el crecimiento de la planta, los nutrientes disponibles y su asimilación y genera una defensa más efectiva contra microorganismos causantes de enfermedades (Yang et al. 2009).

El mejor crecimiento de las plantas por inoculación con PGPR bajo condiciones de estrés se debe a mecanismos tales como la reducción del nivel de etileno inducido por el estrés debido a la actividad de la ACC desaminasa (Glick et al. 2007) y a la regulación de las enzimas de defensa de las plantas CAT, glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) lo que brinda protección contra el estrés oxidativo (Islam et al. 2016; Qin et al. 2016) (**Figura 49**). La inoculación con una PGPR que produce la ACC desaminasa mejoró la tolerancia a la sal y aumentó las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, APX y CAT en plantas de okra (*Abelmoschus esculentus* L.) (Habib et al. 2016). Además, se demostró que plantas de tomate inoculadas con ciertos PGPR pueden mantener su crecimiento en condiciones de alta salinidad y déficit hídrico al reducir el impacto negativo de la liberación de etileno en el crecimiento de la raíz (Mayak et al. 2004). Bajo estrés salino, plántulas de maní inoculadas con cinco rizobacterias halotolerantes

tuvieron un mejor crecimiento en comparación con las plántulas no inoculadas porque pudieron mantener la homeostasis de iones y redujeron la acumulación de ROS (Sharma et al. 2016).

Además, las PGPR mejoran la nutrición de las plantas a través de la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la síntesis de sideróforos y la producción de fitohormonas (Etesami y Beattie 2017, Etesami y Maheshwari, 2018). Varios estudios han confirmado que la aplicación de PGPR productoras de fitohormonas, tales como auxinas, giberelinas, citoquininas (CK) y ácido abscísico (ABA), pueden minimizar la pérdida de rendimiento de los cultivos en condiciones de estrés abiótico (Dodd et al. 2010; Egamberdieva y Kucharova, 2009). En condiciones de sequía, la inoculación de lavanda (*Lavandula dentate*) con la PGPR productora de AIA *Bacillus thuringiensis* mejoró la nutrición, la fisiología y las actividades metabólicas de la planta (Armada et al. 2014). De manera similar, *Azospirillum spp.* aumentó la tolerancia al estrés por sequía en el trigo al mejorar el crecimiento de las raíces y la formación de raíces laterales (Arzanesh et al. 2011). También pueden sintetizar exopolisacáridos (EPS) que son los responsables de la unión, a menudo junto con otras bacterias, a las partículas del suelo y las superficies de las raíces. Las bacterias limitan la absorción de sal de las plantas al atrapar cationes en la matriz de EPS y al regular la expresión de los transportadores de afinidad de iones, aumentan el intercambio de nutrientes minerales tanto de macro como de micronutrientes y alivian el desequilibrio iónico causado por la alta afluencia de iones Na^+ y Cl^- .

Las PGPR también aumentan la acumulación de osmolitos como prolina, glicina betaína y azúcares (Creus et al. 2004), preservando una alta actividad fotosintética y conductancia estomática (del Amor y Cuadra-Crespo, 2012) y alterando el estado hormonal de la planta (Arora et al. 2012). En Chen et al. (2016) plantas de maíz inoculadas con *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 mostraron una mayor tolerancia al estrés salino y mayor contenido de clorofila, en comparación con las plantas no inoculadas.

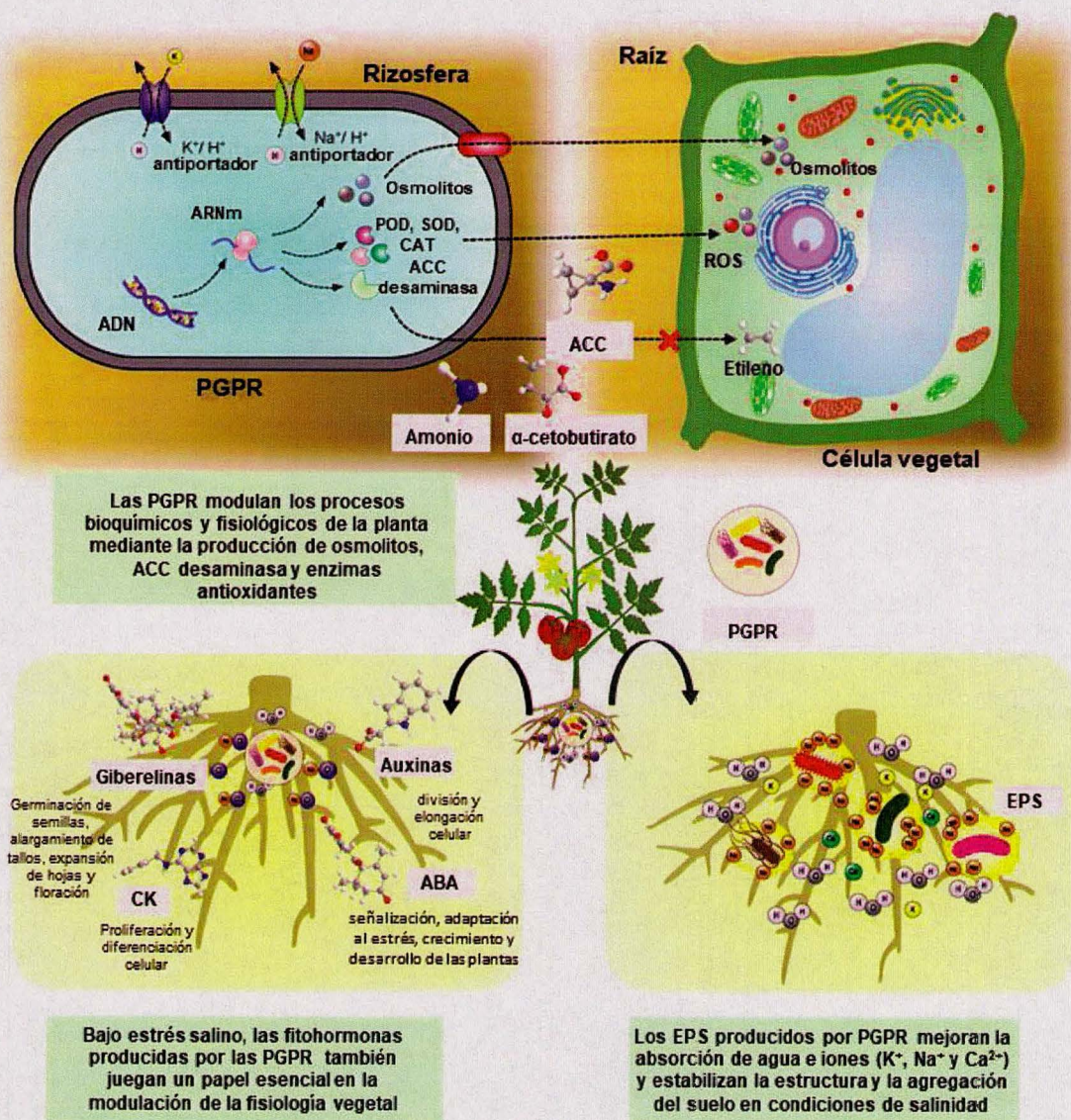


Figura 49. Alivio del estrés salino mediado por PGPR. Adaptado de Egamberdieva et al. 2019.

PGPRs como antagonistas y agentes de biocontrol

Las bacterias que reducen la incidencia o la gravedad de las enfermedades de las plantas a menudo se denominan agentes de biocontrol, mientras que las que muestran actividad antagónica hacia un patógeno se definen como antagonistas (Beattie 2006). Como fue mencionado anteriormente, las PGPR pueden controlar a fitopatógenos mediante mecanismos que promueven indirectamente el crecimiento de las plantas al reducir la gravedad de las enfermedades. Estos mecanismos incluyen la síntesis de enzimas hidrolíticas, como quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden lisar células fúngicas patógenas (Maksimov et al. 2011). Otros mecanismos incluyen la competencia por nutrientes, la colonización de nichos en la superficie de la

raíz (Stephens et al. 1993; Kamilova et al. 2005) y la regulación de los niveles de etileno de la planta en respuesta al estrés impuesto por la infección (Glick y Bashan, 1997; Van Loon, 2007).

La producción de sideróforos, antibióticos y bacteriocinas son tres de los mecanismos más efectivos y conocidos que un antagonista puede emplear para minimizar o prevenir la proliferación de fitopatógenos. Los sideróforos son agentes quelantes de iones férricos de bajo peso molecular producidos por bacterias y hongos que influyen en las plantas para la absorción de varios metales como el zinc, el hierro y el cobre mediante el uso del mecanismo quelante de las rizobacterias (Egamberdiyeva y Kucharova, 2009; Dimkpa et al. 2009). Los antibióticos abarcan un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son perjudiciales para el crecimiento o las actividades metabólicas de otros microorganismos (Duffy, 2003). La producción de uno o más antibióticos es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de las PGPR para actuar como agentes antagónicos contra los fitopatógenos (Glick et al. 2007). Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos tradicionales en que suelen tener un espectro de destrucción relativamente acotado ya que sólo son tóxicas para las bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora.

Inoculación con PGPR

Las interacciones de las PGPR con las plantas son explotadas comercialmente (Podile y Kishore, 2006) y son una gran promesa para la agricultura sostenible. Se han investigado aplicaciones de estas asociaciones en maíz, trigo, avena, cebada, arvejas, canola, soja, papas, tomates, lentejas, achicoria y pepino (Gray y Smith, 2005). Actualmente se comercializan varios inoculantes de PGPR que promueven el crecimiento a través de al menos un mecanismo como la supresión de enfermedades de las plantas (denominados bioprotectores), la mejora de la adquisición de nutrientes (biofertilizantes) o la producción de fitohormonas (bioestimulantes). Varios PGPR se comercializan como agentes de control biológico tales como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Paenibacillus macerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Glick, 2012).

El género *Methylobacterium*

El género *Methylobacterium* se encuentra dentro de la familia *Methylobacteriaceae* del orden Rhizobiales, que, a su vez, se ubica en la clase α -proteobacteria. Las bacterias que pertenecen al género *Methylobacterium* (Patt et al.

1976) son Gram-negativas con forma de bacilo y son ubicuas en la naturaleza encontrándose comúnmente en la atmósfera, el suelo, el agua dulce y los sedimentos. Pueden existir en forma libre o asociadas con tejidos vegetales, donde producen sustancias que promueven el crecimiento de las plantas (Green y Ardley, 2018). Al crecer en tejido meristemático, pueden alcanzar poblaciones de 10^4 a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido vegetal (Doronina et al. 2002).

Los miembros del género *Methylobacterium* también se denominan metilotrofos facultativos de pigmentación rosada (PPFMs, *pink-pigmented facultative methylotrophs*) debido a su pigmentación por carotenoides y su capacidad para crecer en compuestos de un solo carbono como metanol, así como en compuestos de múltiples carbonos (Green, 2006). Tras la colonización de la planta, estos metilotrofos facultativos pueden beneficiarse de una variedad de compuestos orgánicos volátiles que emite la planta como parte de su actividad metabólica normal (Galbally y Kirstine, 2002). Existe evidencia de que estos microorganismos logran tomar el metanol emitido principalmente a través de los estomas y consumirlo, ya que pueden oxidar metanol por medio de la enzima metanol deshidrogenasa (MDH), clave en su metabolismo metilotrófico. También pueden prosperar con otros compuestos de carbono derivados de plantas, los cuales son metabolizados y degradados en moléculas simples que luego serán recicladas por las células de la planta (Sy et al. 2005; Abanda-Nkpwatt et al. 2006; Gourion et al. 2006; Delmotte et al. 2009).

Las especies dentro del género *Methylobacterium* están involucradas en la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la tolerancia al estrés abiótico, la promoción del crecimiento de las plantas y la actividad de biocontrol contra patógenos de plantas (Madhaiyan et al. 2006; Kumar M et al. 2016; Parasuraman et al. 2019; Krug et al. 2020). Las metilobacterias producen auxinas y citoquininas que estimulan la división celular o el alargamiento de las plantas y reducen la acumulación de etileno en las raíces mediante la actividad de la ACC desaminasa. Tal es el caso de *Methylobacterium fujisawaense*, que disminuyó los niveles de etileno y promovió la elongación de raíces en plántulas de canola (Madhaiyan et al. 2006).

Methylobacterium es capaz de producir AIA (Ivanova et al. 2001), por lo que la inoculación podría aumentar su concentración en las plantas y promover el crecimiento de las mismas (Lee et al. 2006). El AIA bacteriano juega un papel importante en el desarrollo del sistema de raíces del huésped. En Pattnaik et al 2017, la aplicación foliar de *M. extorquens* MP1 y *M. zatmanii* MS4 aumentó el crecimiento de tomate en comparación con el control. Además, la inoculación con *Methylobacterium komagatae*

proporcionó un aumento significativo del rendimiento (108%) al ser inoculada en *Crambe abyssinica*, un cultivo importante para la producción de biodiesel de alta calidad (de Aquino et al. 2018).

CAPÍTULO II, PARTE I: “Caracterización de una bacteria con potencial PGPR perteneciente al género *Methylobacterium* que fue aislada a partir de las raíces de una planta de papa”

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del aislamiento *Methylobacterium* sp. 2A

Este aislamiento bacteriano se obtuvo a partir de las raíces de plantas de papa recientemente establecidas in vitro que habían crecido en el invernadero del instituto. Para su aislamiento, dichas raíces se esterizaron superficialmente y se incubaron en LB agar a 28°C durante 4 días. Se seleccionaron las colonias rosadas y se mantuvieron en medio LB sin la adición de NaCl (LBNS).

Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y caracterización fenotípica

Con el fin de determinar sus condiciones óptimas de crecimiento, se ensayaron diferentes temperaturas (18°C, 24°C, 28°C, 30°C y 37°C) y medios de cultivo (LBNS, LB sin sal; PDA, agar papa dextrosa “*potato dextrose agar*” (Merck, Alemania); PSA, agar arveja sacarosa “*pea sucrose agar*”; RSA, agar centeno sacarosa “*rye sucrose agar*”). Se probó la utilización de distintas fuentes de carbono en medio mínimo M9. Este medio se suplementó individualmente con ácido L-glutámico, glicerol, sacarosa, sorbitol, manitol y citrato de sodio. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de agitación a 130 rpm, durante 3 días a 28°C. La tolerancia a pH fue determinada en medio LB ajustado a distintos valores de pH (de 4,5 a 7,5). Se realizó la tinción de Gram y se determinó la actividad de la enzima CAT mediante el método tradicional en portaobjeto y la actividad de la enzima oxidasa mediante la oxidación de discos impregnados con el reactivo N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (Britania S.A., Argentina). Se probó su resistencia a los antibióticos Estreptomicina, Higromicina, Rifampicina, Ampicilina, Kanamicina, Cloramfenicol y Cefotaxima en medio LBNS.

Extracción de ADN genómico bacteriano

El ADN genómico (ADNg) se extrajo manualmente según Chen y Kuo (1993) a partir de un cultivo de 48 h de crecimiento. Brevemente, se tomaron 1,5 ml de dicho cultivo y se centrifugó 3 minutos a 12.000 rpm. El pellet fue resuspendido en 200 µl de buffer de lisis (Tris-acetato 40 mM pH 7,8, sodio-acetato 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%) pipeteando vigorosamente. Para eliminar residuos celulares se añadieron 66 µl de

una solución NaCl 5M y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf, se añadió un volumen igual de cloroformo y se centrifugó por 3 minutos. En el sobrenadante se precipitó el ADNg con EtOH 100% (1:1). Luego de lavar el ADN con EtOH 70% y de secarlo al aire, se resuspendió en 50 µl de buffer TE 1X.

Alineamiento e inferencia filogenética mediante la secuencia ADN ribosomal 16S

El ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos universales fD1 y rP2 (**Anexo, Tabla A2**) (Weisburg et al. 1991) y fue secuenciado en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). La secuencia obtenida también fue comparada con aquellas depositadas en la base de datos EzBioCloud (Yoon et al. 2017) que puede encontrarse en: <http://ezbiocloud.net>. Se llevó a cabo un análisis filogenético comparando la secuencia de 16S rDNA del aislamiento obtenido contra especies representativas del género *Methylobacterium*, y contra once especies que han sido recientemente reclasificadas en el nuevo género *Methylobacterium* (Green y Ardley, 2018). El alineamiento múltiple de secuencias y la construcción del árbol filogenético fueron realizados mediante el software MEGA X (Kumar S et al. 2018) utilizando el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) basado en el modelo de Kimura de dos parámetros con un valor de *bootstrap* de 1000 repeticiones. En el análisis fueron incluidos miembros de la familia Methylocystaceae como *outgroup*.

Con los datos obtenidos se realizó una revisión bibliográfica en la cual se compararon las características de este aislamiento con las de aquellas especies de *Methylobacterium* más próximas filogenéticamente.

Secuenciación del genoma: Ensamblaje *de novo* y anotación

La secuenciación completa del genoma (WGS, "*Whole-genome sequencing*") de *Methylobacterium* sp. 2A se llevó a cabo en una plataforma Illumina TruSeq Nano en Macrogen. El ensamblaje *de novo* se realizó utilizando los procedimientos estándar del *pipeline* de ensamblaje procariótico (Sosa et al. 2018), basado en SPAdes versión 3.9.0 (Bankevich et al. 2012) y SSPACE versión 3.0 (Boetzer et al. 2011). La anotación del genoma se realizó utilizando el servidor de tecnología de subsistemas de anotaciones rápidas (RAST, Rapid Annotations Subsystems Technology) (Aziz et al. 2008).

Filogenia del genoma completo

La filogenia de *Methylobacterium* sp. 2A se evaluó mediante CSI Phylogeny 1.4 (Kaas et al. 2014; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>). Este software infiere la filogenia a partir de las diferencias en los polimorfismos de un nucleótido único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) y del concatenado de los mismos. Los valores de identidad media de nucleótidos (ANI, *average nucleotide identity*) entre *Methylobacterium* sp. 2A y las otras cepas de referencia fueron calculados con el servicio web JspeciesWS (Richter et al. 2015). Se realizó el cálculo de hibridación *in silico* ADN-ADN (DDH, *DNA-DNA hybridization*) entre *Methylobacterium* sp. 2A y la cepa de referencia más similar con el servicio web *Genome-to-Genome Distance Calculator* (GGDC 2.1; Meier-Kolthoff et al. 2013).

Predicción de islas genómicas

Se identificaron islas genómicas (IG) potencialmente adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes. Para ello, *Methylobacterium* sp. 2A se alineó con el genoma completo de *Methylobacterium oryzae* CBMB20 utilizando el software Island Viewer (<https://pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>; Bertelli et al. 2017) y curación manual. Este software integra cuatro métodos diferentes de predicción de islas genómicas: IslandPick, IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM e Islander.

Cálculo del pangenoma

El pangenoma se obtuvo a través de OrthoMCL (Li et al. 2003; <https://orthomcl.org>) y los datos se analizaron mediante R Studio. Las categorías COG se asignaron a través de COGNITOR (Tatusov et al. 2001).

Predicción de rutas metabólicas asociadas a la capacidad PGP

Sobre la base del genoma anotado, la predicción computacional de las vías metabólicas se realizó mediante reconstrucción utilizando el software Pathway Tools v23.0. Se utilizaron el software Pathologic de Pathway Tools (Karp et al. 2002) y la base de datos MetaCyc (Caspi et al. 2005) para generar automáticamente una base de datos (PGDB) a partir del archivo GenBank del genoma anotado de *Methylobacterium* sp. 2A. El PGDB vincula las secuencias y los genes potenciales con las reacciones enzimáticas y las vías bioquímicas. Los clusters de genes fueron identificados con el software SnapGene4 (GSL Biotech) y con antiSMASH 5.0 (Blin et al. 2019), disponibles en: <http://snapgene.com> y <http://antismash.secondarymetabolites.org> y curados manualmente.

Ensayos para la detección de habilidades PGP

Capacidad de fijar N₂ y de solubilizar fosfato

La fijación de nitrógeno fue cualitativamente determinada cultivando colonias individuales en medio Nfb semisólido, de acuerdo a lo descrito por Hartmann y Baldani (2006). La determinación de la capacidad de solubilizar fosfato se llevó a cabo usando fosfato tricálcico (TCP) en medio NBRIP (tanto sólido como líquido). La cuantificación de fosfato se realizó mediante el método colorimétrico de vanadomolibdato según Pearson (1976). Como control positivo se utilizó a la cepa solubilizadora de fosfato *Pseudomonas fluorescens* BNM 233, la cual es actualmente utilizada como biofertilizante (Okon et al. 2015).

Producción de ácido indol acético (AIA)

Detección bioquímica

La cantidad de AIA producido por *Methylobacterium* sp. 2A se calculó utilizando el método de Salkowski (Ehmann, 1977). Las cepas productoras de AIA *Azospirillum brasilense* Az39 y *Pantoea* sp. fueron utilizadas como controles positivos (Díaz Herrera et al. 2016). Dichas cepas se cultivaron en LB líquido con la adición de triptófano (Trp) (0,1 mg.ml⁻¹) y fueron incubadas a 28°C durante 3, 4 o 5 días. Luego, se centrifugaron alícuotas de 2 ml y se tomaron muestras de sobrenadante (1 ml) las cuales fueron mezcladas con 1 ml de reactivo de Salkowski (0,5 FeCl₃ 2% en una solución de H₂SO₄ 35%) y mantenidas en oscuridad. Se registró la densidad óptica (DO) a 530 nm después de 30 min.

Inoculación de plantas de tomate con la construcción *DR5:GUS*, funcional para monitorear la respuesta a auxinas

Semillas de tomate var. Microtom WT y *DR5:GUS* fueron desinfectadas superficialmente y sembradas en medio de multiplicación MS 0,5X (ver Anexo) durante 7 días. Luego, las raíces se inocularon con 10 µl de *Methylobacterium* sp. 2A (DO₆₀₀ 0,05 en NaCl al 0,85%) o sólo con solución salina (no inoculada) y a los 10 días post-inoculación (dpi) se llevaron a cabo análisis histoquímicos y fluorométricos de acuerdo a lo detallado en **Materiales y Métodos del Capítulo I, parte I**. Dichas plantas se mantuvieron en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo DL.

Inoculación de plantas de *Arabidopsis* *iaa19*, mutante defectuosa en la formación de raíces laterales

Se seleccionaron plántulas de *Arabidopsis* Col-0 *iaa19* de una semana de edad que presentaban un desarrollo similar; las mismas fueron establecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X. Se inocularon las raíces con 2 µl de suspensión de *Methylobacterium* sp. 2A (DO₆₀₀ 0,05 en NaCl al 0,85%) y se cuantificó el número de raíces laterales a los 4 y 7 dpi.

RESULTADOS

Características generales de *Methylobacterium* sp. 2A

A partir de raíces de plantas de papa establecidas *in vitro* se logró aislar y caracterizar a un bacilo Gram negativo (Figura 50 A), al cual denominamos "aislamiento 2A". Sus colonias circulares presentan una pigmentación rosada, alcanzando un diámetro promedio de 0,2 mm después de 3 días de incubación, lo que denota un crecimiento lento (Figura 50 B).

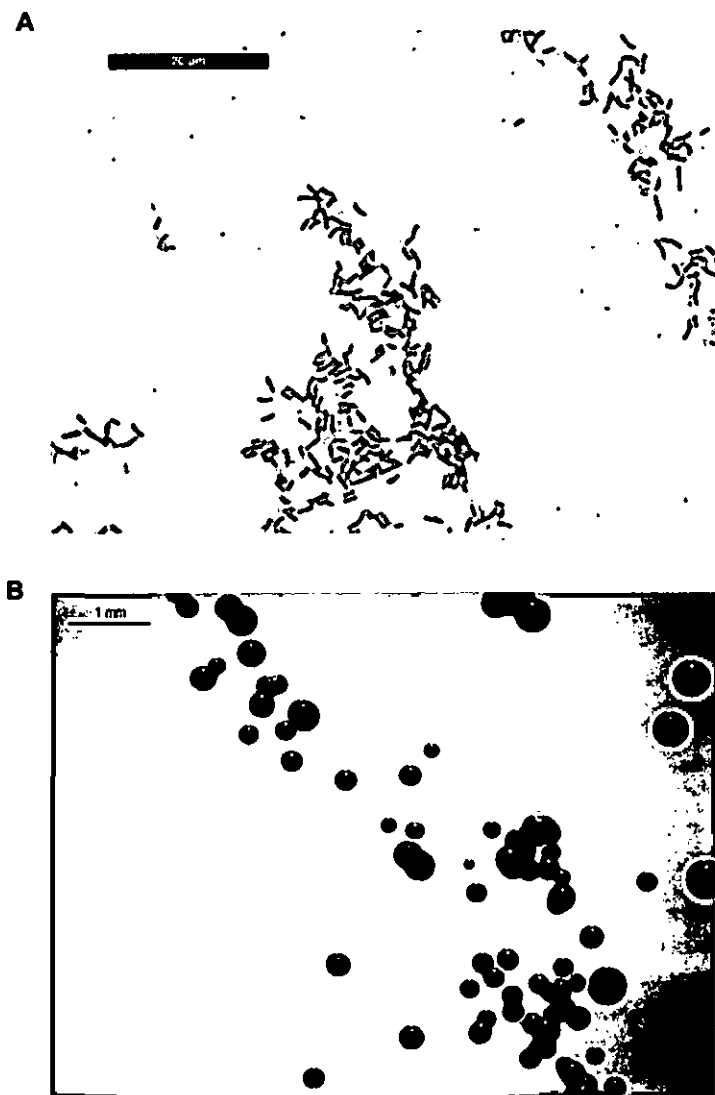


Figura 50. Aspecto microscópico (A) y macroscópico (B) de colonias de *Methylobacterium* sp. 2A crecidas en medio LB sólido, 3 días a 28°C. Las colonias son de color rosa debido a la presencia de carotenoides los cuales actúan como agentes fotoprotectores.

Este aislamiento presentó mayor crecimiento a 28°C en aquellos medios de cultivo que contenían extractos de plantas (PDA, PSA y RSA, ver Anexo) mientras que el crecimiento en LB fue menor. Logró crecer en medio mínimo M9 suplementado con ácido L-glutámico, glicerol o sacarosa como únicas fuentes de carbono pero no en M9 suplementado con sorbitol, manitol o citrato de sodio. Creció en un rango de pH entre 5 y 7, siendo 6 el valor de pH óptimo (Tabla 2). Las reacciones de oxidasa y CAT fueron positivas. Se evidenció resistencia a los antibióticos higromicina (10 µg/µl), ampicilina y cloranfenicol (20 µg/µl), sin embargo, este aislamiento fue sensible a cefotaxima, estreptomycin, rifampicina y kanamicina.

Inferencia filogenética mediante la secuencia ADN ribosomal 16S

Se obtuvo la secuencia de ADNr 16S casi completa (1.218 nt; número de acceso de GenBank: MG818293.1) que fue utilizada para el análisis comparativo frente a otras secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Dicha comparación indicó que este aislamiento pertenece al género *Methylobacterium*, familia Methylobacteriaceae, orden Rhizobiales. Además, la comparación de esta secuencia contra la base de datos EzBioCloud reveló que la secuencia de ADNr 16S de *Methylobacterium* sp. 2A comparte una alta similitud de secuencia (>97%) con catorce especies validadas del género (Tabla 1).

Orden	Nombre	Cepa	Similitud (%)	Mismatch/ Total nt	Cobertura (%)	Nº acceso
1	<i>M. longum</i>	440	99,10	11/1218	100	FN868949
2	<i>M. phyllostachyos</i>	BL47	99,10	11/1218	100	jgi.1071174
3	<i>M. radiotolerans</i>	JCM 2831	98,85	14/1218	100	CP001001
4	<i>M. phyllosphaerae</i>	CBMB27	98,77	15/1218	100	CP015367
5	<i>M. tardum</i>	RB677	98,77	15/1218	99,86	AB252208
6	<i>M. oryzae</i>	CBMB20	98,60	17/1218	100	CP003811
7	<i>M. fujisawaense</i>	DSM 5686	98,52	18/1218	99,86	AB175634
8	<i>M. pseudosasicola</i>	BL36	98,11	23/1218	100	jgi.1071178
9	<i>M. mesophilicum</i>	JCM 2829	98,03	24/1218	100	D32225
10	<i>M. brachiatum</i>	B0021	98,03	24/1218	99,86	AB175649
11	<i>M. trifolii</i>	TA73	97,37	32/1218	95,95	FR847848
12	<i>M. gregans</i>	002-074	97,36	32/1214	99,86	AB252200
13	<i>M. hispanicum</i>	GP34	97,21	34/1217	99,57	AJ635304
14	<i>M. jeotgali</i>	S2R03-9	97,04	36/1218	98,08	DQ471331

Tabla 1. Lista de secuencias que mostraron >97% de similitud con *Methylobacterium* sp. 2A en la base de datos EzBioCloud 16S.

La construcción del árbol filogenético a partir de la secuencia ADNr 16S (Figura 51) indicó que este aislamiento está más estrechamente relacionado con *Mb. fujisawaense*, *Mb. phyllosphaerae*, *Mb. oryzae*, *Mb. radiotolerans*, *Mb. tardum*, *Mb. longum* y *Mb. phyllostachyos* (similitud de secuencia de entre 98,52 - 99,10%).

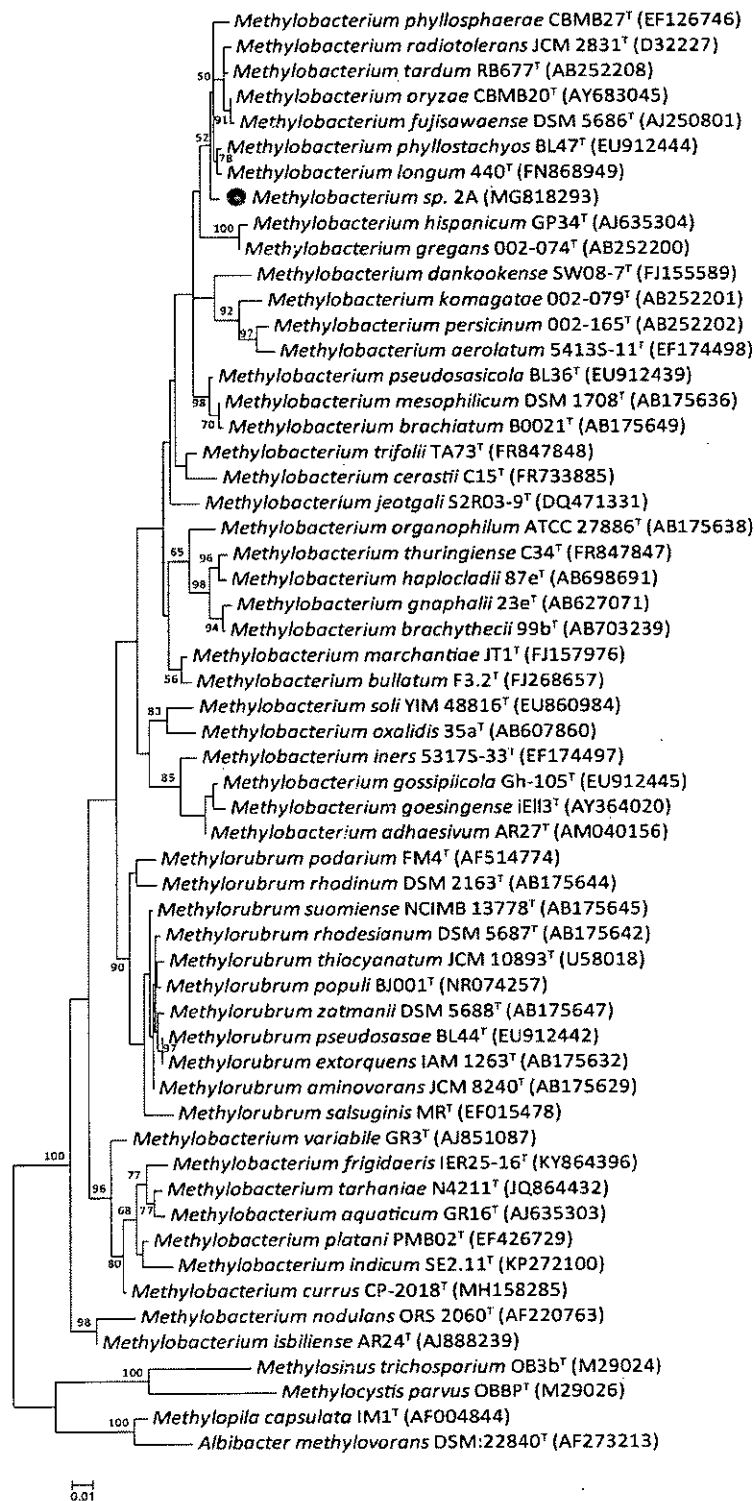


Figura 51. Árbol filogenético del aislamiento *Methylobacterium* sp. 2A y otros representantes de los géneros *Methylobacterium* y *Methylorubrum* basado en la comparación de la secuencia del gen ADNr 16S. El árbol de máxima verosimilitud se reconstruyó utilizando el modelo de dos parámetros Kimura. Las frecuencias con las que apareció una rama dada en 1000 repeticiones se indican en los nodos. No se muestran valores inferiores al 50%. Los números de acceso se indican entre paréntesis. *Methylobacterium* sp. 2A está indicado con un punto rosa. Se incluyen once especies recientemente reclasificadas en el nuevo género *Methylorubrum* y cuatro miembros de la familia Methylocystaceae que fueron utilizados como *outgroup*.

A través de una revisión bibliográfica, se compararon algunas características de *Methylobacterium* sp. 2A tales como la pigmentación de sus colonias, su tamaño celular, las condiciones de crecimiento y las reacciones de CAT y oxidasa, con las de las especies más próximas filogenéticamente a través de una revisión bibliográfica (Tabla 2). Pese a haber sido aisladas de diferentes fuentes, todas las cepas fueron positivas para las reacciones de CAT y oxidasa, presentaron una pigmentación similar y compartieron varias condiciones de crecimiento.

Característica	1	2	3	4	5	6	7
Descrita en	Este estudio	Madhalyan et al. 2007	Ito and Ilizuka, 1971	Madhalyan and Poonguzhalli 2014	Knleff et al. 2012	Kato et al. 2008	Madhalyan et al. 2009
Fuente de donde se aisló	Raíces de papa	Vástago de arroz	Granos de arroz	Hoja de bambú	Hoja de Arabidopsis	Agua	Hoja de arroz
Morfología							
Pigmentación de la colonia	Rosa a rojo	Rosa a rojo	Rosa a rojo	Rosa a rojo	Rosa claro	Rosa	Rosa a rojo
Largo célula (µm)	1,6–2,8	2,1–2,8	1,4–2,5	1,3–2,5	2,4–12,2	1,3–2,1	1,8–2,7
Ancho célula µm)	0,2–0,4	0,6–0,8	0,6–0,8	0,4–0,7	1,2–2,1	2,0–5,1	0,63–0,64
Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Catalasa	Positivo	Positivo	SD	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Condiciones de crecimiento							
Temperatura de crecimiento (°C)							
Rango	20–30	20–30	ND	20–37	4–28	15–35	20–30
Óptimo	28	28	20–32	28	ND	30	28
Rango pH	5,0–7,0	5,0–10,0	6–8	5,0–9,0	5,5–7,6	SD	5,0–9,0

Tabla 2. Características diferenciales de *Methylobacterium* sp. 2A y sus vecinos filogenéticos más cercanos. Cepas: 1, *Methylobacterium* sp. 2A; 2, *Mb. oryzae* CBMB20T; 3, *Mb. radiotolerans* IAM 12098T; 4, *Mb. phyllostachyos* BL47T; 5, *Mb. longum* DSM 23933; 6, *Mb. tardum* RB677; 7, *Mb. phyllosphaerae* CBMB27. SD, sin datos.

Características generales del genoma de *Methylobacterium* sp. 2A

Nuestras observaciones iniciales (ver Figura 7 en la Introducción general) sugerían que este aislamiento tenía el potencial de ser un PGPR, por lo que decidimos

secuenciar su genoma para identificar los genes que podrían ser responsables de este efecto. *Methylobacterium* sp. 2A posee una secuencia genómica de 6.395.352 pb de longitud con un contenido de G+C de 69.34% en moles. En total fueron predichas 6.142 secuencias de ADN codificante (CDS) y cincuenta y cinco ARN estructurales (55 tRNA); 2.022 (33%) se clasificaron como hipotéticos y 2.419 CDS (40%) se asignaron a subsistemas RAST (**Figura 52**). Además, utilizando el archivo GenBank del genoma anotado como entrada, el software Pathologic asignó automáticamente 306 rutas metabólicas y 2.116 reacciones enzimáticas, las cuales fueron exploradas en detalle.

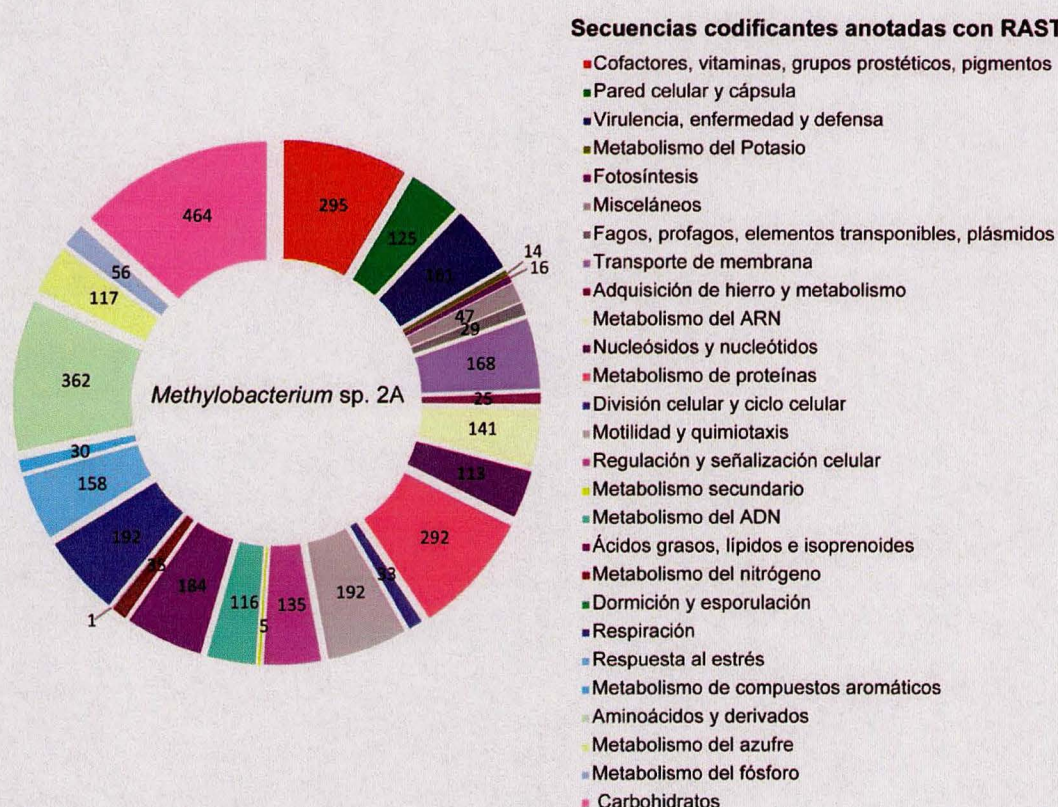


Figura 52. Las secuencias codificantes anotadas fueron agrupadas en subsistemas identificados por RAST. El número de genes está indicado en todas las categorías.

Inferencia filogenética mediante la comparación del genoma completo contra otros representantes del género *Methylobacterium*

La posición filogenética de *Methylobacterium* sp. 2A dentro del género se definió utilizando el software CSI Phylogeny 1.4 (**Figura 53**) el cual infiere la filogenia a partir del concatenado y posterior alineamiento de SNPs de genomas completos mediante un algoritmo de máxima verosimilitud.

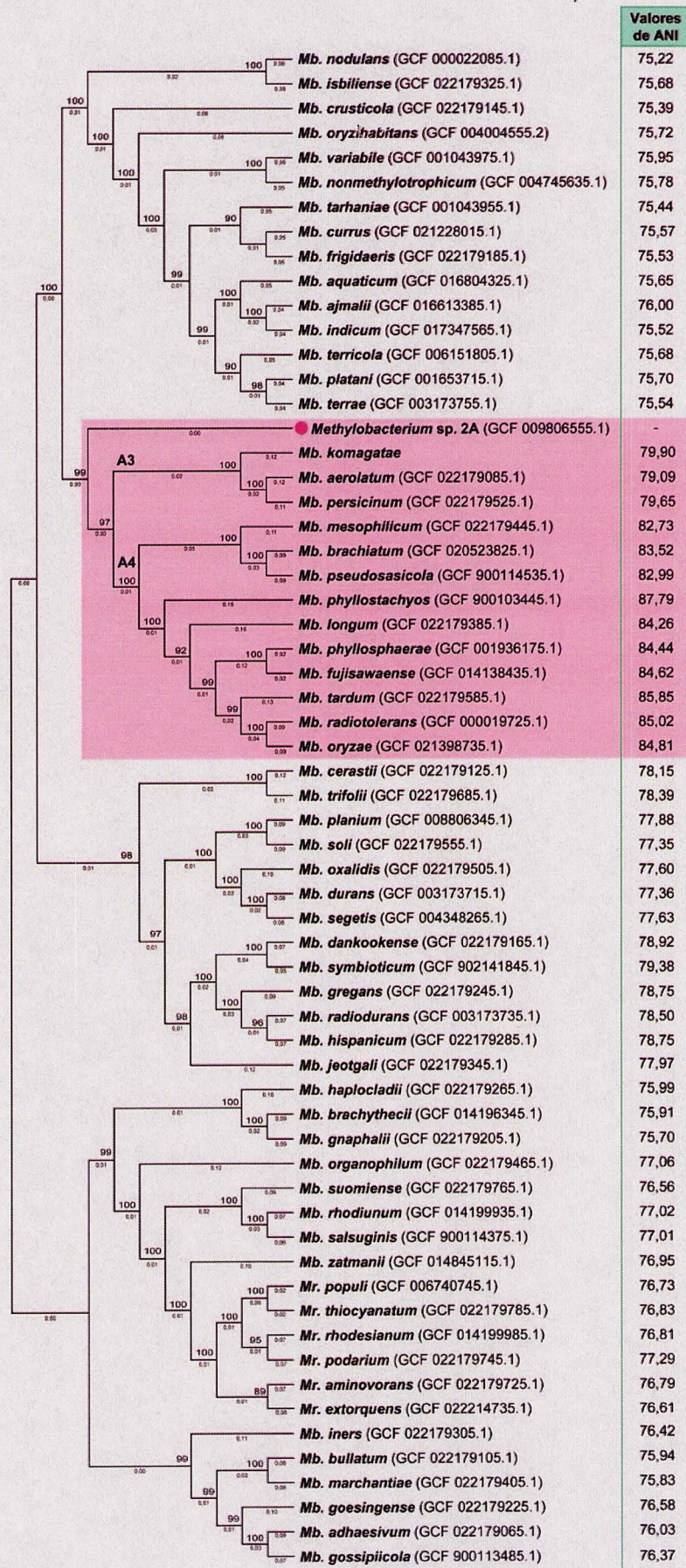


Figura 53. Árbol filogenético del aislamiento *Methylobacterium* sp. 2A y otros representantes de los géneros *Methylobacterium* (Mb) y *Methylobacterium* (Mr) basado en la comparación de los genomas. El árbol de máxima verosimilitud se reconstruyó mediante el software CSI Phylogeny. Las frecuencias con las que apareció una rama dada en 100 repeticiones se indican en los nodos. No se muestran valores inferiores al 50%. *Methylobacterium* sp. 2A está indicado con un punto rosa. Los números de acceso se indican entre paréntesis. En el panel derecho se encuentran los valores de ANI para cada especie respecto a *Methylobacterium* sp. 2A.

En Octubre de 2021, Alessa et al. completaron la filogenia del género *Methylobacterium* al secuenciar 29 genomas de especies publicadas. Es por esto que para este análisis se tuvieron en cuenta los genomas de 61 especies comprendidas dentro del género. Este resultado es concordante con los grupos filogenéticos definidos por Alessa et al. (2021); *Methylobacterium* sp. 2A forma un nodo basal estrechamente relacionado a los grupos A3 y A4 con los cuales conforma un grupo monofilético con 99% de soporte estadístico. Los valores obtenidos de ANI entre *Methylobacterium* sp. 2A y los otros representantes del género fueron más bajos que el umbral establecido de 95% de ANI para el límite de especies procariotas (Chun et al. 2018); el valor máximo de ANI obtenido fue del 87,7% entre *Methylobacterium* sp. 2A y *Mb. phyllostachyos*. Además, el valor de DDH in silico entre *Methylobacterium* sp. 2A y *Mb. phyllostachyos* fue de 37%, este valor al ser menor a 70% indicaría que no pertenecen a la misma especie. Estos resultados respaldan que *Methylobacterium* sp. 2A representa el primer genoma de una nueva especie.

Predicción de islas genómicas

Se predijeron 26 IG que representan 8,6% del genoma completo (**Figura 54 A**). Dentro de las islas hay 473 genes que codifican proteínas de los cuales 177 genes codifican proteínas de función no asignada y 32 genes codifican proteínas relacionadas con transposones. Los genomas microbianos están sujetos a pérdidas y a ganancias de material genético de otros microorganismos (Boto, 2010; Puigbo et al. 2014). El intercambio de material genético es un impulsor clave de la evolución microbiana que permite una rápida adaptación (Boucher et al. 2011). La IG 22 (**Figura 54 B**) tiene una longitud de 6.225 pb; interesantemente, posee la secuencia correspondiente a la proteína de nodulación *noI*O, la cual tiene un 69,95% de identidad con *Pirellulales bacterium*. Al analizar esta región genómica se encontró que dicha secuencia se encuentra flanqueada por una transposasa IS701 que tiene un 95,39% de identidad con el género *Methylobacterium* y por una proteína hipotética que tiene un 59,39% de identidad con *Planctomycetes bacterium*.

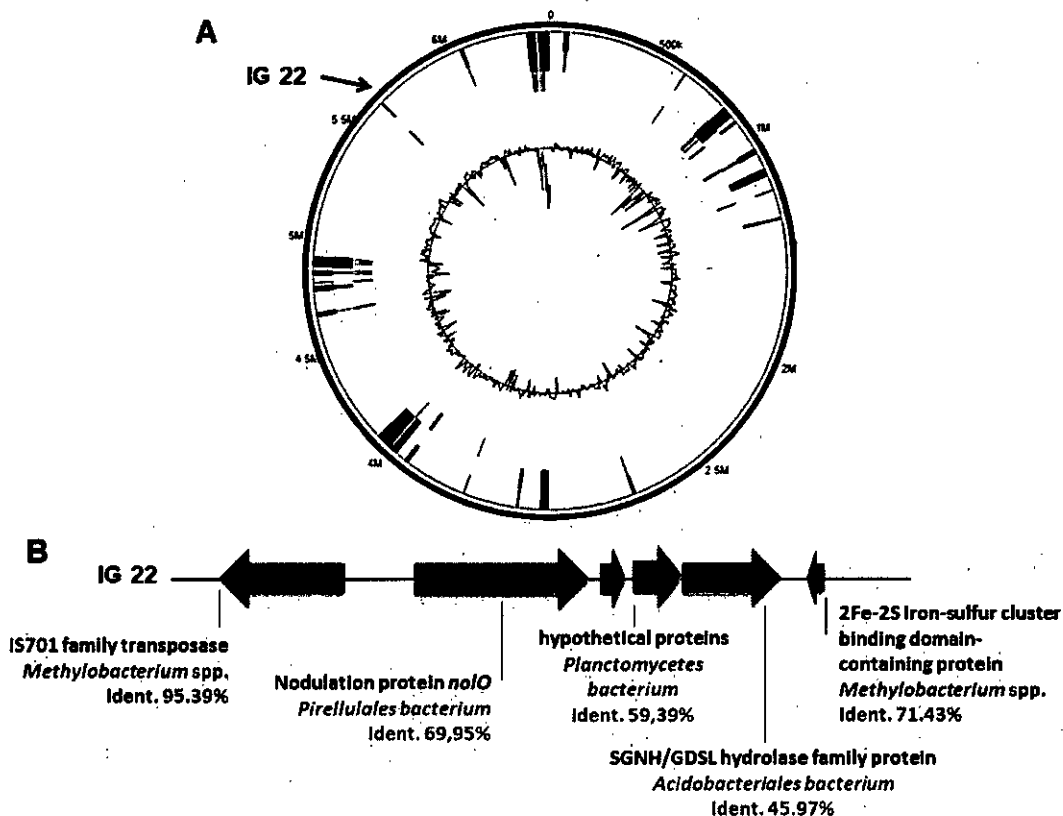


Figura 54. El genoma de *Methylobacterium* sp. 2A posee 26 IG. (A) El primer círculo en rojo muestra los resultados integrados, el segundo círculo en azul y el tercer círculo en amarillo muestran la predicción realizada por IslandPath-DIMOB y por SIGI-HMM respectivamente. El cuarto círculo muestra el diagrama de GC. Se encuentra señalada la isla genómica 22. **(B)** Estructura de la IG 22. Se muestra la posición relativa y el origen putativo de cada gen.

La explicación más parsimoniosa de la aparición del gen *noI* en *Methylobacterium* sp. 2A es su adquisición via transferencia horizontal de una cepa ancestral que podría haber sido *Pirellulales bacterium*.

Genómica comparativa de *Methylobacterium* sp. 2A y familiares cercanos a través del enfoque pangenómico

El cálculo del pangenoma nos permitió identificar aquellos genes únicos de *Methylobacterium* sp. 2A y de cada especie incluida en el análisis, el genoma núcleo (genes encontrados en todos los genomas analizados) y el genoma prescindible (genes presentes en dos o más cepas). Se identificó un genoma núcleo de 3584 genes y 724 genes son exclusivos de *Methylobacterium* sp. 2A (**Figura 55**). Por otra parte, las categorías COG Mobiloma (X), Mecanismos de defensa (V) y Biosíntesis de metabolitos secundarios (Q) están sobrerrepresentadas en *Methylobacterium* sp. 2A.

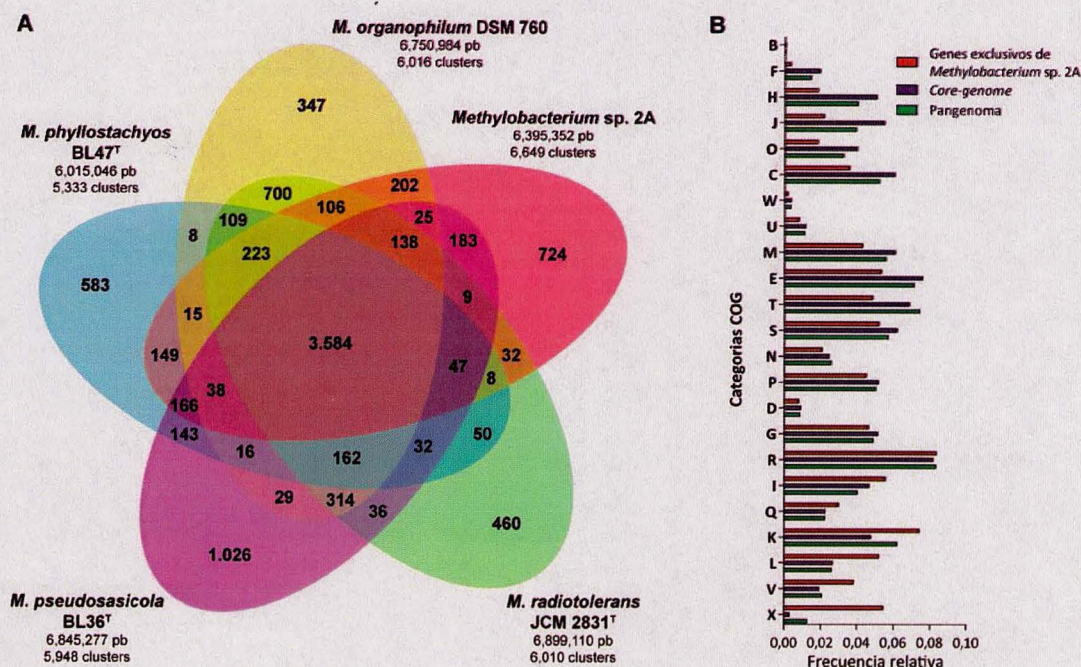


Figura 55. Cálculo del pangenoma (A) Diagrama de Venn que ilustra el número de grupos de genes únicos y compartidos entre la cepa *Methylobacterium* sp. 2A y cuatro de cepas tipo relacionadas. **(B)** Comparación funcional de las categorías COG entre el pangenoma analizado. A saber, B: Estructura y dinámica de la cromatina, F: Metabolismo y transporte de nucleótidos; H: Metabolismo de coenzimas, J: Traducción; O: Modificación postraduccional, recambio de proteínas, funciones de chaperonas, C: Producción y conversión de energía, W: Estructuras extracelulares, U: Tráfico y secreción intracelular, M: Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, E: Metabolismo y transporte de aminoácidos, T: Transducción de señales, S: Función desconocida, N: Motilidad celular, P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos, D: Control del ciclo celular y mitosis, G: Metabolismo y transporte de carbohidratos, R: Solo predicción funcional general, I: Metabolismo de lípidos, Q: Estructura secundaria, K: Transcripción, L: Replicación y reparación, V: Mecanismos de defensa, X: Mobiloma.

Atributos asociados a la promoción del crecimiento vegetal en el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A y validación de habilidades PGP

En el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A se encontraron genes relacionados a la quimiotaxis y motilidad: hay 52 genes que codifican las proteínas quimiotácticas aceptoras de metilo (MCP, *methyl-accepting chemotaxis proteins*), los genes *cheV* y *cheY* y el *cluster* de genes *cheAWRB*. El gen *cheA*, regulador de la respuesta a la quimiotaxis, es esencial para la motilidad hacia los exudados de la raíz (de Weert et al. 2002). Además, presenta 31 genes flagelares agrupados en al menos cinco grupos (**Anexo, Tabla A3**). Al igual que otras bacterias

metilotróficas, *Methylobacterium* sp. 2A contiene en su genoma el cluster *mx*a (12.475 pb) responsable de la oxidación del metanol. Además, se encontraron varios genes atribuibles a rasgos PGP (**Figura 56 y Anexo, Tabla A3**). Identificamos las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de L-triptófano, precursor de la auxina (AIA), las cuales están codificadas por siete genes (*trpA-G*) como en todos los genomas microbianos. En *Methylobacterium* sp. 2A, los genes *TrpEGDC* se agrupan en un operón, mientras que los genes *trp A, B* y *F* no están conectados.

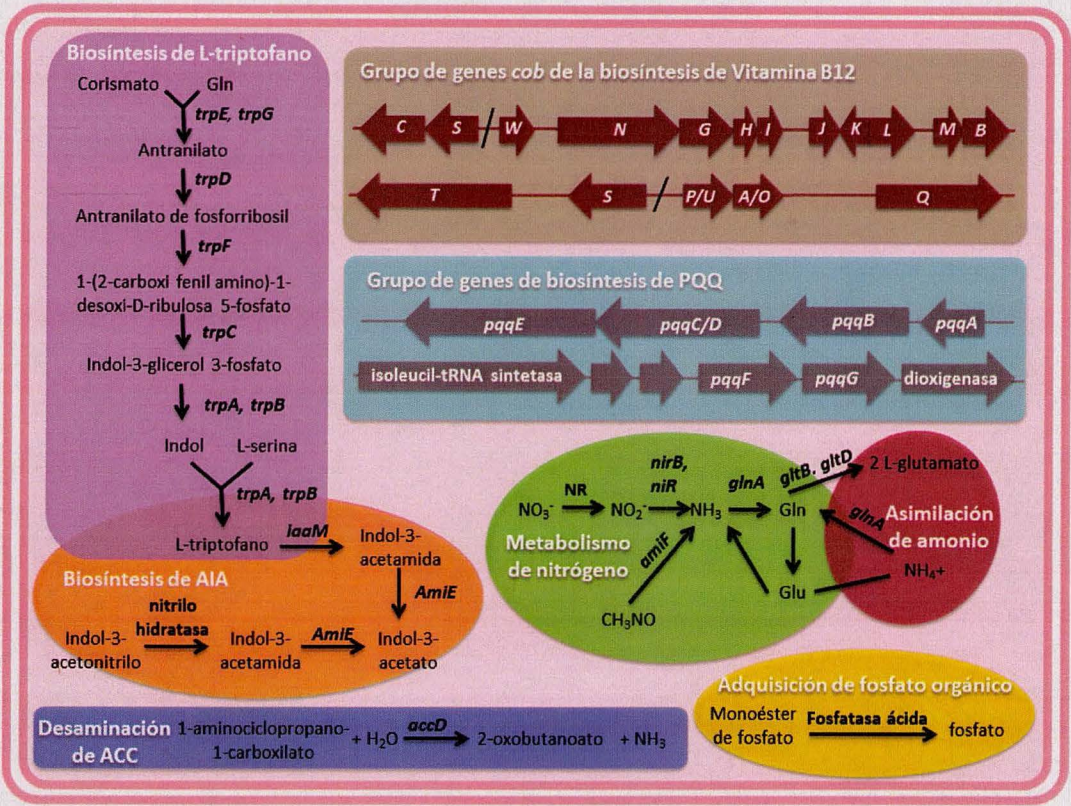


Figura 56. El genoma de *Methylobacterium* sp. 2A contiene genes que pueden contribuir a la estimulación del crecimiento de las plantas y la fertilización. Se muestran las vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de L-triptófano e AIA, y las rutas de asimilación del metabolismo de N₂ y el amoníaco. Los grupos de genes *cob* implicados en la biosíntesis de vitamina B12 y los operones de pirroloquinolina quinona (PQQ) están indicados. PQQ es un cofactor de GDH, involucrado en la solubilización de fosfato. Se incluyen reacciones de desaminación ACC y adquisición de fosfato orgánico. La anotación de genes, el número EC y los nombres de genes KEGG de las enzimas mencionadas en el diagrama se enumeran en el **Anexo, Tabla A3**.

Se identificaron dos vías de biosíntesis de AIA: la vía del indol-3-acetamida (IAM) y la del indol-3-acetonitrilo (IAN). La vía IAM consta de dos pasos en los que el L-triptófano se convierte primero en IAM mediante la enzima triptófano-2-

monooxigenasa (*laaM*), y luego IAM se convierte en AIA mediante una amidasa alifática (*AmiE*). En la vía de IAN, el IAN se puede convertir primero en IAM por la hidrilasa de nitrilo y luego la IAM se convierte en AIA por una amidasa alifática. Además, se ha sugerido la existencia de una enzima nitrilasa para convertir IAN a AIA directamente sin el paso intermedio del IAM. La producción de AIA fue confirmada utilizando el reactivo Salkowski. De hecho, *Methylobacterium* sp. 2A produjo niveles más altos de AIA que *A. brasilense* Az39 y que una cepa de *Pantoea* sp. (Figura 57) lo cual correlaciona estrechamente con el aumento observado en el desarrollo de los pelos radiculares en papa (ver Figura 7 de la Introducción general).

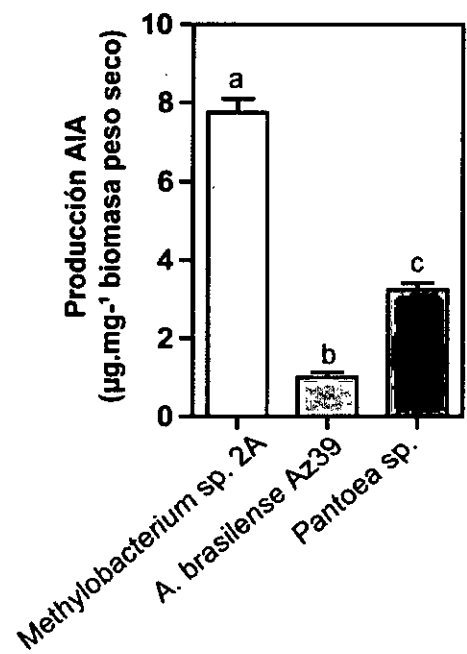


Figura 57. Evaluación de la producción de AIA. *Methylobacterium* sp. 2A produjo cantidades más altas de AIA que *A. brasilense* Az39 y *Pantoea* sp., cepas utilizadas como controles positivos.

Como muchas PGPR asociadas con raíces de plantas, *Methylobacterium* sp. 2A contiene el gen que codifica la ACC desaminasa.

Se ha sugerido que la cobalamina (vitamina B12) estimula el desarrollo de las plantas y podría sintetizarse a través de vías de rescate o *de novo*. Para la biosíntesis *de novo* se requieren más de treinta pasos enzimáticos, mientras que la vía de rescate es una forma rentable para las bacterias (Palacios et al. 2014). En el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A se identificaron todos los genes involucrados en la biosíntesis aeróbica *de novo* (Anexo, Tabla A3); algunos de ellos están agrupados en grupos de genes: *cobP/UA/OQ*, *cobST*, *cobSC* y *cobWNGHIJKLMB* (Figura 56).

Methylobacterium sp. 2A alberga dos copias de *cobS*. En las bacterias Gram negativas, los corrinoideos exógenos se transportan a la célula a través de un sistema de transporte de *casette* de unión a ATP (ABC) que consiste en genes *Btu*. Se identificaron los genes *BtuB*, *BtuC* y *BtuN* que codifican los receptores, lo que sugiere que esta cepa también puede sintetizar cobalamina mediante la absorción de corrinoideos a través de la vía de recuperación (**Anexo, Tabla A3**).

Por otro lado, *Methylobacterium* sp. 2A presenta los genes reguladores de dos componentes involucrados en la fijación de nitrógeno, *NtrBC* y *NtrXY* (**Anexo, Tabla A3**). Este sistema permite la supervivencia de la bacteria en un medio empobrecido en nitrógeno. De hecho, confirmamos que *Methylobacterium* sp. 2A puede crecer en medio NFb (**Figura 58**).

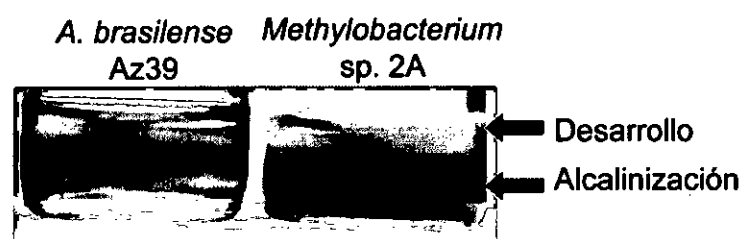


Figura 58. La capacidad de fijación de nitrógeno de *Methylobacterium* sp. 2A se infirió de su crecimiento en un medio de cultivo libre de nitrógeno (NFb). El cambio de pH observado fue similar al de la conocida bacteria fijadora de nitrógeno *A. brasilense*.

Se identificó en su genoma un regulador transcripcional de fijación de nitrógeno de dos componentes, *FixJ* y un gen *FixL*, junto con los genes *nifJ*, *nifP*, *nifS* y *nifU* (**Anexo, Tabla A3**); sin embargo, otros genes *nif* no fueron asignados por la anotación RAST. Además, alberga las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno y la asimilación de amonio (**Figura 56 y Anexo, Tabla A3**).

Además, hay cuatro genes de glucosa deshidrogenasa (*gdh*) presentes en el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A (**Anexo, Tabla A3**). La GDH requiere pirroloquinolina-quinona (PQQ) como cofactor redox para la oxidación directa de glucosa a ácido glucónico, que difunde y ayuda en la solubilización ácida de fosfatos minerales en el suelo. La síntesis de PQQ requiere la expresión de seis genes, *pqqA-G* (Puehringer et al. 2008). *Methylobacterium* sp. 2A alberga el operón completo *pqqABC/DE* donde *pqqC* y *pqqD* se fusionan en un único polipéptido designado *pqqC/D* (**Figura 56 y Anexo Tabla A3**) como en *Methylobacterium extorquens* AM1 (Toyama et al. 1997). En *M. extorquens*, el grupo que contiene *pqqF/G* es un grupo de

seis genes transcritos en la misma dirección donde el primero codifica una isoleucil tRNA sintetasa y el sexto una dioxigenasa (Zhang y Lidstrom 2003). En *Methylobacterium* sp. 2A identificamos esta misma región (Figura 56). La secuencia de ADN que codifica los últimos cinco genes compartió 84,65% de identidad con el grupo de *M. extorquens*. Además, existen tres tipos de enzimas microbianas que pueden solubilizar el fosfato orgánico: una fosfatasa ácida no específica, una fitasa y una liasa o fosfonatasa C-P. El genoma de *Methylobacterium* sp. 2A tiene tres genes que codifican fosfatasas ácidas las cuales pueden liberar fosfato del éster fosfórico o del anhídrido fosfórico (Figura 56).

La solubilización de fosfato es un rasgo importante para aumentar la disponibilidad y la absorción de nutrientes minerales para las plantas. A partir de los datos genómicos se pudo inferir que *Methylobacterium* sp. 2A es capaz de solubilizar fosfato, por lo que lo cultivamos en medios sólidos y líquidos NBRIP que contienen TCP. En los medios sólidos, se observó un halo amarillo indicativo de solubilización de fosfato alrededor de la colonia de *P. fluorescens* BNM 233 (cepa utilizada como control positivo) pero no alrededor de *Methylobacterium* sp. 2A. Por otro lado, cuando se cultivó en medios líquidos, *Methylobacterium* sp. 2A pudo solubilizar fosfato mineral pero en menor medida que el control positivo (Figura 59).

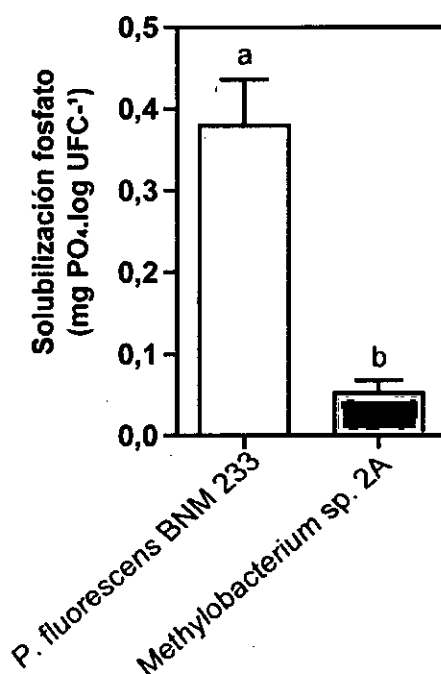


Figura 59. La solubilización de fosfato inorgánico se confirmó en medio líquido NBRIP. Se usó la cepa de *P. fluorescens* BNM 233 como control positivo. Se realizó un análisis

ANOVA de un factor y comparación múltiple con Test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Además, el análisis antiSMASH identificó diez genes asociados con la biosíntesis de terpenos en tres regiones genómicas: cuatro fitoeno sintasas, cuatro fitoeno desaturasas, una fitoeno ciclasa y una fitoeno deshidrogenasa. Informes recientes destacan la importancia ecológica de los terpenos microbianos emitidos por microorganismos beneficiosos que funcionan como compuestos orgánicos volátiles (mVOC) que alteran el desarrollo de las plantas (revisado en Schulz-Bohm et al. 2017).

Con respecto a la capacidad de *Methylobacterium* sp. 2A de producir compuestos antimicrobianos, se encontró en su genoma una quitinasa, un gen *PhzF* de biosíntesis de fenazina, dos genes involucrados en la síntesis de 4-hidroxibenzoato (la transferasa, *ubiA* y un transportador), una penicilina acilasa (*PAH*) y un gen *CvpA* que codifica la producción de colicina V. También se encontraron varias copias de los genes responsables de translocar las colicinas a través de la membrana (*TolA*, *TolB*, *TolC*, *TonB*) (**Anexo, Tabla A3**). Además, se localizaron los genes responsables de la biosíntesis de aerobactina y enterobactina (**Anexo, Tabla A3**). La presencia de un grupo de genes de biosíntesis de sideróforos (*lucABCD*) y una proteína transportadora de sideróforos se confirmó mediante análisis con el software antiSMASH. En cuanto a la resistencia a antibióticos, *Methylobacterium* sp. 2A tiene dos acetiltransferasas de cloranfenicol compatibles con la resistencia al cloranfenicol previamente observada, y un gen β -lactamasa que podría ser responsable de la resistencia a la ampicilina.

Además, su genoma codifica enzimas de eliminación de ROS que podrían aliviar el daño oxidativo: once CAT, dos glutatión reductasas, dos superóxido dismutasas y cinco peroxidasas, entre ellas, dos glutatión, un citocromo C y una peroxidasa de tiol (**Anexo, Tabla A3**).

Efecto de la inoculación de *Methylobacterium* sp. 2A en plantas de tomate con la construcción *DR5:GUS* y de *Arabidopsis iaa19*

Dado que se confirmó la capacidad de *Methylobacterium* sp. 2A de producir AIA (**Figura 57**) se llevó a cabo el análisis histoquímico y flurométrico de la actividad del promotor sintético *DR5* de respuesta a auxinas en plantas de tomate cultivadas *in vitro* inoculadas o no. A los 10 dpi se observaron las raíces al microscopio y se percibió un incremento en la coloración en las puntas de las raíces (**Figura 60 A**). Al

cuantificar la actividad específica de GUS se observó un incremento significativo en aquellas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A (Figura 60 B).

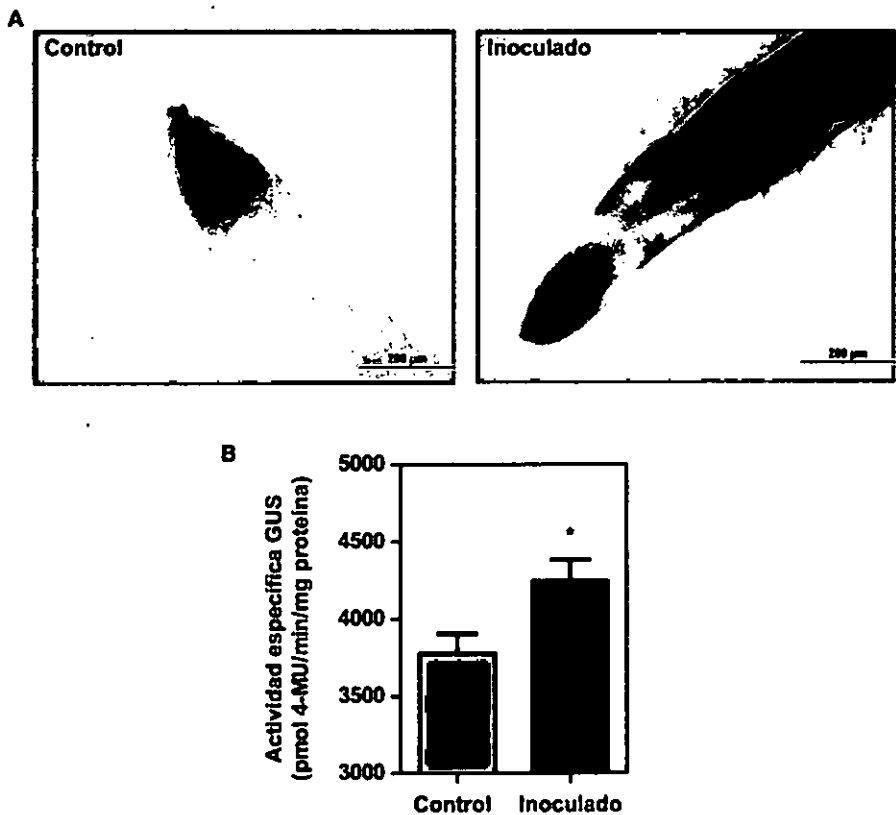


Figura 60. La inducción del promotor de respuesta a auxinas *DR5* se produjo frente a la inoculación con *Methylobacterium* sp. 2A (A) Análisis histoquímico de las raíces de plantas de tomate *DR5:GUS* a los 10 dpi. Barra: 200 µm. (B) Cuantificación de la actividad específica de GUS (pmol 4-MU/min/mg proteína). El análisis estadístico se realizó mediante prueba t (* = $p<0.05$).

Además, se inoculó una mutante de *Arabidopsis*, *iaa19*, que es defectuosa en la formación de raíces laterales debido a que es parcialmente insensible a auxinas; su fenotipo es reversible cuando se aplican auxinas exógenas (Tatematsu et al. 2004). Se cuantificó el número de raíces laterales en *iaa19* a los 4 y 7 dpi con *Methylobacterium* sp. 2A (Figura 61 A). Tras la inoculación, se observó un aumento significativo (37 y 44 % a los 4 y 7 dpi, respectivamente) en la formación de raíces laterales con respecto a las plántulas no inoculadas (Figura 61 B).

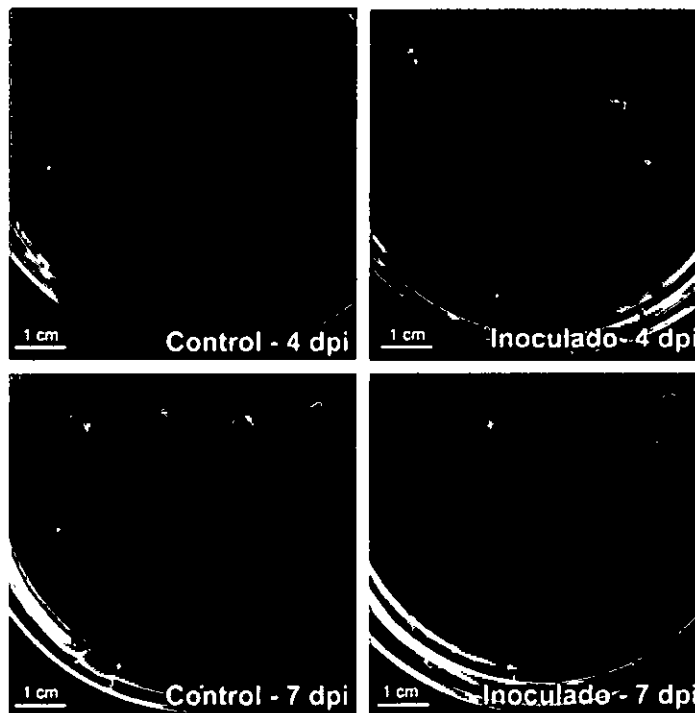
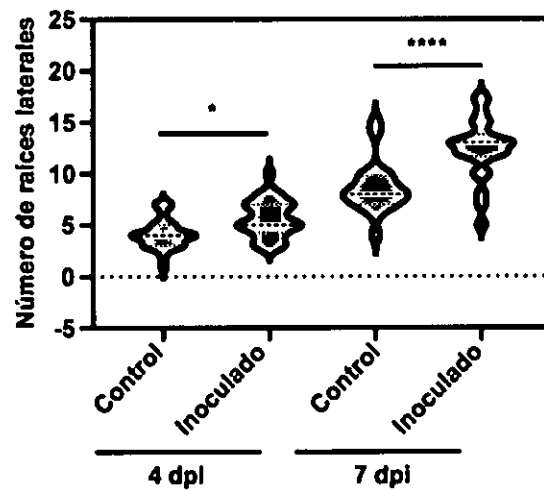
A**B**

Figura 61. (A) Imágenes representativas de las plantas de *Arabidopsis iaa19* que no fueron inoculadas (panel izquierdo) o que fueron inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A (panel derecho) a los 4 y 7 dpi. **(B)** El número de raíces laterales se cuantificó en dichos puntos de tiempo. Se realizó un análisis de ANOVA de un factor y comparación múltiple con Test de Tukey (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

CAPÍTULO II, PARTE II: “Estudio de la promoción del crecimiento vegetal y de su acción biocontroladora”

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de *Arabidopsis thaliana* wild-type Columbia (Col-0) fueron desinfectadas superficialmente y puestas a vernalizar a 4°C durante 2 días. Tras este período, fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio MS y fueron mantenidas en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo DL.

Inoculación de plantas de papa y de *Arabidopsis* con *Methylobacterium* sp. 2A y tratamiento de estrés salino

La inoculación de las plantas de papa con *Methylobacterium* sp. 2A se llevó a cabo *in vitro* por contacto entre raíces. Se micropopagaron en un mismo frasco de forma equidistante entrenudos de plantas de papa que mostraban una pigmentación rosada en la superficie de la raíz junto con entrenudos de plantas de papa que no mostraban presencia del microorganismo. La colonización bacteriana fue evidente a simple vista luego de dos semanas de cultivo en medio sólido MS. Los entrenudos de papa, inoculados o no con *Methylobacterium* sp. 2A, se cultivaron durante 21 días en medio MS sólido con la adición o no de 50 mM NaCl. El ensayo se realizó tres veces, utilizando para cada condición dos frascos con cuatro plantas cada uno (control, C; inoculado, I; estrés salino, S; plantas inoculadas con estrés salino, I + S). Al momento de la cosecha, tanto en el control como en el tratamiento salino, se determinó la longitud de la raíz y del vástago, el número de hojas y el contenido de clorofila; al medir la longitud de la raíz y del vástago no se consideró el entrenudo original. El contenido de clorofila se midió en las hojas completamente expandidas en unidades SPAD, utilizando un espectrofotómetro de clorofila portátil (Clorofilio®, Cavadevices, Argentina).

Para el ensayo se seleccionaron plántulas de *Arabidopsis* de una semana de edad que presentaban un desarrollo similar; las mismas fueron establecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X, o MS 0,5X con 75 mM NaCl (condición de estrés salino de acuerdo a Ruiz Carrasco et al. 2007). Tras 48 h de aclimatación estas plantas fueron inoculadas en forma de gota con 2 µl de solución salina estéril (control) o con una suspensión celular de *Methylobacterium* sp. 2A (DO_{600nm} : 0,05 en 0.85% NaCl).

Diez días después, se determinó el número de hojas y el diámetro de la roseta, y se cuantificó la densidad de raíces laterales en cada planta (número de raíces laterales/longitud de la raíz primaria). Para esto, se fotografiaron las placas de Petri; se midió la longitud de la raíz primaria y se contaron las raíces laterales utilizando el software ImageJ (Schindelin et al. 2012). Las muestras obtenidas al momento de la cosecha fueron almacenadas en nitrógeno líquido para estudios posteriores. Se obtuvieron extractos de proteínas y se determinó la actividad de la enzima CAT como se describe en Aebi (1984). La cuantificación de H_2O_2 se realizó de acuerdo con Junglee et al. (2014). El contenido de proteína fue estimado mediante la técnica de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Este ensayo se llevó a cabo tres veces utilizando dos placas con cinco plantas cada una para cada condición (control, C; Inoculado con *Methylobacterium* sp. 2A, I; estrés salino, S; Plantas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A y sometidas a estrés salino, I + S).

Ensayos de confrontación dual en placa

Los ensayos de cultivo dual se realizaron en los medios PDA o RSA. *Methylobacterium* sp. 2A fue estriado en la mitad de la placa y, después de 3 días de incubación a 25°C, un taco de 1 cm² obtenido de un cultivo en crecimiento activo del oomycete *P. infestans* o de los hongos *F. graminearum*, *B. cinerea*, *P. dissotocum* y *R. solani*, fue colocado en la otra mitad de la placa. Como control se utilizaron placas en las que solo se colocó el taco del hongo. Se reanudó la incubación en iguales condiciones durante 6 días. Finalmente, se comparó el crecimiento radial del micelio de las macrocolonias de los patógenos frente a la presencia de *Methylobacterium* (Ri) con el registrado en las placas control (Rc). La inhibición del crecimiento micelial se calculó de acuerdo con la fórmula: $(Rc-R)/Rc \times 100$ (Lahlali y Hijri, 2010)

Inoculación de plantas de papa con *Methylobacterium* sp. 2A y posterior infección con *P. infestans*

El aislamiento de *P. infestans* Pi-60, se cultivó de acuerdo a los descrito en el capítulo I parte 2. Se infectaron con *P. infestans* plantas de papa cultivadas *in vitro* durante cuatro semanas que habían sido previamente inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A. Se infectaron tres hojas por planta en la cara abaxial con una gota de 10 µl de suspensión de zoosporas. Para cada condición (Pi-60 e I + Pi-60) se utilizaron dos frascos con cinco plantas cada uno. A los 5 dpi, se observó el nivel de agresividad que ejerció el oomycete *P. infestans* sobre la planta (**Figura x**). El resultado obtenido *in vitro* nos alentó a realizar experimentos con plantas que

crecieron en invernadero; para ello, se rociaron plantas de papa de tres semanas de edad con una suspensión de células de *Methylobacterium* sp. 2A (DO_{600nm} : 0,05 en 0,85% NaCl), o con solución salina (control). La infección con Pi-60 se realizó dos días después; se inocularon 10 μ l de suspensión de esporangios o agua en el lado abaxial de los folíolos apicales de tres hojas por planta (dos gotas equidistantes por hoja). A los 5 dpi, las hojas fueron observadas y fotografiadas. Se contaron las lesiones necróticas y se utilizó el software ImageJ para medir el área de la lesión. El experimento se realizó dos veces, con tres plantas para cada condición (control, C; pre-inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A, I; infectado, Pi-60; pre-inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A e infectado, I + Pi-60).

Se recolectaron muestras de hojas y se determinaron los niveles de expresión de los genes *StPR-1b* (relacionado a la patogénesis 1b) y *StPAL* (fenilalanina amonio liasa). Las técnicas utilizadas fueron descritas en el Materiales y Métodos del Capítulo I.

RESULTADOS

Efecto de la inoculación de *Methylobacterium* sp. 2A en condiciones de salinidad

La salinidad afecta el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través del estrés hídrico; de la citotoxicidad debida a la absorción excesiva de iones Na^+ y Cl^- y el desequilibrio nutricional; además de que produce estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (revisado en Isayenkov y Maathuis, 2019).

Las plantas de papa se cultivaron *in vitro* en medio MS con o sin NaCl 50 mM durante 21 días. Se observó una fuerte inhibición del crecimiento del tallo y de la raíz, y una caída en la biomasa total, junto con una disminución significativa en el contenido de clorofila (unidades SPAD) y el número de hojas (**Figura 62 A-E**) en comparación con las condiciones de control (C vs. S). Por otro lado, cuando las plantas de papa fueron inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A y se cultivaron en condiciones de control (I) o de estrés salino (I + S), la inhibición observada en el tallo y en la longitud de la raíz, la disminución en el número de hojas y en la biomasa total fue menos severa (I vs. I + S). Además, el contenido de clorofila no se redujo. Al comparar entre plantas no inoculadas versus inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A en condiciones de sal (S vs. I + S), se observó una diferencia significativa en la mayoría de los parámetros, lo que indica que este aislamiento es capaz de mitigar el efecto negativo de la salinidad.

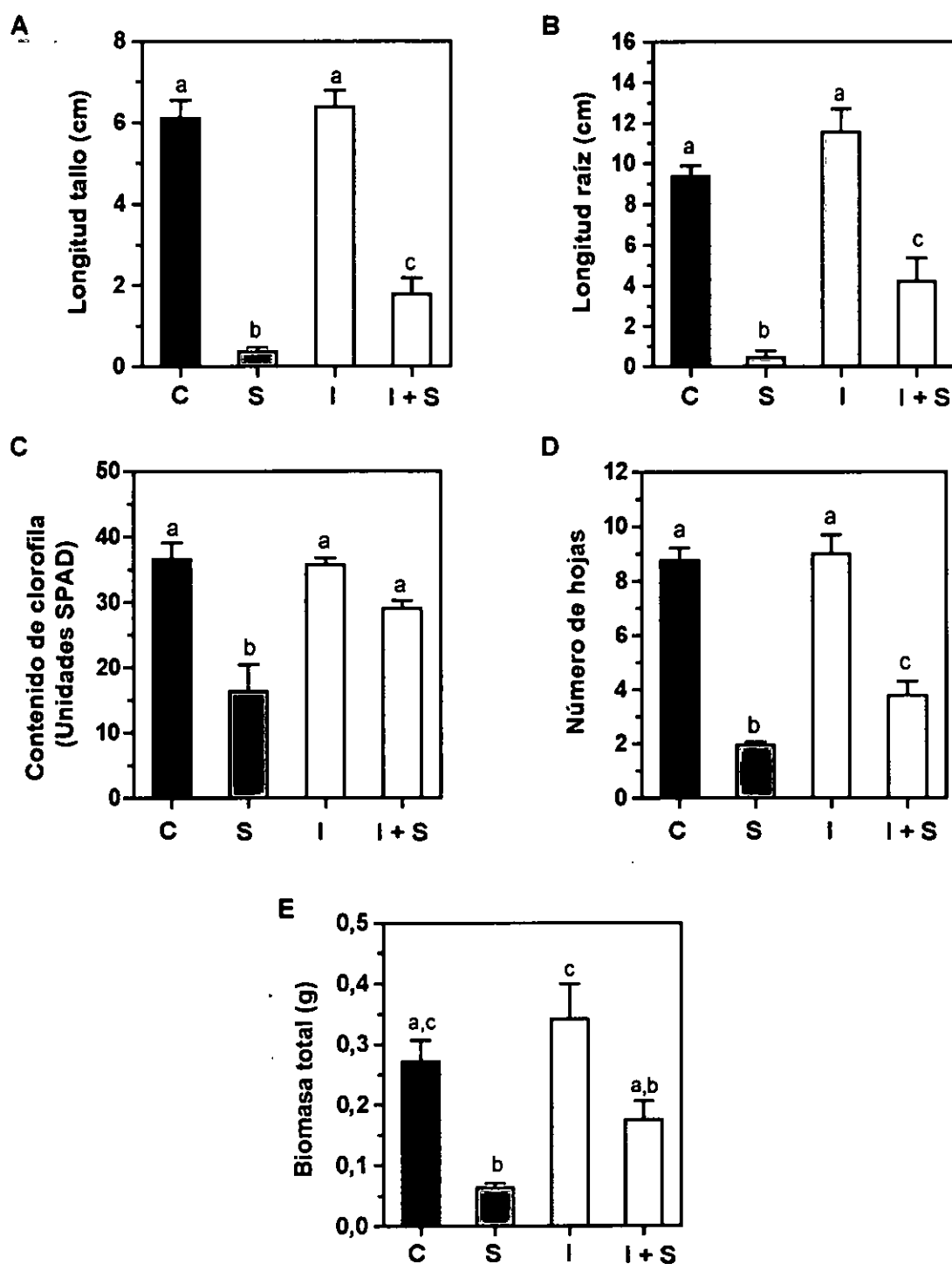


Figura 62. *Methylobacterium* sp. 2A mitiga el estrés salino en plantas de papa inoculadas. Se crecieron entrenudos de plantas *in vitro*, inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A, en medio MS sólido (C o I) o en medio MS con la adición de NaCl 50 mM (S o I + S). Se determinó la longitud del tallo (A) y de la raíz (B) (cm), el contenido de clorofila (C), el número de hojas (D) y la biomasa total (g) (E). Se muestra la media \pm el error estándar de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Se realizó un análisis de ANOVA de dos

factores y comparación múltiple con Test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, plántulas de *Arabidopsis* inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A se cultivaron bajo control o condiciones de estrés salino (**Figura 63 A-B**).

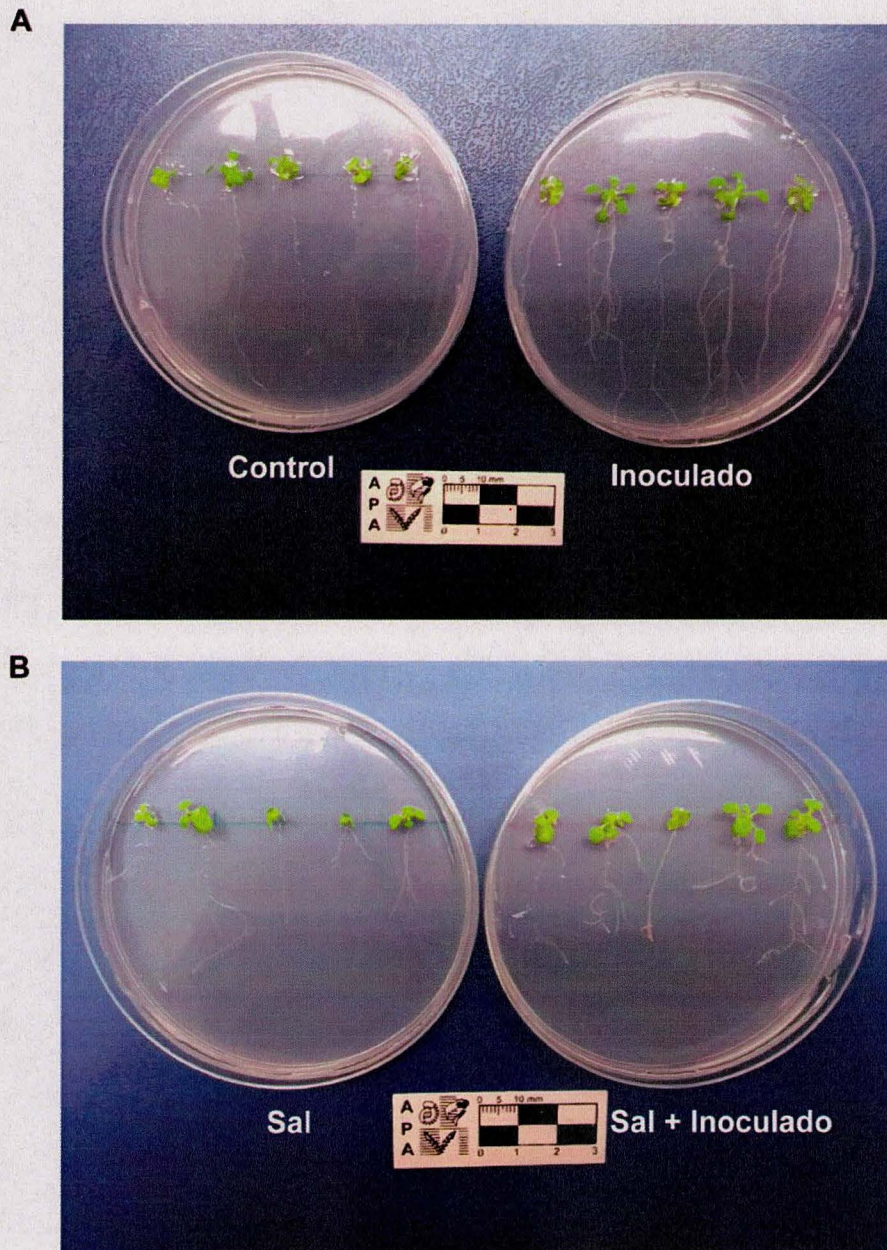


Figura 63. Imágenes representativas de plántulas de *Arabidopsis* crecidas *in vitro* en **(A)** condiciones control (MS 0,5%) y **(B)** salinas (MS 0,5X NaCl 75 mM) sin inocular (panel izquierdo) e inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A (panel derecho).

Se observó un aumento significativo en la densidad de las raíces laterales ($p < 0.05$) y en el número de hojas ($p < 0.01$) en aquellas plántulas que fueron inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A, tanto en condiciones de control como de estrés salino, en comparación con las no inoculadas (C vs. I y S vs. I + S) (**Figura 64 A-B**). La reducción observada en el diámetro de la roseta en plantas control bajo estrés salino (C vs. S) (**Figura 64 C**) no se observó cuando *Methylobacterium* sp. 2A estuvo presente (I vs. I + S).

Como se muestra en la **Figura 64 D**, se observó un aumento de seis veces en la actividad CAT cuando plántulas no inoculadas fueron expuestas a estrés salino (C vs. S). En cambio, este aumento fue poco relevante en las inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A expuestas a salinidad (C vs. I + S). Sin embargo, la actividad CAT aumentó tres veces en plántulas inoculadas crecidas en condiciones control (C vs. I).

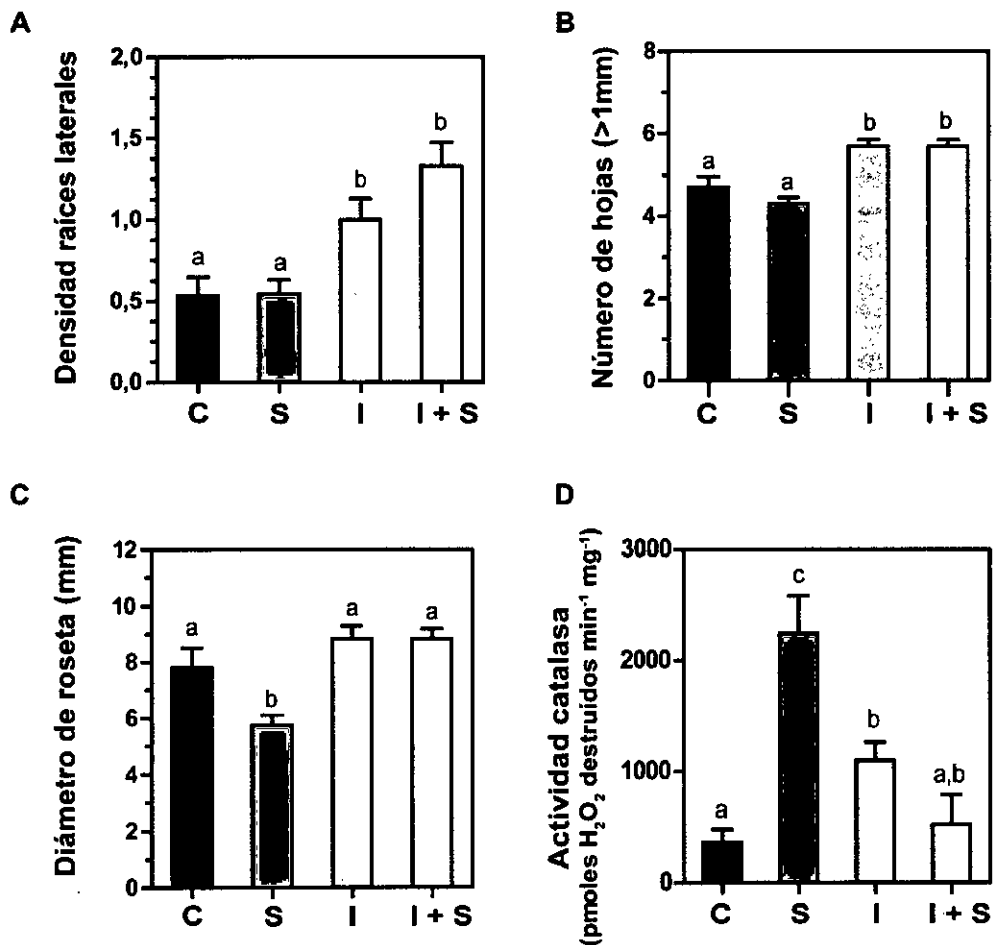


Figura 64. *Methylobacterium* sp. 2A mitiga el estrés salino en *Arabidopsis*. Las semillas de Col-0 se inocularon o no con *Methylobacterium* sp. 2A y se crecieron en medio MS sólido (C o

I) o en medio MS con la adición de NaCl 75 mM (S o I + S). Se determinó la densidad de las raíces laterales (A), el número de hojas (B), el diámetro de la roseta (mm) (C) y la actividad de la enzima catalasa (D). La actividad CAT se expresa como pmoles H_2O_2 destruidos $min^{-1} mg^{-1}$. Se trazó la media \pm el error estándar de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores y comparación múltiple con Test de Tukey. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El aumento observado en la actividad CAT en plantas estresadas (S) no fue suficiente para reducir el contenido de H_2O_2 , de hecho, estas plantas presentan cinco veces más H_2O_2 que las plantas en condiciones control (S vs C, $p = 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de peróxido entre las plántulas inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A crecidas en condiciones control (I vs C, $p = 0,656$) o bajo estrés salino (I+S vs C, $p = 0,651$). Además, se observó un contenido de peróxido similar en las plántulas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A cultivadas bajo condiciones de control o salinas (I vs I+S, $p = 0,796$). Nuestros resultados indican que este aislamiento puede ejercer un efecto protector frente a salinidad en diferentes especies de plantas.

Efecto antagonista de *Methylobacterium* sp. 2A

Para evaluar el efecto biocontrolador de esta cepa, se realizó un ensayo de confrontación en placa contra *B. cinerea*, *F. graminearum*, *R. solani*, *P. dissotocum* (Figura 65 A-D) y *P. infestans* (Figura 66 A).

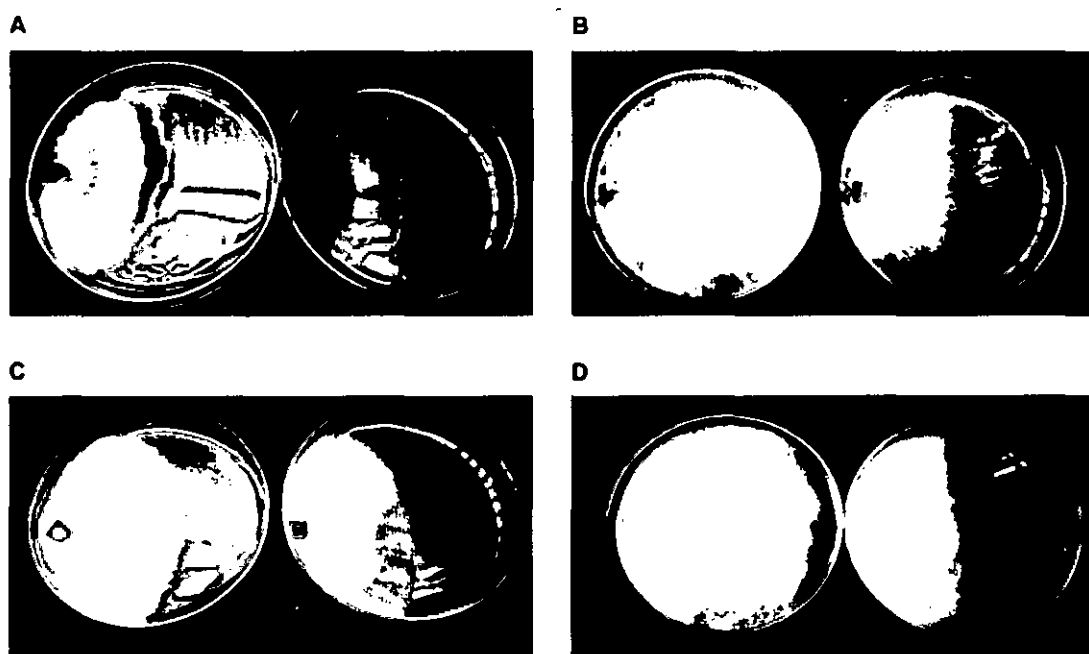


Figura 65. Imágenes ilustrativas que muestran el efecto antagonista de *Methylobacterium* sp. 2A contra diferentes patógenos de plantas en ensayos duales. Las imágenes corresponden a (A) *B. cinerea*, (B) *F. graminearum*, (C) *R. solani* y (D) *P. dissotocum*. Placa izquierda de cada imagen: patógeno; placa derecha: cultivo dual (patógeno + *Methylobacterium* sp. 2A).

Methylobacterium sp. 2A inhibió el crecimiento micelial de *P. infestans* (24,8%), *B. cinerea* (42,1%) y *Fusarium* sp. (34,7%). Por el contrario, no se observó ningún efecto notorio contra *R. solani* (7,2%) y *P. dissotocum* (1,2%) (Figura 66 B).

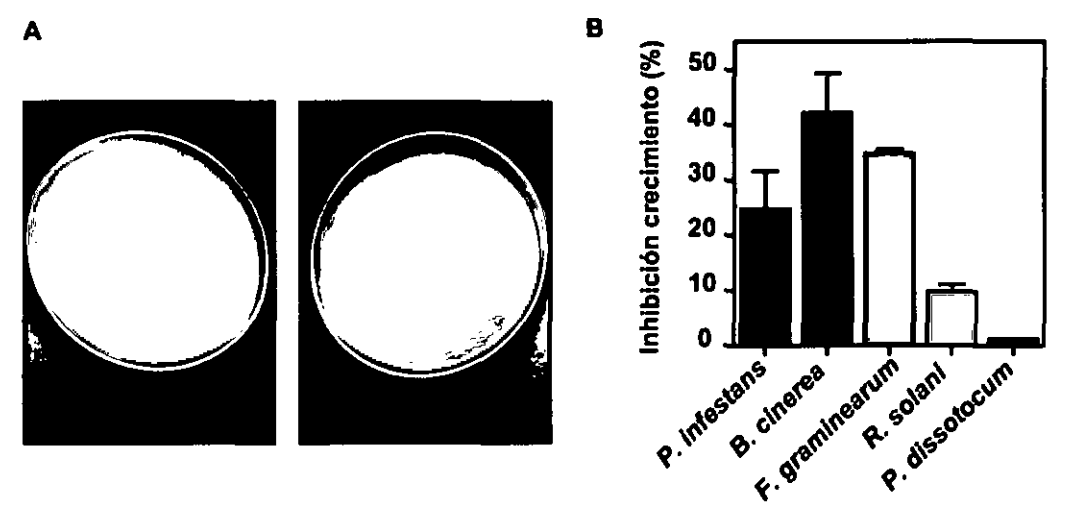


Figura 66. *Methylobacterium* sp. 2A inhibe el crecimiento de *P. infestans*. (A) Imagen ilustrativa que muestra el efecto antagónico de *Methylobacterium* sp. 2A sobre *P. infestans* (placa izquierda: patógeno; placa derecha: cultivo dual (patógeno + *Methylobacterium* sp. 2A)). (B) Cuantificación de la inhibición del crecimiento micelial causada por *Methylobacterium* sp. 2A contra diferentes fitopatógenos en el ensayo de confrontación dual. La inhibición del crecimiento micelial (%) se calculó comparando el tamaño radial de la colonia patógena en el cultivo dual y en las placas de control.

Para analizar más a fondo el efecto antagonista de *Methylobacterium* sp. 2A, primeramente se realizaron ensayos de infección con *P. infestans* en plantas *in vitro* que habian sido inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A. La menor proliferación del oomiceto y la mayor salud en las plantas inoculadas permite concluir que *Methylobacterium* sp. 2A ejerció un efecto protector en las plantas de papa (Figura 67).

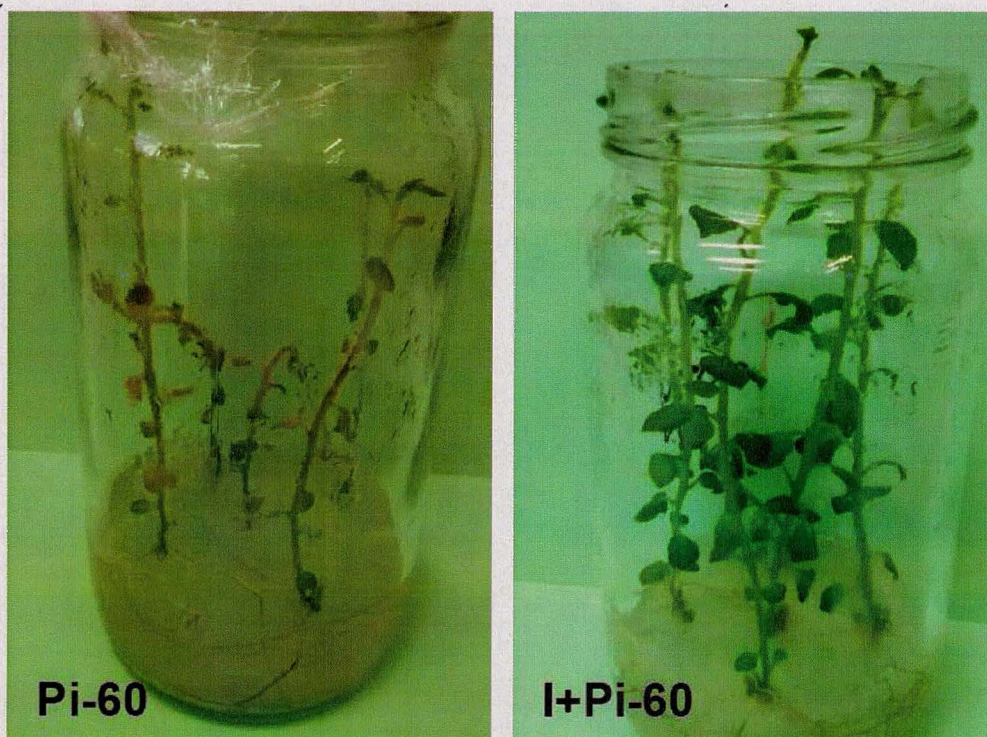


Figura 67. *Methylobacterium* sp. 2A protegió a las plantas de papa contra *P. infestans*. Se infectaron con *P. infestans* (Pi-60) plantas de papa de cuatro semanas de edad cultivadas *in vitro* e inoculadas (panel derecho) o no (panel izquierdo) con *Methylobacterium* sp. 2A. Se pipetearon gotas de 10 μ l de una suspensión de zoosporas en tres hojas por planta. A los 5 dpi, se evaluó la agresividad de *P. infestans*.

Además, se realizaron ensayos de infección con *P. infestans* en plantas de invernadero que previamente se rociaron con *Methylobacterium* sp. 2A (I) o con agua (controles, C). A los 5 dpi evaluamos el área necrótica (**Figura 68 A-B**). No se observaron lesiones en las hojas rociadas con *Methylobacterium* sp. 2A (I), mientras que las lesiones fueron evidentes en las hojas infectadas con *P. infestans* (Pi-60 e I + Pi-60). Sin embargo, el tamaño de la lesión fue significativamente mayor en ausencia de *Methylobacterium* sp. 2A y el 87,5% de las hojas infectadas presentaron clorosis. Por otro lado, en las plantas rociadas con *Methylobacterium* sp. 2A, solo el 28,5% de las hojas presentaban clorosis. Este resultado sugiere que *Methylobacterium* sp. 2A es capaz de restringir el crecimiento de *P. infestans* en la planta.

La resistencia sistémica inducida (ISR) es un estado fisiológico en el que la capacidad defensiva de la planta está optimizada. Esta resistencia es generada por las PGPR que potencian las defensas innatas de la planta contra los estreses bióticos posteriores (revisado en Pieterse et al. 2014). En otro trabajo de nuestro laboratorio (Fantino et al. 2017) se informó que los genes de la *proteína 1b relacionada a la patogénesis* (*StPR-1b*) y la *fenilalanina amonio liasa* (*StPAL*) se indujeron en las hojas

infectadas y distales tras la infección por *P. infestans*. Por lo tanto, decidimos analizar su expresión en hojas de plantas rociadas con *Methylobacterium* sp. 2A que luego se infectaron o no con Pi-60 y compararla con hojas infectadas con Pi-60 que no se inoculaban previamente (**Figura 68 C-D**). No se observó inducción de *StPR-1b* o expresión de *StPAL* en hojas inoculadas (I). La expresión de *StPR-1b* estaba fuertemente inducida (aproximadamente 35 veces, $p < 0.001$) en presencia del oomiceto (Pi-60), sin embargo, no se observó una inducción de este gen en muestras de hojas infectadas con *P. infestans* y previamente rociadas con *Methylobacterium* sp. 2A (I + Pi-60). Por otro lado, *StPAL* se indujo diez veces en hojas infectadas (Pi-60) y sólo cuatro veces en hojas inoculadas e infectadas (I + Pi-60). La reducción observada en la expresión de *PR-1b* en plantas infectadas con Pi-60 y previamente inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A sugiere que los mecanismos de defensa activados por este aislamiento no involucran a este gen.

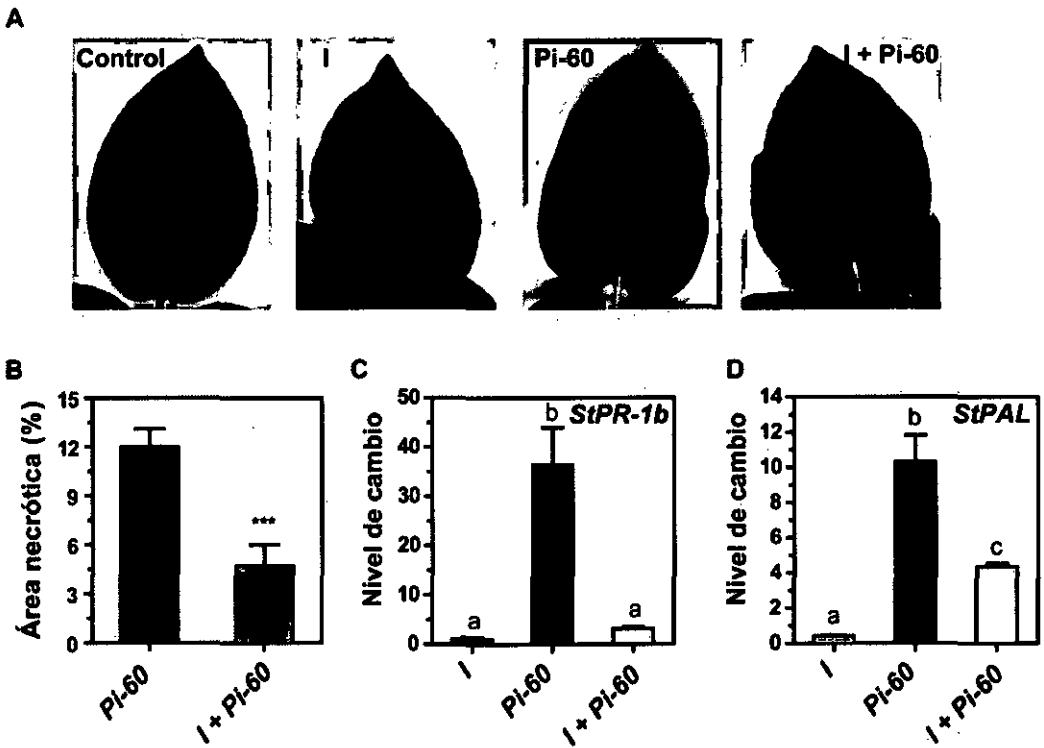


Figura 68. *Methylobacterium* sp. 2A es eficaz para controlar a *P. infestans*. (A) Las plantas de papa de invernadero fueron inoculadas o no con *Methylobacterium* sp. 2A 48 h antes de la infección por *P. infestans*. Las imágenes muestran folíolos apicales control, inoculados (I), infectados (Pi-60) e inoculados e infectados (I + Pi-60). (B) Histograma que representa el porcentaje de área necrótica (%) en hojas infectadas con *P. infestans* (Pi-60) o que fueron previamente inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A (I + Pi-60). Análisis de RT-qPCR de *StPR-1b* (C) y *StPAL* (D) en hojas inoculadas (I), en hojas infectadas con *P. infestans* (Pi-60) y en hojas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A e infectadas con *P. infestans* (I + Pi-60). EF-

1a se utilizó como gen de referencia. Se encuentra graficada la media \pm SEM de tres réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Se realizó un análisis ANOVA de dos factores y comparación múltiple con Test de Tukey. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas en los niveles de transcripción entre tratamientos ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Los microorganismos PGPR estimulan el crecimiento de las plantas al proporcionar hormonas vegetales (auxinas o citoquininas), al reducir los niveles de etileno de la planta a través de la acción de la enzima ACC desaminasa, al ayudar en la adquisición de recursos nutricionales (nitrógeno, hierro y fósforo), o antagonizando contra fitopatógenos (Glick 1995, Glick et al. 1999). Plantas de papa y de *Arabidopsis* cultivadas *in vitro* e inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A mostraron mayor desarrollo que plantas de la misma edad que no habían sido inoculadas, lo que sugiere que este aislamiento podría estimular el crecimiento de las plantas. La secuenciación de su genoma indica que *Methylobacterium* sp. 2A presenta varios atributos relacionados con la fitoestimulación y la fitofertilización, como la biosíntesis de L-triptófano y de AIA, la adquisición y solubilización de fosfato, la biosíntesis de sideróforos y de vitamina B12, la fijación de N₂ y la asimilación de amoníaco. De hecho, el aumento observado en el desarrollo de los pelos radicales y en la densidad de raíces laterales es un fenotipo asociado a auxinas (Overvoorde et al. 2010) que se condice con el AIA producido por este aislamiento.

Los experimentos presentados en este capítulo se llevaron a cabo utilizando plantas cultivadas *in vitro*; sin embargo, se realizaron ensayos preliminares con tubérculos inoculados con *Methylobacterium* sp. 2A en invernadero. Estas plantas estaban más desarrolladas que las no inoculadas (datos no mostrados). Además de modificar los niveles de AIA, este aislamiento podría estimular el crecimiento de la planta ya sea fijando N₂ o mejorando la adquisición de fosfato. Encontramos varios genes involucrados en la fijación de N₂ en *Methylobacterium* sp. 2A; sin embargo, no pudimos identificar el gen *NifH* de nitrogenasa. Múltiples eventos de transferencia horizontal de genes tuvieron lugar durante la evolución de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Los aislamientos del género *Methylobacterium* obtenidos a partir de hojas presentan secuencias altamente divergentes de la secuencia consenso *NifH*, más relacionadas con la proteína de la familia Pfam *NifH* / *frxC*, como *BchX* (Madhaiyan et al. 2015). *Methylobacterium* sp. 2A alberga una subunidad de proteína de hierro clorofilida reductasa X (*BchX*); Este hecho, junto con su capacidad de crecer en medio Nfb, sugiere que es una bacteria diazotrófica. Sin embargo, la actividad nitrogenasa de *Methylobacterium* sp. 2A debe evaluarse mediante el ensayo de reducción de acetileno para concluir esto.

La papa es un cultivo de alta demanda de fertilizantes, que requiere 250 kg ha⁻¹ de nitrógeno y 150 kg ha⁻¹ de fósforo para obtener un rendimiento óptimo (Khan

et al. 2012). La disponibilidad de fósforo a menudo es limitada debido a la formación de complejos de fosfatos inorgánicos y orgánicos insolubles (Adesemoye y Kloepper, 2009). Los datos genómicos indican que *Methylobacterium* sp. 2A es capaz de movilizar fuentes orgánicas de fósforo a través de fosfatasas ácidas y solubilizar fosfato mineral, contribuyendo así a que las plantas adquieran fosfato. El ensayo de solubilización confirmó que este aislamiento es capaz de solubilizar fosfato inorgánico. Por lo tanto, *Methylobacterium* sp. 2A surge como un posible biofertilizante para que las plantas de papa mejoren la absorción de fósforo y nitrógeno como se informó para otras PGPR (Hanif et al. 2015; Naqqash et al. 2016).

Además, nuestros resultados indican que *Methylobacterium* sp. 2A mitiga los efectos nocivos del estrés salino en las plantas de papa y *Arabidopsis*. En condiciones de estrés, el etileno regula la homeostasis de las plantas y reduce el crecimiento de raíces y tallos. Sin embargo, en condiciones salinas, las plantas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A presentaron mayor biomasa, mayor crecimiento de raíces y tallos, y mayor contenido de clorofila que las plantas no inoculadas. La modificación en la arquitectura de la raíz promovida por las auxinas posiblemente aumenta la absorción de agua y nutrientes, lo que explica el mejor *fitness* de las plantas. Además, como muchas otras PGPR, este aislamiento codifica una ACC desaminasa que reduce los niveles de etileno generados por diferentes estreses y permite su crecimiento normal (Glick et al. 2007). En particular, la inoculación de *Achromobacter piechaudii* ARV8 redujo el nivel de etileno y evitó la inhibición del crecimiento de plantas tomate cultivadas en presencia de alta sal (Mayak et al. 2004a) o estrés por sequía (Mayak et al. 2004b). Por lo tanto, *Methylobacterium* sp. 2A podría aliviar el estrés salino al aumentar las auxinas y disminuir el contenido de etileno en la rizosfera.

Otra característica importante observada fue que cuando se cultivaron bajo estrés salino, las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A presentaron niveles más bajos de peróxido que las no inoculadas. Su genoma contiene varias enzimas depuradoras de ROS y fue positivo para la reacción de catalasa. Se informó que la degradación de ROS podría ser el resultado de mejorar las actividades antioxidantes de las plantas mediante PGPR, protegiendo así a las plantas de la toxicidad de la sal (Chu et al. 2019). La actividad catalasa aumentó tras la inoculación con *Methylobacterium* sp. 2A en condiciones de control, pero su actividad fue menor que en las plantas no inoculadas expuestas al estrés salino. Un metaanálisis realizado por Pan et al. (2019) sugiere que las PGPR ayudan a las plantas hospedadoras a aliviar el estrés oxidativo principalmente mediante la reducción de la generación de ROS formados al inicio del estrés iónico, no a través de

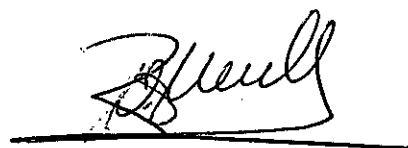
la eliminación de ROS mediante la acumulación de enzimas antioxidantes en las plantas hospedadoras. Este podría ser el caso de *Methylobacterium* sp. 2A.

Para prosperar con éxito dentro de poblaciones bacterianas, *Methylobacterium* sp. 2A tiene que ser altamente competitivo. Su genoma alberga genes relacionados a quimiotaxis y motilidad que podrían ser responsables de la asociación con la raíz, y varios genes involucrados en la producción de compuestos antimicrobianos que podrían funcionar como antibióticos, confiriéndole una ventaja contra otros microorganismos mientras protege a la planta contra fitopatógenos. En este sentido, la quitinasa se ha asociado con la protección contra patógenos fúngicos de plantas (Kumar M et al. 2018). Las colicinas son las bacteriocinas más representativas producidas por bacterias Gram-negativas (Beneduzi et al. 2012), mientras que los productos químicos como la fenazina y el 4-hidroxibenzoato actúan como antibióticos y suprimen a los microbios patógenos de las plantas (Gupta et al. 2015). Como ejemplo, se sabe que la fenazina suprime al patógeno *F. oxysporum* (Chin-A-Woeng et al. 2003). Se informó que la enzima PHA participa en la degradación de las acil-homoserina lactonas, lo que interfiere con el *quórum sensing* de bacterias competidoras (Mukherji et al. 2014). Los genes relacionados con la biosíntesis de aerobactina y enterobactina también se identificaron en el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A. Las bacterias productoras de sideróforos son de gran importancia en el campo de la agricultura; además de complementar el hierro de la planta, los sideróforos evitan el crecimiento de los fitopatógenos del suelo (Fernández Scavino y Pedraza, 2013).

La capacidad de biocontrol de *Methylobacterium* sp. 2A se evidenció en los ensayos de confrontación dual contra *B. cinerea*, *F. graminearum* y *P. infestans*, y en plantas de invernadero infectadas con *P. infestans*. El tamaño de la lesión fue menor y se observó clorosis en menor frecuencia en aquellas plantas que habían sido inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A e infectadas con Pi-60 en comparación con plantas no inoculadas. Además de producir compuestos antimicrobianos, las PGPR son capaces de potenciar los mecanismos de defensa de las plantas contra los patógenos. Se ha informado ISR en papa después de la inoculación con una cepa de *Rhizobium* (Reitz et al. 2001). Esta respuesta difiere de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y no depende del ácido salicílico (SA) (Pieterse et al. 2014). De hecho, en los tiempos analizados observamos que *St-PR1b* no fue inducido en las hojas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A después de la infección con Pi-60. Por el contrario, se observó una inducción muy fuerte de *StPR-1b* cuando las plantas no inoculadas se infectaron con *P. infestans*. Esta inducción, sin embargo, no restringió el

crecimiento del oomiceto. Por otro lado, se observó la inducción de StPAL en plantas inoculadas con *Methylobacterium* sp. 2A tras la infección con *P. infestans*. Si bien su efecto antagonista es claro, por el momento, no podemos inferir qué mecanismos de defensa son disparados en la planta por *Methylobacterium* sp. 2A.

En este trabajo, presentamos un nuevo aislamiento, que proponemos llamar de ahora en adelante *Methylobacterium ingebiense* 2A sp. nov. capaz de promover el crecimiento de las plantas bajo condiciones de control y de estrés salino en dos dicotiledoneas. Probablemente este efecto benéfico no se limite a las plantas de papa y de *Arabidopsis*. Además, en los ensayos de confrontación dual en placa, *Methylobacterium* sp. 2A restringió el crecimiento de dos hongos necrotróficos y del oomiceto hemibiotrófico *P. infestans*, lo que denota un antagonismo de amplio espectro. Ensayos realizados en planta confirmaron que la inoculación fue capaz de reducir el efecto nocivo de *P. infestans* en plantas de papa. Estos resultados promisorios nos permiten pensar que *Methylobacterium* sp. 2A tiene el potencial de ser utilizado como sustituto de fertilizantes químicos y fungicidas, evitando la contaminación en las tierras agrícolas. Esta investigación es el primer enfoque para comprender las capacidades PGP de *Methylobacterium* sp. 2A. Tenemos que probar este aislamiento a campo para evaluar la productividad, la eficacia y la viabilidad de este inóculo. Ciertamente, esta tecnología microbiana ecológica contribuirá a prácticas agrícolas sostenibles y es una estrategia alternativa para mejorar la producción de cultivos para una población mundial en aumento.



Dra. Rita H. Ulloa
Directora

BIBLIOGRAFÍA

- Abanda-Nkpawt D, Mu"sch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J Exp Bot* 57: 4025–4032.
- Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1–12. doi:10.1007/s00253-009-2196-0.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 121–126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Agrios GN (1995) *Fitopatología*. Ed. Limusa. Méjico. 838 p.
- Ahkami AH, Allen White R, Handakumbura PP, Jansson C (2017) Rhizosphere engineering: Enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere* 3:233–243. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.012>
- Akram NA, Ashraf M (2011) Pattern of accumulation of inorganic elements in sunflower (*helianthus annuus* L.) plants subjected to salt stress and exogenous application of 5-aminolevulinic acid. *Pak. J. Bot.* 43, 521–530.
- Alessa O, Ogura Y, Fujitani Y, Takami H, Hayashi T, Sahin N and Tani A (2021) Comprehensive Comparative Genomics and Phenotyping of *Methylobacterium* Species. *Front. Microbiol.* 12:740610. doi: 10.3389/fmicb.2021.740610
- Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, Blechl AE et al (2016) Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *Plant Cell* 28, 1510–1520.
- Arce AL, Cabello JV, Chan RL (2008) Patents on Plant Transcription Factors. *Recent Patents in Biotechnology* 2;209–217.
- Armada E, Azcón R, López-Castillo OM, et al (2015) Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol Biochem* 90:64–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>
- Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK (2012) PGPR for Protection of Plant Health Under Saline Conditions. In: Maheshwari D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_12
- Arzanesh MH, Alikhani HA, Khavazi K et al. (2011) Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 197–205. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0444-1>
- Arzani A, Ashraf M (2016) Smart Engineering of Genetic Resources for Enhanced Salinity Tolerance in Crop Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35:3, 146–189, DOI: 10.1080/07352689.2016.1245056
- Asano T, Hakata M, Nakamura H, et al (2011) Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 75:179–191. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9717-1>
- Asano T, Hayashi N, Kobayashi M, et al (2012) A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. *Plant J* 69:26–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04766.x>
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Badri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32: 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Baillo EH, Kimotho RN, Zhang Z, Xu P (2019) Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes (Basel)* 10:1–23. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>

Baker BP, Green TA, Loker AJ (2020) Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biol. Control* 140, 104095. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2019.104095>.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Bauer WD, Mathesius U (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol.*;7(4):429-33. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.008. PMID: 15231266.

Beattie GA (2006) Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Gnanama- nickam SS (ed) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dor- drecht, pp 1-56.

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044–1051. doi:10.1590/S1415-47572012000600020.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>

Bertelli C, Laird MR, Williams KP; Simon Fraser University Research Computing Group, Lau BY, Hoad G, Winsor GL, Brinkman FSL (2017) IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.*;45(W1):W30-W35. doi: 10.1093/nar/gkx343.

Bhise KK, Dandge PB (2019) Mitigation of salinity stress in plants using plant growth promoting bacteria

Birch PRJ, Bryan G, Fenton B et al. (2012) Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable?. *Food Sec.* 4, 477–508. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0220-1>

Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 47, W81–W87. doi:10.1093/nar/gkz310.

Boetzer M, Henkel C V, Jansen HJ, et al (2011) Scaffolding Pre-assembled Contigs Using SSPACE. *Bioinformatics* 27:578–579. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>

Borkiewicz L, Polkowska-Kowalczyk L, Cieřła J et al (2020) Expression of maize calcium-dependent protein kinase (ZmCPK11) improves salt tolerance in transgenic Arabidopsis plants by regulating sodium and potassium homeostasis and stabilizing photosystem II. *Physiol Plant* 168:38–57. <https://doi.org/10.1111/ppl.12938>

Boto L (2010) Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. Biol. Sci.* 277, 819–827. doi: 10.1098/rspb.2009.1679

Boucher Y, Cordero OX, Takemura A, Hunt DE, Schliep K, Baptiste E, Lopez P, Tarr CL, Polz MF (2011) Local mobile gene pools rapidly cross species boundaries to create endemism within global *Vibrio cholerae* populations *mBio* 2:e00335-10.

Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, et al (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464:418–422. <https://doi.org/10.1038/nature08794>

Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 483e492. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2012.03.008>.

Caldiz DO, Gaspari FJ, Haverkort AJ, Struik PC (2001) Agro- ecological zoning and potential yield of single or double cropping of potato in Argentina. *Agric For Meteorol.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(01\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(01)00231-3)

Cantos de Ruiz ST, Andrade FH, Mendiburu A (1989) Rendimiento potencial del cultivo de papa en Balcarce, causas que limitan la productividad real. *Rev. Latinoam. la Papa* v. 2

Caspi R (2005) MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* 34, D511–D516. doi:10.1093/nar/gkj128.

Castelán-Muñoz N, Herrera J, Cajero-Sánchez W, et al (2019) MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Front Plant Sci* 10:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00853>

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>

- Chen L, Liu Y, Wu G, Veronican Njeri K, Shen Q, Zhang N, Zhang R (2016) Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiol Plant*. 2016 Sep;158(1):34-44. doi: 10.1111/ppl.12441.
- Chen WP, Kuo TT (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21:2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol*. 157, 503–523. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00686.x.
- Choi H, Park H-J, Park JH, et al (2005) Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase AtCPK32 Interacts with ABF4, a Transcriptional Regulator of Absciscic Acid-Responsive Gene Expression, and Modulates Its Activity. *Plant Physiol* 139:1750–1761. <https://doi.org/10.1104/pp.105.069757>
- Chu TN, Tran BTH, Van Bui L, Hoang MTT (2019) Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Res. Notes* 12, 11. doi:10.1186/s13104-019-4046-1.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, et al (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
- Cicore PL, Andreu AB, Huarte MA (2012) Reaction to late blight in response to nitrogen management in Argentine potato cultivars; Elsevier; *Crop Protection*; 42; 69-73.
- Coca M, San Segundo B (2010) AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* 63:526–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04255.x>
- Coleman-Derr D, Tringe SG (2014) Building the crops of tomorrow: Advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. *Front Microbiol* 5:1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00283>
- Cordero I, Balaguer L, Rinco A (2018) Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. 1–10. Doi:10.1002/jpln.201700480.
- Costa MR, Moura EF (2001) Manual de extração de DNA. *Embrapa Amaz Orient* 89:24
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can J Bot* 82:273–281
- De Aquino G, Ventura M, Alexandrino R, et al (2018) Plant-promoting rhizobacteria *Methylobacterium komagatae* increases crambe yields, root system and plant height. *Ind Crops Prod* 121:277. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.020>
- de la Casa A, Ovando G, Bressanini L, Martínez J (2014) Estimación del rendimiento potencial de papa en Córdoba, Argentina, a partir de la eficiencia en el uso de la radiación y de la productividad del agua. 31:75–91
- De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV et al (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15, 1173–1180. Doi:10.1094/MPMI.2002.15.11.1173.
- DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA (2009) Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J*;425(1):27–40. doi: 10.1042/BJ20091147. PMID: 20001960.
- Del Amor FM, Cuadra-Crespo (2012) Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Funct Plant Biol*;39(1):82-90. doi: 10.1071/FP11173. PMID: 32480762.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R et al. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16428–16433.
- Díaz Herrera S, Grossi C, Zawoznik M, Groppa MD (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res* 186–187:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>
- Dimitri MJ (1972) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Vol. 1. Segunda Edición. Editorial ACME pp. 48-49.

- Ding Y, Cao J, Ni L et al (2013) ZmCPK11 is involved in abscisic acid- induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. *J Exp Bot* 64:871–884. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers366>
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22:2, 107-149, DOI: 10.1080/713610853
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 157 361–379. 10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x
- Doronina NV, Ivanova EG, Trotsenko YA (2002) New evidence for the ability of methylobacteria and methanotrophs to synthesize auxins. *Microbiology* 71:116–118.
- Dou D, Zhou JM (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* 12:484–495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
- Duffy B (2003) Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 41:501-38.
- Egamberdieva D, Kucharova Z (2009) Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biol. Fertil. Soils*;45:561–573.
- Ehmann A (1977) The van urk-Salkowski reagent—a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J Chromatogr* 132:267–276. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)89300-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)89300-0)
- Elkhatib HA, Elkhatib EA, Allah AMK, El-Sharkawy AM (2004) Yield Response of Salt-Stressed Potato to Potassium Fertilization: A Preliminary Mathematical Model. *J Plant Nutr* 27:111–122. <https://doi.org/10.1081/PLN-120027550>
- Etesami H, Beattie GA (2017) Plant-Microbe Interactions in Adaptation of Agricultural Crops to Abiotic Stress Conditions. In: Kumar V., Kumar M., Sharma S., Prasad R. (eds) *Probiotics and Plant Health*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_7
- Etesami H, Maheshwari DK (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* 156:225–246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, et al (2017) Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front. Plant Sci.* 8:1147. doi: 10.3389/fpls.2017.01147
- Fantino E, Segretin ME, Santin F, et al (2017) Analysis of the potato calcium-dependent protein kinase family and characterization of StCDPK7, a member induced upon infection with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Rep* 36:1137–1157. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2144-x>
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, et al (2009) Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 185–212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Fernández Scavino A, Pedraza R (2013) "The Role of Siderophores in Plant Growth-Promoting Bacteria," in *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*, 265–285. doi:10.1007/978-3-642-37241-4_11.
- Forni C, Duca D, Glick BR (2017) Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* 410:335–356
- Fry W (2008) *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* 9:385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
- Fry WE, Birch PRJ, Judelson HS, et al (2015) Five reasons to consider *phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology* 105:966–981. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI>
- Galbally IE, Kirstine W (2002) The Production of Methanol by Flowering Plants and the Global Cycle of Methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 43(3), 195–229. doi:10.1023/a:1020684815474
- Gao C (2021) Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell* 184:1621–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005>

Gao X, He P (2013) Nuclear dynamics of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases in effector-triggered immunity © 2013 Landes Bioscience. Do not distribute © 2013 Landes Bioscience . Do not distribute. Plant Signal Behav 8:e23868

García JE, Maroniche G, Creus C, Suárez-Rodríguez R, et al (2017) In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different Azospirillum native strains and their effects on growth of maize under drought stress. Microbiol. Res. 202, 21–29. Doi:10.1016/j.micres.2017.04.007.

Garzón JM, Young M (2016) La producción de papa en Córdoba: Aspectos básicos y potencial productivo. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Córdoba. Córdoba. http://magya.cba.gov.ar/upload/Informe_IERAL_Papa_Nov_2016.pdf.

Giammaria V, Grandellis C, Bachmann S, et al (2011) StCDPK2 expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. Planta 233:593–609. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1319-2>

Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41, 109–117. doi:10.1139/m95-015.

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. 2012:

Glick BR, Bashan Y (1997) Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. Biotechnol Adv.;15(2):353-78. doi: 10.1016/s0734-9750(97)00004-9. PMID: 14538716.

Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Published by Imperial College Press and distributed by World Scientific Publishing co. doi:10.1142/p130.

Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007) Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 26, 227–242. doi:10.1080/07352680701572966.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. Front Plant Sci 5:1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>

Gourion B, Rossignol M, Vorholt JA. (2006). A proteomic study of Methylobacterium extorquens reveals a response regulator essential for epiphytic growth. Proc Natl Acad Sci USA 103: 13186–13191.

Grandellis C, Fantino E, García MNM, et al (2016) StCDPK3 phosphorylates in vitro two transcription factors involved in GA and ABA signaling in potato: StRSG1 and StABF1. PLoS One 11:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167389>

Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395–412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>

Green PN, Ardley JK (2018) Review of the genus Methylobacterium and closely related organisms : a proposal that some Methylobacterium species be reclassified into a new genus, Methylorubrum gen. nov. 2727–2748. doi:10.1099/ijsem.0.002856.

Grossi CEM, Santin F, Quintana SA, et al (2021) Calcium - dependent protein kinase 2 plays a positive role in the salt stress response in potato. Plant Cell Rep. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02676-7>

Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. Int J Genomics 2014:; <https://doi.org/10.1155/2014/701596>

Gupta G, Parihar S, Ahirwar N, Snehi DSK, Singh V (2015) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. J. Microb. Biochem. Technol. 07. doi:10.4172/1948-5948.1000188.

Habib SH, Kausar H, Saud HM (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. Biomed. Res. Int. 2016:6284547. 10.1155/2016/6284547

Hakim S, Naqqash T, Nawaz MS, et al (2021) Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. 5:1–23. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>

Hamel LP, Sheen J, Séguin A (2014) Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends Plant Sci*;19(2):79-89. doi: 10.1016/j.tplants.2013.10.009. Epub 2013 Dec 14. PMID: 24342084; PMCID: PMC3932502.

Han EH, Petrella DP, Blakeslee JJ (2017) "Bending" models of halotropism: Incorporating protein phosphatase 2A, ABCB trans- porters, and auxin metabolism. *J Exp Bot* 68:3071–3089. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx127>

Hanif MK, Hameed S, Imran A, Naqqash T, Shahid M, Van Elsas JD (2015) Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Front. Microbiol.* 6, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2015.00583.

Harmon AC (2003) Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravit. Space Biol Bull.* 16, 83–90.

Hartmann A, Baldani I (2006) "The Genus *Azospirillum*," in, 115–140. Doi:10.1007/0-387-30745-1_6.

Hasanuzzaman M, Hossain MA, da Silva JAT et al (2012) Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Venkateswarlu B, Shanker A, Shanker C, Maheswari M (eds) *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. Springer, Dordrecht

Hashemi M, Tabet D, Sandroni M, et al (2021) The hunt for sustainable biocontrol of oomycete plant pathogens, a case study of *Phytophthora infestans*. *Fungal Biol Rev* 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.003>

Hichri I, Muhovski Y, Žižková E et al (2017) The *Solanum lycopersi-* cum WRKY3 transcription factor SLWRKY3 is involved in salt stress tolerance in tomato. *Front Plant Sci* 8:1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01343>

Hijmans RJ (2003) The effect of climate change on global potato production. *Am. J. Potato Res.* 80, 271–279. doi: 10.1007/BF02855363

Huang CJ, Wei G, Jie YC, Xu JJ, Zhao SY, et al. (2015) Responses of gas exchange, chlorophyll synthesis and ros-scavenging systems to salinity stress in two ramie (*boehmeria nivea* L.) cultivars. *Photosynthetica* 53, 455–463.

Huang S, Vleeshouwers VGAA, Visser RGF, Jacobsen E (2005) An Accurate In Vitro Assay for High-Throughput Disease Testing of *Phytophthora infestans* in Potato. 1263–1267

Ilangumaran G, Smith DL (2017) Plant Growth Promoting Rhizobacteria inamelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Front. Plant Sci.* 8. DOI: 10.3389/fpls.2017.01768.

Imbellone PA, Giménez JE, Panigatti JL (2010) *Suelos de la Región Pampeana: Procesos de formación*. Ed. INTA, Buenos Aires.

Isayenkov S V, Maathuis FJM (2019) Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front Plant Sci* 10:80. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>

Islam F, Yasmeen T, Arif MS, Ali S, Ali B, Hameed S, et al (2016).Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by upregulating antioxidant defense and biological soil fertility. *Plant Growth Regul.*80, 23–36. doi: 10.1007/s10725-015-0142-y

Ito H, Iizuka H (1971) Taxonomic Studies on a Radio-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1566–1571. Doi:10.1080/00021369.1971.10860119.

Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y (2010) Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca^{2+} -dependent protein kinase is important for substrate recognition. *PlantCell*22: 1592–1604.

Jaarsma R, de Vries RSM, de Boer AH (2013) Effect of Salt Stress on Growth, Na^{+} Accumulation and Proline Metabolism in Potato (*Solanum tuberosum*) Cultivars. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060183>

Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 7:106–111. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02223-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02223-3)

Junglee S, Urban L, Sallanon H, Lopez-lauri F (2014) Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. 730–736

Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O (2014) Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* 9(8):e104984 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>

Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol.* 2005 Nov;7(11):1809-17. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x. PMID: 16232295.

Kamoun S (2006) A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>

Karp PD, Paley S, Romero P (2002) The pathway tools software. *Bioinformatics* 18, 225–232. Doi:10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.S225.

Kato Y, Asahara M, Goto K, Kasai H, Yokota A (2008) *Methylobacterium persicinum* sp. Nov., *Methylobacterium komagatae* sp. Nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. Nov., *Methylobacterium tardum* sp. Nov. and *Methylobacterium gregans* sp. Nov., isolated from freshwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1134–1141. Doi:10.1099/ijs.0.65583-0.

Khan MZ, Akhtar ME, Mahmood-ul-Hassan M, Mahmood MM, Safdar MN (2012) Potato Tuber Yield and Quality As Affected By Rates and Sources of Potassium Fertilizer. *J. Plant Nutr.* 35, 664–677. Doi:10.1080/01904167.2012.653072.

Khan SA, Li MZ, Wang SM, Yin HJ (2018) Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress. *Int J Mol Sci* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijms19061634>

Khenifi ML, Boudjeniba M, Kameli A (2011) Effects of salt stress on micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African J Biotechnol* 10:7840–7845. <https://doi.org/10.5897/AJB10.982>

Kibria MG, Hoque MA (2019) A Review on Plant Responses to Soil Salinity and Amelioration Strategies. *Open J Soil Sci* 09:219–231. <https://doi.org/10.4236/ojss.2019.911013>

Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Station de Pathologie, Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Tours, France; *Végétale et Phyto-Bactériologie*, Ed.; pp. 879–882.

Knief C, Dengler V, Bodelier PLE, Vorholt JA (2012) Characterization of *Methylobacterium* strains isolated from the phyllosphere and description of *Methylobacterium longum* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101, 169–183. doi:10.1007/s10482-011-9650-6.

Kobayashi M, Yoshioka M, Asai S, et al (2012) StCDPK5 confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst. *New Phytol* 196:223–237. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04226.x>

Krug L, Morauf C, Donat C, Muller H, Cernava T, Berg G (2020) Plant growth-promoting methylobacteria selectively increase the biomass of biotechnologically relevant microalgae. *Front. Microbiol.* 11:427. doi: 10.3389/fmicb.2020.00427

Kumar M, Brar A, Yadav M, Chawade A, Pareek N (2018) Chitinases — Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. 1–12. doi:10.3390/agriculture8070088.

Kumar M, Tomar RS, Lade H, Paul D (2016) Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:120.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.*;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096. PMID: 29722887; PMCID: PMC5967553.

kumarGreen PN (2006) *Methylobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*, vol 5, 3rd edn. Springer, New York, pp 257–265

Kumpf RP, Nowack MK (2015) The root cap: a short story of life and death. *J Exp Bot* 66:5651–5662. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv295>

Lahlali R, Hijri M (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett* 311:152–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02084.x>

Lee HS, Madhaiyan M, Kim CW, Choi SJ, et al (2006) Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylobacterial isolates, *Biology and Fertility of Soils*, vol. 42 (pg. 402-408)

Leesutthiphonchai W, Vu AL, Ah-Fong AMV, Judelson HS (2018) How does phytophthora infestans evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology* 108:916–924. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-18-0130-IA>

Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.*;13(9):2178-2189. doi:10.1101/gr.1224503

Li X, Guo C, Ahmad S, et al (2019) Systematic analysis of MYB family genes in potato and their multiple roles in development and stress responses. *Biomolecules* 9:1–21. <https://doi.org/10.3390/biom9080317>

Liu G, Li X, Jin S, Liu X, Zhu L, et al. (2014) Overexpression of Rice NAC Gene SNAC1 Improves Drought and Salt Tolerance by Enhancing Root Development and Reducing Transpiration Rate in Transgenic Cotton. *PLoS ONE* 9(1): e86895. doi:10.1371/journal.pone.0086895

Liu LY, Huang WJ, Pu RL, Wang JH (2014) Detection of internal leaf structure deterioration using a new spectral ratio index in the near-infrared shoulder region. *J. Integr. Agric.* 13, 760–769.

Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG (2004) CDPK-mediated signalling pathways: Specificity and cross-talk. *J Exp Bot* 55:181–188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh008>

Lynch T, Erickson BJ, Finkelstein RR (2012) Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant Mol Biol* 80:647–658. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9973-3>

Madhaiyan M, Kim BY, Poonguzhali S, Kwon SW, Song MH, Ryu JH, et al (2007) *Methylobacterium oryzae* sp. Nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylobacterial, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 326–331. Doi:10.1099/ijs.0.64603-0.

Madhaiyan M, Ngho S T, Prithiviraj B, Ji L (2015) Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotechnol. Biofuels* 8, 222. doi:10.1186/s13068-015-0404-y.

Madhaiyan M, Poonguzhali S (2014) *Methylobacterium pseudosasicola* sp. Nov. and *Methylobacterium phyllostachyos* sp. Nov., isolated from bamboo leaf surfaces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2376–2384. Doi:10.1099/ijs.0.057232-0.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, Sa TM (2009) *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. Nov., a pink-pigmented, facultative methylobacter from the phyllosphere of rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 22–27. Doi:10.1099/ijs.0.001693-0.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T (2006) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta*. 2006 Jul;224(2):268-78. doi: 10.1007/s00425-005-0211-y.

Maksimov IV, Abizgil'dina RR and Pusenkova LI (2011) Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review). *Appl Biochem Microbiol* 47:333-345.

Mane SP, Robinet CV, Ulanov A, et al (2008) Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Funct Plant Biol* 35:669–688. <https://doi.org/10.1071/FP07293>

Marco F, Bitrián M, Carrasco P, Rajam MV, Alcázar R, Tiburcio AF (2015) Genetic Engineering Strategies for Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_29

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. Academic Press, San Diego.

Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004a) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 565–572. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>.

- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004b) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166, 525–530. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Mishra KB, Iannacone R, Petrozza A, et al (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci* 182:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.022>
- Moore CA, Bowen HC, Scrase-Field S et al (2002) The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic Ca²⁺ elevations in root endodermal cells subjected to cooling. *Plant J* 30:457–465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2002.01306.x>
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, et al (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺- permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* 4:1749–1762. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040327>
- Mosquera T, Alvarez MF, Jiménez-Gómez JM, et al (2016) Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. *PLoS One* 11:1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156254>
- Mukherji R, Varshney NK, Panigrahi P, Suresh CG, Prabhune A (2014) A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* 56, 1–7. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.12.010.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Muñiz García MN, Giammaria V, Grandellis C, et al (2012) Characterization of StABF1, a stress-responsive bZIP transcription factor from *Solanum tuberosum* L. that is phosphorylated by StCDPK2 in vitro. *Planta* 235:761–778. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1540-7>
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naqqash T, Hameed S, Imran A, Hanif MK, Majeed A, van Elsas JD (2016) Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. doi:10.3389/fpls.2016.00144.
- Narula N, Kothe E, Behl RK (2009) Role of root exudates in plant-microbe interactions. *J Appl Bot Food Qual* 82:122–130
- Obidiegwu JE, Bryan GJ, Jones HG, Prashar A (2015) Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. 6:1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00542>
- Okon Y, Labandera-Gonzales C, Lage M, Lage P (2015) Agronomic Applications of Azospirillum and Other PGPR. *Biol. Nitrogen Fixat.* 2–2, 925–936. doi:10.1002/9781119053095.ch90.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a001537.
- Palacios OA, Bashan Y, De-Bashan EL (2014) Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. *Biol. Fertil. Soils* 50, 415–432. doi:10.1007/s00374-013-0894-3
- Palta JP (1992) Mechanisms for obtaining freezing stress resistance in herbaceous plants, pp 219–250. In Stalker, H.P., and J.T. Murphy (Eds.) *Plant Breeding in the 1990s: Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s*, North Carolina State University, Raleigh, NC March 1991. CAB International Press, Wallingford, UK.
- Pan J, Peng F, Xue X, You Q, Zhang W, Wang T, et al (2019) The growth promotion of two salt-tolerant plant groups with PGPR inoculation: A meta-analysis. *Sustain.* 11. doi:10.3390/su11020378.

Pan Y, Seymour GB, Lu C et al (2012) An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep* 31:349–360. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1170-3>

Parasuraman P, Pattnaik S, Busi S (2019) *Phyllosphere Microbiome: Functional Importance in Sustainable Agriculture, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 135–148.

Parmar A, Sturm B, Hensel O (2017) Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. *Food Security* 9: 907–927.

Patt TE, Cole GC, Hanson RS (1976) *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 26(2), 226–229.

Pattnaik S, Rajkumari J, Paramanandham P, Busi S (2017) Indole Acetic Acid Production and Growth-Promoting Activity of *Methylobacterium extorquens* MP1 and *Methylobacterium zatmanii* MS4 in Tomato. *Int J Veg Sci* 23:321–330. <https://doi.org/10.1080/19315260.2017.1283381>

Pearson D (1976) General Methods-Determination of Phosphate by the Vanado-Molybdate Colorimetric Method. *Chem. Anal. Anal. Foods*. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10018114600/en/>

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol.*;11(11):789–99. doi: 10.1038/nrmicro3109. Epub 2013 Sep 23. PMID: 24056930.

Pieterse CMJ, Pierik R, Van Wees SCM (2014) Different shades of JAZ during plant growth and defense. *New Phytol.* 204, 261–264. Doi:10.1111/nph.13029.

Podile AR, Kishore GK (2007) Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_6

Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R (2008) The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochem.* 9, 8. Doi:10.1186/1471-2091-9-8.

Puigbo P, Lobkovsky AE, Kristensen DM, et al (2014) Genomes in turmoil: quantification of genome dynamics in prokaryote supergenomes. *BMC Biol*;12:66.

Qin Y, Druzhinina IS, Pan X, Yuan Z (2016) Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnol. Adv.* 34, 1245–1259. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.005

Qiu T, Jiang L, Li S, Yang Y (2017) Small-scale habitat-specific variation and adaptive divergence of photosynthetic pigments in different alkali soils in reed identified by common garden and genetic tests. *Front. Plant Sci.* 7:2016.

Quintana Arrúa SA (2019) Estudio de factores de transcripción relacionados al estrés salino en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). Maestría en Biotecnología. Universidad de Buenos Aires.

Raíces M, Ulloa RM, MacIntosh GC et al (2003) StCDPK1 is expressed in potato stolon tips and is induced by high sucrose concentration. *J Exp Bot* 54:2589–2591. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg282>

Reguera M et al (2011) Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochim. Biophys. Acta* doi:10.1016/j.bbagr.2011.08.005

Reitz M, Hoffmann-Hergarten S, Hallmann J, Sikora R (2001) Induction of systemic resistance in potato by rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins and enhanced lignin biosynthesis. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108(1), 11–20. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/43215377>

Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J (2015) JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32:929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

Roach T, Krieger-Liszka A (2014) Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. *Curr Protein Pept Sci.* 15(4):351–62. doi: 10.2174/1389203715666140327105143.

Romeis T, Herde M (2014) From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Curr Opin Plant Biol* 20:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.03.002>

- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* 20:5556–5567. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5556>
- Roser M, Ritchie H (2017) Fertilizers and Pesticides (Oxford: Our World in Data). <https://ourworldindata.org/fertilizer-and-pesticides/>.
- Ruiz Carrasco KB, Baroni Fornasiero R, Tassoni A, Bagni N (2007) Identification of two phenotypes of *Arabidopsis thaliana* under in vitro salt stress conditions. *Biol Plant* 51:436–442. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0093-x>
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, et al (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23:319–327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00787.x>
- Santin F, Bhogale S, Fantino E, et al (2017) *Solanum tuberosum* StCDPK1 is regulated by miR390 at the posttranscriptional level and phosphorylates the auxin efflux carrier StPIN4 in vitro, a potential downstream target in potato development. *Physiol Plant* 159:244–261. <https://doi.org/10.1111/ppl.12517>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *3*:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P, Janssen PH (2004) Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 4363–4366.
- Schulz P, Herde M, Romeis T (2013) Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol* 163:523–530. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222539>
- Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P (2017) Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.02484.
- Sciorra MD, Fantino E, Grossi CEM, Ulloa RM (2021) Characterization of two group III potato CDPKs, StCDPK22 and StCDPK24, that contain three EF-Hand motifs in their CLDs. *Plant Physiol Biochem* 162:716–729. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.008>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (2021) Producción de papa en Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/magyp-informe-papa-mayo-2021.pdf>.
- Sestak Z, Stiffel P (1997) Leaf age-related differences in chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica* 33 (3–4):347–369.
- Sharma S, Kulkarni J, Jha, B (2016). Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Front. Microbiol.* 7:1600. doi:10.3389/fmicb.2016.01600
- Shavrukov Y (2013) Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *J Exp Bot* 64(1):119–127. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers316>
- Singh JS (2015) Microbes: the chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 203: 80–82
- Singh RP, Jha PN (2017) The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants. 8. Doi:10.3389/fmicb.2017.01945.
- Smirnoff N (1996) BOTANICAL BRIEFING: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot* 78(6):661–669. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0175>
- Sosa EJ, Burguener G, Lanza-rotti E, et al (2018) Target-Pathogen: a structural bioinformatic approach to prioritize drug targets in pathogens. *Nucleic Acids Res* 46:D413–D418. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1015>
- Springmann M, Clark M, Mason-D'Croz D, et al (2018) Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature* 562:519–525. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0594-0>

Stephens PM, Crowley JJ, O'Connell C (1993) Selection of pseudomonad strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugar- beet seeds in soil. *Soil Biol Biochem* 25:1283-1288

Sy A, Timmers AC, Knief C, Vorholt JA. (2005). Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl Environ Microbiol* 71: 7245–7252.

Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, et al (2004) Massugu2 Encodes Aux/IAA19, an Auxin-Regulated Protein That Functions Together with the Transcriptional Activator NPH4/ARF7 to Regulate Differential Growth Responses of Hypocotyl and Formation of Lateral Roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:379–393. <https://doi.org/10.1105/tpc.018630>

Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, et al. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 2001, 29: 22–28. 10.1093/nar/29.1.22

Toyama H, Chistoserdova L, Lidstrom ME (1997) Sequence analysis of pqq genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology* 143 (Pt 2:595–602. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-595>

Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN et al (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ* 31:1063–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01817.x>

Turan MA, Katkat V, Taban S (2007) Variations in proline, chlorophyll and mineral elements contents of wheat plants grown under salinity stress. *J. Agron.* 6, 137–141.

van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>

Vivek PJ, Resmi MS, Sreekumar S, et al (2017) Calcium-dependent protein kinase in ginger binds with importin- α through its junction domain for nuclear localization, and further interacts with NAC transcription factor. *Front Plant Sci* 7:1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01909>

Vleeshouwers VGAA, Raffaele S, Vossen JH, et al (2011) Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu Rev Phytopathol* 49:507–531. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>

Wang B, Zhang Y, Bi Z et al (2019) Impaired function of the calcium- dependent protein kinase, OsCPK12, leads to early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Front Plant Sci* 10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00052>

Wang CT, Song W (2013) Calcium-dependent protein kinase gene ZmCPK12 from maize confers tolerance to drought and salt stresses in transgenic plants. *Acta Physiol Plant* 35:1659–1666. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1208-3>

Wang J, Cheng G, Wang C, et al (2017) The bHLH transcription factor CgbHLH001 is a potential interaction partner of CDPK in halophyte *Chenopodium glaucum*. *Sci Rep* 7:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06706-x>

Webb AAR, Taylor JE, McAinsh MR, Hetherington AM (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* 22,45–96.

Weckwerth P, Ehler B, Romeis T (2015) ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the Zea mays CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling. *Plant Cell Environ* 38:544–558. <https://doi.org/10.1111/pce.12414>

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Wen F, Ye F, Xiao Z et al (2020) Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase (CDPK) in grass *Brachypodium distachyon*. *BMC Genom* 21:1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6475-6>

White PJ, Bradshaw JE, Dale MFB, et al (2009) Relationships between yield and mineral concentrations in potato tubers. *HortScience* 44:6–11. <https://doi.org/10.21273/hortsci.44.1.6>

- Xiong TC, Ronzier E, Sanchez F et al (2014) Imaging long distance propagating calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-aequorin reporter. *Front Plant Sci* 5:1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00043>
- Xu J, Tian YS, Peng RH, et al (2010) AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 231:1251–1260. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1122-0>
- Yip Delormel T, Boudsocq M (2019) Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 224:585–604. <https://doi.org/10.1111/nph.16088>
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zhang C, Wang M, Khan N, et al (2021) Potentials, Utilization, and Bioengineering of Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* for Sustainable Agriculture
- Zhang H, Si X, Ji X, Fan R, Liu J, et al (2018) Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat. Biotechnol.* 36, 894–898.
- Zhang M y Lidstrom ME (2003) Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* 149:1033–1040. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26105-0>
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, et al (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:3019–3036. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050666>
- Zou JJ, Li XD, Ratnasekera D, et al (2015) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *Plant Cell* 27:1445–1460. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00144>
- Zou JJ, Wei FJ, Wang C, et al (2010) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase cpk10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol* 154:1232–1243. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157545>

ANEXO

Tablas

Tabla A1. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión mediante RT-qPCR y aquellos utilizados para PCR en el Capítulo 1. Se incluyen los números de acceso de las secuencias (<https://ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). *Descrito en Jaarsma et al. 2013.

Gen/Secuencia	Nombre utilizado	Número de acceso	Oligonucleótidos (5'-3')
Utilizados para análisis de expresión mediante RT-qPCR			
<i>Solanum tuberosum</i> calcium-dependent protein kinase 2	CDPK2	NM_001288442.1	Sl2-FP CCATGGATCAGGATCAGGAG Sl2-RP TTCATATGGCTTACCAAGAATTG
<i>Ethylene response factor 5</i>	ERF5	PGSC0003DMT400027937	ERF5-FP ATACCCGCGAAACCTGTTGT ERF5-RP TCCTAACCAACCCGAGTCC
<i>wrky</i> transcription factor 6	WRKY6	PGSC0003DMT400075091	WRKY6-FP TGATGGTCATGCTTGGAGAA WRKY6-RP TCGTTGTGGATTGTCTTGGA
<i>GAPDH</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	U17005.1	GAPDH-FP GAAGGACTGGAGAGGTGGA GAPDH-RP GACAACAGAAACATCAGCAGT
<i>Pyrroline-5-carboxylate synthase 1</i>	P5CS1	AT2G39800.1	* P5CS1-FP TTAAAGAGGACGGAGCTTGC * P5CS1-RP CAGTGCATCAGGTCGTGACT
<i>Proline dehydrogenase</i>	PDH	AT3G30775.1	* PDH-FP CCACCGATAATGAATCTTGTGAAC * PDH-RP TTGCAGAAGATTTCGGGAAGT
<i>Elongation factor 1 alpha</i>	EF-1 α	AB061263.1	EF-1 α -FP ATTGGAAACGGATATGCTCCA EF-1 α -RP TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
Utilizados para PCR			
<i>Solanum tuberosum</i> calcium-dependent protein kinase 2	CDPK2	NM_001288442.1	35S-FP ATCTCCACTGACGTAAGGGA R4-RP AAGTTCTTGAGCATCCTTGG

Tabla A2. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión mediante RT-qPCR y aquellos utilizados para PCR en el **Capítulo 2**. Se incluyen los números de acceso de las secuencias (<https://ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Gen/Secuencia	Nombre utilizado	Número de acceso	Oligonucleótidos (5'-3')	
Utilizados para análisis de expresión mediante RT-qPCR				
Pathogenesis related protein 1b	PR-1b	AY050221	StPR-1bFw	GCCCAAATTCACCCCAAGAC
			StPR-1bRv	CTGCACCGGAATGAATCAAGT
Phenylalanine ammonia-lyase 1	PAL1	KC631948.1	PAL1-Fw	GGTGTTACTACTGGATTTGGTGC
			PAL1-Rv	CCTAACAAGCATAGCTGCC
Utilizados para PCR				
16S ribosomal DNA	16S rDNA	MG818293.1	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
			Rp2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

Tabla A3. Se enumeran los genes en el genoma de *Methylobacterium* sp. 2A que pueden contribuir a su capacidad PGP. AHL: acil-homoserin lactonas.

Rasgos PGP	Anotación del gen	Nº EC	Nombre del gen KEGG
	Fitoestimulación		
Biosíntesis de L-triptofano	Tryptophan synthase alpha chain	4.2.1.20	<i>trpA</i>
	Tryptophan synthase beta chain	4.2.1.20	<i>trpB</i>
	Indole-3-glycerol phosphate synthase	4.1.1.48	<i>trpC</i>
	Anthranilate phosphoribosyltransferase	2.4.2.18	<i>trpD</i>
	Anthranilate synthase, aminase component	4.1.3.27	<i>trpE</i>
	Phosphoribosylanthranilate isomerase	5.3.1.24	<i>trpF</i>
	Anthranilate synthase, amidotransferase component	4.1.3.27	<i>trpG</i>
Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) a partir de L-triptofano	Tryptophan 2-monooxygenase	1.13.12.3	<i>iaaM</i>
	Aliphatic amidase	3.5.1.4	<i>amiE</i>
	Cobalt-containing nitrile hydratase subunit alpha	4.2.1.84	<i>nthA</i>
	Cobalt-containing nitrile hydratase subunit beta	4.2.1.84	<i>nthB</i>
	Nitrilase	3.5.5.7	
ACC desaminasa	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	3.5.99.7	<i>accD</i>
Biosíntesis de Vitamina B12	Siroheme synthase / Precorrin-2 oxidase	1.3.1.76	<i>CysG</i>
	ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase	2.5.1.17	<i>CobA/cobO</i>
	Cobyrinic acid A,C-diamide synthase	6.3.5.9	<i>CobB</i>
	CblX, a non-orthologous displasment for Alpha-ribazole-5'-phosphate phosphatase		<i>CobC</i>
	CblY, a non-orthologous displasment for Alpha-ribazole-5'-phosphate phosphatase		<i>CobC</i>
	Adenosylcobinamide-phosphate synthase	6.3.1.10	<i>CobCD</i>
	Precorrin-6A synthase	2.1.1.152	<i>CobF</i>
	Precorrin-3B synthase	1.14.13.83	<i>CobG</i>
	Cobalt-precorrin-8x methylmutase	5.4.1.2	<i>CobH</i>
	Cobalt-precorrin-2 C20-methyltransferase /	2.1.1.130	<i>CobI</i>
	Cobalt-precorrin-3b C17-methyltransferase	2.1.1.131	<i>CobJ</i>
	Cobalt-precorrin-6x reductase	1.3.1.54	<i>CobK</i>
	Cobalt-precorrin-6y C5-methyltransferase / Cobalt-precorrin-6y C15-methyltransferase	2.1.1.132	<i>CobL</i>

	[decarboxylating]		
	Cobalt-precorrin-4 C11-methyltransferase	2.1.1.133	<i>cobM</i>
	CobN component of cobalt chelatase involved in B12 biosynthesis	6.6.1.2	<i>CobN</i>
	Cobyric acid synthase	6.3.5.10	<i>CobQ</i>
	Cobalamin biosynthesis protein BluB @ 5,6-dimethylbenzimidazole synthase putative CobR	1.13.11.79	<i>BluB/CobR</i>
	Aerobic cobaltochelataze CobS subunit	6.6.1.2	<i>CobNST</i>
	Cobalamin 5'-phosphate synthase	2.7.8.26	<i>CobS</i>
	Aerobic cobaltochelataze CobT subunit	6.6.1.2	<i>CobT</i>
	Adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase	2.7.1.156/2.7.7.62	<i>CobP/U</i>
	CobW GTPase involved in cobalt insertion for B12 biosynthesis		<i>CobW</i>
	Outer membrane vitamin B12 receptor BtuB		<i>BtuB</i>
	Optional hypothetical component of the B12 transporter BtuN		<i>BtuN</i>
	Vitamin B12 ABC transporter, permease component BtuC		<i>BtuC</i>
Fitofertilización			
	Two-component nitrogen fixation transcriptional regulator FixJ		<i>FixJ</i>
	Two-component oxygen-sensor histidine kinase FixL		<i>FixL</i>
	Nitrogen regulation protein NtrB	2.7.13.3	<i>NtrB</i>
	Nitrogen regulation protein NtrC		<i>NtrC</i>
	Nitrogen regulation protein NtrX		<i>NtrX</i>
Fijación de Nitrógeno	Nitrogen regulation protein NtrY	2.7.3.-	<i>NtrY</i>
	Flavodoxin reductase		<i>nifJ</i>
	Serine acetyltransferase	2.3.1.30	<i>nifP</i>
	Cysteine desulfurase	2.8.1.7	<i>nifS</i>
	Iron-sulfur cluster assembly protein		<i>nifU</i>
	Assimilatory nitrate reductase large subunit	1.7.1.1	<i>NR</i>
	Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit	1.7.1.4	<i>nirB</i>
Metabolismo del nitrógeno y asimilación de amoníaco	Ferredoxin--nitrite reductase	1.7.7.1	<i>nir</i>
	Glutaminase	3.5.1.2	<i>glsA</i>
	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	6.3.5.4	<i>AS-B</i>

	Formamidase	3.5.1.49	<i>amiF</i>
	Glutamine synthetase type I	6.3.1.2	<i>glnA</i>
	Glutamate synthase [NADPH] large chain	1.4.1.13	<i>gltB</i>
	Glutamate synthase [NADPH] small chain	1.4.1.13	<i>gltD</i>
	NAD ⁺ -specific glutamate dehydrogenase	1.4.1.2	
	Ammonium transporter		
Solubilización de fosfato inorgánico	Coenzyme PQQ synthesis protein A		<i>pqqA</i>
	Coenzyme PQQ synthesis protein B		<i>pqqB</i>
	Coenzyme PQQ synthesis protein C/D		<i>pqqC/D</i>
	Coenzyme PQQ synthesis protein E		<i>pqqE</i>
	UDP-glucose dehydrogenase	1.1.1.22	<i>gdh</i>
	Protease		<i>pqqF</i>
	Zinc protease		<i>pqqG</i>
Adquisición de fosfato orgánico	Nonspecific acid phosphatase precursor	3.1.3.2	
	Probable acid phosphatase		
Otros genes que confieren aptitud PGP			
Quimiotaxis bacteriana	Signal transduction histidine kinase CheA	2.7.3.-	<i>CheA</i>
	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase CheB	3.1.1.61	<i>CheB</i>
	Chemotaxis protein methyltransferase CheR	2.1.1.80	<i>CheR</i>
	Chemotaxis protein CheV	2.7.3.-	<i>CheV</i>
	Positive regulator of CheA protein activity		<i>CheW</i>
	Chemotaxis protein motC		<i>motC</i>
	Chemotaxis response regulator containing a CheY-like receiver domain and a methylesterase domain		
	Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY		
	CheY-like receiver		
	Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)		<i>MCP</i>
Motilidad bacteriana	Flagellar basal-body P-ring formation protein		<i>FlgA</i>
	Flagellar basal-body rod protein FlgB		<i>FlgB</i>
	Flagellar basal-body rod protein FlgC		<i>FlgC</i>
	Flagellar basal-body rod modification protein		<i>FlgD</i>
	Flagellar hook protein FlgE		<i>FlgE</i>

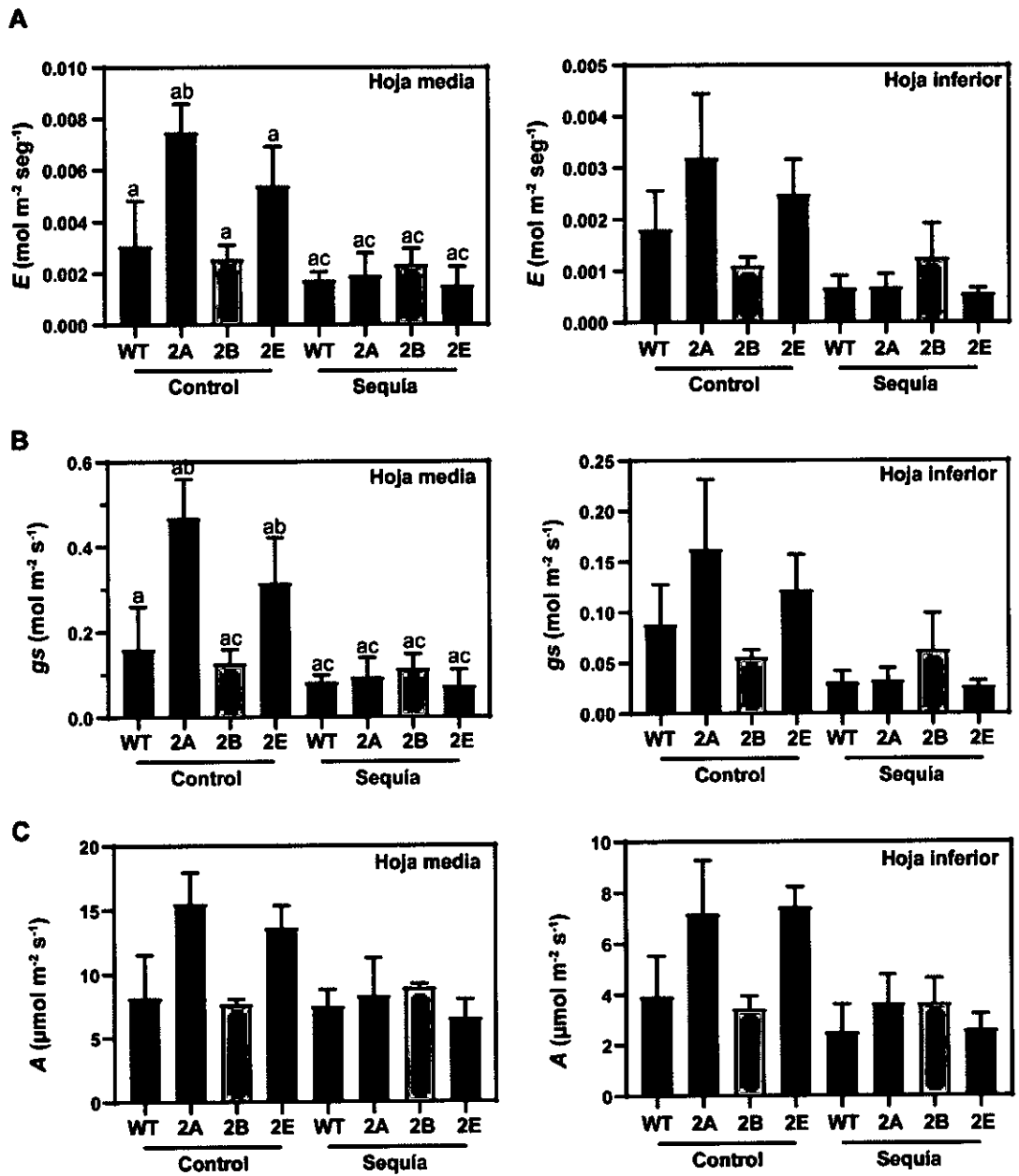
	Flagellar basal-body rod protein FlgF		<i>FlgF</i>
	Flagellar basal-body rod protein FlgG		<i>FlgG</i>
	Flagellar L-ring protein FlgH		<i>FlgH</i>
	Flagellar P-ring protein FlgI		<i>FlgI</i>
	Flagellar protein FlgJ [peptidoglycan hydrolase]	3.2.1.-	<i>FlgJ</i>
	Flagellar hook-associated protein FlgK		<i>FlgK</i>
	Flagellar hook-associated protein FlgL		<i>FlgL</i>
	Flagellar biosynthesis protein FlhA		<i>FlhA</i>
	Flagellar biosynthesis protein FlhB		<i>FlhB</i>
	Flagellar biosynthesis protein FliL		<i>FliL</i>
	Flagellar biosynthesis protein FliP		<i>FliP</i>
	Flagellar biosynthesis protein FliQ		<i>FliQ</i>
	Flagellar biosynthesis protein FliR		<i>FliR</i>
	Flagellar hook-associated protein FliD		<i>FliD</i>
	Flagellar hook-basal body complex protein FliE		<i>FliE</i>
	Flagellar M-ring protein FliF		<i>FliF</i>
	Flagellar motor switch protein FliG		<i>FliG</i>
	Flagellum-specific ATP synthase FliI		<i>FliI</i>
	Flagellar protein FliJ		<i>FliJ</i>
	Flagellar hook-length control protein FliK		<i>FliK</i>
	Flagellar motor switch protein FliM		<i>FliM</i>
	Flagellar motor switch protein FliN		<i>FliN</i>
	Flagellar trans-acting factor FliX		<i>FliX</i>
	Flagellar protein FlbB		<i>FlbB</i>
	Flagellin protein FlaA		<i>FlaA</i>
	Flagellar motor rotation protein MotA		<i>MotA</i>
	Flagellar motor rotation protein MotB		<i>MotB</i>
Degradación de especies reactivas de oxígeno / Degradación de radicales superóxido	Superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor	1.15.1.1	<i>sodC</i>
	Superoxide dismutase [Fe]	1.15.1.1	<i>sodB</i>
	Catalase	1.11.1.6	<i>CAT</i>
	Putative manganese containing catalase		

	Peroxidase	1.11.1.7	
	Thiol peroxidase	1.11.1.15	<i>tpx</i>
	Cytochrome c551 peroxidase	1.11.1.5	
	Glutathione reductase		
	Glutathione peroxidase family protein	1.11.1.9	<i>GPx</i>
Compuestos antimicrobianos			
Producción de quitinasa	Chitinase	3.2.1.14	<i>ChiC</i>
Producción de fenazina	Phenazine biosynthesis protein PhzF like		<i>PhzF</i>
	Dihydrofolate synthase	6.3.2.12	<i>folC</i>
	Folypolyglutamate synthase	6.3.2.17	<i>folC</i>
	Amidophosphoribosyltransferase	2.4.2.14	<i>purF</i>
	Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase beta chain	6.4.1.2	
Producción de colicina	Colicin V production protein		<i>CvpA</i>
	tRNA pseudouridine synthase A	4.2.1.70	
	TolA protein		<i>TolA</i>
	TolB protein precursor, periplasmic protein involved in the tonb-independent uptake of group A colicins		<i>TolB</i>
	Type I secretion outer membrane protein, TolC precursor		<i>TolC</i>
Producción de 4-hidroxibenzoato	4-hydroxybenzoate polyprenyl transferase	2.5.1.39	<i>ubiA</i>
	4-hydroxybenzoate transporter		<i>pcaK</i>
Degradación de AHLs	Penicillin acylase	3.5.1.11	<i>PAH</i>
	Siderophore biosynthesis protein, monooxygenase		
	Siderophore synthetase large component, acetyltransferase		
	Siderophore synthetase small component, acetyltransferase		
	Siderophore synthetase component, ligase		
Biosíntesis de sideróforos	Siderophore biosynthesis diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	2.6.1.76	<i>EctB</i>
	TonB-dependent siderophore receptor		
	TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor		
	L-lysine 6-monooxygenase	1.14.13.59	<i>iucD</i>
Biosíntesis de aerobactina	N6-hydroxylysine O-acetyltransferase	2.3.1.102	<i>iucB</i>
	Citrate:6-N-acetyl-6-N-hydroxy-L-lysine ligase, alpha subunit	6.3.2.27	<i>iucA/C</i>
	Aerobactin siderophore receptor iutA		<i>iutA</i>

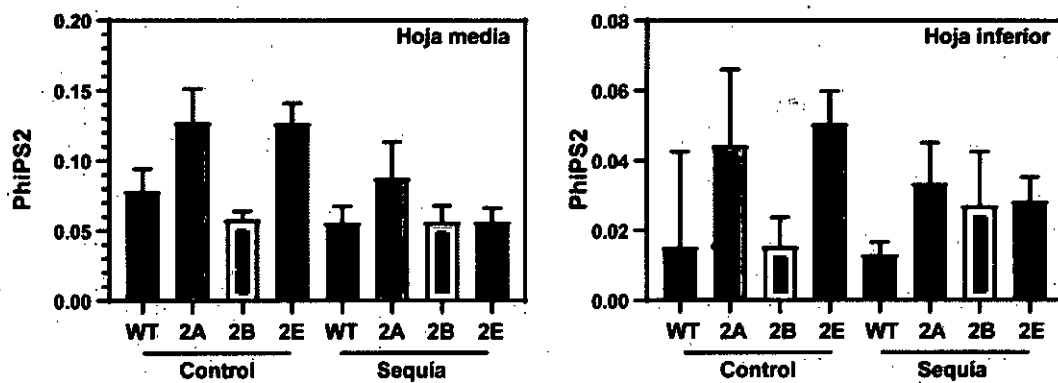
Biosíntesis de enterobactina	Isochorismatase	3.3.2.1	<i>EntB</i>
	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	2.7.7.58	<i>entE</i>
	Holo-[acyl-carrier protein] synthase	2.7.8.7	<i>acpS</i>
	4'-phosphopantetheinyl transferase	2.7.8.-	<i>entD</i>
Resistencia a antibióticos			
Cloranfenicol	Chloramphenicol acetyltransferase	2.3.1.28	
B-lactamasa	B-lactamase	3.5.2.6	<i>blaP</i>

Figuras

Figura A1. Medición de los parámetros fotosintéticos de plantas WT y 35S:StCDPK2 2A, 2B y 2E. (A) La tasa de transpiración (E , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (B) la conductancia estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (C) la tasa de asimilación neta con irradiancia de saturación (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (D) la eficiencia fotoquímica del PSII (PhiPS2) y (E) la tasa de transporte de electrones (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron los parámetros cuantificados luego del *rewatering* en hojas completamente expandidas medias e inferiores de plantas control y sometidas a sequía. En los histogramas se muestra graficada la media \pm error estándar. Se realizó un análisis de ANOVA de dos factores con Test de Tukey. Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.



D



E

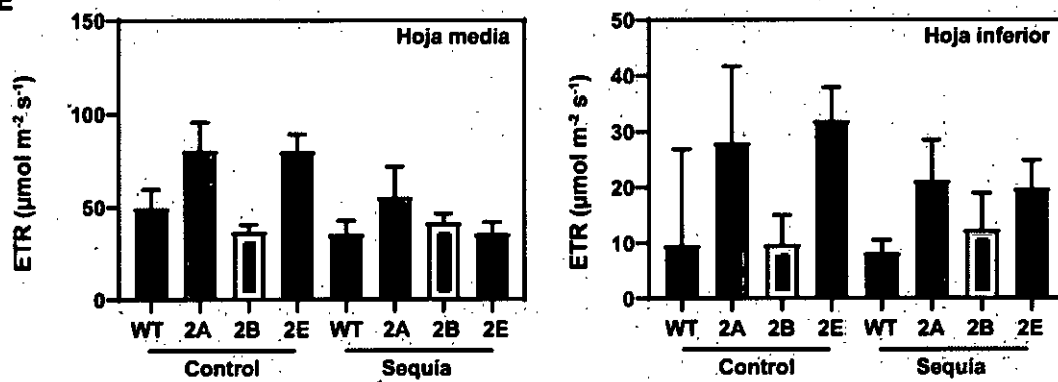
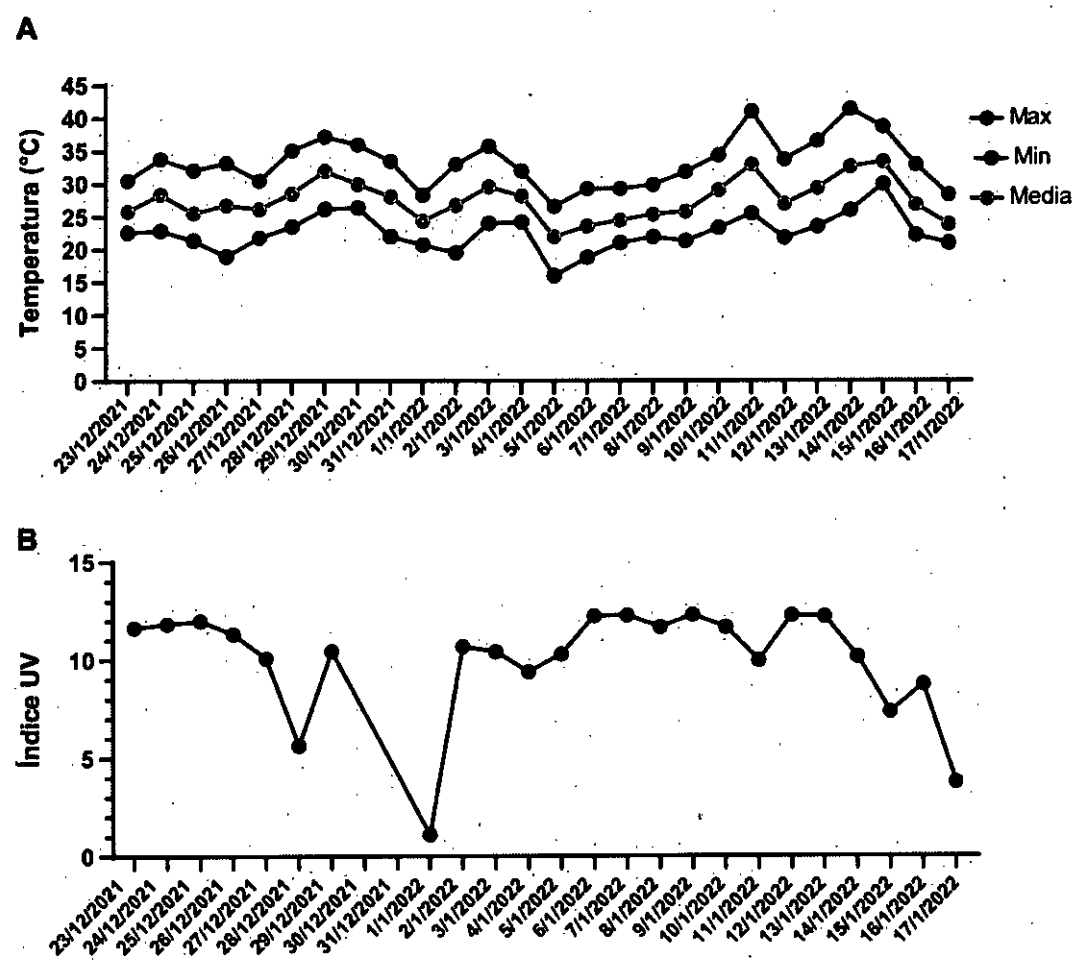


Figura A2. Datos de temperatura e índice UV durante los 25 días en los que las plantas de papa WT Y 35S:StCDPK2 2B, 2D y 2E fueron sometidas a sequía. Se encuentran graficadas las temperaturas (°C) máximas, mínimas y medias (A) y el índice UV (B) para cada día. Los días 11/1/22 y 14/1/22 las temperaturas máximas fueron de 41,1 y 41,5°C, respectivamente. Estos datos fueron medidos en el Observatorio Central de la Ciudad de Buenos Aires (OCBA) y cedidos gentilmente por el Servicio Meteorológico Nacional.



Software

Se utilizaron diferentes software para análisis de datos o de imágenes:

- **Diseño de oligonucleótidos:** Se utilizaron las herramientas online Primer BLAST y OligoAnalyzer disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> y <http://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>, respectivamente.
- **Comparación de secuencias:** BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Basic Local Alignment Search Tool.
- **Gráficos y análisis estadístico:** Todos los análisis y gráficos contenidos en este trabajo fueron realizados por medio del software GraphPad Prism versión 5.03 (GraphPad Software), disponible en: <http://graphpad.com>.
- **Búsqueda de elementos reguladores en promotores:** Se descargaron las matrices de PlantPAN 3.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw>; Chow et al. 2019) y se utilizó la MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>; Grant et al. 2011) para escanear las secuencias promotoras.

Materiales biológicos

Aislamiento:	Cedido por:
<i>Phytophthora infestans</i> Pi-60	Lic. Natalia Norero (Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA EEA Balcarce)
<i>Botrytis cinerea</i> T4	Dr. Fernando Pieckenstain (IIB-INTECH, UNSAM-CONICET)
<i>A. brasilense</i> Az39 <i>P. fluorescens</i> BNM 233	Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA, CICVyA, INTA Castelar)
<i>Pythium dissotocum</i>	M. Sc. Pablo Grijalba (Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UBA)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Dr. Natalia Almasia (Instituto de Biotecnología, INTA Castelar)

Semillas:	Cedidas por:
<i>Arabidopsis</i> Col-0 Tomate Microtom WT y <i>DR5:GUS</i>	Dr. Diego Wengier (INGEBI-CONICET)

Composición de los medios de cultivo utilizados

Medios para el cultivo *in vitro* de plantas:

Medio MS 2% (pH 5,7) (para el cultivo de papa):

Sales de MS..... 4,42 g/l
Sacarosa 2% (p/v)..... 20 g/l
± Agar..... 7 g/l

Medio MS 0,5X 3% (pH 5,7) (para el cultivo de tomate):

Sales de MS..... 2,21 g/l
Sacarosa 2% (p/v)..... 30 g/l
± Agar..... 7 g/l

Medio MS 0,5X (pH 5,7) (para el cultivo de Arabidopsis):

Sales de MS..... 2,21 g/l
± Agar..... 7 g/l

Medios para el cultivo de *Methylobacterium* sp. 2A:

Luria-Bertani (para el cultivo de bacterias):

Peptona.....10 g/l
Extracto de levadura..... 5 g/l
± Agar..... 15 g/l
± NaCl (- NaCl: LBNS)..... 10 g/l

Medio PSA (*pea sucrose agar*):

Arvejas.....160 g/l
Sacarosa..... 5 g/l
± Agar..... 15 g/l

Medio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium):

Glucosa.....	10 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,25 g/l
KCl.....	0,2 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/l
Agar.....	15 g/l

Medio Mínimo M9:

Sales de M9 5X.....	200 ml/l
MgSO ₄ 1M.....	2 ml/l
CaCl ₂ 1M.....	0,1 ml/l
Solución 20% de la fuente de carbono...	20 ml/l

Sales de M9 5X:

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O.....	64 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
NaCl.....	2,5 g/l
NH ₄ Cl.....	5,0 g/l

Medio para el cultivo de *P. infestans*:

Medio RSA (*rye sucrose agar*):

Grano de centeno germinado.....	60 g/l
Sacarosa.....	20 g/l
± Agar.....	15 g/l