



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS PSICROTOLERANTES
PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE PLANTAS DE
INTERÉS PRODUCTIVO DE CHILE AFECTADOS POR LAS BAJAS
TEMPERATURAS**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Alumna: Paulina A. Vega Celedón.

Profesor Guía: Dr. Michael Seeger Pfeiffer.

AGOSTO, 2020

Resumen

El estrés provocado por las bajas temperaturas en las plantas provoca principalmente disminuciones en el crecimiento y la productividad de diversos cultivos agrícolas. Chile es un país líder mundial en la exportación de fruta. Las zonas centro y sur de Chile concentran las mayores superficies de cultivos, y a su vez, son las zonas más afectadas por las heladas, que dificulta y pelagra el desarrollo de variadas especies de plantas. Asimismo, el aumento de la temperatura, generado por el cambio climático, reduce el tiempo de aclimatación al frío de las plantas, ocurriendo más tarde en otoño o a principios del invierno, reduciendo directamente la efectividad de la aclimatación al frío y la tolerancia a la congelación, provocando mayor susceptibilidad de las plantas a eventos de heladas. Actualmente, se utilizan métodos activos y pasivos para contrarrestar el efecto de las bajas temperaturas, pero requieren de esfuerzo y la toma de precauciones que involucran la utilización de agentes químicos. Frente a esta problemática, se hace imperativo la búsqueda de alternativas sustentables que permitan disminuir los daños provocados por el estrés por frío. Una alternativa, es la utilización de bacterias tolerantes al frío, promotoras del crecimiento vegetal, que presenten la habilidad de proteger y promover el crecimiento de las plantas frente a diversos tipos de estrés. La hipótesis de esta tesis postula que bacterias psicotolerantes promotoras del crecimiento vegetal, aisladas desde flora silvestre de zonas andinas y subantárticas de Chile, tienen la capacidad de modular la respuesta a estrés por enfriamiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y de proteger y promover el crecimiento de una planta de interés productivo (e.g., *Persea americana* Mill.) a bajas temperaturas en condiciones de campo. Los objetivos de esta tesis comprenden (i) aislar e identificar bacterias psicotolerantes asociadas a la rizósfera y la filósfera de flora silvestre de zonas andinas y subantárticas de Chile, (ii) definir y caracterizar un consorcio bacteriano psicotolerante mediante la evaluación de actividades de protección y promoción del crecimiento vegetal de los aislados, (iii) evaluar la capacidad del consorcio bacteriano de modular la expresión de genes involucrados en respuesta a estrés por enfriamiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y (iv) determinar el efecto del consorcio bacteriano sobre la tolerancia al frío y promoción del crecimiento de paltos (*Persea americana* Mill. cv. Hass) a bajas temperaturas en condiciones de campo. Diversas bacterias psicotolerantes con características promotoras

del crecimiento vegetal fueron aisladas desde flora silvestre de ambientes fríos de Chile. Se seleccionó un consorcio bacteriano psicotolerante, con múltiples actividades protectoras y promotoras del crecimiento del crecimiento vegetal, compuesto por *Pseudomonas* sp. CpR2b y *Pseudomonas* sp. TmR8. El efecto protector y promotor del crecimiento, frente a estrés por frío del consorcio seleccionado fue evaluado en plantas de *A. thaliana*, tomate y paltos. Este consorcio, aplicado de forma radicular y foliar, tuvo la capacidad de promover el crecimiento de plantas de *A. thaliana* bajo estrés por enfriamiento, además de aumentar la expresión de los genes involucrados en la vía de señalización por frío (*cbf3*, *cbf2* y *cbf1*) y disminuir la expresión del gen *della gai*, involucrado en la disminución del crecimiento de *A. thaliana*, evidenciando su efecto positivo sobre el crecimiento de esta planta. Este consorcio, aplicado de forma radicular y foliar, tuvo la capacidad de promover el crecimiento de plantas de tomate bajo estrés por enfriamiento, presentando una mayor sobrevivencia al estrés por congelamiento con el tratamiento foliar. Este consorcio, aplicado de forma radicular en condición de campo, tuvo la capacidad de promover el crecimiento de paltos durante la época de invierno de 2018 y protegerlos de las heladas ocurridas en julio–agosto de ese año, disminuyendo en un 15,8% la severidad del daño causado por este efecto climático. Sumado a estos efectos sobre el estrés por frío en plantas, se observó una disminución del estrés oxidativo en plantas de tomate frente a estrés hídrico, mediante la aplicación radicular y foliar de este consorcio. En esta tesis, el consorcio, compuesto por bacterias aisladas desde flora silvestre de la Cordillera de Los Andes, presentó la habilidad de proteger y promover el crecimiento vegetal frente al estrés por frío y otros tipos de estrés bióticos y abióticos, además, de modular positivamente genes involucrados en el crecimiento y la vía de señalización por frío en plantas, pudiendo de esta manera convertirse en un atractivo biofertilizante para la agricultura.

Abstract

“Effect of a consortium of psychrotolerant plant growth-promoting bacteria on agricultural plants of Chile affected by low temperatures”

The stress caused by low temperatures in plants mainly causes decreases in the growth and productivity of many agricultural crops. Chile is a world leader in fruit export. Central and Southern Chile concentrate the largest areas of crops, and in turn, are the most affected areas by frost, which hinders and endangers the development of many plant species. The increase in temperature, generated by the climate change, reduces the time of cold acclimatization in plants, occurring later in autumn or early winter, directly reducing the effectiveness of the cold acclimatization and tolerance to freezing, causing higher susceptibility of plants to frost events. Currently, active, and passive methods are used to counteract the effects of low temperatures, but they require efforts and precautions involving the use of chemical agents. Therefore, the search for sustainable alternatives that allow reducing the damage caused by cold stress becomes essential. An alternative is the use of cold tolerant plant growth-promoting bacteria, which have the ability to protect and promote plant growth against several types of stress. Consequently, the hypothesis of this thesis postulates that plant growth-promoting psychrotolerant bacteria, isolated from the wild flora of the Andean and subantarctic areas of Chile, have the ability to modulate the chilling stress response of the model plant *Arabidopsis thaliana*, and to protect and to promote the growth of an agricultural plant (*e.g.*, *Persea americana* Mill.) at low temperatures on field conditions. The aims of this thesis are (i) to isolate and identify psychrotolerant bacteria associated with the rhizosphere and phyllosphere of wild flora of Andean and Subantarctic zones of Chile, (ii) to define and characterize a psychrotolerant consortium by evaluating protection and plant growth-promoting activities of bacterial isolates, (iii) to assess the ability of the bacterial consortium to modulate the expression of genes involved in the response to chilling stress in the model plant *Arabidopsis thaliana*, and (iv) to determine the effects of the bacterial consortium on avocado (*Persea americana* Mill.) cold tolerance and growth-promotion at low temperatures on field. From this study, several psychrotolerant bacteria with plant growth-promoting characteristics were isolated from wild flora in cold environments of Chile. A psychrotolerant

bacterial consortium with several protective and promoting activities of plant growth was selected, composed by *Pseudomonas* sp. CpR2b and *Pseudomonas* sp. TmR8. The protective and growth-promoting effect against cold stress of the selected consortium was evaluated in *A. thaliana*, tomato, and avocado plants. This consortium, applied in a root and foliar treatments, had the ability to promote the growth of *A. thaliana* plants under chilling stress, in addition to increasing the expression of the genes involved in the cold signaling pathway (*cbf3*, *cbf2*, and *cbf1*) and decreasing the expression of the *della gai* gene, involved in the growth decrease of *A. thaliana*, showing its positive effect on the growth of this plant. This consortium, applied using root and foliar treatments, had the ability to promote the growth of tomato plants under chilling stress, presenting a higher survival to freezing stress with the foliar treatment. This consortium, applied in a root treatment on field, had the ability to promote the growth of avocados during the winter season of 2018 and protect them from the frosts that occurred in July - August of that year, decreasing the severity of the damage (15.8% less) caused by this climatic effect. In addition to these effects on cold stress in plants, a decrease in oxidative stress in tomato plants under water stress was observed, through root and foliar applications of this consortium. In this thesis, the consortium, composed by bacteria isolated from wild flora of the Andes Mountains, presented the ability to protect and promote the plant growth against cold stress and other types of biotic and abiotic stress, in addition to positively modulating genes involved in growth and the cold signaling pathway in plants, thus becoming an attractive biofertilizer for agriculture.