



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Factores abióticos que afectan la biosíntesis de ácido indolacético en bacterias endófitas de maíz

Silvana Vico

Orientador: Dra. Adriana Montañez
Laboratorio de Microbiología de Suelos,
IECA, Facultad de Ciencias.

Montevideo
2017

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 AUXINAS	2
1.2 ÁCIDO INDOLACÉTICO	2
1.3 MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	4
1.3.1 Bacterias endófitas	4
1.4 BIOSÍNTESIS BACTERIANA DE AIA	5
1.4.1 Vías de síntesis de AIA en bacterias	7
1.5 MÉTODOS PARA DETERMINAR INDOLES Y AIA	10
1.6 FACTORES MODULADORES DE LA BIOSÍNTESIS	12
2. HIPOTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 CEPAS BACTERIANAS	17
4.2 CONDICIONES DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS CEPAS	18
4.3. BIOSÍNTESIS DE INDOLES TOTALES	19
4.4 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO	19
4.4.1 Preparacion de extractos	20
4.4.2 Condiciones para análisis por HPLC-UV	20
4.4.3 Condiciones para análisis por HPLC-MS	21

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1 BIOSÍNTESIS DE INDOLES TOTALES POR LAS CEPAS	22
5.1.1 Efecto de la temperatura de crecimiento en la biosíntesis de indoles.....	22
5.1.2 Efecto de la fuente de carbono en la biosíntesis de indoles.....	24
5.1.3 Puesta a punto de la técnica colorimétrica.....	25
5.2. PRODUCCIÓN DE AIA POR LAS CEPAS SEGÚN LA FUENTE DE CARBONO.	26
5.2.1 Detección de AIA por HPLC-UV.....	26
5.2.2 Cuantificación de AIA por HPLC-MS.....	28
5.3 METABOLITOS INTERMEDIARIOS Y/O DE RESERVA EN LA BIOSÍNTESIS DE AIA.....	31
7. CONCLUSIONES	33
8. PERSPECTIVAS	34
9. ANEXO	35
9.1 Medios de cultivo y reactivos.....	35
10. BIBLIOGRAFÍA	36

Índice de figuras

Fig 1. Estructura química del ácido indolacético.	3
Fig. 2. Vías metabólicas de producción de AIA a partir de triptófano en bacterias.	7
Fig. 3. Producción de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en diferentes temperaturas de crecimiento.....	22
Fig 4. Curvas de calibración de AIA, Correlación entre métodos.	25
Fig 5. Cromatograma y espectro de masas de estándar de ácido indolacético.....	28

RESUMEN

El ácido indolacético (AIA) es la auxina responsable de la división, expansión y diferenciación de las células y tejidos de las plantas, estimula la elongación de las raíces y promueve la defensa contra fitopatógenos. El 80 % de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen AIA. La producción en bacterias está regulada, entre otros, por factores ambientales, pero los mecanismos por los cuales las bacterias regulan los niveles de AIA son complejos y no están completamente estudiados. Se ha establecido que el AIA es sintetizado principalmente a partir del triptófano y se conocen al menos tres vías metabólicas a partir de este compuesto. Más allá de la regulación genética es necesario conocer los factores ambientales que regulan la utilización de las distintas vías metabólicas implicadas en la biosíntesis. Es posible que distintos recursos nutricionales y/o factores ambientales modulen la biosíntesis y la síntesis de distintos conjugados. El objetivo de este trabajo fue estudiar la biosíntesis de AIA usando como precursor el triptófano, a distintas temperaturas y fuentes de carbono, en distintos aislamientos bacterianos endófitos aislados de maíz. Los aislamientos utilizados fueron: EMA 68, *Pseudomona fluorescens*; EMA 83 y EMA 171 *Rhanelia spp*; EMA 175, *Burkholderia cepacia*; y EMA 176, *Rhizobium spp*. La biosíntesis de AIA y otros indoles se determinó mediante el método colorimétrico de Salkowski, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-UV) y HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC/MS). Los resultados constataron diferencias en la biosíntesis de AIA por las distintas cepas y bajo las distintas condiciones de crecimiento, temperatura y fuentes carbonadas. La temperatura óptima de producción fue en la mayoría de las cepas 28°C. Los resultados para las distintas fuentes de carbono mostraron, una notoria modulación en la producción de AIA tanto en *Pseudomona fluorescens* y como en *Rhizobium spp*. Los análisis por espectrometría de masa mostraron información sobre las posibles vías biosintéticas utilizadas para la síntesis de dicha auxina, mediante la detección de compuestos de reserva Indol-3-láctico y Triptofol. De acuerdo a esto último, deducimos que las cepas de *Rhanelia spp* (EMA 83 y 171) así como *Burkholderia cepacia* (EMA 175) utilizarían por lo menos la vía del indol pirúvico, no así *Pseudomona fluorescens* (EMA 68) ni *Rhizobium spp* (EMA 176) que utilizarían vías alternativas. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los factores abióticos (temperatura y fuente de carbono) modulan la producción de AIA y que esta es dependiente de cada cepa. El método óptimo para cuantificarlo es el HPLC/MS porque es el más preciso y específico y aporta información muy valiosa desde punto de vista metabólico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 AUXINAS

Las auxinas son el grupo principal de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal. Estos compuestos orgánicos son de bajo peso molecular y actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son sintetizados, interviniendo en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas, entre otros (Salisbury & Ross 1994; Petrusek & Friml 2009). Estos reguladores están directamente involucrados en procesos metabólicos y/o en el proceso de desarrollo, tal es el caso de la inducción de la floración. Dado que actúan en bajas concentraciones para modificar dichos procesos, sus efectos varían según su interacción con otros reguladores de crecimiento vegetal. Es de esta forma que regulan o influyen en un rango de procesos celulares y fisiológicos entre los que se cuentan la división celular, diferenciación celular, desarrollo de frutos, tropismos, germinación de semillas, senescencia, abscisión de las hojas, entre otros (Zažímalová et al. 2014)

La auxina natural más abundante y de mayor importancia fisiológica es el ácido indolacético (AIA) (Taiz & Zeiger 2010).

1.2 ÁCIDO INDOLACÉTICO

Los primeros estudios que se llevaron a cabo en vías de descubrir el AIA datan del siglo XIX, cuando el botánico alemán Julian von Sachs propuso que una sustancia endógena era la responsable de la formación y crecimiento de diferentes órganos de la planta y sugirió que dicha sustancia se moviliza a través de la planta en respuesta a factores externos como la gravedad. Años después Charles Darwin e hijo demostraron que el ápice del coleoptilo de las gramíneas era el responsable que las plantas se curvaran hacia la luz (fototropismo) y que ello era producido por una señal interna. Tras diversos estudios tratando de dilucidar la molécula responsable de estos eventos, en 1926 Fritz Went demostró que efectivamente era una sustancia química la que provocaba estos fenómenos, la denominó auxina. Años después identificaron químicamente esta sustancia como AIA (Taiz & Zeiger 2010).

Estructuralmente es un ácido carboxílico ($C_{10}H_9NO_2$, peso molecular = 175 g/mol) en el que el grupo carboxilo está unido a través de un grupo metileno a la posición C-3 de un anillo de indol (Fig. 1), siendo la distancia de 0.5 nm entre la carga negativa en el grupo carboxilo y la carga residual positiva del anillo aromático la responsable de la actividad auxínica (Taiz & Zeiger 2010).

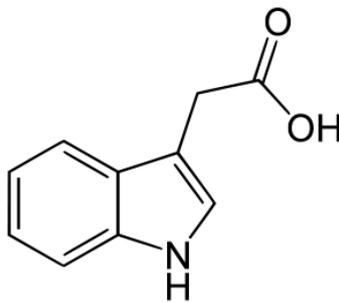


Fig 1. Estructura química del ácido indolacético (Taiz & Zeiger 2010).

EL AIA es la auxina natural más abundante presente en la mayoría de las plantas pero la habilidad de sintetizar esta hormona no es solo un atributo de las plantas, sino que es también una característica de muchas bacterias, levaduras y hongos, entre otros seres vivos (Lehmann et al. 2010).

El 80 % de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) producen esta y otras fitohormonas, siendo una característica muy aprovechable desde el punto de vista agronómico (Patten & Glick 2002). La eficacia de esta fitohormona natural se ha comprobado en diversos estudios, en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y la calidad de las cosechas (Frankenberger, W. T. & Arshad 1995).

1.3 MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) son aquellos microorganismos habitantes de la rizósfera o endófitos de plantas que estimulan significativamente el crecimiento de las mismas. Los mecanismos por los cuales ejercen efectos positivos sobre las plantas son numerosos y podemos clasificarlos en directos e indirectos. La promoción directa del crecimiento ocurre cuando los MPCV proveen compuestos que afectan el metabolismo de la planta o cuando ellos facilitan la adquisición de nutrientes del suelo no disponible para la planta. El mecanismo directo de promoción de crecimiento más importante después de la fijación biológica de nitrógeno es la síntesis de fitohormonas u otros compuestos reguladores. (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Boiero et al. 2007). De forma indirecta los microorganismos pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo y/o mejorar la resistencia a patógenos (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006; Lugtenberg & Kamilova 2009).

Las bacterias que promueven el crecimiento vegetal (BPCV) son un grupo heterogéneo que puede encontrarse en la rizósfera, asociado a las raíces o de forma endófito.

1.3.1 *Bacterias endófitas*

Bacterias endófitas se definen como las bacterias que colonizan el tejido sano de la planta sin causar síntomas evidentes o no producir lesiones obvias en el huésped. (Bacon & Hinton 2006).

Dichas bacterias habitan dentro de los tejidos de las plantas (intercelulares), al menos durante una parte de su ciclo de vida sin causar daño alguno al hospedero, establecen asociación simbiótica y producen grandes beneficios para las plantas. Las bacterias endófitas cumplen una gran diversidad de funciones como promotoras de crecimiento vegetal, control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos, así como también mejoran la eficiencia de los procesos de fitorremediación de compuesto tóxicos en la rizósfera (Marrero-Coto et al. 2012). Estos microorganismo son fuentes inagotable de más de 20.000 compuestos biológicamente activos, los cuales influyen de manera directa en el rendimiento y supervivencia de las plantas

hospederas. Diversos estudios sobre bacterias endófitas han reportado que éstas pueden producir diversos metabolitos con efectos benéficos como antibióticos, metabolitos secundarios incluyendo algunos compuestos antitumorales, agentes antiinflamatorios, etc. (Bacon & Hinton 2006; Eroglu S 2012).

1.4 BIOSÍNTESIS BACTERIANA DE AIA

Diferentes tipos de bacterias son capaces de sintetizar AIA tales como bacterias rizosféricas, endófitas, cianobacterias, entre otras (Sergeeva et al. 2002; Ahmed et al. 2010)(Sergeeva et al. 2002; Ahmed et al. 2010). Dentro de los géneros más estudiados encontramos: *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Agrobacterium* (Carreño-Lopez et al. 2000; Torres-Rubio et al. 2000; Cassán & Garcia de Salamone 2008; Apine & Jadhav 2011).

La interacción de estos microorganismos con las plantas puede ser benéfica, donde el AIA se comporta como molécula señal recíproca en la interacción entre planta y microorganismo manteniendo la relación simbiótica desarrollada entre plantas hospederas y sus microorganismos aliados (Malhotra & Srivastava 2009), o por el contrario pueden ser patógenas tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* o *Pseudomonas putida* donde se asocia la producción de AIA con genes de virulencia (Thomashow et al. 1984; Patten & Glick 2002; Baca & Elmerich 2007).

Independientemente de la especie, la producción de AIA por parte de bacterias rizosféricas puede tener un efecto positivo o no al interactuar con la planta dado que la raíz es muy sensible a las concentraciones del mismo. Pequeñas cantidades suelen ser las óptimas para obtener un resultado deseado en las raíces, mientras que una elevada concentración llevaría a inhibir el crecimiento. También hay que tener en cuenta que la planta puede contar internamente con una cantidad menor o mayor de esta auxina de forma libre o conjugada la cual se verá aumentada con el ingreso de AIA de origen bacteriano y con ello sus efectos. Al aumentar moderadamente el AIA endógeno de la planta, ésta puede responder mediante un mecanismo de regulación que le permite convertir en conjugados el AIA en exceso. Sin embargo cuando ciertos microorganismos rizosféricos o endófitos sobrepasan el umbral

controlable de la planta, ésta ya no puede responder favorablemente y forma tumores, como es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (Patten & Glick 1996; Spaepen et al. 2007).

Por este motivo, el uso de microorganismos con este tipo de características para la inoculación en plantas debe ser rigurosamente estudiado para evitar obtener efectos indeseados sobre el desarrollo radical de las plantas.

Así mismo, cabe mencionar que el AIA producido por las bacterias no solo tiene efectos directos sobre la planta sino que también lo tiene sobre las propias bacterias, actuando como molécula señal que desencadena la expresión de genes involucrados en la adhesión, adaptación y virulencia, lo que lleva a una mejor adaptación a los tejidos vegetales, favoreciendo la colonización de la planta (Domka et al. 2006; van Puyvelde et al. 2011; Pandey et al. 2013).

1.4.1 Vías de síntesis de AIA en bacterias

Al igual que en las plantas la biosíntesis bacteriana de AIA puede ser triptófano dependiente o triptófano independiente. Existen 6 vías en bacterias para la biosíntesis de AIA, de las cuales 5 utilizan triptófano como precursor. Se han identificado 2 vías principales con triptófano como precursor, la vía del indol-3-piruvato (IpyA) y la vía indol-3- acetamida (IAM), así como 3 vías secundarias: vía de la triptamina (TAM), vía del indol-3- acetonitrilo (IAN) y la vía side chain oxidasa (TSO). La vía independiente del triptófano es una vía poco común tanto en bacterias como en plantas, aun así hay evidencia de su existencia (Prinsen et al. 1993).

Las cinco vías que tienen triptófano de precursor así como la vía independiente se resumen en Fig. 2 (Spaepen et al. 2007).

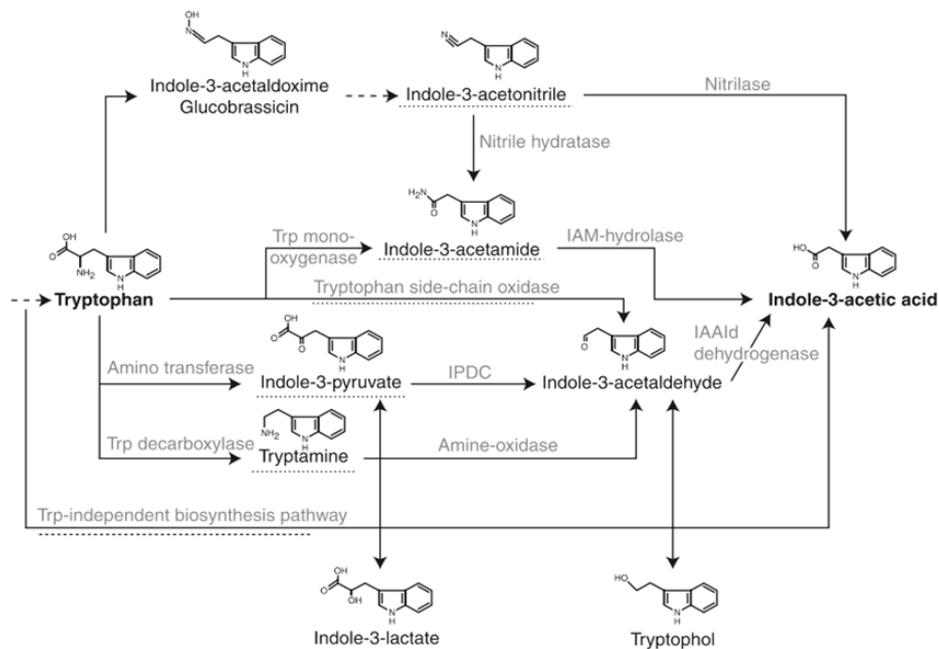


Fig. 2. Vías metabólicas de producción de AIA a partir de triptófano en bacterias (Spaepen et al. 2007).

La vía del indol pirúvico (IPyA) es utilizada para sintetizar AIA tanto por bacterias como por plantas, el triptófano es desaminado por una aminotransferasa dando como producto indol-3-piruvato (IPA), luego éste sufre una descarboxilación para dar indol acetaldehído y por último se oxida para obtener IAA. Esta vía ha sido reportada principalmente en bacterias no patogénicas como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Enterobacter cloacae* (Aguilar-Piedras et al. 2008; Baca & Elmerich 2007; Brandl & Lindow 1996; Koga et al. 1994; Xie et al. 2005) así como también en menor proporción en especies fitopatógenas como *P. agglomerans* (Sergeeva et al. 2007).

La vía de IAM, por el contrario esta principalmente caracterizada en bacterias fitopatógenas, las cuales inducen la formación de cayos y tumores en plantas (Lambrecht et al. 2000), y con menor frecuencia en bacterias simbióticas no patogénicas (Kochar et al. 2011). Esta vía se lleva a cabo en 2 pasos, que involucran la acción de dos enzimas consecutivas, la enzima triptófano-2- monooxigenasa (IaaM) que convierte triptófano en IAM y luego éste es catalizado por la indol acetamida hidrolasa (IaaH) para obtener finalmente AIA.

La vía de la triptamina, ha sido reportada tanto en plantas, hongos así como en ciertas especies bacterianas como *Bacillus cereus* (Perley & Stowe 1966), *Azospirillum brasilense* (Hartmann et al. 1983) y *Azospirillum lipoferum* (Ruckdäschel & Klingmüller 1992).

La vía TSO solo fue descrita hasta el momento en *Pseudomonas fluorescens* (Suzuki et al. 2003) y la vía del indól 3 acetonitrilo para *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium spp* (Kobayashi et al. 1995) y *Azospirillum brasilense* (Carreño-Lopez et al. 2000).

En bacterias algunos intermediarios de la biosíntesis de AIA pueden ser convertidos en compuestos de reserva, como es el caso del ácido-3- indol láctico (ILA) e indol-3-etanol o triptofol (TOL), que resultan de la reducción de ácido indol pirúvico e indol-3-acetaldehído, respectivamente.

La función fisiológica de estos compuestos es aún desconocida, ILA es inactiva como fitohormona pero es capaz de competir con AIA por los sitios de unión a auxinas en plantas (Sprunck et al. 1995).

En plantas así como en bacterias muchas moléculas de AIA se encuentran unidas covalentemente a azúcares o aminoácidos, formando conjugados (Woodward & Bartel 2005). Estos tienen diversos roles como ser la protección de la degradación, reserva, transporte y principalmente mantener la homeostasis de AIA en las células.

En bacterias solo se ha reportado en *Pseudomonas savastanoi* donde se ha detectado la formación del conjugado AIA-lisina. Se cree que la función de estos conjugados es la de regular la cantidad de AIA en las células (Leveau & Lindow 2005).

Se han descrito diferentes factores genéticos para afectar el nivel de biosíntesis de AIA en bacterias. En primer lugar, se ha demostrado que la ubicación de los genes de biosíntesis de la auxina en el genoma, ya sea plásmidico o cromosómico, modula el nivel de producción de AIA. Los plásmidos generalmente están presentes en varias copias en la célula bacteriana, proporcionando un mayor número de genes que pueden transcribirse en comparación con los que se encuentran en el cromosoma (Brandl & Lindow 1996; Patten & Glick 1996).

En diferentes especies de *Pseudomonas* se reportó la importancia de la ubicación de estos genes, siendo que en *P. savastanoi* los genes biosintéticos se encuentran en un plásmido, mientras que en *P. syringae* los genes homólogos están codificados en el ADN cromosómico. En la última especie, se produce una cantidad mucho más pequeña de AIA (Ona et al. 2005).

En segundo lugar, se observó que el modo de expresión, constitutivo frente a inducido, de los genes de biosíntesis de AIA difería entre las vías de biosíntesis y entre las especies bacterianas.

Los genes que codifican para las vías IPyA y IAN son inducibles mientras que los relacionados a la vía IAM son expresados constitutivamente en la mayoría de los microorganismos estudiados hasta ahora (Abramovitch et al. 2006). En diferentes especies de *Agrobacterium*, la región del plásmido Ti que contiene *iaaM* y *iaaH* se transfiere e integra en el genoma de la planta. Los genes se expresan bajo el control de fuertes promotores constitutivos, lo que resulta en la producción de altos niveles de AIA dentro del tejido vegetal (Costacurta et al. 1994). En *P. fluorescens* CHA0 la vía IPyA es presumiblemente constitutiva (Oberhänsli et al. 1991).

1.5 MÉTODOS PARA DETERMINAR INDOLES Y AIA

Múltiples son las técnicas utilizadas para la detección de fitohormonas en caldos microbianos, teniendo cada una de ellas sus ventajas y desventajas. Entre las más utilizadas están, i) la técnica clásica espectrofotométrica con reactivo de Salkowski, la cual es simple, rápida y de relativo bajo costo pero de discutida especificidad; ii) la cromatografía en capa fina (TLC), que es más específica pero solo nos da información cualitativa; y iii) la cromatografía de alta afinidad (HPLC) con detector UV o acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) que es la técnica más sensible y precisa ampliamente utilizada para separar y cuantificar este tipo de metabolitos.

1.5.1 Detección colorimétrica de Salkowski

La técnica colorimétrica de Salkowski (Gordon & Weber 1951; Glickmann & Dessaux 1995) consiste en la oxidación de compuestos indólicos por sales férricas. Cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso, dependiendo de la concentración de indoles presente. Se ha determinado que la longitud de onda a la que ocurre la mayor absorbancia de una solución de indoles es a 530 nanómetros, y éstos se cuantifican como equivalente de AIA en base a una curva de calibración.

El reactivo de Salkowski originalmente lleva en su composición ácido perclórico, que es el que oxida las moléculas de indol presentes en el AIA, generando la coloración. Sin embargo, algunas modificaciones hechas al reactivo han permitido sustituir el ácido perclórico, que es de alto costo, por ácido sulfúrico, obteniéndose coloraciones semejantes.

1.5.2 Detección por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ha sido el método de separación más empleado en este tipo de análisis, siendo la fase reversa C18 la más usada. La mayoría de los métodos de HPLC empleados para la separación de indoles y sus derivados (como el AIA), utilizan sistemas de gradientes con mezcla de dos solventes como fase móvil, pero al ser este método largo y costoso puede ser sustituido por un método isocrático optimizado. (Castillo et al. 2005; Hou et al. 2008)

El análisis de indoles por HPLC es un método altamente reportado en bibliografía, así también son múltiples las técnicas y condiciones para preparar los extractos, extraer el compuesto de

interés y las condiciones de corrida (Liu et al. 2007; Szkop & Bielawski 2013; Castillo et al. 2005). En el presente trabajo realizamos HPLC-UV para un análisis cualitativo y HPLC-MS para un análisis cualitativo y cuantitativo.

1.6 FACTORES MODULADORES DE LA BIOSÍNTESIS

Los estudios reportados al momento describen que los factores que modulan la biosíntesis de AIA o la expresión de los genes involucrados en su síntesis son diversos. Estos pueden afectar tanto el desarrollo del microorganismo como la expresión de los genes implicados en la producción de AIA (Lee & Lee 2010; Lee et al. 2015).

La biosíntesis de AIA por bacterias varía tanto entre especies como entre aislamientos de la misma especie y esto es debido tanto a su variabilidad genética como a la influencia que ejercen las condiciones ambientales a las que son sometidas durante su desarrollo. Tal es así que en cultivos *in vitro* factores como temperatura, pH, presión osmótica y disponibilidad de nutrientes (carbono, nitrógeno) muestran un abanico de efectos sobre la biosíntesis de este compuesto (Spaepen et al. 2007; Shokri & Emtiazi 2010). Los distintos microorganismos tienen diferentes preferencias por la fuente carbonada o de nitrógeno al momento de producir AIA así como también cepas de una misma especie, (Tabla 1).

Independientemente de las condiciones de crecimiento, se considera que la síntesis está estrechamente vinculada a la disponibilidad de su precursor principal, el Triptófano (Trp).

Este aminoácido está universalmente presente en los tejidos vegetales ya sea de forma libre o incorporada y en la rizósfera se puede originar de dos formas: por la degradación de raíces o por exudados (Duca et al. 2014), Aunque la cantidad de triptófano en exudados de la raíz es más bien baja, el triptófano exógeno puede ser absorbido eficientemente por bacterias. (Kravchenko et al. 2004).

La mayoría de las bacterias pueden producir Trp en baja cantidad por lo cual *in vitro* es necesario el agregado de Trp exógeno (Halda-Alija 2003; Ahmad et al. 2008; Ryu & Patten 2008).

La aplicación de Trp exógeno incrementa fuertemente la producción de AIA, esto ha sido comprobado en diversos microorganismos como: *Azospirillum*, *Pantoea agglomerans*, *P. putida* o *Rhizobium* donde se observa una proporcionalidad entre la concentración de AIA y la cantidad de Trp (Prinsen et al. 1993; Patten & Glick 2002; Lindow 1998; Theunis et al. 2004).

Como ejemplo, tanto para *Azospirillum brasilense* como *Pseudomonas putida* se sabe que la presencia de triptófano incrementa de 3 a 5 veces la expresión del gen IPDC (que codifica para

la enzima indol piruvato descarboxilasa) crucial en la vía del indol pirúvico. (Zimmer et al. 1998; Patten & Glick 2002). También se ha evidenciado este incremento cuando la fuente carbonada es limitante, o sea al final de la fase exponencial-inicio de fase estacionaria (Omay et al. 1993) o a pH ácido (Ona et al. 2005; Broek et al. 2005). La concentración extracelular de AIA es dependiente del tamaño de la población y en un medio rico su concentración alcanza un máximo en la fase estacionaria y se va a mantener durante toda la fase (Muller et al. 2009).

La temperatura también puede afectar la biosíntesis de AIA. En *Azospirillum brasilense* se ha reportado que cambios en la temperatura inducen la expresión del gen *lpdC*. (Malhotra & Srivastava 2008).

Tabla 1. Condiciones óptimas de producción de AIA en bacterias endófitas estudiadas previamente (modificada de Duca et al., 2014).

Bacteria	[Trp] mg.ml ⁻¹	Fuente de Carbono	Temperatura (°C)	Referencia
<i>Azospirillum brasilense</i>	1	-	37	(Malhotra & Srivastava 2009)
<i>Bacillus cereus</i>	1.5	Glucosa	30	(Mohite 2013)
<i>Bacillus subtilis</i>	1	Manitol	30	(Mohite 2013)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	Sacarosa	30	(Mehboob Ahmed et al. 2010)
<i>Ps. fluorescens</i>	0.5	Lactosa	-	(Jeyanthi & Ganesh 2013)
<i>Pseudomona putida</i>	0.2	Sacarosa	-	(Bharucha et al. 2013)
<i>Pseudomona sp</i>	5	Glicerol	30	(Balaji,N et al. 2012)
<i>Rhizobium sp</i>	1	Manitol	-	(Kumar & Ram 2012))
<i>Rhizobium sp</i>	-	-	37	(Sudha et al. 2012)
<i>Rhizobium sp</i>	2	Manitol	-	(Mazumder et al. 2010)
<i>Rhizobium sp</i>	5	Lactosa	-	(De & Basu 1996)
<i>Rhizobium sp</i>	2,5	Glucosa	30	(Nalini & Rao 2014)
<i>Rhizobium sp</i>	3	Manitol	30	(Shokri & Emtiazi 2010)

(-) no se especifica la condición utilizada.

El efecto de la temperatura o las fuentes carbonadas en BPCV sobre la biosíntesis de AIA ha sido escasamente estudiado, y no existe información suficiente sobre sus efectos sobre las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-planta.

2. HIPOTESIS

La hipótesis que nos planteamos fue que no todas las cepas endófitas productoras de ácido indolacético producen igual cantidad de ésta auxina y que depende de la fuente carbonada y la temperatura de crecimiento.

Con el presente trabajo se pretende contribuir al conocimiento de esta fitohormona y así establecer las mejores condiciones para una óptima biosíntesis de la misma por parte de las bacterias endófitas seleccionadas, de modo de poder mejorar sus posibles aplicaciones en la agricultura.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura de crecimiento y la fuente de carbono en la producción de ácido indolacético por bacterias endófitas de maíz.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Puesta a punto de técnicas utilizadas para evaluar la producción de indoles.
- Evaluar en todas las cepas el efecto de fuentes de carbono y temperatura de crecimiento en la producción de indoles por colorimetría.
- Confirmar por HPLC la producción de AIA por el método de adición de estándar (Spiking).
- Cuantificar por HPLC/MS la producción de AIA en las distintas cepas considerando la variable fuentes de carbono.
- Discriminar por HPLC/MS la producción de diferentes metabolitos intermediarios y/o de reserva en las distintas cepas considerando el factor fuentes de carbono y analizar posibles vías de síntesis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CEPAS BACTERIANAS

Para este trabajo se utilizaron cepas de la colección de bacterias endófitas aisladas de maíz (*Zea mays L.*) perteneciente al Laboratorio de Microbiología de Suelo de la Facultad de Ciencias. La colección es conservada en TY-Glicerol al 50% a -80°C y una sub colección de trabajo a -20°C, se identifican con la sigla EMA y un número.

Las cepas fueron caracterizadas en trabajos anteriores como bacterias diazótroficas por crecer en medios de cultivo sin nitrógeno y presentar el gen estructural fundamental de la nitrogenasa (*nifH*) así como también se determinó que eran productoras de AIA (Montañez et al. 2009; Montañez et al. 2012) y solubilizadoras de fosforo (Beracochea 2011).

De la mencionada colección se seleccionaron 5 cepas para utilizar en este trabajo (Tabla 2)

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y su sitio de aislamiento en maíz (*Zea mays L.*).

Cepa	Identificación	origen
EMA 68	<i>Pseudomona fluorescens</i>	Tallo
EMA 83	<i>Rahnella spp</i>	Tallo
EMA 171	<i>Burkholderia cepacia</i>	Raiz
EMA 175	<i>Rahnella spp</i>	Tallo Basal
EMA 176	<i>Rhizobium spp</i>	Raiz

4.2 CONDICIONES DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS CEPAS.

En primera instancia las cepas (conservadas a -20°C) se sembraron por agotamiento en placa con medio mínimo con manitol a 28°C para reactivar su crecimiento y verificar su pureza. A las 48 hs de crecimiento, se colectó la siembra en placa con $500\ \mu\text{l}$ NaCl 0,85% (p/v) estéril y se ajustó la OD_{620} a 0,5 con la misma solución salina.

Se inocularon $100\ \mu\text{l}$ (OD_{620} 0,5) de cada cepa, en tubos con 20 ml de medio mínimo (MM, anexo 1) suplementado con $2\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Trp y distintas fuentes de carbono 0,25% w/v, Glicerol, Manitol, Sorbitol, Sacarosa, Glucosa, Lactosa y Rafinosa. Los tubos se incubaron en baño mecánico con agitación (140 rpm) a 28°C . Dichos cultivos se utilizaron para la cuantificación de indoles por colorimetría y HPLC según se detalla a continuación:

Para la evaluación de la producción de AIA en las distintas temperaturas de crecimiento, se cultivan 24 hs con la fuente de carbono sacarosa, a 15°C , 28°C y 35°C y se cuantifican indoles por el método colorimétrico de Salkowski.

Para la evaluación de la biosíntesis de indoles totales y AIA con las distintas fuentes carbonadas, los cultivos se dejaron crecer un total de 7 días, realizando los análisis por colorimetría a las 24 hs y por HPLC a los 7 días.

Dado que bajo estas condiciones de crecimiento los valores absolutos de producción de AIA se sobreestiman en aquellas cepas de crecimiento rápido (*Rahnella spp* Y *Rhizobium spp*) y se subestiman las de crecimiento más lento como *Pseudomonas fluorescens*. Se optó por calcular la producción eficiente, de modo de poder hacer comparaciones entre cepas.

Cálculo de eficiencia

El cálculo se realizó expresando la producción de AIA por unidad formadora de colonia (UFC). Para esto se realizaron curvas de crecimiento en MM suplementado con las distintas fuentes de carbono. Todos los recuentos se realizaron hasta la fase estacionaria o hasta obtener la concentración de 10^8 células.

Para el ensayo a distintas temperaturas se realizó el recuento en placa a las 24 hs.

4.3. BIOSÍNTESIS DE INDOLES TOTALES

La cuantificación de indoles totales se realizó por la técnica colorimétrica de Salkowski-

Luego que los cultivos descriptos en el apartado 4.2 se incubaron 24hs, una alícuota de 2 ml de cada cultivo se centrifugó a 12200 r.p.m. en centrifuga minispin-ependorff por 10 minutos. Posteriormente se mezcló sobrenadante y reactivo de Salkowski (Anexo 1), en una proporción 1:1 y se conservaron 30 min en oscuridad para su posterior lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 530 nm.

El contenido de indoles se cuantificó como equivalentes de AIA y la lectura se interpoló en una curva de calibración de AIA. La curva de calibración se realizó en un rango de 0 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA, y se obtuvo un r^2 : 0,9817.

La reacción y lectura espectrofotométrica se realizó de forma paralela tanto en micro placa (Sarwar & Kremer 1995) como en cubeta de espectrofotómetro (método clásico), con el objetivo de realizar una correlación entre ellas y así optimizar la técnica para futuras aplicaciones.

4.4 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Para la evaluación de biosíntesis de AIA por parte de las cepas en estudio se realizó en primera instancia un análisis cualitativo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector UV para luego confirmar y cuantificar la fitohormona mediante la técnica HPLC acoplado a espectrofotómetro de masas (HPLC/MS). Previo a correr las muestras en HPLC se prepararon los extractos.

4.4.1 Preparación de extractos

Luego del periodo de incubación de los cultivos (ver 4.2) se prepararon los extractos mediante dos técnicas: a) extracción orgánica (Castillo et al. 2005; Sergeeva et al. 2007; Castillo et al. 2014) y b) filtración (Szkop & Bielawski 2013).

Para la técnica a, el caldo se centrifugó en frío (4°C) a 8000rpm durante 20 min. Se tomó el sobrenadante y se le agregó el mismo volumen de acetato de etilo. Se esperó la separación de fases y se descartó la fase acuosa e interfase. Se ajustó el pH de la fase orgánica a 2,8 con HCl 1M. Posteriormente se extrajo 3 veces con acetato de etilo de forma consecutiva colectando la fase acuosa. Finalmente, el extracto se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno y se volvió a disolver en 1mL de buffer de corrida (fase móvil de la cromatografía). Para la técnica b, se tomó una alícuota del caldo y se centrifugó a 13400 rpm en centrifuga minispin-ependorf por 10 min, luego se tomó 500 µl de sobrenadante para ser filtrado en columnas de 3kD (Amicon® Ultra 0.5 ml centrifugal filters) a 13400 rpm durante 30 min. Finalmente el filtrado obtenido se conserva en freezer -20°C para su posterior análisis.

4.4.2 Condiciones para análisis por HPLC/UV

Con el objetivo de realizar el análisis cualitativo de las muestras, se realizaron corridas de HPLC/UV utilizando la técnica de adición de estándar (spiking).

Se realizó la corrida de todos los extractos con y sin el agregado de una solución estándar de AIA 260 µM en una proporción 1:4 con el objetivo de visualizar un incremento en el área del pico en el tiempo de retención correspondiente al estándar de AIA.

El análisis de muestras se realizó en un HPLC Agilent series 1200, donde se utilizó una columna de fase reversa Restek C18 de 250 x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 10µm.

El método realizado fue isocrático con un flujo de 1ml/min de la fase móvil metanol-Acido fórmico 0,2% (50:50) a temperatura ambiente. La detección de arreglo de diodos uv visible $\lambda=280$ nm (Hou et al. 2008)

Las muestras luego de preparadas por extracción orgánica fueron filtradas por filtro de 22 µm previo a ser inyectadas al igual que las soluciones utilizadas como fase móvil. No necesariamente las purificadas por filtración.

Todas las muestras fueron corridas por duplicado, con y sin estándar de AIA para las cuales se inyectó un volumen de 30 μ l. Previamente se realizó la corrida del estándar de AIA de concentración conocida con el objetivo de identificar su tiempo de retención y así poder determinar en qué muestras estaba presente la fitohormona.

La detección de AIA en estas condiciones es detectable por encima de un umbral mínimo de AIA de aproximadamente 10 μ M. Valor obtenido por el cálculo de área de concentración conocida:

$$\text{Concentración de la muestra} = \frac{\text{área de la muestra}}{\text{área del estándar}} \times \text{Concentración del estándar}$$

Por lo tanto, cepas con producción de AIA \leq \approx 10 μ M fueron consideradas como no productoras, por este método.

4.4.3 Condiciones para análisis por HPLC/MS

Teniendo como objetivo la confirmación de AIA con mayor sensibilidad, su cuantificación y la detección de otros compuestos indólicos relacionados con las vías de producción de AIA (metabolitos intermediarios o de reserva) se realizaron corridas de HPLC acoplado a un espectrómetro de masa (Lin et al. 2015).

La separación cromatográfica de las muestras se realizó en un HPLC Agilent 1200 donde utilizamos una columna de fase reversa C18 Kinetex de 100 x 3.0mm con un tamaño de partícula de 2.6 μ m. El método utilizado para la separación cromatográfica fue por gradiente, con un flujo de 0,4ml/min donde la fase móvil estaba compuesta de A (Acido fórmico 10mM) y B (Acetonitrilo). La programación del gradiente fue la siguiente: 0-15 min 10%B; 15-17 min 50% B; 17.1-20 min 10% B con un tiempo total de corrida de 20 min y un volumen de inyección de 10 μ l.

EL HPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas micrOTOF-Q Bruker, equipado con electro spray y operando en modo de ionización positiva.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 BIOSÍNTESIS DE INDOLES POR LAS CEPAS

5.1.1 Efecto de la temperatura de crecimiento en la biosíntesis de indoles.

Dado que la variable temperatura no solo afecta la producción de ácido indolacético sino la viabilidad de la cepa, primero consideramos el crecimiento y observamos que a 15°C grados ambas *Rahnella* spp (EMA83 y EMA175) crecen, así como también lo hace la cepa de *Rhizobium* spp (EMA 176) en menor medida. Por el contrario, *P. fluorescens* (EMA 68) y *B. cepacia* (EMA171) se ven afectadas por la baja temperatura y casi no crecen. Luego detectamos que a 35°C EMA 68 es la que crece menos, evidenciando condiciones desfavorables para su desarrollo, mientras que el resto de las cepas lo hacen de igual manera que a 28°C.

Mediante el método colorimétrico de Salkowski observamos como se ve afectada la producción de AIA a las distintas temperaturas (Figura 4).

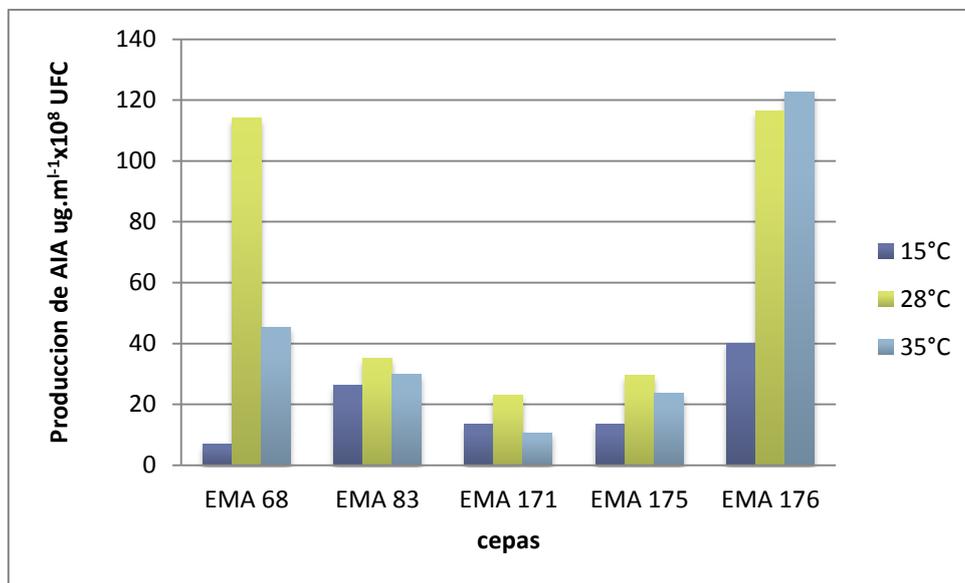


Fig. 4. Producción de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) por 10^8 UFC en 24 hs con sacarosa de fuente carbonada en diferentes temperaturas de crecimiento.

Observamos que a 15°C la biosíntesis es baja para todas las cepas, aun cuando las cepas EMA 83, EMA 175 y EMA 176 crecen a ésta temperatura casi igual que a 28°C.

Todas las cepas lo hacen eficientemente a 28°C, como ya se ha reportado para diversos géneros como, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas spp* tal como se describió en la tabla 1. A temperaturas superiores (35°C) observamos que la cepa de *Rhizobium spp* (EMA 176) es la única que incrementa la producción de la auxina. Este resultado particular de *Rhizobium spp* concuerda con los datos reportados anteriormente por Sudha et al. 2012, donde se determinó que la temperatura óptima de producción de AIA para cepas de este género es $37\pm 3^{\circ}\text{C}$. La diferencia entre ambas temperaturas también se ha reportado para otros microorganismos como es el caso de *Azospirillum brasilense* el cual crece mejor a 30° y su máximo de producción se observa a 37° (Narayana et al. 2009). En condiciones *in vivo* la temperatura óptima para la producción de AIA pueden ser un reflejo del nicho que ocupa el microorganismo, ya que no es lo mismo las condiciones abióticas en la rizósfera que dentro de la planta.

Con estos resultados, determinamos que en casos excepcionales la temperatura óptima de producción de AIA no se corresponde necesariamente con la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, sino que está estrechamente relacionada a la temperatura en la cual las enzimas involucradas en la biosíntesis funcionan con mayor eficiencia.

5.1.2 Efecto de la fuente de carbono en la biosíntesis de indoles.

La cuantificación de indoles con distintas fuentes carbonadas por el método colorimétrico se resume en la tabla 3, donde se pueden apreciar las diferencias cuantitativas entre la producción de AIA absoluta y eficiente.

Tabla 3. Efecto de la fuente carbonada en la producción de AIA absoluta $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A) y eficiente $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por 10^8 UFC (E), cuantificado por técnica colorimétrica (Glickmann & Dessaux 1995).

Cuantificación de AIA por colorimetría										
FC	<i>Pseudomona fluorescens</i> (EMA 75)		<i>Rhanella spp</i> (EMA 83)		<i>Burkholderia cepacia</i> (EMA175)		<i>Rhanella spp</i> (EMA 175)		<i>Rhizobium spp</i> (EMA 176)	
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
Glicerol	48,1BC	70,3c	147,2B	40,2a	24,2D	30,1de	116,2C	30,1b	84,0D	58,4de
Sorbitol	85,1A	114,1bc	135,8B	35,1bc	24,8D	23,1ef	156,5B	29,5b	114,7BC	116,5a
Glucosa	38,2C	30,5c	158,4A	37,5ab	81,1A	88,9a	176,5A	23,4d	140,5A	70,6cd
Rafinosa	39,2C	119,9bc	158,1A	32,7cd	24,1D	59,9b	160,5B	30,1b	144,2A	88,8bc
Lactosa	74,0AB	253,6a	146,2B	31,1de	18,8D	19,7f	155,8B	34,1a	130,7AB	101,5ab
Sacarosa	45,0BC	170,1ab	160,8A	33,7bc	57,0B	47,9c	174,4A	25,9c	129,0AB	71,9cd
Manitol	49,9BC	41,7c	137,7B	27,6e	38,2C	33,4d	164,2AB	24,2cd	99,7CD	49,9e

Los valores seguidos por letras mayúsculas corresponden a diferencias significativa para producción absoluta de AIA, dentro de cada cepa según Test de Fisher-LSD ($p < 0,05$). Los valores seguidos por letras minúsculas corresponden a diferencias significativa para producción eficiente de AIA, dentro de cada cepa según Test de Fisher-LSD ($p < 0,05$).

En la tabla 3 observamos que la cepa de *P. fluorescens* es la más eficiente en producir indoles en la mayoría de las fuentes carbonadas, destacándose especialmente con lactosa, coincidiendo con lo reportado por Jeyanthi & Ganesh 2013. Por el contrario, *B. cepacia* presenta su mínimo con la misma fuente. Curiosamente esta cepa no es la que crece más en estas condiciones de cultivo pero aun así es la que más indoles produce en relación a la cantidad de células.

El rango de producción para las *Rhanella spp* (23,36-40,18 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) es significativamente inferior a la observada para el resto de las cepas especialmente en *P. fluorescens* donde el rango de producción que observamos es amplio (30,47-253,62 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Para *Rhizobium spp* la preferencia por la fuente carbonada es muy variada, siendo manitol, lactosa y glucosa las ya reportadas como óptimas (ver Tabla 1). En nuestros EMA 176 genera la mayor producción al crecerla con sorbitol ($116,49 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), seguido por lactosa $101,54 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Dado que la reacción de Salkowski determina indoles totales (Goswami et al. 2015) y no específicamente AIA debemos complementar estos resultados con otro método más específico como una Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

5.1.3 Puesta a punto de la técnica colorimétrica

Para la cuantificación de indoles por el método colorimétrico, se seleccionó la proporción reactivo/muestra 1:1 como la óptima, dado que proporciones 2:1 o 4:1 utilizadas en otros trabajos (Glickmann & Dessaux 1995; Kulkarni et al. 2013) no nos proporcionaban linealidad a concentraciones muy bajas, o reaccionaban con el blanco que contiene triptófano.

También al realizar la cuantificación de forma paralela en cubetas espectrofotométricas (método clásico) y en microplaca, obtuvimos datos equivalentes teniendo en cuenta un factor de conversión (calculado por la relación entre las pendientes de los distintos métodos) de 0,61 (fig. 3) en estas condiciones experimentales, por lo que concluimos que utilizar la microplaca es la forma más adecuada ya que reduce el tiempo de lectura y resulta ser más económica al requerir menos reactivo.

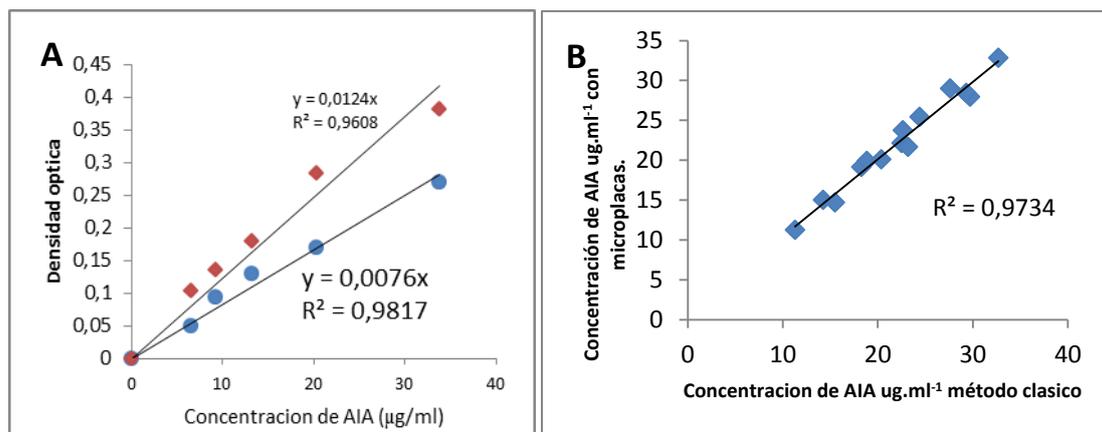


Fig 3. A) Curvas de calibración de AIA en cubetas (clásico) y micro placa (azul: cubetas, rojo: micro placa). B) Correlación entre ambos métodos.

5.2. PRODUCCIÓN DE AIA POR LAS CEPAS SEGÚN LA FUENTE DE CARBONO.

5.2.1 Detección de AIA por HPLC/UV

Entre los métodos utilizados para preparar las muestras concluimos que el método de filtración con Amicon® es más conveniente respecto a la extracción orgánica ya que se obtienen en menor tiempo, de forma más práctica y obtenemos extractos más estables, dado que se conservan en freezer sin perder su viabilidad por tiempos prolongados. No así mediante extracción orgánica.

Luego de la preparación de extractos se realizaron las corridas cromatograficas, y mediante la técnica de adición del estándar (Spiking) de AIA evidenciamos la producción del mismo por parte de las cepas según la fuente carbonada utilizada (tabla 4), el AIA en todos los casos tiene un tiempo de retención de $6,1 \pm 0.4$ min.

Tabla 4. Detección de Ácido indol acético realizado por HPLC/UV mediante la técnica de adición de estándar (spiking) para las cepas *Ps. fluorescens*, *Rahnella spp* (EMA 83 y EMA 175), *Burkholderia cepacia* y *Rhizobium spp* en siete fuentes carbonadas distintas. (+) Detección de AIA, (-) AIA no detectada

Tratamiento	Detección de AIA por HPLC/UV				
	<i>Pseudomona fluorescens</i> (EMA 68)	<i>Rahnella spp</i> (EMA 83)	<i>Burkholderia cepacia</i> (EMA 171)	<i>Rahnella spp</i> (EMA 175)	<i>Rhizobium spp</i> (EMA 176)
<i>Glicerol</i>	+	+	+	+	+
<i>Sorbitol</i>	-	+	-	+	-
<i>Glucosa</i>	-	-	+	+	-
<i>Rafinosa</i>	-	-	+	+	+
<i>Lactosa</i>	-	+	-	+	+
<i>Sacarosa</i>	+	+	-	+	+
<i>Manitol</i>	-	-	+	+	+

Mediante este método confirmamos biosíntesis de la hormona en 22 de 35 muestras, pero ésta se produce a niveles muy inferiores a lo que esperamos detectar en función del método colorimétrico tabla 3, lo que evidencia la falta de especificidad de este último.

Al ser este método más específico podemos realmente observar si hay un efecto de la fuente carbonada en la biosíntesis del ácido indolacético, apreciando de forma cualitativa la presencia de nuestro metabolito de interés.

Si comparamos dos cepas de la misma especie como *Rahnella spp* (EMA 83 Y EMA 175) observamos comportamientos distintos. La producción de AIA en EMA 83 muestra ser modulada según la fuente carbonada, no detectándose producción con: glucosa, rafinosa y manitol y si con glicerol, lactosa sacarosa y sorbitol; mientras que para EMA 175 observamos que produce cantidades detectables de esta fitohormona para todas las fuentes carbonadas.

Para *P. fluorescens* vemos producción por encima del umbral, solo con glicerol y sacarosa, para *B. cepacia* con glucosa, rafinosa y sorbitol y para *Rhizobium* fue detectado en todas las fuentes carbonadas con excepción de sorbitol y glucosa.

El método de adición de estándar es utilizado habitualmente con el objetivo de cuantificar la concentración de la muestra, nosotros no lo utilizamos con ese fin dado que las concentraciones de AIA son demasiado bajas para ser detectadas y cuantificadas por este método en estas condiciones experimentales. Para cuantificar con exactitud utilizamos HPLC acoplado a masas.

5.2.2 Cuantificación de AIA por HPLC/MS

A través de esta técnica logramos detectar la producción de AIA con una sensibilidad mayor a la técnica de adición de estándar (spiking). Asimismo, también logramos cuantificar la producción AIA para las distintas cepas con las distintas fuentes carbonadas.

En primera instancia detectamos el tiempo de retención correspondiente al estándar de ácido indol acético en 10.3 min para luego obtener el espectro de masas característico. Al haber realizado una ionización por adición de electrones (ionización positiva, M+) el espectro característico para el AIA es el observado en la fig. 5. Las señales que se observan corresponden al ion molecular ($M+H^+$)= 176m/z y el pico base correspondiente a 130m/z (fragmento más abundante).

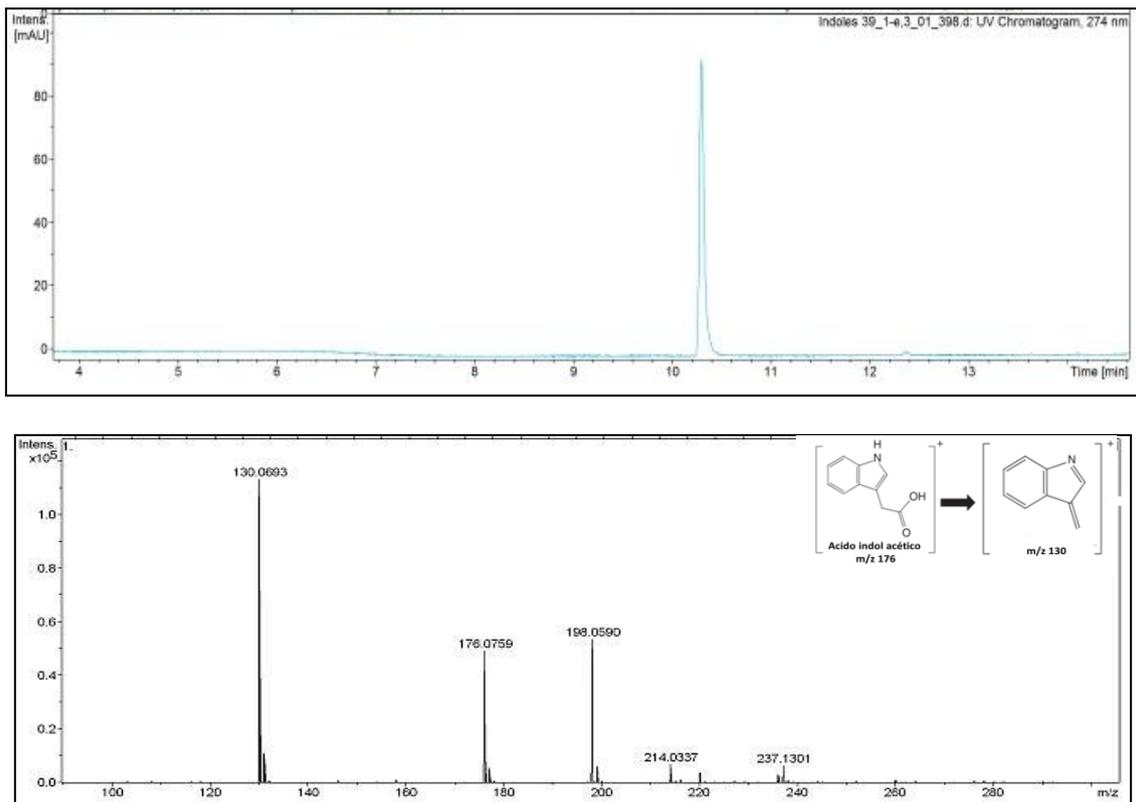


Fig. 5. Cromatograma y espectro de masas de estándar de AIA analizado por HPLC/MS.

En el procesamiento de las muestras por HPLC /MS el AIA fue detectado en 29 de 35 de las cepas en las distintas fuentes carbonadas. En base a la concentración del estándar cuantificamos el AIA presente en cada muestra (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de AIA (μM) producido por las cepas de trabajo en las distintas fuentes carbonadas detectado por espectrometría de masa.

FC	<i>Pseudomona fluorescens</i> (EMA 68)	<i>Rahnella spp</i> (EMA 83)	<i>Burkholderia cepacia</i> (EMA 171)	<i>Rahnella spp</i> (EMA 175)	<i>Rhizobium spp</i> (EMA 176)
<i>Glicerol</i>	61,3	nd	21,6	39,9	14,6
<i>Sorbitol</i>	nd	28,9	16,0	7,1	6,7
<i>Glucosa</i>	nd	11,4	28,8	27,3	7,1
<i>Rafinosa</i>	24,9	nd	nd	33,4	11,0
<i>Lactosa</i>	nd	13,1	14,4	24,9	15,1
<i>Sacarosa</i>	80,3	15,2	15,9	21,3	66,7
<i>Manitol</i>	26,7	nd	16,5	33,1	32,0

Podemos ver que la sensibilidad de la espectrometría de masa es superior a la técnica utilizada previamente, dado que bajo ciertas condiciones de crecimiento el método de adición de estándar no logra detectar concentraciones bajas que si se obtuvieron mediante este método.

En base a los resultados presentados en la tabla 5 concluimos que hay una modulación en la producción de la fitohormona al utilizar distintas fuentes carbonadas, siendo más evidente en ciertas cepas. Se observaron valores bien dispares (mayor modulación) en las cepas de *Pseudomona fluorescens* y *Rhizobium spp* donde es elevada la producción de AIA utilizando sacarosa (80,27 y 66,7 μM respectivamente) y muy bajo o no producen cuando crecen con sorbitol o glucosa.

Se observó comportamientos distintos entre ambas *Rahnella spp*, con menos diferencias cuantitativas al modificar la fuente de carbono al igual que en *B. cepacia*. Para *B. cepacia* crecida con rafinosa detectamos discordancia con lo determinado por HPLC-UV, siendo

realmente no productora de AIA en estas condiciones. La discordancia la atribuimos a errores experimentales.

El efecto de la fuente de carbono en la biosíntesis de AIA fue demostrado por autores tales como Carreño-Lopez et al. 2000 donde con un mutante de *Azospirillum*, al cual le habían quitado el gen *lpdC*, no se afectaba la producción de AIA cuando utilizaba como fuente carbonada lactato o piruvato, y no observando producción cuando utilizaba gluconato. Esto nos indica que no solo existen vías alternativas en una misma cepa sino que la fuente carbona está influyendo en la utilización de una u otra vía. La ruta alternativa es regulada por represión catabólica.

5.3 METABOLITOS INTERMEDIARIOS Y/O DE RESERVA EN LA BIOSÍNTESIS DE AIA

A continuación realizamos la búsqueda de otros compuestos de interés como son los intermediarios o compuestos de reserva de las posibles vías de producción de AIA a partir de triptófano, mediante un *screening* por su peso molecular.

Los compuestos buscados fueron: indol 3 acetamida (IAM), indol 3 acetonitrilo (IAN), indol 3 pirúvico (IPyA), indol 3 acetaldehído, indol láctico (ILA) y triptofol (TOL) siendo detectados únicamente los dos últimos, tabla 6.

Tanto ILA como TOL fueron luego confirmados comparando los espectros de masa de sus correspondientes estándares.

El IPyA y el indol 3 acetaldehído son moléculas inestables por lo que es esperable no encontrarlos en los caldos bacterianos tal como lo describió Carreño-Lopez et al. 2000. El IAM e IAN, no fueron encontrados en estas condiciones experimentales pero aun así no podemos descartar que las cepas utilicen estas vías para producir el AIA.

Tabla 6. Detección de los metabolitos de reserva ILA y TOL en los extractos de las cepas estudiadas con las distintas fuentes de carbono, por HPLC/MS. Detectado:+, nd: no detectado.

FC	<i>P. fluorescens</i> (EMA 68)		<i>Rahnella spp</i> (EMA 83)		<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i> (EMA 171)		<i>Rahnella spp</i> (EMA 175)		<i>Rhizobium spp</i> (EMA 176)	
	ILA	TOL	ILA	TOL	ILA	TOL	ILA	TOL	ILA	TOL
Glicerol	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Sorbitol	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd
Glucosa	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd
Rafinosa	nd	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+
Lactosa	nd	nd	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Sacarosa	nd	nd	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
Manitol	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd

La presencia de uno o ambos metabolitos en cada uno de los casos nos llevan a deducir las vías por las cuales se produciría el AIA en las cepas estudiadas. Siendo el TOL indicador de 3 potenciales vías, las cuales producen indol 3 acetaldehído previo al ácido indol acético, como lo son la vía del indol pirúvico, las vías de la triptamina y la TSO.

El indol láctico es producto de la reducción del ácido indol pirúvico por lo que su presencia nos indicaría que la biosíntesis de AIA estaría dada por esta vía.

El caso de *Pseudomona fluorescens* observamos ausencia de ILA para todos los tratamientos y la presencia de TOL en dos casos (en los tratamientos con rafinosa y glicerol), lo que nos llevó a pensar que utiliza vías alternativas a la vía del indol pirúvico, incluso aquéllas que no tienen al indol acetaldehído como intermediario. Estudios previos demostraron mediante análisis genético que cepas de este mismo género producían AIA por la vía del IAM (Kochar et al. 2011), así como también por la vía TSO (Oberhänsli et al. 1991).

En ambas *Rahnella spp* así como en *Burkholderia cepacia* observamos tanto presencia de ILA como de TOL para la mayoría de los casos por lo que concluimos que utiliza por lo menos la vía del indol pirúvico para la biosíntesis de AIA, no pudiendo descartar que utilice alguna otra capaz de metabolizar el indol 3 acetaldehído.

En el caso de *Rhizobium spp* obtuvimos resultados variados en las distintas condiciones, no acumula ni ILA ni TOL con glicerol, lactosa y sacarosa, acumula ILA con sorbitol, lactosa y manitol y solo TOL con rafinosa, lo que nos lleva a pensar que nuestra cepa de *Rhizobium spp* utiliza diferentes vías para producir el ácido indol acético, entre ellas la del indol pirúvico evidenciado por la presencia de ILA en los caldos bacterianos.

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La fuente carbonada así como la temperatura de crecimiento modulan la biosíntesis de ácido indolacético en las cepas EMA 68-*Pseudomonas fluorescens* y EMA 176-*Rhizobium spp.*
- Las cepas EMA 83-*Rhanella spp.*, EMA 171-*Burkholderia cepacia* y EMA 175-*Rahnella spp.* no se ven afectadas fuertemente por el cambio de fuente carbonada al momento de sintetizar AIA, lo cual sería una ventaja al ser capaz de sintetizarlo en similares proporciones en las fuentes carbonadas según su disponibilidad *in vivo*.
- La ruta metabólica por la cual las cepas EMA 83-*Rhanella spp.*, EMA 171-*Burkholderia cepacia* y EMA 175-*Rahnella spp.* realizarían la biosíntesis de AIA sería la vía del indolpirúvico.

El trabajo también aporta información útil en las técnicas analíticas:

- El método colorimétrico de Salkowski ampliamente usado para la cuantificación no es adecuado, ya que se trata de una aproximación inexacta. De todos modos es un método económico y práctico para procesar un número importante de muestras
- Al utilizar el método colorimétrico podemos utilizar microplacas en lugar de cubetas
- Es importante diferenciar entre valores absolutos y eficiencia para obtener valores con mayor exactitud.
- La utilización de filtros de membranas para 3kd frente a la extracción orgánica, se recomienda ya que reduce tiempo y costos.
- La sensibilidad y especificidad del detector de masas comparado con detector de UV es muy superior.

8. PERSPECTIVAS

Para completar nuestros ensayos de modulación de la producción de AIA con distintas fuentes carbonadas sería de especial interés determinar la expresión de los genes claves de cada vía metabólica (los más reportados *lpdC* e *laaM*) a través de RT-PCR mARN.

Para ello es necesario profundizar en el conocimiento de los principales genes implicados en la biosíntesis de AIA en las distintas cepas seleccionadas, en base a la detección de los intermediarios por HPLC/MS, con el fin de dilucidar con mayor certeza la o las vías que utilizan estas cepas, otro abordaje podría ser mediante genética bacteriana a través del estudio de mutantes.

De manera complementaria, sería interesante experimentar su efecto en planta realizando ensayos genobioticos, así como estudiar otros factores que podrían estar involucrados en la síntesis de AIA, como pueden ser el pH, presencia de patógenos o estrés abiótico. Se debería tener en cuenta que dada la posibilidad de expresión de vías vinculadas más a aspectos patogénicos o virulentos es muy importante determinar si existe la vía del IAM en el microorganismo en estudio y/o que factores determinan su expresión y virulencia. Tal reconocimiento ayudaría a re considerar la aplicación de dichos microorganismos en la agricultura como promotores de crecimiento.

Teniendo en cuenta el importante papel que juegan las fitohormonas y en particular el AIA es una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial podría resultar económicamente atractiva.

9. ANEXO

9.1 Medios de cultivo y reactivos.

Medio mínimo (MM)

NH₄H₂PO₄	1,25 g
KCl	0,25 g
MgSO₄·7H₂O	0,25 g
K₂HPO₄	0,5 g
Agua	csp 1litro
Ajustar PH a 7	

*medio solido: agregar 15g/l de agar.

**MMM: Al medio mínimo se le agrega manitol 0,25% w/v.

Reactivo de Salkowski

H₂SO₄ cc	150ml
FeCl₃ 0,5M	7,5ml
Agua	150ml

10. BIBLIOGRAFIA

- Abramovitch, R., Anderson, J. & Martin, G., 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, pp.601–611.
- Aguilar-Piedras, J.J. ., Xiqui-Vásquez, M. L., García-García, S., & Baca, B. E , 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1–2), pp.29–37.
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), pp.173–181.
- Ahmed, M., Stal, L.J. & Hasnain, S., 2010. Production of indole-3-acetic acid by the cyanobacterium *Arthrospira platensis* strain MMG-9. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), pp.1259–1265.
- Apine, O.A. & Jadhav, J.P., 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), pp.1235–1244.
- Baca, B.E. & Elmerich, C., 2007. Microbial Production of Plant Hormones. In C. Elmerich & W. E. Newton, eds. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 113–143.
- Bacon, C.W. & Hinton, D.M., 2006. Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. *Plant-Associated bacteria*, (1992), pp.155–194.
- Balaji,N, Lavanya & Tamilarasan, M. and, 2012. Optimization of Fermentation Condition for Indole Acetic Acid Production By *Pseudomonas* Species . *International Journal of Advanced Biotechnology and Research.*, 3(4), pp.797–803.
- Beracochea, M., 2011. Respuesta de variedades comerciales de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas. *Tesina de grado. Universidad de la República.*, p.55.

- Bharucha, U., Patel, K. & Trivedi, U.B., 2013. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, 2(3), pp.215–221.
- Boiero, L., Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V., 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), pp.874–880.
- Brandl, M.T. & Lindow, S.E., 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), pp.4121–4128.
- Broek, A. vande Gysegom, P., Ona, O., Hendrickx, N., Prinsen, E., Impe, J.V., Vanderleyden, J., 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(4), pp.311–323.
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., and Baca, B.E., 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular & general genetics: MGG*, 264(4), pp.521–530.
- Cassán, F. & Garcia de Salamone, I., 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. A. A. de Microbiología, ed. *Azospirillum sp. : cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Buenos Aires.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, P., Sánchez-Bravo, J., & Acosta, M., 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, 27, pp.137–142.
- Castillo, G., Torrecillas, A., Nogueiras, C., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M., 2014. Simultaneous quantification of phytohormones in fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), pp.1937–1946.

- Costacurta, a, Keijers, V. & Vanderleyden, J., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular & general genetics : MGG*, 243, pp.463–472.
- De, P.S. & Basu, P.S., 1996. Growth behaviour and IAA production by a *Rhizobium* sp. isolated from root nodules of a leguminous medicinal herb, *Tephrosea purpurea* Pers., in culture. *Microbiological Research*, 151(1), pp.71–76.
- Domka, J., Lee, J. & Wood, T.K., 2006. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp.2449–2459.
- Duca, D., Lorv J, Patten C, Rose D, Glick B., 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), pp.85–125.
- Eroglu, S., Toprak S., Urgan O, MD, Ozge E. Onur, MD, Arzu Denizbasi, MD, Haldun Akoglu, MD, Cigdem Ozpolat, MD, Ebru Akoglu, M. (2012). *Microbial root edophytes. Saudi Med J*(Vol. 33, pp. 53–69).
- Frankenberger, W. T., J. & Arshad, M., 1995. *Phytohormones in soils: microbial production and function.*, New York: Marcel Dekker Inc.
- Glickmann, E. & Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), pp.793–796.
- Gordon, S. a & Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, pp.192–195.
- Goswami, D., Thakker, J.N. & Dhandhukia, P.C., 2015. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*, 110, pp.7–14.
- Halda-Alija, L., 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian journal of microbiology*, 49(12), pp.781–787.

- Hartmann, A., Singh, M. & Klingmüller, W., 1983. Isolation and characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(8), pp.916–923.
- Hou, S., Zhu, J., Ding, M., Lv, G., 2008. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76(4), pp.798–802.
- Jeyanthi, V. & Ganesh, P., 2013. Production , Optimization and Characterization of Phytohormone Indole Acetic Acid by Pseudomonas fluorescence. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(2), pp.514–520.
- Kobayashi, M., Suzuki ,T., Fujita, T., Masuda, M., Shimizu, S., 1995. Occurrence of Enzymes Involved in Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid from Indole-3-Acetonitrile in Plant-Associated Bacteria, Agrobacterium and Rhizobium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), pp.714–718.
- Kochar, M., Upadhyay, A. & Srivastava, S., 2011. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain Pseudomonas fluorescens Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in Microbiology*, 162(4), pp.426–435.
- Koga, J., Syono, K., Ichikawa, T., Adachi, T., 1994. Involvement of I-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in Enterobacter cloacae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1209(2), pp.241–247.
- Kravchenko, L. V, Azarova, T., Makarova, N., Tikhonovich, L., 2004. The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. *Microbiology*, 73(2), pp.156–158.
- Kulkarni, G.B., Nayak, A., Sajjan, S., Oblesha, A., Karegoudar, T., 2013. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in Pantoea dispersa strain GPK. *Letters in Applied Microbiology*, 56(5), pp.340–347.
- Kumar, P.R. & Ram, M.R., 2012. Production of indole acetic acid by Rhizobium isolates from Vigna trilobata (L) Verdc . , 6(27), pp.5536–5541.

- Lambrecht, M. Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J., 2000. Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 8(7), pp.298–300.
- Lee, J., Wood, T.K. & Lee, J., 2015. Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends in Microbiology*, 23(11), pp.707–718.
- Lee, J.H. & Lee, J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), pp.426–444.
- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., Pollmann, S., 2010. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *European Journal of Cell Biology*, 89(12), pp.895–905.
- Leveau, J.H.J. & Lindow, S.E., 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), pp.2365–2371.
- Lin, G.-H., Chang, C.-Y. & Lin, H.-R., 2015. Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 988, pp.53–58.
- Lindow, S.E., 1998. Contribution of Indole-3-Acetic Acid Production to the Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola*. , 64(9), pp.3256–3263.
- Liu, H.-T., Li, Y., Luan, T., Lan, C., Shu, W., 2007. Simultaneous Determination of Phytohormones in Plant Extracts using SPME and HPLC. *Chromatographia*, 66(7–8), pp.515–520.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), pp.541–556.
- Malhotra, M. & Srivastava, S., 2008. Organization of the ipdC region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: Molecular and functional analysis of ipdC in strain SM. *Environmental Microbiology*, 10(5), pp.1365–1373.

- Malhotra, M. & Srivastava, S., 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), pp.73–80.
- Marrero-Coto, J., Amores-Sánchez, I. & Coto-Pérez, O., 2012. Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(3), pp.52–71.
- Mazumder, P., Ghosh, S., Sadhu, S., Maiti, T., 2010. Production of indole acetic acid by *Rhizobium* sp. from root nodules of a leguminous herb *Crotalaria saltiana* Andr. in culture. *Appl Microbiol*, 4.
- Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), pp.638–649.
- Montañez, A., Abreu, C., Gill, P., Hardarson, G., Sicardi, M., 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), pp.253–263.
- Montañez, A., Blanco, A., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi M, 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, pp.21–28.
- Muller, H., Westendorf C, Leitner E, Chernin L, Riedel K, Schmidt S, Eberl L, Berg G., 2009. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), pp.468–478.
- Nalini, G. & Rao, Y.R.K.V.T., 2014. Effect of Different Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Indole Acetic Acid Production by *Rhizobium* Species Isolated from Cluster Bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L .)]. *British Microbiology Research Journal*, 4(11), pp.1189–1197.

- Narayana, K.J., Prabhakar, P., Krishna, P., Venketeswarlu, Y., Vijayalakshmi, M., 2009. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 11(June), pp.49–55.
- Oberhänsli, T., Dfago, G. & Haas, D., 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of general microbiology*, 137(10), pp.2273–2279.
- Omay, S.H., Schmidt, W., Martin, P., Bangerth, F., 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under in vitro conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(2), pp.187–192.
- Ona, O., Van Impe, J., Prinsen, E., Vanderleyden, J., 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), pp.125–132.
- Pandey, R., Swamy, K. V. & Khetmalas, M.B., 2013. Indole: A novel signaling molecule and its applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 12(3), pp.297–310.
- Patten, C.L. & Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), pp.207–220.
- Patten, C.L. & Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), pp.3795–801.
- Perley, J.E. & Stowe, B.B., 1966. The Production of Tryptamine from Tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). *The Biochemical journal*, 100(1), pp.169–174.
- Petrasek, J. & Friml, J., 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16), pp.2675–2688.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Onckelen, V I., 1993. *Azospirillum brasilense* Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(5), pp.609–615.

- van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2011. Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microbial Ecology*, 61(4), pp.723–728.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 19(8), pp.827–837.
- Ruckdäschel, E. & Klingmüller, W., 1992. Analysis of IAA biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* and Tn5 induced mutants. *Symbiosis*, 13, pp.123–132.
- Ryu, R.J. & Patten, C.L., 2008. Aromatic Amino Acid-Dependent Expression of Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Is Regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J. Biol. Chem.*, 283(21), pp.7200–7208.
- Salisbury, F. & Ross, C., 1994. *Fisiología vegetal* Grupo Editorial Iberoamérica, ed.,
- Sarwar, M. & Kremer, R.J., 1995. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, 172(2), pp.261–269.
- Sergeeva, E., Hirkala, D.L.M. & Nelson, L.M., 2007. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant and Soil*, 297(1), pp.1–13.
- Sergeeva, E., Liaimer, A. & Bergman, B., 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*, 215(2), pp.229–238.
- Shokri, D. & Emtiazi, G., 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. *Current Microbiology*, 61(3), pp.217–225.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp.425–448.
- Sprunck, S., Jacobsen, H.-J. & Reinard, T., 1995. Indole-3-lactic acid is a weak auxin analogue but not an anti-auxin. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(4), p.191.

- Sudha, M., Shyamala, R., Prabhavathi, P., Astapriya, P., Yamuna, S., Saranya, A., 2012. Production and Optimization of Indole Acetic Acid by Indigenous Micro Flora using Agro Waste as Substrate. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(1), pp.39–43.
- Suzuki, S., He, Y. & Oyaizu, H., 2003. Indole-3-Acetic Acid Production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and Its Association with Suppression of Creeping Bentgrass Brown Patch. *Current Microbiology*, 47(2), pp.138–143.
- Szkop, M. & Bielawski, W., 2013. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(3), pp.683–691.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2010. *Plant physiology* fifth Edit., Sinauer Associates Inc.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W., Prinsen, E., 2004. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17(10), pp.1153–1161.
- Thomashow, L.S., Reeves, S. & Thomashow, M.F., 1984. Crown gall oncogenesis : Evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. , 81(August), pp.5071–5075.
- Torres-Rubio, M.G., Valencia, S., Bernal, J., Martínez, P., 2000. Isolation of enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(4), pp.171–176.
- Woodward, A.W. & Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), pp.707–735.
- Xie, B., Xu, K., Hong, X., San, F., 2005. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 248(1), pp.57–63.

Zažímalová, E., Petrášek, J., Benková, E., Mueller-Roeber, B., Balazadeh, 2014. *Auxin and Its Role in Plant Development*, Springer Vienna, vol. 33 (2014) pp. 21-33.

Zimmer, W., Wesche, M. & Timmermans, L., 1998. Identification and Isolation of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: Sequencing and Functional Analysis of the Gene Locus. *Current Microbiology*, 36(6), pp.327–331.