

Tesis de Maestría
PEDECIBA Biología, Subárea Microbiología

ANÁLISIS DEL ESTABLECIMIENTO DE SOJA MEDIANTE EL USO DEL CONSORCIO BRADYRIZOBIOS - *DELFTIA*

Célica Cagide Diflore

Tutora: Dra. Susana Castro Sowinski

Co-tutora: Dra. María Morel Revetria

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana
Unidad de Microbiología Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Febrero, 2017

CONTENIDO

CONTENIDO DE FIGURAS	4
CONTENIDO DE TABLAS	5
RESUMEN	6
ESTRUCTURA DE LA TESIS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	9
1.2. Asociación rizobio - leguminosa	11
1.3. Diálogo molecular rizobio – leguminosa	16
1.3.1. Polisacáridos.....	17
1.3.2. Fitohormonas.....	17
1.3.3. Flavonoides	18
1.3.4. Los factores Nod	20
1.4. Mejoramiento de la simbiosis: co-inoculación con PGPRs	22
1.4.1. <i>Delftia</i>	23
1.4.2. Biofertilizantes y formulaciones mixtas comerciales.....	24
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
2.1. Hipótesis.....	26
2.2. Objetivo general	26
2.3. Objetivos específicos.....	26
3. CAPÍTULO I.....	27
“Efecto de la co-inoculación con <i>B. elkanii</i> y <i>Delftia</i> sp. JD2 sobre el rendimiento y nodulación del cultivo de soja”.....	27
3.1. Materiales y métodos.....	28
3.1.1. Cepas bacterianas y material vegetal	28
3.1.2. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones <i>in vitro</i>	28
3.1.3. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones de invernáculo. Diseño experimental.....	30
3.1.4. Análisis estadístico	32
3.2. Resultados	33
3.2.1. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones <i>in vitro</i>	33
3.2.2. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones de invernáculo	36
4. CAPÍTULO II	44

“Estudio de la respuesta de la planta de soja a la co-inoculación con <i>B. elkanii</i> y <i>Delftia</i> sp. JD2, mediante una aproximación metabolómica”	44
4.1. Materiales y métodos.....	47
4.1.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos	47
4.1.2. Extracción de compuestos de bajo peso molecular (CBPM)	47
4.1.3. Análisis por GC-MS	49
4.2. Resultados	51
4.2.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos	51
4.2.2. Identificación y cuantificación de metabolitos de bajo peso molecular	56
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	76
7. PERSPECTIVAS	76
8. EPÍLOGO: Una serie de eventos desafortunados	78
9. ANEXO.....	82
10. BIBLIOGRAFÍA.....	83

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa, NR.....	13
Figura 1.3. Estructura general de los flavonoides.....	19
Figura 1.4. Estructura de los factores Nod.	21
Figura 3.1. Plantas de soja crecidas en condiciones <i>in vitro</i> en medio mineral (Somesagaran & Hoben, 1985) estéril, libre de nitrógeno. Temperatura: 26°C. Fotoperíodo: 16/8 luz/oscuridad.....	33
Figura 3.2. Cinética de nodulación de plantas crecidas en condiciones <i>in vitro</i>	34
Tabla 3.3. Producción de biomasa aérea en condiciones <i>in vitro</i>	36
Tabla 3.4. Variables de producción de biomasa de plantas en estadio V4 (30 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.....	38
Figura 3.5. Plantas de soja al inicio de la floración, estadio reproductivo R2 (100 días después de la inoculación) en crecidas en condiciones de invernáculo.	39
Figura 3.9. Plantas en estadio de madurez fisiológica (MF, 180 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.	41
Figura 3.10. Vainas obtenidas a los 180 días luego de la siembra de plantas crecidas en condiciones de invernáculo.	42
Figura 4.1. Plantas de soja al inicio del estadio R2 (100 días después de la siembra) crecidas en condiciones de invernáculo.	54
Figura 4.2. Cromatogramas en TIC (corriente iónica total) de extractos de raíces en estadio V4 (30 días después de la siembra) de plantas crecidas en condiciones de invernáculo	57
Figura 4.3. Cromatogramas en TIC (corriente iónica total) de extractos de raíces en estadio R2 (100 días después de la siembra) de plantas crecidas en condiciones de invernáculo.	58
Figura 4.4. Efectos de la co-inoculación <i>B. elkanii</i> y <i>Delftia</i> sp. JD2 sobre las plantas de soja.	68

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.1. Ejemplos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y su mecanismo de acción sobre cultivos de interés agronómico. AIA significa ácido indol-acético.....	10
Tabla 1.2. Asociaciones rizobio – leguminosa específicas y flavonoides involucrados en el diálogo molecular	18
Tabla 3.1. Denominación y origen de las cepas empleadas.....	28
Tabla 3.2. Tratamientos ensayados e inoculación de microorganismos sobre semilla en condiones <i>in vitro</i>	30
Tabla 3.3. Producción de biomasa aérea en condiciones <i>in vitro</i>	36
Tabla 3.4. Variables de producción de biomasa de plantas en estadio V4 (30 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.....	38
Tabla 3.4. Variables de producción de biomasa de plantas en estadio R2 (100 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.....	39
Tabla 3.5. Número y peso seco de nódulos expresados en mg de plantas en estadio R2 (100 días después de la inoculación) crecidas en condiciones de invernáculo.	40
Tabla 3.6. Parámetros estimados en plantas en estadio MF (180 días después de la siembra). El Índice de cosecha (IC) se calcula como la relación entre el peso fresco (PF) de los granos y el PF de la biomasa aérea.	43
Tabla 4.1. Contenido de clorofila total (a + b), clorofila a, clorofila b, relación b/a y carotenoides, de plantas de soja cosechadas en estadio V4.	52
Tabla 4.2. Contenido de clorofila totales (a + b), clorofila a, clorofila b, relación b/a y carotenoides de plantas de soja en estadio R2 (100 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo. Los valores se expresan en mg de pigmento por g de hoja fresca.	54
Tabla 4.3. Parámetros empleados para la identificación de compuestos flavonoides mediante GC-MS.....	56
Tabla 4.4. Composición química de flavonoides en los extractos de raíces. V4: estadio de cuarto nudo (30días después de la siembra); R2: estadio de floración (100 días después de la siembra). ...	59
Tabla 4.5. Composición química de extractos de raíces en estadio V4 (30 días después de la siembra)	61
Tabla 4.6. Composición química de extractos de raíces (estadio R2, 100 días después de la siembra)	64

RESUMEN

La inoculación de plantas con especies microbianas promotoras del crecimiento vegetal es una forma de contribuir al desarrollo de sistemas productivos sustentables. Comparado con la inoculación tradicional simple, la co-inoculación de leguminosas es una alternativa sencilla y eficaz para mejorar el rendimiento de cosecha. Un ejemplo es la co-inoculación de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* y *Delftia* sp. JD2. Trabajos previos, realizados en nuestro laboratorio, demostraron que en presencia de JD2 la planta de alfalfa cambia la composición de sus exudados radicales y aumenta la cantidad de flavonoides secretados. Además, JD2 aportaría auxinas al sistema alfalfa-sinorizobio-*Delftia*, induciendo una nodulación temprana, incrementando el número de nódulos por planta, el crecimiento radical y la producción de biomasa.

En el trabajo de tesis se analizó el efecto de la co-inoculación de soja con cepas de *Bradyrhizobium elkanii* y JD2, tanto sobre la producción de biomasa y rendimiento de las plantas, como sobre el perfil de metabolitos presentes en raíces y nódulos de plantas crecidas en condiciones de invernáculo e *in vitro*. Los resultados obtenidos de los ensayos de invernáculo indicaron que la co-inoculación de semillas de soja incrementó en promedio un 79 y 18% la biomasa seca radical y aérea, respectivamente, en el estadio V4 (cuarto nudo), en relación a las plantas inoculadas con los bradyrizobios, aunque se encontraron diferencias estadísticas solo en la primera variable. Los resultados obtenidos en los ensayo *in vitro* sugieren que cuando las plantas se co-inoculan, se produce una nodulación temprana en las raíces, lo cual es muy beneficioso a nivel agronómico. Una nodulación temprana podría representar el éxito en el establecimiento del proceso simbiótico frente a un desafío climático, por ejemplo. En el estadio R2 (floración completa), la co-inoculación incrementó la biomasa aérea y el peso seco de los nódulos, tanto de raíces secundarias como principales. En el estadio MF (madurez fisiológica) las plantas co-inoculadas presentaron el mayor promedio de rendimiento en grano, sugiriendo que la co-inoculación con JD2 sería un tratamiento de elección para aumentar el índice de cosecha, comparado con la inoculación simple. Las plantas co-inoculadas presentaron además un mayor contenido de pigmentos fotosintéticos, lo que sugiere una mayor capacidad de recolección de luz de estas plantas, y por consiguiente, una posible mejora en la capacidad para realizar fotosíntesis. A través del análisis de algunos metabolitos secundarios presentes en extractos de raíces y nódulos, se observó que durante el estadio V4 se detectó una acumulación de daidzeína, genisteína, luteolina y coumestrol en raíces de plantas co-inoculadas con bradyrizobios y *Delftia* sp. JD2, mientras que las plantas inoculadas con los bradyrizobios acumularon solamente daidzeína. En estadio R2 se detectaron los cuatro flavonoides en ambos tratamientos. Se detectaron también numerosos compuestos de bajo peso molecular, mayormente azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos, entre otros, aunque no se detectaron diferencias marcadas entre los distintos tratamientos. En su conjunto los resultados sugieren que la co-inoculación de soja con bradyrizobios y JD2 induce una nodulación temprana e incrementa el rendimiento en granos a través del cambio en el estado fisiológico de la planta, tal cual se describirá en el cuerpo de la tesis.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis está organizada de la siguiente forma:

Se incluye un Resumen, seguido de una Introducción general sobre la importancia de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal en el establecimiento, crecimiento y desarrollo de las plantas, así como de las moléculas implicadas en la comunicación microorganismo-planta. Posteriormente se desarrolla la Hipótesis del trabajo, y los Objetivos generales y específicos. Los Resultados se presentan en dos capítulos con sus correspondientes apartados: un marco general, los materiales y métodos empleados, los resultados y una discusión preliminar. El primer capítulo presenta los estudios realizados para determinar el efecto de la co-inoculación de soja con *bradyrizobios* y *Delftia* sp. JD2 sobre el crecimiento de la planta. El segundo capítulo trata sobre la identificación de moléculas clave producidas por la planta y que puedan explicar los resultados obtenidos en el Capítulo I. La tesis concluye con una sección de Discusión General, así como de Conclusiones y Perspectivas de futuro. Se incluye además una sección que hemos denominado Epílogo, donde se intenta plasmar los conocimientos adquiridos durante esta tesis y que no se reflejan en la misma. Se presentan en esa última sección algunas dificultades enfrentadas durante el trabajo, como se detectaron los problemas y como se procedió para su solución.

1. INTRODUCCIÓN

La soja, [*Glycine max* (L. Merr.)], es una leguminosa de gran importancia económica. Su demanda mundial ha ido en aumento debido a su consumo no sólo como alimento (aceites, harinas y granos), sino también por su utilización para la producción de biodiesel (www.faostat.fao.org; Wilson, 2008). En los últimos doce años, la producción de soja aumentó drásticamente en nuestro país, cubriendo en la actualidad más de un millón de hectáreas sembradas. Las exportaciones de grano se han convertido en una de las principales fuente de entrada de divisas, pasando de ser el 7% de las exportaciones de bienes en 2006 a representar el 25% en 2016. La soja es el producto con mayor incidencia tanto en la producción de granos, como en las exportaciones totales. El máximo registro de producción de granos de soja fue en 2013, cuando se alcanzó una participación del 28% en las exportaciones totales del país, coincidiendo esta producción record con los altos precios promedio de exportación (Informe Anual de Comercio Exterior, 2016).

Según la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), de la superficie total de cultivos de verano, la soja ocupa el 90% del área cultivada. Más allá de las fluctuaciones en el precio, área sembrada y rendimiento, es indudable el crecimiento espectacular y sostenido que este cultivo ha tenido dentro del área agrícola en la última década. Por ello, el principal desafío para los investigadores y técnicos es el aumento de la productividad sin comprometer la sanidad de los ecosistemas donde se produce, lo que ha impulsado a la generación de conocimiento básico y aplicado sobre el cultivo. Los campos de investigación en los que se ha hecho más énfasis son el ajuste en el manejo del cultivo y la mejora genética de las variedades. Ambos pueden producir avances consistentes en el rendimiento pero a veces limitados dado que generalmente se llega a los límites físicos del cultivo (AgroBIO, www.agrobiomexico.org.mx). Es importante entonces mejorar otras características asociadas al rendimiento. Se considera que un aumento de producción del 5% se acompañaría de un importante aumento en los beneficios económicos tanto para el agricultor como para la economía del país.

El uso de especies microbianas promotoras del crecimiento vegetal es una herramienta útil que puede contribuir al desarrollo de un sistema productivo sustentable. Debido a que la práctica de la inoculación microbiana de los cultivos vegetales es una metodología fácil de adoptar, se espera un gran éxito en cuanto al desarrollo de nuevas formulaciones para las leguminosas, incluyendo la soja. Los productores serían los principales beneficiarios de su uso, debido a que ahorra tiempo y dinero, y facilita la adopción de prácticas agrícolas sustentables que disminuyen la erosión del suelo, entre otros factores (AgroBIO, www.agrobiomexico.org.mx).

1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las PGPRs o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria; Kloepper y Schroth, 1978) son un grupo heterogéneo de bacterias capaces de promover, directa o indirectamente, el desarrollo y crecimiento de algunas plantas. Pueden encontrarse en vida libre o en asociaciones mutualistas con plantas (Vacheron *et al.*, 2013; Drogue *et al.*, 2012). Se conoce una amplia variedad de PGPRs que incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, entre otros (Vessey, 2003; Hayat *et al.*, 2010). En la *Tabla 1.1* se describen algunos ejemplos de PGPRs, y sus características más relevantes.

Las PGPRs deben cumplir con tres condiciones para ser consideradas como tal: (i) colonizar la rizósfera, el rizoplaneo (superficie de la raíz) o la propia raíz (dentro de los tejidos radicales); (ii) sobrevivir y multiplicarse en la rizósfera, y (iii) promover el crecimiento vegetal (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Gray & Smith, 2005; Espinosa-Urgel, 2004; Gamalero *et al.*, 2004; Rothballer *et al.*, 2003).

Cuando se establece una asociación microorganismo-planta, y el microorganismo desempeña un mecanismo de promoción directa del crecimiento vegetal, la PGPR debe presentar uno o varios de los siguientes efectos:

- a) proporcionar a la planta compuestos con potencial promotor de su crecimiento, por ejemplo fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, etc (Cassán, 2009);
- b) facilitar la absorción de ciertos nutrientes del suelo, como la producción de ácidos orgánicos que actúan como solubilizadores de fosfatos (Drogue *et al.*, 2013), o de sideróforos que median la captación de hierro del entorno (Yadegari *et al.*, 2010);
- c) producir y secretar compuestos fenólicos que estimulen la germinación de las semillas, así como la emergencia y el establecimiento de las plántulas (Podile & Kishore, 2006);
- d) fijar el nitrógeno atmosférico a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN; Masson- Boivin *et al.*, 2009; Podile & Kishore, 2006).

Por otro lado, los mecanismos indirectos de acción de las PGPRs están directamente relacionados con la protección de las plantas frente a los fitopatógenos, como pueden ser otras clases de bacterias u hongos (Compant *et al.*, 2005). Dentro de los mecanismos indirectos se encuentran la producción

de proteasas extracelulares, antibióticos y antifúngicos, la inducción de la resistencia sistémica en la planta, la competencia frente a los microorganismos patógenos por nutrientes (por ejemplo, agotamiento de hierro en la rizósfera) y la competencia por un nicho específico (Couillerot *et al.*, 2009; Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Tabla 1.1. Ejemplos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y su mecanismo de acción sobre cultivos de interés agronómico. AIA significa ácido indol-acético.

Microorganismo	Cultivo	Características de interés	Referencias bibliográficas
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	arroz	Fijador de N ₂ en vida libre; productor de AIA	Fallik <i>et al.</i> , 1989
<i>Sinorhizobium meliloti</i> U143	alfalfa	Fijador de N ₂ en asociación simbiótica con alfalfa	Castro-Sowinski <i>et al.</i> , 2002
<i>S. meliloti</i> 1021	alfalfa	Fijador de N ₂ en asociación simbiótica con alfalfa	Fisher & Long, 1992
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301	soja	Fijador de N ₂ en asociación simbiótica con soja	Campos <i>et al.</i> , 2001
<i>B. elkanii</i> U1302	soja	Fijador de N ₂ en asociación simbiótica con soja	Campos <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	trébol, arroz	Fijador de N ₂ en asociación simbiótica con trébol, productor de AIA	Biswas <i>et al.</i> , 2000; Dazzo <i>et al.</i> , 2000
<i>Delftia</i> sp. JD2	leguminosas	Productor de AIA y sideróforos. Fijador de N ₂ en vida libre. Promotor del crecimiento vegetal de alfalfa y trébol	Ubalde <i>et al.</i> , 2012; Morel <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	maní	Productor de AIA y sideróforos	Dey <i>et al.</i> , 2004
<i>Kluyvera ascorbata</i> SUD165	canola, tomate	Productor de AIA y sideróforos	Burd <i>et al.</i> , 2000

1.2. Asociación rizobio - leguminosa

El ejemplo de asociación mutualista más estudiado es el caso particular de la simbiosis entre los rizobios y las plantas de la familia Leguminosae (Fabaceae) (Morel & Castro Sowinski, 2013; Hayat *et al.*, 2010). Se estima que en Uruguay, anualmente, esta asociación aporta a los ecosistemas 150 kg de nitrógeno por hectárea (Labandera, 2007); y es una de las relaciones simbióticas más importantes desde el punto de vista agrícola y ambiental.

La atmósfera contiene alrededor de un 78% de su volumen en nitrógeno presente en la forma de dinitrógeno (N_2). A pesar de su abundancia, el nitrógeno suele ser un factor limitante en el crecimiento de las plantas, pues el mismo no está disponible para su incorporación a los sistemas biológicos debido a lo difícil de reducir el triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno del N_2 . Solamente un pequeño grupo de seres vivos, todos ellos procariotas, conocidos como microorganismos diazótrofos, son capaces de fijar el N_2 atmosférico, mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), transformándolo en amonio (Roesch *et al.*, 2007).

Las bacterias diazotróficas pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellas que son capaces de fijar el N_2 en asociación (simbiótica o no-simbiótica) con una planta, y las que realizan el proceso de FBN en condiciones de vida libre (Masson-Boivin *et al.*, 2009; Bhattacharjee *et al.*, 2008).

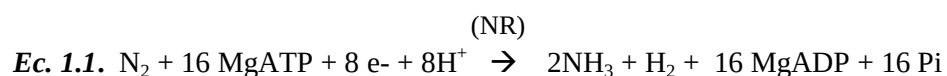
Los diazótrofos de vida libre son por lo general bacterias heterótrofas que se encuentran en la rizósfera (Figuerola, 2004). Entre ellas se encuentran miembros de los géneros *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, entre otros (Morel & Castro Sowinski, 2013).

Dentro de los diazótrofos simbióticos, los más estudiados son los rizobios, bacilos *Gram* negativos, aerobios y heterótrofos, que pertenecen a diferentes géneros dentro de las clases α - y β -Proteobacterias (Reeve *et al.*, 2017; Bapaume & Reinhardt, 2012). Todos los rizobios comparten una característica fundamental: son capaces de fijar el N_2 atmosférico únicamente luego de establecerse en forma endosimbiótica en plantas leguminosas.

La colonización de la planta por los rizobios ocasiona cambios en la arquitectura de la raíz y en la expresión de genes en la raíz y el tallo de la leguminosa (Morel & Castro-Sowinski 2013). La estructura característica que se forma en la raíz se conoce como nódulo radical. En el nódulo se

alojan las bacterias diazótrofes que luego se diferencian en bacteroides, y es en el nódulo donde ocurre el proceso de FBN (Morel & Castro Sowinski, 2013; Gibson *et al.*, 2008).

Durante la FBN, el N₂ atmosférico se reduce a amonio (NH₄⁺) mediante un complicado mecanismo que se lleva a cabo a través de la acción del complejo enzimático nitrogenasa (NR). Este complejo reduce el triple enlace del N₂ en un proceso que implica un alto costo energético y que aún no está completamente dilucidado (Ryu *et al.*, 2017; *Ec. 1.1*). El NH₄⁺ producido se incorpora a algunos compuestos carbonados, y de este modo pasa a formar parte de los aminoácidos que quedan disponibles para la planta. Mientras tanto, la planta aporta fotosintatos (moléculas carbonadas derivadas de la fotosíntesis) a la bacteria, quien los utiliza como fuente de carbono y energía (Franche *et al.*, 2009; Taiz & Zeiger, 2006).



La reacción catalizada por la NR es fuertemente endergónica, y para que la reacción sea factible se acopla a la hidrólisis de compuestos con un alto potencial de transferencia del grupo fosfato, en este caso la hidrólisis altamente exergónica del ATP. La enzima se inhibe en presencia de nitrógeno combinado (NO₃⁻ o NH₄⁺), ya que para el bacterioide es energéticamente más económico utilizar estas fuentes de nitrógeno en comparación con los gastos energéticos producidos durante la FBN (Barea *et al.*, 2005).

NR es un complejo proteico de gran tamaño que se compone de dos subunidades:

- 1) la proteína homodimérica que contiene Fe (Fe-proteína), capaz de tomar electrones de un compuesto reducido, como las ferredoxinas reducidas, producidas por la planta. Esta proteína está codificada por los genes *nifH*, y
- 2) la proteína tetramérica, compuesta por dos subunidades α y dos subunidades β, y que contiene Fe y molibdeno (Mo) (o MoFe-proteína). En ella se produce el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. Esta subunidad heterotetramérica de la NR está codificada por los genes *nifD* y *nifK* (*Figura 1.1*; Franche *et al.*, 2009; Rubio & Ludden, 2008).

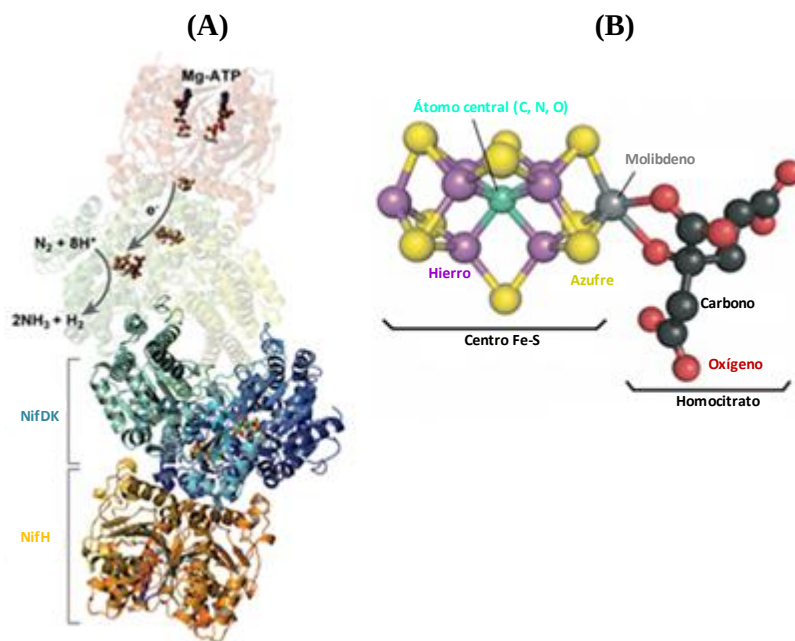


Figura 1.1. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa, NR. **(A)** El componente NifDK es una proteína heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$) formada por dos dímeros $\alpha\beta$ relacionados por una doble simetría. NifDK lleva un cofactor de hierro-molibdeno (FeMo-Co) dentro del sitio activo en cada subunidad α (NifD) y un P-cluster en la interfase de las subunidades α y β en cada par $\alpha\beta$. Las subunidades α presenta un sitio de unión a magnesio y ATP **(B)** Estructura del cofactor hierro – molibdeno (Fe-Mo-Co). Imagen modificada de Rubio & Ludden, 2008.

Por otro lado, la enzima se inhibe también frente al oxígeno, pero en este sentido la estructura y composición nodular proporciona un ambiente óptimo para que se lleve a cabo la FBN. Una hemoproteína, llamada leghemoglobina, capta el oxígeno presente en el nódulo impidiendo que la enzima NR se inactive, pero dejando suficiente oxígeno libre para que tenga lugar la respiración celular (Madsen *et al.*, 2010).

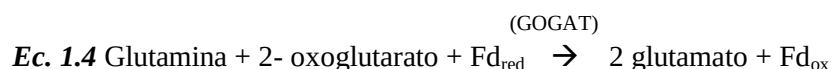
El proceso simbiótico se explica porque los bacteroides generan el ATP necesario a partir del catabolismo de los fotosintatos que la planta le proporciona, y las bacterias le suministran a la planta una fuente de nitrógeno reducido, principalmente a través de la formación de amonio (Vessey 2003).

Las células vegetales evitan la toxicidad del amonio incorporándolo rápidamente en los esqueletos carbonados, formando así algunos aminoácidos. El primer paso en este proceso involucra la incorporación del amonio al esqueleto carbonado a través de las acciones secuenciales de las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (*Figura 1.2*).

La glutamina sintetasa (GS) tiene una alta afinidad por el amonio (NH_4^+), el cual se incorpora a una molécula de glutamato para formar glutamina, reacción acoplada a la hidrólisis de ATP (*Ec. 1.2*).



Esta reacción no solo requiere la hidrólisis de ATP, sino que la enzima necesita también cationes divalentes, como el Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , como cofactores. Existen dos clases de GS en plantas: una en el citoplasma y otra en los plástidos de las raíces o en los cloroplastos de tallos y hojas. Las formas citosólicas se expresan durante la germinación de las semillas y producen glutamina para el transporte intracelular de nitrógeno. En los plástidos de raíces, la GS proporciona el nitrógeno amídico de la glutamina para su consumo; mientras que la GS de los cloroplastos reasimila el NH_4^+ producido por la foto-respiración (Seabra *et al.*, 2010; Carvalho & Cullimore, 2003). Al aumentar los niveles de glutamina, aumenta también la actividad de la enzima glutamato sintasa (también denominada glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa, GOGAT), que transfiere un grupo amida de la glutamina, al 2-oxoglutarato, obteniendo como resultado dos moléculas de glutamato. Las plantas presentan dos tipos de GOGAT, una que acepta los electrones del NADH, y otra que acepta electrones de la ferredoxina reducida (*Ec.1.3 y 1.4*; Mulley *et al.*, 2011).



La GOGAT dependiente de NADH se ubica en los tejidos no fotosintéticos, como las raíces, donde actúa asimilando el NH_4^+ absorbido desde la rizosfera; mientras que en las células vasculares de las hojas en desarrollo, esta enzima asimila la glutamina translocada desde las raíces. La GOGAT dependiente de Fd (ferredoxina) se encuentra en los cloroplastos y participa de la foto-respiración (Mulley *et al.*, 2011).

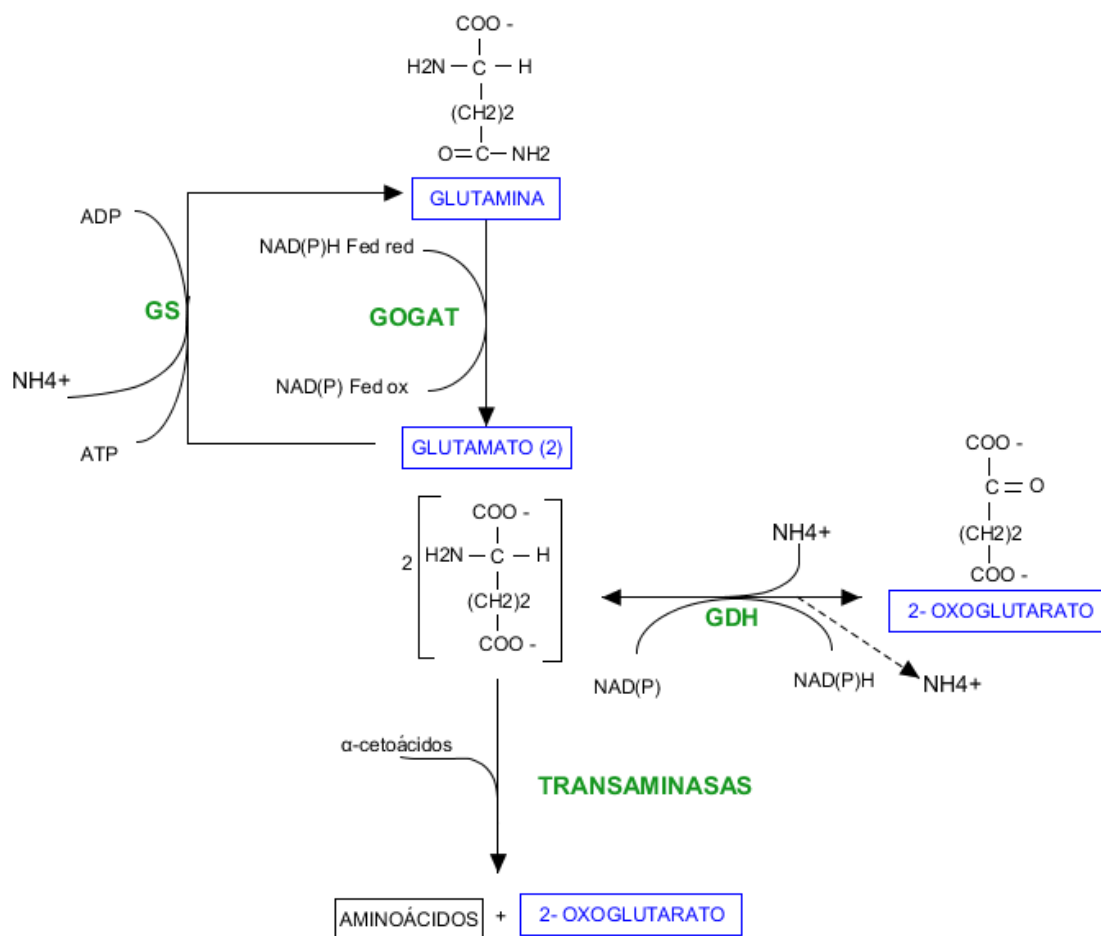


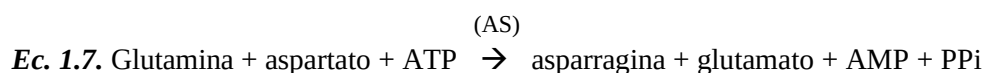
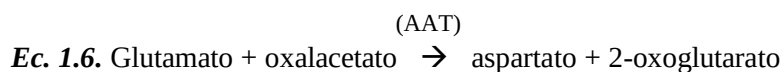
Figura 1.2. Esquema de la asimilación de amonio en plantas. Glutamina sintetasa (GS), glutamato sintetasa (GOGAT), aminotransferasas o transaminasas y glutamato deshidrogenasa (GDH, con actividad aminante y desaminante).

De las dos moléculas de glutamato generadas por la GOGAT (*Ec. 1.3*), una se utiliza para incorporar amonio, cerrando el ciclo. La otra se transfiere al xilema para su transformación en: a) amidas (asparagina y glutamina) y su posterior catabolismo, en leguminosas templadas como alfalfa y lotus; o b) ureidos (alantoína y ácido alantoico) para su catabolismo en leguminosas tropicales como la soja, maní, etc. (White *et al.*, 2007).

La glutamato deshidrogenasa (GDH) de plantas cumple un rol en el metabolismo mediante la aminación reductiva del oxoglutarato para sintetizar glutamato (*Figura 1.2*; Tercé - Laforgue *et al.*, 2004), y así catalizar las reacciones subsiguientes de la asimilación de amonio. Actualmente se considera que la GDH participa principalmente en los procesos catabólicos, y su actividad se estimula en condiciones de oscuridad, senescencia, germinación y situaciones limitantes de carbono (*Ec. 1.5*; Dubois *et al.*, 2003).



Una vez que se incorpora el nitrógeno, en la forma de glutamina y glutamato, se biosintetizan otros aminoácidos por reacciones de transaminación. Las enzimas que catalizan estas reacciones se denominan aminotransferasas (o transaminasas, *Figura 1.2*). Por ejemplo, la aspartato aminotransferasa (AAT) cataliza la reacción descrita en la *Ec. 1.6* (Silvente *et al.*, 2003). El aspartato producido puede transformarse en asparagina por la acción de la enzima asparagina sintetasa (AS), siendo la glutamina la molécula dadora del nitrógeno amídico. Esta ecuación se muestra en la *Ec. 1.7* (Sulieman & Phan Tran, 2013; Shi *et al.*, 1997).



La asparagina es un componente clave del transporte de amonio y de la reserva de nitrógeno dentro de la planta debido a su gran estabilidad química y su alta relación nitrógeno/carbono. Otras de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos es la alanina aminotransferasa (AlaAT), que cataliza las reacciones reversibles de alanina/2-oxoglutarato $\leftrightarrow$ glutamato/piruvato y alanina/glioxilato $\leftrightarrow$ glicina/piruvato (Ricoult *et al.*, 2006). Todas las transaminasas son dependiente del cofactor pirodoxal fosfato y se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos vegetales como raíces, tallos y hojas (Xu *et al.*, 2017).

1.3. Diálogo molecular rizobio – leguminosa

El establecimiento de una simbiosis efectiva entre las leguminosas y los rizobios es un proceso complejo que implica mecanismos de señalización y de reconocimiento altamente específicos por parte de ambos simbioses. Este diálogo varía con el rizobio y con la planta a nodular (especificidad relativa de cada rizobio para nodular una leguminosa particular), determinando el éxito de una simbiosis en términos de FBN. Son múltiples los factores que afectan este diálogo molecular; entre ellos la compatibilidad entre los simbioses, las condiciones fisicoquímicas del suelo, y la presencia de ciertas biomoléculas como son los polisacáridos, fitohormonas y flavonoides (Hayat *et al.*, 2010).

1.3.1. Polisacáridos

Los polisacáridos y oligosacáridos son componentes esenciales en la comunicación microorganismo-planta (Upadhyay *et al.*, 2012). Los polisacáridos extracelulares bacterianos, que incluyen a los exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS) y β -glucanos cíclicos, se acumulan en la superficie celular bacteriana. Estos poseen variadas funciones, como la protección contra el estrés (Qurashi & Sabri, 2012; Upadhyay *et al.*, 2012), la adhesión a superficies bióticas y abióticas (Tsuneda *et al.*, 2003) y la inhibición de la respuesta de defensa de las plantas durante las interacciones microorganismo-planta (Kyungseok *et al.*, 2008).

En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, los polisacáridos y proteínas producidas por los rizobios juegan un papel fundamental en la interacción física entre la planta y la bacteria. En particular, los EPS bacterianos son sumamente importantes en el proceso de invasión radical, en la formación e infección de los nódulos, y en el desarrollo del bacteroide. Esto se ha demostrado con mutantes de rizobios que carecen de EPS. Estos mutantes no invaden ni forman canales de infección en sus leguminosas hospederas (Bomfeti *et al.*, 2011). Por otro lado, los LPS son componentes importantes de las membranas de las bacterias *Gram*-negativas, y en los rizobios cumplen diferentes roles durante la etapa endosimbiótica de la interacción con la planta. Además, al igual que los EPS, se relacionan con la adaptación y sobrevivencia de los rizobios bajo diferentes condiciones ambientales, posiblemente porque enmascaran la superficie bacteriana, evitando de este modo que se desencadene la respuesta de defensa en la planta (Fischer *et al.*, 2003).

1.3.2. Fitohormonas

Se conocen algunos microorganismos capaces de secretar fitohormonas, principalmente auxinas y citoquininas (CKs), que actúan como moléculas señal coordinando cambios en la división y diferenciación celular vegetal, así como afectando la arquitectura de la raíz y del tallo (Boiero *et al.*, 2007; Lopez-Bucio *et al.*, 2007). Algunos ejemplos de bacterias productoras de fitohormonas son miembros de los géneros *Pseudomonas* (Khakipour *et al.*, 2008), *Azospirillum* (Khalid *et al.*, 2011), *Rhizobium* (Etesami *et al.*, 2009), *Bacillus* (Lim & Kim, 2009) y *Delftia* (Morel *et al.*, 2011). Por ejemplo, la auxina ácido indolacético (AIA) producida por las bacterias tiene efectos directos tanto sobre la planta como sobre las propias bacterias. En las bacterias actúa como molécula señal desencadenando la expresión de genes involucrados en la adhesión, adaptación y virulencia, lo que lleva a una mejor adaptación del microorganismo a los tejidos vegetales, favoreciendo la colonización de la planta (Spaepen *et al.*, 2006). En la planta, el AIA de origen microbiano es responsable, al menos en parte, de la promoción del crecimiento vegetal, principalmente debido a

que induce el aumento del volumen radical, especialmente de raíces secundarias, aumentando de esta forma el área activa para la absorción de nutrientes minerales y agua, así como también aumentando los nichos donde establecer interacciones con posibles huéspedes.

Además de estos efectos, tanto las auxinas como las CKs, liberadas por los microorganismos, desempeñan un papel importante en la simbiosis rizobio-planta. Ambas familias de hormonas se han relacionado con la organogénesis del nódulo (Ariel *et al.*, 2012; Op den Camp *et al.*, 2011; Oldroyd & Downie, 2008), entre otros efectos.

1.3.3. Flavonoides

La especificidad de la interacción rizobio-planta está, en parte, determinada por el tipo de flavonoide secretado por la raíz de la leguminosa (Tabla 1.2; Ardley *et al.*, 2013).

Tabla 1.2. Asociaciones rizobio – leguminosa específicas y flavonoides involucrados en el diálogo molecular

Rizobio	Leguminosa	Flavonoide (s)	Referencia
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	alfalfa	Luteolina	Peters <i>et al.</i> , 1986
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	soja	Coumestrol	Lee <i>et al.</i> , 2012
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	soja	Genisteína	Cooper, 2004
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	arveja y lenteja	Hespertina y naringenina	Begum <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv trifolii</i>	trébol	7,4'-dihidroxiavona	Redmond <i>et al.</i> , 1986

Los flavonoides son metabolitos secundarios fenólicos de origen vegetal, que están involucrados en la mayoría de las interacciones planta-microorganismo conocidas. Se han encontrado más de 10.000 variantes estructurales de flavonoides producidos por plantas vasculares y una gran parte de ellos se han detectado en leguminosas (Weston & Mathesius; 2013; Bais *et al.*, 2006). Si bien existen 13 subclases de flavonoides, los más estudiados son las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas (Figura 1.3). Estos poseen como unidad básica una estructura de 15 átomos de carbono provenientes del malonil-coenzima A y del p-cumaril coenzima A. La mayoría de los flavonoides se

representan como moléculas de tipo C6-C3-C6, con un anillo aromático y un heterociclo con oxígeno (Pérez Trueba & Martínez Sánchez, 2001; Cesco *et al.*, 2012).

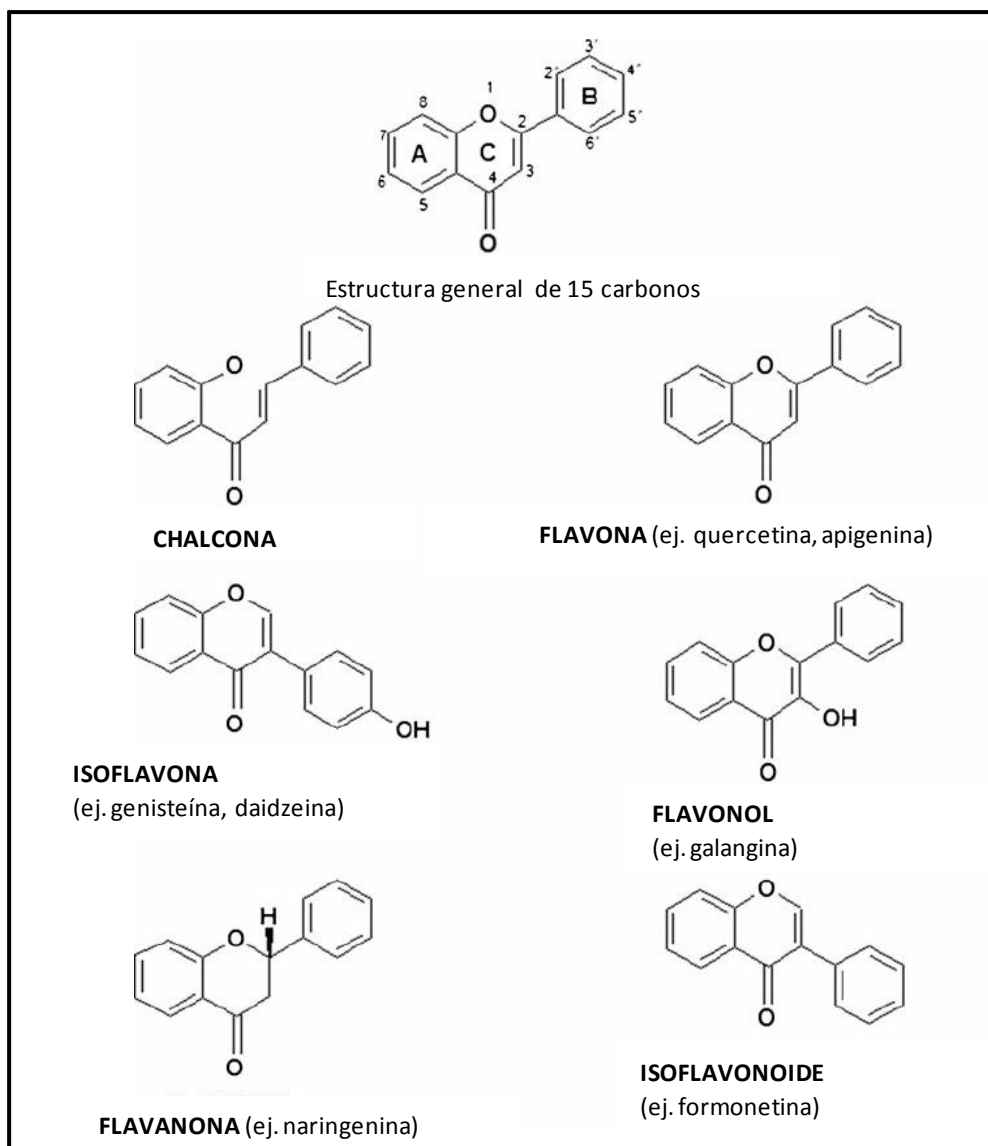


Figura 1.3. Estructura general de los flavonoides. Como ejemplos se muestra la chalcona, flavona, isoflavona, flavonol, flavanona e isoflavonoide. Imagen modificada de Cesco *et al.*, 2012.

Los flavonoides secretados por las raíces cumplen un rol clave en la primera etapa del diálogo molecular microorganismo-planta (Cesco *et al.*, 2012). Estos actúan como quimio-atrayentes de los rizobios hacia las raíces de la leguminosa y como primera señal molecular para la inducción de la expresión de los genes bacterianos involucrados en la nodulación.

Los genes esenciales para la infección por los rizobios se dividen en dos clases:

- 1) un conjunto de genes implicados en la síntesis de las estructuras superficiales de la célula bacteriana, tales como los genes que determinan la síntesis de los exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*) y β -1,2-glucanos (genes *ndv*).
- 2) los genes de nodulación (*nol*, *nod*). Los flavonoides actúan como señales inductoras de la expresión de estos últimos (genes *nod*, Lorkiewicz, 1996; Mandal *et al.*, 2010), mediante el activador transcripcional NodD. La expresión de los genes *nod* es imprescindible para la formación del factor de nodulación (factores Nod), involucrado en la formación del nódulo (Morel & Castro Sowinski, 2013; Mandal *et al.*, 2010), y la ausencia o mutación de los mismos impide o dificulta el proceso de infección (Scheres *et al*, 1990).

1.3.4. Los factores Nod

Los factores Nod son lipoquitoligosacáridos (LCO) que inducen la formación y desarrollo del nódulo radical. Los LCOs son moléculas complejas, constituidas por un esqueleto de cuatro a cinco N-acetil glucosaminas unidas por enlaces β -1,4, con varias decoraciones, y una N-acetilación en el extremo no reductor (*Figura 1.4*). Las sustituciones adicionales (metilo, fucosilo, acetilo, sulfato, entre otras), junto con la longitud y grado de saturación del grupo N-acilo, varían ampliamente entre los factores Nod producidos por diferentes especies de rizobios. Estas decoraciones determinan la especificidad de la interacción entre la leguminosa y el rizobio (Oldroyd, 2013).

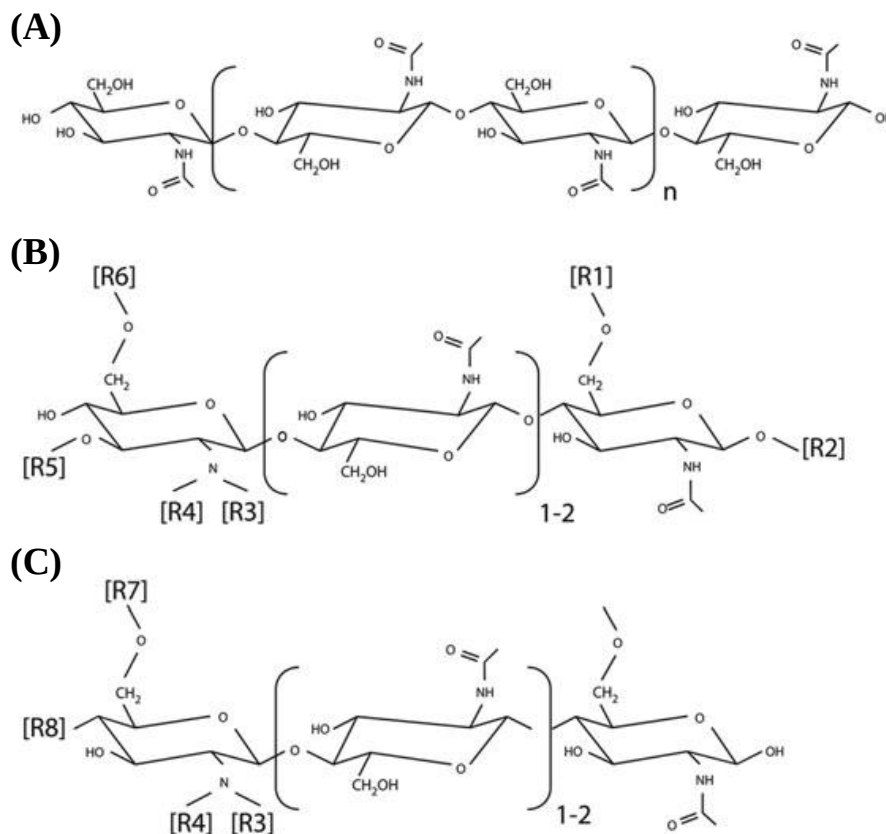


Figura 1.4. Estructura de los factores Nod. (A) Estructura general de los lipoquitoligosacáridos (LCOs). (B) Factor Nod producido por *Rhizobium*. El número de glucosaminas en el esqueleto común varía entre cuatro y cinco. La sustitución (R) varía según la cepa de rizobio. (C) Factor Nod producido por *Burkholderia tuberum* STM678. Figura modificada de Hirsch & Fujishige, 2012.

Los LCOs son responsables de inducir una serie de respuestas y modificaciones en la planta, incluyendo la formación de los nódulos donde se alojarán los bacteroides (Oldroyd, 2013; Hayat *et al.*, 2010). Los factores Nod activan la ruta de señalización que lleva al establecimiento de la simbiosis, dando lugar a oscilaciones de calcio. Estas oscilaciones se dan inicialmente en las células vegetales epidérmicas, pero más tarde también en las células corticales, previo a su colonización. Los rizobios que se encuentran en la superficie de la raíz entran a la planta por un hilo de infección, que se inicia con el enrollamiento de los pelos radicales. Los hilos de infección son invaginaciones invasivas de las células de la planta que permiten la invasión de los rizobios a la raíz. El núcleo de la célula vegetal se reubica, y una alineación de los organelos, conocida como la zona de pre-infección, predice la ruta del hilo de infección. En algunos casos, los rizobios permanecen dentro de

los hilos de infección, pero por lo general, las bacterias se liberan dentro de las células del nódulo. En esta situación, las bacterias pueden diferenciarse en un estado fijador de nitrógeno, conocido como el bacteroide (*Figura 1.5*; Oldroyd, 2013).

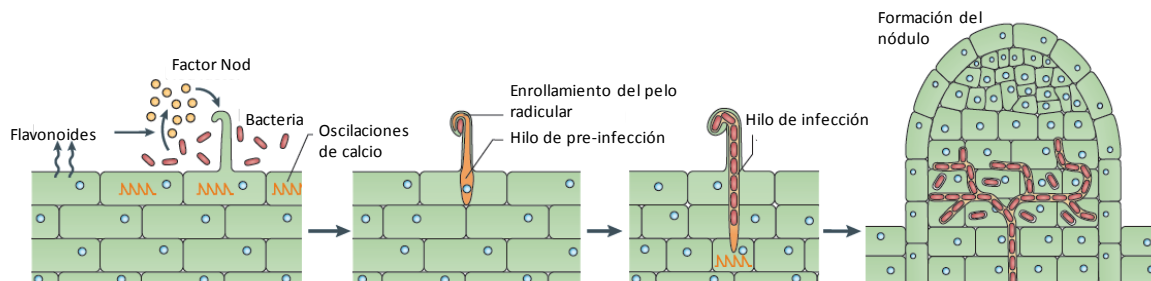


Figura 1.5. Formación del hilo de infección y colonización de las células radicales. Imagen modificada de Oldroyd, 2013.

1.4. Mejoramiento de la simbiosis: co-inoculación con PGPRs

Muchas evidencias científicas demuestran que el uso de una combinación de microorganismos beneficiosos, y que desarrollan diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, tiene un efecto aditivo o sinérgico sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Morel *et al.*, 2016). Nuevas evidencias también apoyan que la adición de metabolitos secundarios microbianos a las bioformulaciones puede aumentar la productividad agrícola mejorando el desempeño de la inoculación (Morel *et al.*, 2015).

Se ha constatado que es posible mejorar el proceso simbiótico rizobio-leguminosa mediante la inoculación combinada (o co-inoculación) con rizobios y otros PGPRs (Morel *et al.*, 2012). Por ejemplo, durante la co-inoculación de alfalfa con *S. meliloti* y *Azospirillum brasilense*, este último incrementa el exudado de los flavonoides producidos por la planta, lo cual redundará en un aumento en la velocidad de nodulación, el número de nódulos por planta y el rendimiento vegetal (Itzigsohn *et al.*, 1993).

Otras PGPRs conocidas por su potencial como co-inoculante son algunas *Pseudomonas* spp. (Marek-Kozaczuk *et al.*, 2000), *Azospirillum* spp. (German *et al.*, 2000; Burdman *et al.*, 1997;

Itzigsohn *et al.*, 1993), *Bacillus* spp. (Camacho *et al.*, 2001) y *Delftia* spp. (Morel *et al.*, 2015; Morel y Castro-Sowinski, 2013; Ubalde *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2011).

1.4.1. *Delftia*

Las bacterias del género *Delftia* son β -Proteobacterias que pertenecen a la familia Comamonadaceae (Wen *et al.*, 1999). Existen cinco especies identificadas: *D. acidovorans* (Wen *et al.*, 1999), *D. tsuruhatensis* (Shigematsu *et al.*, 2003), *D. lacustris* (Jørgensen *et al.*, 2009), *D. litopenaei* (Chen *et al.*, 2012) y *D. deserti* (Li *et al.*, 2015). Entre los distintos aislamientos de *Delftia* spp. se han descrito funciones tan variadas como la capacidad de degradar peptidoglucano (Jørgensen *et al.*, 2009), y PET (tereftalato de polietileno, Shigematsu *et al.*, 2003), o de producir y acumular poli β -hidroxibutirato (Chen *et al.*, 2012).

Varias bacterias de este género son PGPRs, específicamente actuando como promotoras del crecimiento de plantas de arroz (Han *et al.*, 2005), canola (Berg, 2009) y algunas leguminosas (Morel *et al.*, 2015; Ubalde *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2005). Estas bacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en vida libre, producir ácido indol acético (AIA) y sideróforos, y cooperar durante la interacción rizobio-leguminosa promoviendo el establecimiento del proceso simbiótico y el crecimiento vegetal (Morel *et al.*, 2015; Ubalde *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2011).

En particular, el aislamiento *Delftia* sp. JD2 promueve el crecimiento de alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol (*Trifolium repens*) cuando se co-inocula con los rizobios específicos para estas plantas (Morel *et al.*, 2011; Ubalde *et al.*, 2012). Durante la co-inoculación de alfalfa y trébol con rizobios y JD2 se produce un aumento de la tasa de nodulación y producción de biomasa, comparado con la inoculación simple, tanto en ensayos llevados a cabo en condiciones *in vitro* como en invernáculo (Morel *et al.*, 2015; Ubalde *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2011). JD2 produce AIA y sideróforos, y su presencia induce un aumento en la producción de flavonoides por parte de alfalfa, lo cual explicaría la nodulación temprana y el desarrollo de un mayor sistema radical en alfalfa. Por más detalles sobre los mecanismos de comunicación entre los sinorizobios y JD2 con alfalfa ver Morel *et al.* (2015).

Actualmente, existen disponibles en las bases de datos varios genomas de *Delftia*, incluyendo al de la cepa JD2 (Morel *et al.*, 2016) que será objeto de estudio durante esta tesis.

1.4.2. Biofertilizantes y formulaciones mixtas comerciales

Los PGPRs son microorganismos relevantes a nivel agronómico debido a que aumentan la productividad vegetal a nivel de campo, y por consiguiente pueden ser utilizados como biofertilizantes (Ramos Solano, 2000).

Se define como biofertilizantes a aquellos insumos formulados con uno o más microorganismos vivos, que aplicados sobre las semillas, la superficie de las plantas o en el suelo, colonizan la rizósfera y/o el interior de la planta y promueven su crecimiento, por proporcionar o aumentar la disponibilidad de nutrientes primarios para la planta hospedera (Vessey, 2003).

El uso de biofertilizantes a gran escala para implementar sistemas de producción agrícola sustentables tiene grandes beneficios ya que constituye un medio para reducir insumos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos naturales.

Los efectos secundarios del uso de agroquímicos han generado gran preocupación a nivel mundial, por lo que hay un creciente interés en la mejora de las prácticas agrícolas, como lo es el uso de biofertilizantes y la creación de nuevas formulaciones beneficiosas. El estudio y comprensión de cuáles son los efectos de estos productos parece ser de gran importancia tanto a nivel agrícola como ambiental. Estas estrategias pretenden ayudar a las prácticas sostenibles y amigables con el ambiente, fundamentales para la estabilidad y la productividad de los sistemas agrícolas y los ecosistemas naturales (Kennedy & Smith, 1995).

Las PGPR y sus efectos beneficiosos sobre las plantas se explotan comercialmente y constituyen una gran promesa para la agricultura sustentable (Podile & Kishore, 2006). Este tipo de estrategias han sido y continúan siendo hoy investigadas para su aplicación en la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas de maíz, trigo, cebada, colza, soja, hortalizas, etc. (Gray & Smith, 2005).

Existen en el mercado formulaciones mixtas que contienen más de un microorganismo promotor, aunque la mayoría de ellas no se han diseñado para leguminosas (Figueiredo *et al.*, 2008). Uruguay no cuenta con este tipo de formulaciones mixtas comerciales para leguminosas aunque si existen en la región. Nitrasoil Argentina S.A., por ejemplo, produce un inoculante para soja, llamado “Bio-Enhance”, que contiene a *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Esta formulación estimula la producción de señales químicas entre la raíz y las bacterias en la rizósfera (www.nitrasoil.com.ar). Por otro lado, Signum® es un bio-preparado desarrollado por Rizobacter Argentina S.A., diseñado como generador de señales moleculares que activan de manera temprana

procesos metabólicos en las bacterias y las plantas, permitiendo maximizar el desarrollo de las leguminosas (<http://www.rizobacter.com.ar>). Además que explotar a la bacteria *per se*, este último preparado innovador explota a las sustancias que se secretan cuando la bacteria está en contacto con la planta. Los reportes sobre inoculantes a base de bacterias del género *Delftia* se resumen, hasta donde conocemos, solo a BIOBOOST, una marca registrada de LALLEMAND (BRETTYOUNG™, www.brettyoung.ca).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Es posible mejorar algunas de las características asociadas al proceso simbiótico entre los bradyrizobios del inoculante comercial y las plantas de soja, mediante el uso combinado del inoculante y *Delftia* sp. JD2.

Por ello proponemos que la co-inoculación de las semillas de soja con *Delftia* sp. JD2 y *B. elkani* U1301 y U1302 mejora la nodulación y la productividad de las plantas, en relación a la inoculación de semillas solo con *B. elkani* U1301 y U1302. La presencia de algunos metabolitos secundarios en las raíces y parte aérea de la planta explicaría, al menos en parte, el efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de las plantas de soja.

2.2. Objetivo general

Conocer la respuesta de las plantas de soja frente a la co-inoculación con *Bradyrhizobium elkanii* y *Delftia* sp.

2.3. Objetivos específicos

Conocer el efecto de la co-inoculación sobre:

- la cinética de nodulación en condiciones *in vitro*
- la producción de soja en términos de nodulación y peso seco de biomasa (nódulos, raíces y parte aérea) bajo condiciones de invernáculo
- el rendimiento en grano del cultivo de soja bajo condiciones de invernáculo

Analizar el perfil de algunos metabolitos producidos en los diferentes órganos vegetales, así como los cambios en su composición y cantidad.

Correlacionar el estado fisiológico (composición en metabolitos) y el desarrollo de las plantas.

3. CAPÍTULO I

“Efecto de la co-inoculación con *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2 sobre el rendimiento y nodulación del cultivo de soja”

El uso combinado de microorganismos beneficiosos tiene un efecto sinérgico sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Morel *et al.*, 2016). En base a los antecedentes reportados sobre el potencial de *Delftia* sp. JD2 como cepa promotora del crecimiento vegetal, se diseñó una estrategia experimental basada en ensayos de promoción de crecimiento vegetal para determinar los efectos del uso combinado de JD2 y bradyrizobios sobre la productividad de soja (Ver Objetivo General 1). Por un lado, se realizaron ensayos con plantas crecidas *in vitro*, en condiciones controladas de temperatura y luz, y en medio semisólido libre de nitrógeno. Estos ensayos sirvieron para evaluar el efecto de JD2 sobre la nodulación de las plantas en los primeros estadios de desarrollo vegetativo. Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos con plantas crecidas en invernáculo, en un sustrato no estéril y con bajo contenido de nitrógeno. Estos ensayos sirvieron para evaluar el crecimiento vegetal en condiciones más cercanas a las que ocurren naturalmente a campo y en estadios vegetativos y reproductivos de crecimiento. Asimismo, los ensayos de invernáculo permitieron evaluar el efecto de la co-inoculación sobre el rendimiento en granos de las plantas. Los ensayos de promoción del crecimiento y nodulación se describen al detalle a continuación, en la sección de Materiales y métodos.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Cepas bacterianas y material vegetal

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Delftia* sp. JD2 (Morel *et al.*, 2011) y *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302 (Campos *et al.*, 2001; *Tabla 3.1*). Estos últimos forman parte de la formulación comercial nacional LIKUIQ para soja. LIKUIQ es producido y comercializado por la empresa Lage y Cia S.A. (www.lageycia.com) y contiene una concentración inicial de bradyrizobios de 5×10^9 UFC/mL de inoculante según las exigencias del MGAP para su registro (MGAP-DGSA, 2017. *Proteocolo técnico para registro de inoculantes*). La cepa JD2 fue aislada de suelo por nuestro grupo de laboratorio (Morel *et al.*, 2011), la misma se conservó en glicerol al 20% a -80°C hasta su uso.

Tabla 3.1. Denominación y origen de las cepas empleadas

Cepa	Denominación y origen
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301*	SEMIA 587 (Brasil)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1302*	SEMIA 5019; IAC 29W; U-732 (Brasil)
<i>Delftia</i> sp. JD2	Morel <i>et al.</i> , 2011 (Uruguay)

*Formulación comercial: mezcla de *B. elkanii* U1301 y U1302

Como material vegetal se emplearon semillas de soja de la variedad GE 590ci, suministradas por la empresa Lage y Cia S.A. Esta variedad es un cultivar de ciclo largo (ciclo V) de origen argentino (inase.org.uy).

3.1.2. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones *in vitro*

3.1.2.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de soja se lavaron con agua destilada estéril en agitación por 1 min y se incubaron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, durante 15 min y 200 rpm. Luego de repetidos lavados con agua estéril, las semillas se incubaron por 15-20 min en agua estéril para permitir su hidratación. Posteriormente, se dejaron germinar en placas conteniendo agar/agua (0,8%) durante 48 h a 30 °C y oscuridad.

3.1.2.2. Siembra de semillas en condiciones *gnotobióticas*

Las semillas de soja, desinfectadas y germinadas, se sembraron en probetas de vidrio de 500 mL conteniendo 450 ml de solución mineral estéril libre de nitrógeno (Somesagaran & Hoben, 1985) y

agar al 0,8% (Sigma; A 9799, agar con bajo contenido de nitrógeno, específico para el cultivo de plantas), a razón de una semilla por probeta. El diseño del sistema en medio semi-sólido se basó en la metodología empleada por Hungría *et al.* (1994).

3.1.2.3. Inoculación de semillas

Se preparó un pre-inóculo de *Delftia* sp. JD2 transfiriendo 50 µl de la suspensión bacteriana almacenada en glicerol a 5 mL de medio TY (ver Anexo). El pre-inóculo se incubó en agitación (200 rpm) a 30 °C por 24 h.

Para la preparación del inóculo de JD2, se transfirieron 500µL del cultivo fresco de JD2 a un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio TY y se incubó en agitación a 30 °C por 24 h. Las células se colectaron mediante centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm y 4 °C. El *pellet* celular se suspendió en buffer fosfato 50 mM, pH 7, hasta obtener una densidad óptica de 0,005 a 620 nm (aproximadamente 10^7 UFC/mL).

El inóculo de *B. elkanii* se preparó a partir del inoculante comercial LIKUIQ (concentración inicial de 5×10^9 UFC de bradyrizobios/mL de inoculate). Las células se colectaron mediante centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm a 4 °C. El *pellet* celular se suspendió en buffer fosfato 50 mM, pH 7, hasta obtener una densidad óptica de 0,05 a 620 nm (aproximadamente 10^8 UFC/mL).

Los tratamientos realizados de inoculación se detallan en la *Tabla 3.2*. La inoculación se realizó directamente sobre las semillas pre-germinadas. Se inoculó 100 µL de suspensión bacteriana de JD2 (10^7 UFC/mL) por semilla para los tratamientos JD2 y COINO y 100 µL de suspensión bacteriana LIKUIQ (10^8 UFC/mL) por semilla, para los tratamientos RHZ y COINO (*Tabla 3.2*). Las concentraciones bacterianas finales de inoculación fueron del orden de 10^7 UFC inoculadas sobre semilla para *B. elkanii* y 10^6 UFC inoculadas sobre semilla para *Delftia* JD2 (concentración de JD2 óptima para la promoción del crecimiento de alfalfa según Morel *et al.*, 2011). Para el tratamiento control, las semillas recibieron 100 µL de buffer fosfato 50 mM, pH 7.

Las plantas se incubaron durante 30 días en cuarto de plantas a 26 °C, bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La luz se suministró a través de tres tubos “Gro-lux” (Gro-luxTM, Sylvania). Se realizaron tres repeticiones del ensayo en las mismas condiciones con 10 tubos por tratamiento cada ensayo (10 plantas).

Tabla 3.2. Tratamientos ensayados e inoculación de microorganismos sobre semilla en condiciones *in vitro*

Denominación de tratamiento	Microorganismo inoculado	Descripción
control	sin microorganismos	Control negativo: semillas sin inocular
JD2	<i>Delftia</i> sp. JD2	Semilla inoculada con 10^6 UFC de JD2
RHZ	<i>B. elkanii</i> U1301 - U1302	Control positivo: semilla inoculada con 10^7 UFC de bradyrizobios (Inoculante comercial)
COINO	<i>B. elkanii</i> U1301- U1302 + <i>Delftia</i> JD2	Semilla inoculada con 10^7 UFC de bradyrizobios + 10^6 UFC de JD2

3.1.2.4. Cinética de nodulación

Se realizaron recuentos diarios de nódulos en raíz principal y en raíces secundarias durante los 30 días. Con la información obtenida se realizaron curvas de nodulación (número de nódulos por planta en función de los días post-inoculación).

3.1.2.5. Producción de biomasa aérea y radical

Al final del período de evaluación se separó la parte aérea (tallos y hojas) de la radical y se registró la longitud de parte aérea en cm. Luego se secó la parte aérea a 60 °C hasta peso constante y se determinó el peso seco aéreo por planta.

3.1.3. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones de invernáculo. Diseño experimental

3.1.3.1. Preparación de macetas, desinfección y siembra de semillas

Los ensayos en invernáculo se realizaron con un diseño completamente al azar, con 50 plantas por tratamiento. Se utilizaron macetas de plástico conteniendo 5 Kg de sustrato para las plantas que se analizarían en los estadios vegetativos y reproductivos, y 8 Kg de sustrato para las plantas que alcanzarían la madurez fisiológica. El sustrato consistió en una mezcla de tierra:arena:vermiculita en una proporción 2:2:1. Se empleó tierra negra con bajo contenido de nitrógeno (10 ppm,

determinado por el Laboratorio de análisis de suelo CampoLab), arena de río y vermiculita de grano fino.

Las semillas se desinfectaron como se describió en el punto 3.1.2.1. Se sembraron tres semillas desinfectadas por maceta, directamente en el sustrato, y a una profundidad de 2 cm de la superficie.

3.1.3.2. Inoculación y condiciones de crecimiento

Las semillas se inocularon de la misma forma que se describió en el punto 3.1.2.3 y se realizaron los mismos tratamientos descriptos en la *Tabla 3.2*.

A los 10 días desde la siembra se realizó un raleo. Se seleccionó una de las tres plántulas en base al estado fisiológico aparente y el mejor establecimiento de la planta, y se descartó el resto. Las plantas crecieron en condiciones de invernáculo, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad controlado utilizando tubos “Gro-lux” (Gro-lux™, Sylvania). La temperatura osciló entre 10-30 °C a lo largo del cultivo. Durante el ciclo del cultivo, las plantas se regaron cada tres días y de forma alternada con aproximadamente 250 mL (capacidad de campo) de medio Jensen (ver Anexo) diluido al décimo, solución de hiperfosfato (1g/L), y agua corriente. El ensayo se realizó por completo tres veces.

3.1.3.3. Toma de muestras

Las plantas se cosecharon en tres estadios de desarrollo: V4, o de cuarto nudo, aproximadamente a los 30 días post-siembra; R2, o floración completa, aproximadamente 80 días post siembra y; MF, o madurez fisiológica, a los 180 días post-siembra, aproximadamente. En los dos primeros estadios de muestreo se tomaron 10 plantas por cada tratamiento para la determinación de producción de biomasa seca. En el estadio MF se tomaron 10 plantas por tratamiento, para cuantificar el rendimiento en grano.

3.1.3.4. Determinación de biomasa seca y nodulación

Al momento de la cosecha se cortó la parte aérea de las plantas y se determinó la longitud del tallo principal en cm. Posteriormente, se determinó el peso fresco y el peso seco en g tanto de la parte aérea como de la parte radical. Para determinar la biomasa seca las plantas se secaron a 60 °C hasta peso constante.

En las plantas que recibieron inoculación con los bradyrizobios, los nódulos se separaron de la raíz y se clasificaron y contaron como nódulos de raíz principal (NP) o de raíces secundarias (NS). Luego se secaron para determinar su peso seco.

Cuando las plantas alcanzaron la MF, se determinó el rendimiento en grano. Se determinó el peso seco de la parte aérea, así como el número, peso y largo de vainas, y el número y peso de granos. Se determinó además el índice de cosecha (IC) como la relación entre el rendimiento del producto que se cosecha (granos) y la biomasa aérea total (parte aérea total incluyendo los granos) según describi Koester *et al.* (2014).

3.1.4. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis estadístico univariado (ANOVA) en algunos casos con p -valor $< 0,1$ y p -valor $< 0,05$ en otros, según como se indica en cada caso. En caso de obtener diferencias significativas, los tratamientos se compararon empleando el test de Tukey. En aquellos casos en que el conjunto de datos no mostraron distribución normal u homogeneidad de varianza, se aplicaron pruebas no paramétricas a los datos (Kruskal Wallis). Se utilizó el paquete estadístico PAST software versión 1.56 (Hammer *et al.*, 2001).

3.2. Resultados

3.2.1. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones *in vitro*

El inicio de la nodulación de las plantas inoculadas con bradyrizobios en los ensayos *in vitro* se registró entre los días 7 y 11 luego de la inoculación. Las tres repeticiones del ensayo *in vitro* mostraron una cinética con la misma tendencia. Por lo tanto, a continuación se muestran los resultados de uno de los ensayos. En la *Figura 3.1* se muestra el sistema diseñado para el desarrollo de los ensayos *in vitro*, así como la apariencia de las plantas que se desarrollan en este sistema.

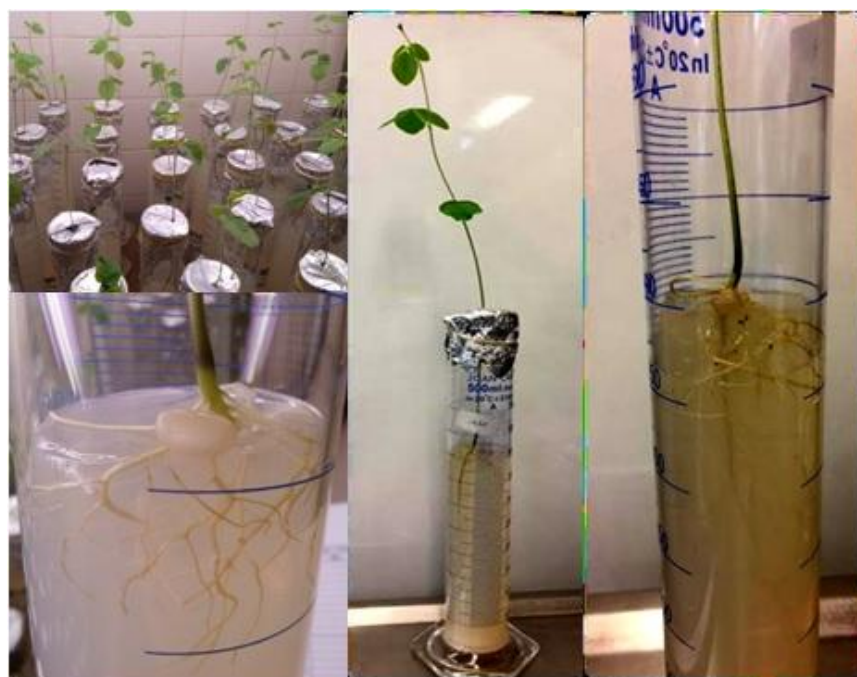


Figura 3.1. Plantas de soja crecidas en condiciones *in vitro* en medio mineral (Somesagaran & Hoben, 1985) estéril, libre de nitrógeno. Temperatura: 26°C. Fotoperíodo: 16/8 luz/oscuridad.

3.2.1.1. Cinética de nodulación

Los primeros nódulos se observaron a los 7 días de la inoculación de las plantas, tanto para los tratamientos RHZ, como COINO, mientras que en los tratamientos control y JD2 no se observó nodulación, tal como era esperado. El número de nódulos totales por planta fue mayor en las plantas co-inoculadas, desde el inicio de la nodulación hasta el momento de la cosecha, comparado con las plantas que recibieron inoculación simple (*Figura 3.2*). Es importante resaltar que el comienzo de la nodulación se observó entre los días 7 y 11 post inoculación, dependiendo de la repetición del ensayo. En la *Figura 3.2* se muestra la cinética de nodulación.

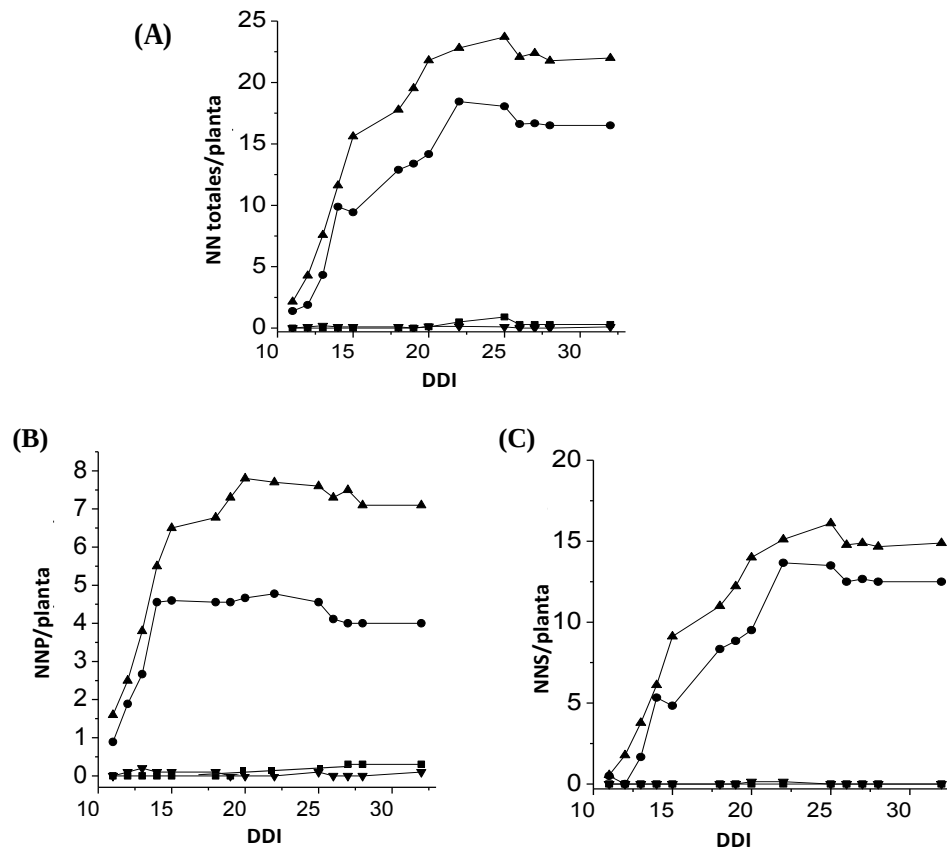


Figura 3.2. Cinética de nodulación de plantas crecidas en condiciones *in vitro*. Plantas de soja inoculadas sólo con los bradyrizobios del inoculante comercial (●, RHZ) y plantas co-inoculadas con los bradyrizobios del inoculante comercial y *Delftia* sp. JD2 (▲, COINO). Como controles se utilizaron plantas inoculadas solo con *Delftia* sp. JD2 (▼, JD2) y plantas sin inocular tratadas con buffer fosfato de sodio 50mM pH 7 (○, control). (A) Número de nódulos totales por planta (NN totales/planta); (B) Número de nódulos en raíz principal por planta (NNP/planta); (C) Número de nódulos en raíces secundarias por planta (NNS/planta). DDI (días después de la inoculación)

A los 20 días de la inoculación se encontró que el número de nódulos en la raíz principal se duplicó en plantas del tratamiento COINO, comparado con plantas del tratamiento RHZ. Mientras que el número de nódulos en raíz principal de las plantas del tratamiento RHZ se mantuvo constante a partir de los 15 días de inoculación, el número de nódulos en las plantas COINO se mantuvo constante a partir de los 20 días de la co-inoculación (Figura 3.2 B).

Esta desaceleración en la velocidad de nodulación se explicaría por el equilibrio costo/beneficio de la FBN que la planta establece. Si bien la FBN en los nódulos es beneficiosa para la planta, le insume un alto costo energético. Está claro que por ello la planta regula cuidadosamente este proceso y lo hace a múltiples niveles. Uno de ellos es a través de la regulación del número de nódulos (Ding & Oldrayd, 2009).

El aumento del número de nódulos por raíz en plantas co-inoculadas con JD2 y los bradyrizobios podría explicarse por la acción de las auxinas, principalmente por el AIA producido por la *Delftia*. Cabe destacar que la aplicación de niveles bajos de auxinas promueve la nodulación, mientras que altos niveles la inhibirían, sugiriendo que existe una concentración óptima de auxina para estimular este proceso (Glick, 2012). En este entendido, JD2 podría mejorar la nodulación a través de la secreción de bajos y adecuados niveles de AIA.

A diferencia de lo observado con el número de nódulos en raíz principal, la diferencia en el número de nódulos en raíces secundarias fue menor entre los tratamientos RHZ y COINO. Igualmente, las plantas del tratamiento COINO alcanzaron un número de nódulos mayor a partir del día 13, llegando a 16 nódulos por planta al momento de la cosecha (*Figura 3.2 C*).

Los resultados obtenidos muestran que la nodulación mejoró cuando las plantas de soja se co-inoculaban con *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2, en comparación con la inoculación simple. Esta mejora en la nodulación, debido a la co-inoculación con *Delftia* JD2 y *S. meliloti*, ya había sido reportada para plantas de alfalfa y trébol (Morel *et al.*, 2011; Ubalde *et al.*, 2012). En conjunto, los resultados sugieren que existe un efecto positivo de la co-inoculación con JD2 sobre las asociaciones rizobio-leguminosa.

3.2.1.2. Producción de biomasa seca aérea

Se observó un incremento del 54% en la longitud de la parte aérea en las plantas co-inoculadas en relación a la inoculación simple (*Tabla 3.3*). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la longitud de la parte aérea de los tratamientos COINO y JD2, con respecto a las plantas del tratamiento control (*Tabla 3.3*).

El peso seco de la parte aérea de las plantas del tratamiento COINO también se incrementó un 54% con respecto a las plantas del tratamiento RHZ (*Tabla 3.3*). A pesar del mayor valor medio, el peso seco de la parte aérea en plantas COINO y el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas.

Tabla 3.3. Producción de biomasa aérea en condiciones *in vitro*.

Tratamiento	Longitud de PA	PS de PA
Control	52 ± 7,7 (a)	204 ± 37 (a)
JD2	48 ± 3,5 (ab)	179 ± 31 (ab)
RHZ	37 ± 14 (b)	151 ± 51 (b)
COINO	57 ± 6,0 (a)	232 ± 40 (ab)

Longitud de parte aérea (PA) por planta en cm. Peso seco (PS) de parte aérea por planta en mg. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,1$). Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

La producción de biomasa aérea se relaciona proporcionalmente con la tasa de crecimiento ya que ambos parámetros dependen de la capacidad de la captación de luz y por tanto con la capacidad fotosintética, así como también con la FBN (Pérez - Amaro *et al.*, 2004; Salvagiotti *et al.*, 2008). La mayor producción vegetal en plantas co-inoculadas (Tabla 3.3) estaría en concordancia con los resultados en términos de la velocidad de nodulación. Los nódulos de la raíz principal se consideran los más eficientes en términos de fijación de nitrógeno, lo que se relacionaría con la mayor longitud y peso seco de parte aérea de las plantas co-inoculadas.

A medida que la cantidad de nitrógeno fijado aumenta, existe un mayor número de aminoácidos disponibles para la síntesis de proteínas, contribuyendo así al crecimiento y desarrollo de la planta, incrementando entre otros factores, la superficie de la planta con función fotosintética (Hernández, 2002). Según los parámetros analizados al momento, la información indica que las plantas del tratamiento COINO presentan una mayor producción de biomasa que las plantas del tratamiento RHZ.

3.2.2. Ensayo de promoción de crecimiento de soja en condiciones de invernáculo

Con el fin de determinar el efecto de la co-inoculación *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2 sobre la producción de biomasa seca y rendimiento de plantas de soja, se llevaron a cabo ensayos en condiciones de invernáculo como una aproximación a las condiciones ambientales naturales en las que se desarrolla el cultivo de soja en el campo.

3.2.2.1. Producción de biomasa y nodulación

Estadio V4

Aproximadamente a los 30 días desde la inoculación, las plantas alcanzaron el estadio de cuarto nudo (V4) en las tres repeticiones ensayadas. En este estadio las únicas plantas que presentaron nódulos fueron las plantas co-inoculadas, sugiriendo una nodulación temprana. Estas plantas sólo presentaron nódulos en las raíces secundarias (*Figura 3.4 B*). Los nódulos fueron muy pequeños y difíciles de extraer desde la raíz, por ello, para este estadio no se realizaron estudios de parámetros de nodulación, y solo se registró la nodulación temprana. En la *Figura 3.4* se muestra el aspecto de las plantas en estadio V4.

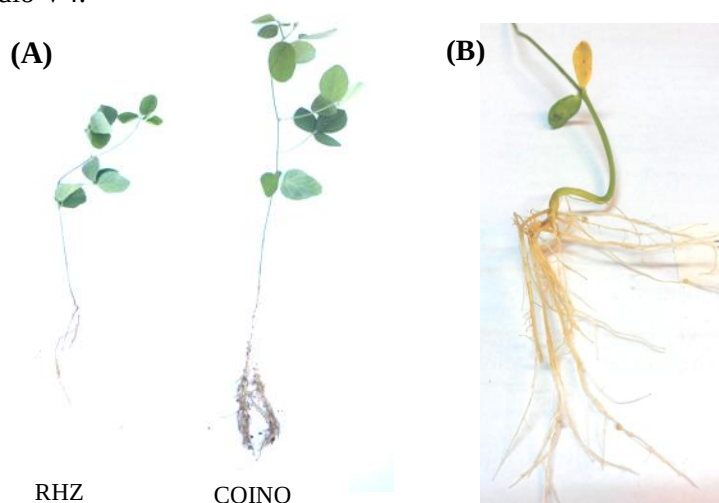


Figura 3.4. Aspecto de las plantas en estadio V4 (30 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo. **(A)** Aspectos de plantas correspondientes al tratamiento RHZ y COINO. **(B)** Parte radical de plantas del tratamiento COINO.

Las plantas del tratamiento COINO alcanzaron un largo de la parte aérea un 35% mayor que las plantas del tratamiento RHZ sugiriendo un efecto positivo de la co-inoculación en este parámetro del crecimiento vegetal (*Tabla 3.4*). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la longitud de la parte aérea entre las plantas COINO y control. Asimismo, y a pesar de observarse en el tratamiento COINO un 18% de aumento en el peso seco de la parte aérea respecto al tratamiento RHZ, tampoco existieron diferencias significativas entre tratamientos (*Tabla 3.4*).

Tabla 3.4. Variables de producción de biomasa de plantas en estadio V4 (30 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.

Tratamiento	Longitud de PA	PS de PA	PS de PR
Control	34 ± 5 (ab)	675 ± 91 (a)	196 ± 37 (bc)
JD2	30 ± 4 (bc)	690 ± 107 (a)	206 ± 40 (ab)
RHZ	26 ± 3 (c)	657 ± 130 (a)	143 ± 45 (c)
COINO	35 ± 3 (a)	773 ± 183 (a)	257 ± 39 (a)

Longitud de parte aérea (PA) en cm. Peso seco (PS) de parte aérea (PA) en mg. Peso seco de parte radical (PR) en mg. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,1$). Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

Se observó un efecto positivo de la co-inoculación en otros parámetros relacionados con la producción vegetal. La biomasa seca radical fue significativamente mayor (79%) para plantas del tratamiento COINO con respecto al RHZ (Tabla 3.4). La inoculación simple con JD2 no aumentó el peso seco de la parte aérea pero si aumentó significativamente el peso seco de las raíces en un 45% en comparación a la inoculación con bradyrizobios, lo que sugiere un efecto directo de JD2 sobre las raíces de soja. Este comportamiento de *Delftia* sp. JD2 sobre las raíces ya había sido demostrado en plantas de alfalfa (Morel *et al.*, 2015). La producción de AIA por parte de JD2 justificaría este resultado. El AIA induce el aumento del volumen radical de la planta, incrementando así la superficie de absorción de nutrientes.

Al igual que los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* (ver Tabla 3.3), los parámetros analizados en el tratamiento control fueron mayores o similares a los del tratamiento RHZ. Esto podría explicarse por el gasto energético que las plantas inoculadas estarían realizando para establecer los nódulos y que aparentemente estaría retrasando su desarrollo. Este fenómeno podría explicarse porque durante al inicio del proceso simbiótico las plantas del tratamiento RHZ requeriría más energía de la planta huésped (utilizada en el establecimiento del nódulo), y la fijación de nitrógeno suele ser débil durante este período para plantas de soja en estas condiciones (Yuan *et al.*, 2017).

Estadio R2

Las plantas llegaron al estadio reproductivo de floración (R2) a los 100 días de la inoculación (Figura 3.5). Para el estudio del efecto de la co-inoculación sobre el crecimiento de soja en R2 se midieron las mismas variables que para el estadio V4.



Figura 3.5. Plantas de soja al inicio de la floración, estadio reproductivo R2 (100 días después de la inoculación) en crecidas en condiciones de invernáculo.

Durante la floración sólo se detectaron diferencias significativas en la longitud de parte aérea entre los tratamientos control y COINO. Los valores medios en la longitud de la parte aérea de las plantas co-inoculadas fueron 16% mayores respecto a las plantas inoculadas con bradyrizobios (Tabla 3.4.).

Tabla 3.4. Variables de producción de biomasa de plantas en estadio R2 (100 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo.

Tratamientos	Longitud de PA	PS de PA	PS de PR
Control	39 ± 11 (b)	4294 ± 860 (b)	1764 ± 662 (a)
JD2	40 ± 10 (ab)	4586 ± 490 (b)	2002 ± 453 (a)
RHZ	44 ± 7 (ab)	5772 ± 1020 (a)	1917 ± 619 (a)
COINO	51 ± 8 (a)	5997 ± 690 (a)	1714 ± 842 (a)

Longitud de parte aérea (PA) en cm. Peso seco (PS) de parte aérea (PA) en mg. Peso seco de parte radical (PR) en mg. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,1$). Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

Por otra parte, tampoco se detectaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea ni de parte radical entre los tratamientos, aunque se detectó un incremento del 4% del peso seco de la parte aérea en las plantas co-inoculadas, con respecto a las plantas del tratamiento RHZ (Tabla 3.4).

Durante este estadio se detectaron nódulos en todas aquellas plantas inoculadas con bradyrizobios, tanto para el tratamiento COINO como para RHZ (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Número y peso seco de nódulos expresados en mg de plantas en estadio R2 (100 días después de la inoculación) crecidas en condiciones de invernáculo.

Tratamiento	NNP/planta	PS NP/planta	NNS/planta	PS NS/planta
RHZ	10 (a)	27,0 (b)	74 (a)	236 (a)
COINO	5 (b)	46,3 (a)	53 (b)	246 (a)

NNP: número de nódulos en raíz principal. PSNP: peso seco de nódulos de raíz principal. NNS: número de nódulos en raíces secundarias. PSNS: peso seco de nódulos en raíces secundarias. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,1$). RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

Al ser la simbiosis un fenómeno tan complejo, la nodulación de las leguminosas se encuentra influenciada por un gran número de factores ambientales, así como también por los factores genéticos propios de ambos simbioses, entre otros (Ferguson *et al.*, 2010). En las leguminosas anuales, como la soja, la tasa de FBN varía a lo largo del ciclo del cultivo. En los estadios vegetativos la FBN es muy baja, momento en el cual son más importantes los aportes de nitrógeno desde el suelo. No obstante, es la etapa mas crítica para la formación de nódulos (Yuan *et al.*, 2017). Los nódulos comienzan a fijar nitrógeno cuando se expresa la leghemoglobina, y esta actividad aumenta gradualmente hasta obtener la mayor tasa de FBN en el comienzo de las etapas reproductivas (floración y fructificación), coincidiendo con el momento de mayor demanda de nitrógeno por parte de la planta (Yuan *et al.*, 2017).

A pesar de que el número de nódulos en la raíz principal y en las raíces secundarias, fue menor en plantas co-inoculadas, los nódulos fueron de significativamente mas pesados que los encontrados en el tratamiento RHZ. Esta diferencia se reflejó en el peso seco tanto de los nódulos en raíz principal como en raíces secundaris. (Tabla 3.5).

Estadio MF

A los 180 días de inoculación las plantas alcanzaron el estadio de madurez fisiológica completa. En la *Figura 3.9* se puede observar el aspecto de las plantas al momento de la cosecha en el estadio de MF.

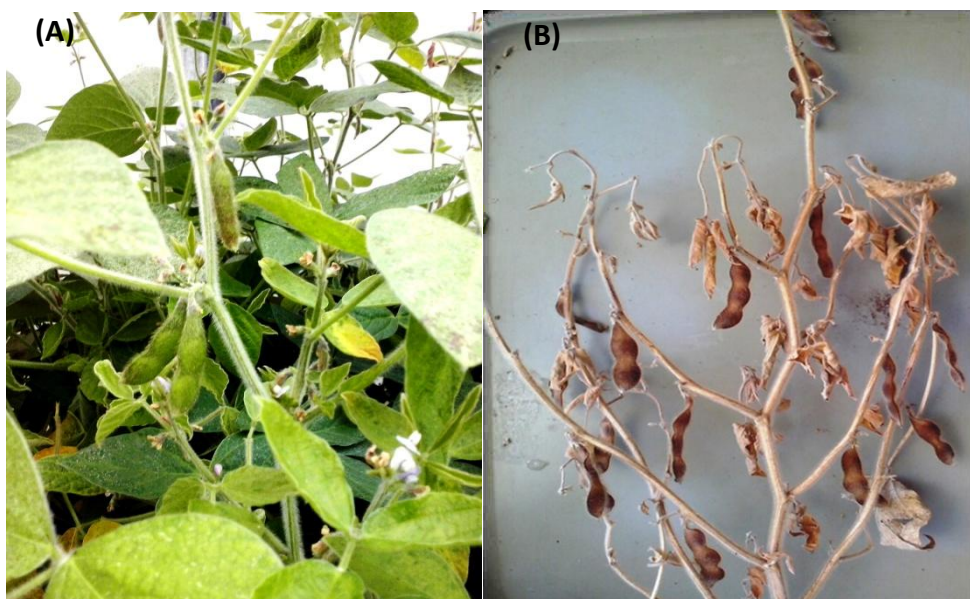


Figura 3.9. Plantas en estadio de madurez fisiológica (MF, 180 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo. **(A)** Inicio del estadio de fructificación. **(B)** Etapa de cosecha; las plantas se encuentran en proceso de senescencia.

El período de senescencia es el último estadio en el desarrollo de la planta, caracterizado por el la desintegración celular, que finaliza con la muerte de células, tejidos y órganos. Luego del estadio reproductivo R5, la tasa de FBN disminuye hasta hacerse totalmente nula justo antes de la madurez fisiológica (MF). Este fenómeno ocurre porque la planta destina gran cantidad de esqueletos carbonados (fuente de energía para los rizobios) a la producción de granos. La tasa de FBN se debilita gradualmente desde el momento que la planta arriba a la etapa de formación de vainas, y en la etapa de cosecha, los nódulos senescen y son casi incapaces de fijar nitrógeno (Yuan *et al.*, 2017). Esto justifica la apariencia de los nódulos en todas las plantas inoculadas con bradyrizobios al momento de la cosecha. En el estadio de MF las raíces se observaron completamente desintegradas y los nódulos tenían una apariencia vacía.

Por lo anteriormente expuesto, en el estadio de MF, sólo se realizaron determinaciones en la parte aérea. El rendimiento del cultivo se determinó como el rendimiento en grano (tamaño y producción) que es el parámetro de importancia desde el punto de vista agronómico (*Figura 3.10*).



Figura 3.10. Vainas obtenidas a los 180 días luego de la siembra de plantas crecidas en condiciones de invernáculo. Las fotos son ilustrativas y no se muestran en la misma escala de tamaño.

Al momento de la cosecha no se observaron diferencias significativas en el número de granos por planta, en el número de grano por vaina, ni el tamaño de las vainas (*Tabla 3.6*). En base al peso fresco de los granos por planta y al peso total de las plantas, se calculó el índice de cosecha, detectándose en sus valores diferencias significativas (*Tabla 3.6*).

Los resultados muestran que el índice de cosecha aumentó un 47% en plantas del tratamiento COINO respecto a las plantas bajo inoculación simple (*Tabla 3.6*) sugiriendo el efecto positivo de la co-inoculación en el parámetro productivo de mayor relevancia en los cultivos de soja.

Por otro lado, las plantas inoculadas con JD2 mostraron mayores valores de rendimiento en grano que las plantas RHZ (*Tabla 3.6*), sugiriendo que en las condiciones analizadas la inoculación simple con JD2 tendría un efecto positivo en el rendimiento en grano, cuando se lo compara con la inoculación con los bradyrizobios del inoculante comercial.

Tabla 3.6. Parámetros estimados en plantas en estadio MF (180 días después de la siembra). El Índice de cosecha (IC) se calcula como la relación entre el peso fresco (PF) de los granos y el PF de la biomasa aérea.

Tratamiento	Número de granos/planta	Número de grano/vaina	Largo de vaina (cm)	PF de grano/planta (g)	PF de biomasa aérea/planta (g)	IC
CONTROL	15 (a)	2.35 (a)	3.60 (a)	0.570 (b)	13.57 (a)	0.042 (c)
JD2	18 (a)	2.21 (a)	3.72 (a)	0.563 (b)	9.937 (a)	0.057 (b)
RHZ	13 (a)	2.15 (a)	3.62 (a)	0.605 (b)	12.93 (a)	0.047 (c)
COINO	12 (a)	2.17 (a)	3.67 (a)	0.795 (a)	11.57 (a)	0.069 (a)

Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. Diferentes letras entre paréntesis indican diferencias significativas entre tratamientos para cada columna ($p < 0,05$).

El efecto de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno, así como el efecto sinérgico de la co-inoculación con rizobios y *Delftia* JD2 están ya confirmados y reportados en leguminosas diferentes a la soja (Morel *et al.*, 2015; Morel *et al.*, 2012; Ubalde *et al.*, 2012). En experimentos de inoculación realizados en trébol se demostró que la inoculación solo con aislamientos de *Delftia* spp. aumenta significativamente la biomasa vegetal, hasta valores similares a los obtenidos cuando se inocula con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* U204 (Ubalde *et al.*, 2012). También se ha reportado que JD2 puede funcionar como una bacteria colaboradora (o “helper”) de los rizobios durante la co-inoculación de alfalfa y trébol en condiciones gnotobióticas, mejorando así la producción de biomasa de las plantas (Morel *et al.*, 2015; Ubalde *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2011).

Según los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* y en invernáculo, la co-inoculación con *B. elkanii* U301 y U1302 y *Delftia* JD2 podría ofrecer mayores ventajas en términos de nodulación, que el inoculante comercial tradicional, lo que se traduciría más tarde en una mayor producción de grano.

4. CAPÍTULO II

“Estudio de la respuesta de la planta de soja a la co-inoculación con *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2, mediante una aproximación metabolómica”

El objetivo de este capítulo pretende comprender el intercambio de señales, o comunicación entre los microorganismos y las plantas. Este es un proceso complejo que involucra cambios drásticos tanto en el metabolismo de las bacterias como de las células vegetales. Entre otros cambios, durante la FBN, el metabolismo vegetal debe cambiar para proporcionar a los rizobios fuentes de carbono, generar poder reductor para la síntesis de ATP y responder a la provisión de nitrógeno fijado por el simbiote.

Para comprender este proceso es importante conocer los compuestos implicados en el reconocimiento microorganismo-planta, el metabolismo del carbono y del nitrógeno de ambas partes, las respuestas de defensa de la planta, el intercambio de nutrientes y la transducción de señales. Resulta importante entonces conocer el perfil de metabolitos producidos por los microorganismos y la planta frente a la infección microbiana.

Entre los enfoques “ómicos”, la metabolómica ofrece una visión completa de los metabolitos que participan en diferentes eventos celulares, lo que representa el estado fisiológico absoluto de una célula u organismo (Kumar *et al.*, 2017). El análisis metabolómico involucra la identificación y cuantificación de metabolitos de bajo peso molecular en un organismo, en una etapa del desarrollo particular de un órgano, tejido o célula específica, conectando así la actividad bioquímica celular con el fenotipo del organismo en ese momento dado (Pandey *et al.*, 2016).

Las herramientas más utilizadas para el estudio metabolómico son la resonancia magnética nuclear (RMN) y las espectrometría de masa (MS) (Sumner *et al.*, 2003). La RMN es un método no destructivo ampliamente utilizado para identificar metabolitos con un peso molecular menor a 50 kDa (Winning *et al.*, 2009). Sin embargo, la escasa sensibilidad de esta técnica plantea una limitación importante. A diferencia de la RMN, la mayor sensibilidad de la MS permite su uso más extenso (Glinski *et al.*, 2006). La combinación de varias técnicas analíticas que generalmente consisten en métodos de separación acoplados a MS, permite obtener una amplia cobertura de la

variedad de metabolitos que produce un organismo (Arbona *et al.*, 2013). Los métodos de separación aplicados generalmente son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC).

Sin ahondar en las diferencias entre estos métodos, la GC-MS permite la identificación y cuantificación de un gran número de metabolitos termo estables (Doerfler *et al.*, 2013; Halket *et al.*, 2005), mientras que la LC-MS permite detectar un rango más amplio de metabolitos, sobretodo no-volátiles y/o termolábiles (Doerfler *et al.*, 2013). Otras técnicas incluyen el análisis de inyección de flujo acoplado a MS (FIA / MS) y la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR; Johnson *et al.*, 2004). Ninguna metodología analítica es ideal para la identificación de todos los metabolitos de una muestra. En su lugar, es necesaria la combinación de varias técnicas para analizar la mayoría de los metabolitos, basándose en sus diferentes polaridades, peso molecular, volatilidad, termoestabilidad, concentración esperada, entre otras características.

La elección de la técnica de GC-MS se basó en que ésta es una técnica microanalítica robusta, y por la existencia de bibliotecas comerciales, o bases de datos disponibles, basadas en los espectros de masa obtenidos por GC-MS de numerosos compuestos, y que permiten la rápida identificación de compuestos. El cromatógrafo de gases separa moléculas presentes en mezclas complejas en una serie de compuestos que posteriormente se ionizan, fragmentan, detectan e identifican de forma inequívoca mediante un MS. El detector MS es el más empleado hoy en día, gracias a su sensibilidad, operatividad y, sobre todo, al gran volumen de información estructural que puede proporcionar (Stashenko *et al.*, 2006). El impacto electrónico (IE) es la técnica de ionización comúnmente empleada en MS. Consiste en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de un alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad. La ionización de los analitos genera que cada metabolito se fragmente en uno o más iones de masa precisa y estos iones pueden servir como *etiqueta* para identificar ese metabolito (Desbrosses *et al.*, 2005). Los fragmentos de masa que pertenecen a un compuesto tienen el mismo tiempo de retención en la columna cromatográfica y están presentes en una abundancia relativa fija, independientemente de la concentración de los metabolitos. Por lo tanto, cualquier fragmento o conjunto de fragmentos con idénticos tiempos de retención pueden utilizarse para la cuantificación del analito. Por regla general, la elección de fragmentos de masa con fines cuantitativos debe ser selectiva, es decir, sólo pueden usarse los fragmentos que son exclusivos de un compuesto. Los fragmentos de masa que son comunes a los compuestos de co-elución (fragmentos con tiempos de retención similares e idéntica relación masa – carga; m/z) deben evitarse para fines de cuantificación.

Los aspectos prácticos relacionados con cuántos componentes están presentes en una mezcla y cuántos de ellos pueden ser detectados, depende de varios factores, entre ellos, del método de extracción utilizado, las impurezas presentes y la concentración de la muestra, los sistemas cromatográficos y sus elementos (volumen y modo de inyección, tipo y dimensiones de la columna, sistemas de detección), entre otros (Stashenko *et al.*, 2006). Existen dos modos de inyección en GC, el modo *split* y el modo *splitless*. El primero divide la muestra inyectada antes de ser dirigida hacia la columna, mientras que en el segundo la totalidad de la muestra inyectada llega a la columna. La división de la muestra con la inyección *split* da lugar a que los límites de detección disminuyan considerablemente debido a que las cantidades de analito que se separan y detectan son más pequeñas, lo cual es una desventaja a la hora de realizar análisis de compuestos trazas o analitos en concentraciones muy bajas (Grob, 2003). Luego de analizar ambos modos de inyección de muestras, durante esta tesis se decidió emplear la inyección *splitless* debido a que se buscaba detectar analitos presentes en bajas concentraciones en raíces y nódulos.

El objetivo a cumplir durante el desarrollo de este capítulo se centró en el estudio del perfil de metabolitos producidos por la planta en respuesta a la co-inoculación bacteriana. Se analizaron los metabolitos extraídos de raíces y nódulos de soja mediante métodos espectrofotométricos y cromatográficos. Se cuantificó la producción de pigmentos fotosintéticos y se identificó la producción de flavonoides así como otros compuestos orgánicos de bajo peso relevantes en el metabolismo de la planta.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Se colectaron 250 mg de hojas frescas de plantas crecidas en condiciones de invernáculo hasta los estadios V4 y R2 (ver Capítulo I, punto 3.1.3) y se realizó a partir de ellas una extracción orgánica de pigmentos en 12,5 mL de acetona al 80%, en condiciones de baja luminosidad y temperatura. Para ello, se maceró el tejido vegetal con acetona al 80% en mortero sobre cama de hielo, hasta obtener un macerado homogéneo. Posteriormente, el macerado se centrifugó a 10000 rpm por 3 min a 4 °C, y se colectó el sobrenadante. Se determinó en el mismo, el contenido de clorofila *a* y *b* y de carotenoides totales, mediante espectrofotometría a 663, 647 y 470 nm, respectivamente (Pompelli *et al*, 2012). Debido a que el espectro de absorción de ambas clorofilas se superponen, se utilizaron las ecuaciones de Arnon (Arnon, 1949) modificadas por Pompelli *et al*. (2013) para determinar la cantidad de pigmentos:

$$\text{Clorofila } a = (12.25 * A_{663}) - (2.79 * A_{647})$$

$$\text{Clorofila } b = (21.50 * A_{647}) - (5.10 * A_{663})$$

$$\text{Carotenoides totales} = [(1000 * A_{470}) - (1.82 * \text{Clorofila } a) - (85.02 * \text{Clorofila } b)]$$

Los contenidos se expresaron en mg de pigmento/g de material vegetal.

4.1.2. Extracción de compuestos de bajo peso molecular (CBPM)

Se colectaron hojas, raíces y nódulos de plantas en los estadios V4 y R2 y se liofilizaron en tubos Falcon de 50 mL por 5 días empleando un equipo BW-18B Freeze Dryer. El total de cada muestra liofilizada se molió en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener una muestra homogénea y totalmente desintegrada. Se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Se realizaron tres extracciones de compuestos de bajo peso molecular, empleando diferentes solventes orgánicos según el tipo de compuesto que se quería detectar.

4.1.2.1. Extracción de flavonoides en metanol

Para la extracción de compuestos fenólicos se mezclaron 30 mg de raíces liofilizadas con 1,5 mL de metanol al 90%. Se incubó la mezcla por 15 min a 60 °C y luego se centrifugó por 15 min a 3000 g. Se colectó el sobrenadante y se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador *speed vac*[®] (Juge *et al.*, 2012). El residuo seco se suspendió en 600 µL de dimetilformamida (DMFA), se filtró con membrana de poro de 0,45 µm y se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis por GC-MS.

4.1.2.2. Extracción de aminoácidos y carbohidratos en metanol:cloroformo:agua

Para la determinación del contenido de aminoácidos y carbohidratos en hojas y nódulos se realizó una extracción con metanol: cloroformo: agua (12:5:3, v/v/v), según recomiendan Juge *et al.*, 2012. Se partió de 60 mg de nódulos liofilizados y 50 mg de hojas liofilizadas que se suspendieron en un volumen total de 1500 µL de la mezcla de solventes de extracción. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65 °C por 30 min para detener la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Luego de una centrifugación a 1500 g por 10 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante al cual se le adicionó 0,25 mL de agua miliQ. Para conseguir una separación de fases, se centrifugó por 3 min a 21000 g y se colectó la fase acuosa. Posteriormente, se colectó la fase acuosa y se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador *speed vac*[®]. El residuo obtenido se suspendió en 600 µL de DMFA, se filtró con membrana de poro de 0,45 µm y se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis por GC-MS.

4.1.2.3 Extracción de otros CBPM en acetona:etanol

Para la extracción de CBPM, 250 mg de raíces liofilizadas se mezclaron con tres volúmenes de acetona-etanol (1:1). Se mantuvo la mezcla en frío (-20 °C) por 24 h con el fin de precipitar las proteínas y los azúcares (Serandour *et al.*, 2008). Luego de una centrifugación (15000 g, 4 °C, 15 min), se obtuvo el sobrenadante que se concentró por evaporación a baja presión en un concentrador *speed vac*[®]. A continuación, los residuos secos se suspendieron en 600 µL de DMFA, se filtraron con membrana de poro 0,45 µm y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.1.3. Análisis por GC-MS

4.1.3.1. Derivatización de metabolitos

Los diferentes extractos disueltos en DMFA se derivatizaron mediante un proceso de sililación (volatilización) utilizando una mezcla de 50 μ L de extracto y 50 μ L de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA, 15222 - Sigma-Aldrich) (Serandour *et al.*, 2008). La reacción se llevó a cabo a 70 °C por 20 min. Luego de este tiempo las muestras quedan listas para su inyección en el GC-MS.

4.1.3.2. Método cromatográfico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en el equipo GCMS-QP 2010 ULTRA (Shimadzu), equipado con un auto-inyector (AOC-20i, Shimadzu), una pre-columna GC *Guard column* (0.25 μ m $\times$ 5m, RESTEK cat#1000), una columna HP-5MS (0.25 μ m $\times$ 30m, Agilent, 19091SS - 433) y un flujo de gas Helio de 28.9 mL por min. La temperatura inicial del horno fue de 80 °C, mantenida por 2 min, se incrementó luego a 290 °C (8 °C/min), se mantuvo por 3 min y finalmente se incrementó a 310 °C (20 °C/min) y se mantuvo por 10 min adicionales. La temperatura del inyector y detector fue de 300 °C. El volumen de inyección fue de 1 μ L y el modo de inyección fue el *splitless*. Los cromatogramas se analizaron con el software GCMS *Solutions* de Shimadzu.

4.1.3.3. Identificación y cuantificación de metabolitos

Para la identificación de los compuestos se empleó una combinación de varias aproximaciones: (a) los tiempos de retención (*t_{ret}*); (b) los espectros de masas experimentales (EI, 70 eV); (c) la comparación con la base de datos de espectros de masa presente en la librería del equipo (NIST and Wiley libraries); y (d) los espectros de masas de compuestos patrón (EI, 70 eV).

Para la confirmación y cuantificación de algunos de los metabolitos identificados se empleó genisteína deuterada (Geni-d4) calidad estándar (genisteína-d4; 95%; D-6282, CDN ISOTOPES) como patrón interno (PI). Como patrones externos (PE), se emplearon genisteína, luteolina y daidzeína calidad estándar (98% de pureza, Sigma-Aldrich). Para la cuantificación de aminoácidos se empleó como PE una mezcla de aminoácidos calidad estándar analítico (Sigma-Aldrich; AAS18-10X1ML).

Se realizaron curvas de calibración empleando Geni-d4 como PI. El espectro de masas de la genisteína y la Geni-d4 comparten el ión 471 (ión más abundante), por lo cual para diferenciar entre genisteína y Geni-d4 se utilizó el ión precursor 475 (más abundante en Geni-d4). Por esta razón fue necesario despreciar en cada muestra, o punto de la curva de calibración, el aporte del ión 471 por parte del PI. Para ello se inyectó el PI y se calculó el área correspondiente al pico del ión 471. Para cada punto de la curva de calibración fue necesario restablecer el valor del área del ión 471 de PE despreciando el aporte de dicho ión por parte del PI. Se graficó la relación área vs relación de concentración ($\frac{\text{ÁPE}}{\text{ÁPI}}$ vs $\frac{\text{Conc. PE}}{\text{Conc. PI}}$). La concentración de PI empleado fue de 0,3 mg/mL, tanto para la curva de calibración como en las muestras problema. Las concentraciones de PE empleadas para la construcción de la curva de calibración fueron 1, 05, 025, 020, 0166, 0,100, 0,075 y 0,005 mg/mL.

4.2. Resultados

4.2.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Las clorofilas son los pigmentos más importantes en la puesta en funcionamiento de la fotosíntesis y son esenciales para la conversión oxigénica de la energía luminosa en energía química (Pinkard *et al.*, 2006). Existen muchas razones de porque la cantidad de pigmentos fotosintéticos aumentan y/o decrecen en las plantas, y aunque como aproximación es inexacta, su cuantificación se utiliza para estimar de forma indirecta muchos aspectos de la fisiología de la planta, incluyendo el nivel nitrogenado y la capacidad fotosintética de las plantas (Mattiello *et al.*, 2015). El suministro inadecuado de fuentes nitrogenadas conduce, entre otros, a la reducción del área foliar, del contenido de clorofila y de la tasa fotosintética, lo que resulta en una menor producción de biomasa y rendimiento de los compuestos de almacenamiento (Tegedera & Rentsch, 2010). En el campo del mejoramiento del rendimiento vegetal, el aumentar la producción de material cosechable (rendimiento en granos por ejemplo) y mejorar su estado nutricional (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es un desafío biotecnológico (Hirel & Gallais, 2006). Es por ello que la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos se utilizó como medida indirecta del estado fisiológico de las plantas, tal como se discute más adelante.

Estadio V4 (30 días después de la siembra) -

En la *Tabla 4.1* se detallan los valores obtenidos para clorofila *a* y *b* y la relación entre ellas. Se constataron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* y *b* entre plantas de los tratamientos RHZ y COINO, siendo mayor el contenido de pigmentos para las plantas del tratamiento RHZ. Independientemente del tratamiento aplicado, el contenido de clorofila *b* fue, en promedio, dos veces mayor al contenido de clorofila *a*.

Tabla 4.1. Contenido de clorofila total (a + b), clorofila a, clorofila b, relación b/a y carotenoides, de plantas de soja cosechadas en estadio V4.

Tratamiento	CLOROFILAS	CLOROFILA <i>a</i>	CLOROFILA <i>b</i>	<i>b/a</i>	CAROTENOIDES
	TOTALES				
CONTROL	5.267 (a)	2.009 (ab)	3.258 (bc)	1.622 (a)	0.999 (b)
JD2	5.712 (a)	1.893 (b)	3.819 (ab)	2.018 (a)	1.056 (b)
RHZ	6.483 (a)	2.334 (a)	4.149 (a)	1.778 (a)	1.240 (a)
COINO	4.956 (b)	1.869 (b)	3.087 (b)	1.651 (a)	0.991 (b)

Los valores se expresan en mg de pigmento por g de hoja fresca. Diferentes letras entre paréntesis indican diferencias significativas entre tratamientos para cada columna ($P < 0,1$). Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

La clorofila *a* se encuentra asociada a los centros de reacción así como también a los complejos antena, y es el principal pigmento que participa en la fotosíntesis durante el transporte fotoelectrónico. Este proceso genera compuestos reductores y oxidantes potentes que proporcionan la energía necesaria para las reacciones subsiguientes a la fotosíntesis: transporte de electrones, síntesis de ATP y la fijación de CO_2 (Ripullone *et al.*, 2003). Además de la clorofila *a*, las antenas contienen otros pigmentos (clorofila *b*, carotenoides y xantófilas) que absorben la luz de diferentes longitudes de onda, extendiendo enormemente el rango de luz que las plantas pueden absorber y utilizar para la fotosíntesis. Otro de los pigmentos determinados en hoja fueron los carotenoides totales, los cuales mostraron un incremento del 25% en plantas del tratamiento RHZ respecto a las plantas del tratamiento COINO. En resumen, las plantas RHZ presentaron un mayor contenido de pigmentos fotosintéticos, lo que las hace más competentes en términos de fotosíntesis en el estadio V4.

Dado que la clorofila *b* se encuentra sólo en las antenas externas de los fotosistemas (Busheva *et al.*, 1991), la relación clorofila *b/a* permite estimar la cantidad relativa de antenas externas por centro de reacción. La relación *b/a* fue similar para todos los tratamientos.

En lo que respecta a las plantas co-inoculadas, estas presentaron el menor contenido de los pigmentos cuantificados, aunque con diferencias estadísticamente significativas solo en relación al tratamiento RHZ (Tabla 4.1). Esta observación indicaría que el estado nitrogenado y/o la capacidad fotosintética de las hojas de las plantas co-inoculadas se encuentran comprometidos, en relación a las plantas del tratamiento RHZ, para el estadio V4. Por otro lado, en el Capítulo I se mostró que las

plantas co-inoculadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso seco aéreo medio respecto a las plantas del tratamiento RHZ (*Tabla 3.4*). El mayor efecto de la co-inoculación de plantas en el estadio V4 se observó en la zona de raíces. Estas plantas fueron las únicas que presentaron nódulos (pequeños) en sus raíces secundarias y un mayor peso seco radical (*Tabla 3.4*) en relación a las plantas del tratamiento RHZ. Estos resultados van en el mismo sentido que los resultados observados por Morel *et al.* (2011, 2015) en estudios sobre alfalfa. Aunque en ese trabajo no se realizó un estudio dependiente del estadio de la planta, se verificó que durante la co-inoculación de alfalfa con *S. meliloti* y JD2 se produce un aumento de la tasa de nodulación y del desarrollo de la raíz comparado con la inoculación simple, tanto en ensayos llevados a cabo en condiciones gnotobióticas como en invernáculo. Los efectos de la co-inoculación con JD2 y rizobios sobre las raíces se explican, al menos en parte, por la secreción por parte de JD2 de AIA que ejerce efectos directos sobre el desarrollo radical. Además, en alfalfa se demostró que la colonización de las raíces por JD2 provoca un aumento en la secreción de moléculas producidas por la planta hacia la rizosfera, por ejemplo, de flavonoides inductores de la nodulación, lo que lleva a una mayor y temprana nodulación (Morel *et al.*, 2015).

Estadio R2-

La fotosíntesis durante las etapas reproductivas está positivamente correlacionada con el rendimiento de los cultivos, y se ha sugerido que una forma de aumentar esos rendimientos es mejorar la capacidad fotosintética de las hojas (Paradisco *et al.*, 2017; Dhanapal *et al.*, 2016).

Una vez que las plantas iniciaron el estadio reproductivo (R) se observó un cambio notorio en la pigmentación de las hojas, principalmente entre las plantas co-inoculadas y el resto de los tratamientos ensayados. En la *Figura 4.1* se puede observar un ejemplo del aspecto de las plantas al momento de la toma de muestras para la determinación de pigmentos fotosintéticos.

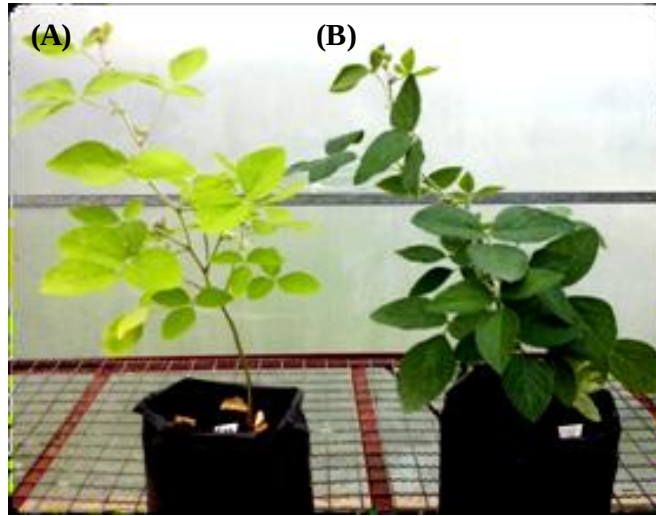


Figura 4.1. Plantas de soja al inicio del estadio R2 (100 días después de la siembra) crecidas en condiciones de invernáculo. Plantas de tratamientos RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. (A) y COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302 (B).

En concordancia con lo observado al momento del muestreo (Figura 4.1), el contenido de clorofilas totales (clorofila *a* + clorofila *b*) fue significativamente mayor en las plantas del tratamiento COINO con respecto a las del RHZ, mostrando valores tres veces mayores. Este dato resulta más relevante ante el hecho de que no se detectaron diferencias significativas en el contenido de clorofilas totales en el resto de los otros tratamientos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Contenido de clorofila totales (*a* + *b*), clorofila *a*, clorofila *b*, relación *b/a* y carotenoides de plantas de soja en estadio R2 (100 días después de la inoculación) en condiciones de invernáculo. Los valores se expresan en mg de pigmento por g de hoja fresca.

Tratamiento	CLOROFILAS TOTALES	CLOROFILA <i>a</i>	CLOROFILA <i>b</i>	<i>b/a</i>	CAROTENOIDES
CONTROL	0.409 (ab)	0.305 (b)	0.104 (b)	0.341 (a)	14.30 (b)
JD2	0.477 (b)	0.336 (b)	0.141 (ab)	0.419 (a)	16.30 (b)
RHZ	0.556 (ab)	0.418 (b)	0.138 (b)	0.330 (a)	20.60 (b)
COINO	1.418 (a)	1.189 (a)	0.229 (a)	0.193 (a)	30.50 (a)

Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,1$).

Tanto el contenido de clorofila *a* como clorofila *b* se incrementaron un 84 y 66%, respectivamente, en plantas del tratamiento COINO con respecto al de las plantas RHZ (Tabla 4.2).

Del mismo modo que en el estadio V4, en R2 las plantas del tratamiento JD2 probablemente presentaron mayor número de antenas externas por cada centro de reacción. Las plantas inoculadas con JD2 presentaron incluso mayor contenido de clorofila *b*, respecto a las plantas control. Es posible que el AIA producido por JD2 sea captado por la planta, lo que podría explicar estas diferencias en contenido de pigmentos. Se ha reportado que el AIA además de afectar la división, extensión y diferenciación celular vegetal, media las respuestas a la luz, gravedad y florecimiento. También afecta a la fotosíntesis, la formación de pigmentos, la biosíntesis de diversos metabolitos y la resistencia a condiciones estresantes (Glick, 2012). Dado que *Delftia* sp. JD2 es productora de AIA (Morel *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2015), el mayor contenido de clorofila *a* y *b* en plantas del tratamiento COINO podría relacionarse con el aumento en la producción de esta fitohormona durante el proceso de asociación de JD2 con la planta.

El contenido de carotenoides aumentó un 48% en plantas del tratamiento COINO con respecto a plantas del tratamiento RHZ. Además, el contenido de carotenoides por gramo de hoja se incrementó al menos 15, 20 y 30 veces en plantas de los tratamientos JD2, RHZ y COINO, respectivamente, comparado con las plantas del mismo tratamiento pero en el estadio vegetativo V4 (Tabla 4.1 y 4.2).

Se ha demostrado que los carotenoides son necesarios para proteger a las bacterioclorofilas (en las bacterias fotosintéticas) y las clorofilas (en las plantas superiores) de la fotodestrucción generada por la radiación solar. La exposición de las plantas al exceso de radiación solar conduce a la reducción de la capacidad fotosintética (Choudhury *et al.*, 2001). Por ello, el mayor contenido de carotenoides en plantas del tratamiento COINO podría representar una ventaja en términos fotosintéticos frente a las plantas del tratamiento RHZ, indicando que las plantas co-inoculadas se encuentran mejor preparadas para tolerar el estrés impuesto por ejemplo, en una solarización (desinfección del suelo por medio del calor generado de la energía solar capturada), entre otros. Además, este resultado deja abierta la siguiente pregunta: ¿puede la co-inoculación con cepas de *Delftia* representar una ventaja al momento de establecer cultivos de leguminosas en regiones donde la irradiación solar tiene mayor incidencia sobre los suelos?

Curiosamente, mientras que el contenido de carotenoides aumentó en R2, el contenido de clorofilas disminuyó con respecto al estadio de desarrollo V4 en todos los tratamientos. Posiblemente el

efecto acumulativo del daño por la irradiación solar impulsó una mayor producción de pigmentos protectores para contrarrestar este efecto dañino.

4.2.2. Identificación y cuantificación de metabolitos de bajo peso molecular

Se probaron varias metodologías comúnmente empleadas para el análisis metabolómico pero que no arrojaron resultados positivos, por lo que no se presentarán en esta tesis. En algunos casos, el procedimiento no fue reproducible, en otros existieron problemas con la sensibilidad de detección, la concentración de los compuestos, etc. Finalmente, se logró analizar por GC-MS el contenido de flavonoides en raíces y nódulos, así como de aminoácidos, ácidos orgánicos y otros CBPM en raíces, nódulos y hojas. La GC no es el procedimiento ideal para la detección de compuestos fenólicos, y en general los flavonoides suelen determinarse por HPLC; pero los intentos que se realizaron en el HPLC del Instituto Clemente Estable, no arrojaron resultados positivos, y a pesar de que se detectaron picos con espectros de absorción típicos de flavonoides, estos no pudieron ser identificados.

4.2.2.1. Flavonoides en raíces

La identificación de flavonoides se realizó por comparación de espectros de masas con los estándares correspondientes. En la *Tabla 4.3*, se detallan los iones empleados para la identificación de flavonoides y sus tiempos de retención. El trabajo se limitó a estos flavonoides que serían los de mayor relevancia en la interacción soja-bradirizobio. No se descarta la presencia/insidencia de otros flavonoides, pero la falta de más compuestos estándares limitó ampliar este estudio.

Tabla 4.3. Parámetros empleados para la identificación de compuestos flavonoides mediante GC-MS.

FLAVONOIDE	m/z	T. ret
Daidzeína	383, 398	30.000
Genisteína	471, 228, 399	30.301
Luteolina	463, 478, 479	30.627
Coumestrol	412, 392	31.792

m/z , relación masa carga (iones presentes en el espectro de masas confirmatorios del compuesto).

T.ret, tiempo de retención en min en el cromatograma TIC.

Estadio V4- (30 días después de la siembra)

Los resultados se muestran en la *Figura 4.2*. No se detectó la presencia de los flavonoides detallados en la *Tabla 4.3* en los extractos de raíces de plantas no inoculadas (plantas control). En los extractos de las plantas del tratamiento RHZ se detectó una ligera acumulación de daidzeína; mientras que en las raíces de las plantas provenientes de los tratamientos JD2 y COINO se observó la acumulación de daidzeína, genisteína, luteolina y coumestrol. Cabe destacar que la intensidad y área de los picos cromatográficos correspondientes a estos flavonoides en extractos de raíces de plantas co-inoculadas fueron diez veces mayores respecto a plantas de los tratamientos JD2 y RHZ, sugiriendo que en respuesta a la co-inoculación la planta podría modificar su metabolismo para la producción de una mayor cantidad de estos flavonoides (*Figura 4.2*).

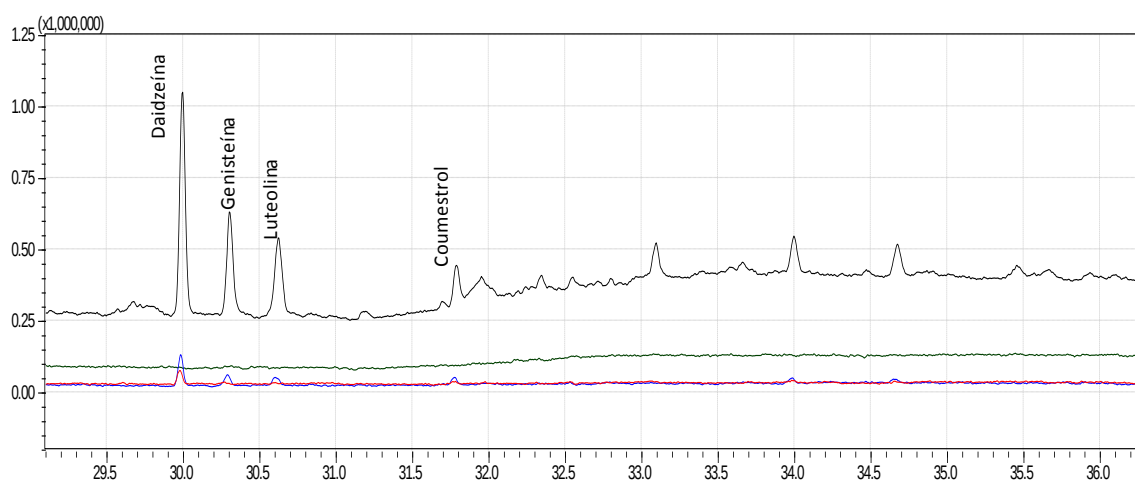


Figura 4.2. Cromatogramas en TIC (corriente iónica total) de extractos de raíces en estadio V4 (30 días después de la siembra) de plantas crecidas en condiciones de invernáculo. (verde) raíces de plantas control, (rojo) raíces de plantas RHZ, (azul) raíces de plantas JD2, (negro) raíces de plantas COINO. Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

La principal función de los flavonoides en la interacción simbiótica rizobio-planta es la inducción de la transcripción de genes que codifican para los Factores Nod en los rizobios. Estos factores desencadenan la formación de nódulos en las raíces de la planta. Se ha reportado que la daidzeína, la genisteína y el coumestrol son compuestos señales claves en el establecimiento de la simbiosis entre los bradyrizobios y la soja, siendo la daidzeína el flavonoide más abundante (Juge *et al.*, 2012;

Antunes *et al.*, 2006). Los resultados sugieren que las plantas sometidas al tratamiento COINO estarían en mejores condiciones para el desarrollo de los nódulos, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos de nodulación temprana en el Capítulo I.

Estadio R2-(100 días después de la siembra)

El análisis bioquímico de los extractos de raíces mostró que en el estadio más avanzado de R2, las plantas control contienen niveles bajos de daidzeína, genisteína y coumestrol (*Figura 4.3*).

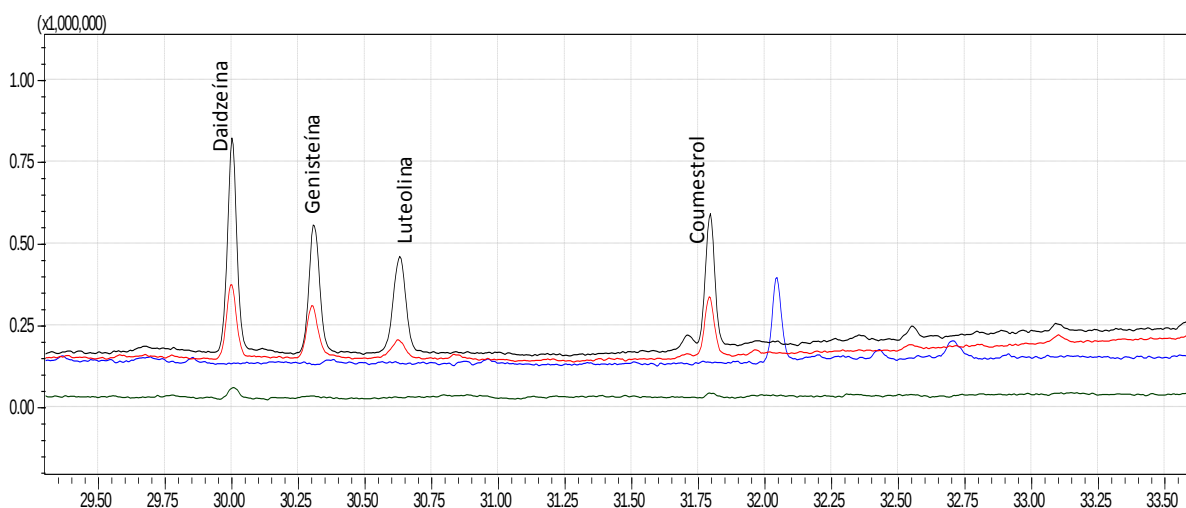


Figura 4.3. Cromatogramas en TIC (corriente iónica total) de extractos de raíces en estadio R2 (100 días después de la siembra) de plantas crecidas en condiciones de invernáculo. (verde) raíces de plantas CONTROL, (rojo) raíces de plantas RHZ, (azul) raíces de plantas JD2, (negro) raíces de plantas COINO. Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

El contenido de flavonoides en plantas inoculadas mostró un perfil diferente al obtenido para el estadio V4, y no se detectó ninguno de los flavonoides analizados en los extractos de raíces de plantas inoculadas con JD2, sugiriendo que los mismos ya habrían sido degradados o excretados por la planta. Sin embargo, en las raíces de plantas del tratamiento RHZ el nivel de daidzeína aumentó notoriamente y se detectó genisteína, luteolina y coumestrol.

En las raíces de plantas co-inoculadas se detectó daidzeína, genisteína, luteolina y coumestrol, pero en niveles menores a los detectados en plantas colectadas durante el estadio V4 (cuando la nodulación ya estaba establecida en estas plantas; *Figura 4.2*). Probablemente, una vez establecido

el nódulo, las plantas co-inoculadas disminuyen los niveles de flavonoides para dar lugar a la producción de otras moléculas con mayor relevancia en el metabolismo del nitrógeno.

La intensidad de los picos y la abundancia de flavonoides fueron similares en las plantas de los tratamientos COINO y RHZ. La daidzeina y el coumestrol fueron los picos mayoritarios en todos los casos, siendo el doble en intensidad que los picos de genisteina y diez veces mayor que el pico de luteolina (*Figura 4.3*).

En la *Tabla 4.4* se resume la información de los cromatogramas analizados en la forma de presencia o ausencia de flavonoides en los extractos de raíces y su abundancia relativa, según el tipo de tratamiento y el estadio del cultivo. Los resultados se expresaron en la forma de abundancia relativa debido a que no fue posible cuantificarlos por el motivo descrito en el Epílogo (Una serie de eventos desafortunados).

Tabla 4.4. Composición química de flavonoides en los extractos de raíces. V4: estadio de cuarto nudo (30 días después de la siembra); R2: estadio de floración (100 días después de la siembra). (+) presencia del flavonoide. (++) presencia del flavonoide en altos niveles. (-) ausencia del flavonoide. Control: tratamiento de plantas sin inocular; RHZ y JD2: tratamientos de plantas inoculadas con bradyrizobios o JD2, respectivamente; y COINO: tratamiento de plantas co-inoculadas.

Flavonoide	Control		RHZ		JD2		COINO	
	V4	R2	V4	R2	V4	R2	V4	R2
Daidzeina	-	+	+	++	+	-	++	++
Genisteina	-	+	-	++	+	-	++	++
Luteolina	-	-	-	++	+	-	++	++
Coumestrol	-	+	-	++	+	-	++	++

Control: semillas sin inocular. JD2: semillas inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2. RHZ: semillas inoculadas con 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302. COINO: semillas co-inoculadas con 10^6 UFC de *Delftia* sp. JD2 + 10^7 UFC con *B. elkanii* U1301-U1302.

4.2.2.2. Flavonoides en nódulos

No se detectaron los flavonoides evaluados en ningún extracto de nódulos, independientemente del tratamiento y del estadio de muestreo. Este resultado es muy interesante, sobre todo teniendo en cuenta la producción de metabolitos en diferentes partes de la planta, tal cual se discutirá en la sección Discusión General.

4.2.2.3. Otros CBPM en raíces

Con el fin de ampliar la lista de metabolitos de bajo peso molecular posiblemente involucrados en la interacción tripartita soja-bradyrizobios-JD2, y de contribuir al establecimiento del mecanismo de interacción microorganismo--planta, se determinó el perfil de otros CBPM en diferentes partes de la planta. En particular, se analizaron los niveles de algunos metabolitos relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno en raíces y nódulos, en los dos estadios muestreados, V4 y R2.

Se detectaron aminoácidos, ácidos grasos, ácidos carboxílicos y diversos carbohidratos en los diferentes tratamientos. La identificación de los compuestos se realizó por comparación con la base de datos de las librerías públicas de los compuestos. En el caso de la identificación de los aminoácidos se utilizaron compuestos patrón (ver Materiales y Métodos).

Estadio V4 – (30 días después de la siembra)

Se detectó una amplia variedad de compuestos en las raíces colectadas en estadio V4. Sin embargo, no todos los compuestos pudieron identificarse basándose en los estándares disponibles y en las bases de datos.

En todos los tratamientos se detectaron diversos ácidos orgánicos, incluyendo ácidos grasos así como muchos hidratos de carbono. En todos los casos se observó elevados niveles de azúcares solubles, principalmente inositol, arabinosa y glucosa, que fueron los compuestos más abundantes. En la *Tabla 4.5* se detallan todos los compuestos identificados para cada tratamiento según el grupo químico al que pertenecen.

La mayor variedad de ácidos grasos se detectó en las plantas control, principalmente ácidos grasos insaturados y de cadena larga. Las plantas del tratamiento RHZ y COINO mostraron un perfil similar de ácidos grasos, sin embargo, solo en las plantas del tratamiento COINO se detectó ácido caproico, un ácido graso de cadena corta (C6:0).

La mayor diversidad de ácidos orgánicos se observó en las raíces de plantas inoculadas con JD2 y co-inoculadas con bradyrizobios y JD2. Los ácidos orgánicos suelen encontrarse en grandes cantidades en los exudados radicales. Estos actúan como fuente de nutrientes y a su vez mejoran su disponibilidad, así como también reducen el pH del ambiente, ayudando a la solubilización de cationes. La liberación de ácidos orgánicos a la rizosfera induce el crecimiento de rizobacterias y atrae a los microorganismos hacia las raíces (Morel *et al.*, 2015).

Tabla 4.5. Composición química de extractos de raíces en estadio V4 (30 días después de la siembra): compuestos de bajo peso molecular (CBPM, derivados trimetilsil). Control: tratamiento de plantas sin inocular; RHZ y JD2: tratamientos de plantas inoculadas con bradyrizobios o JD2, respectivamente; y COINO: tratamiento de plantas co-inoculadas.

Compuesto químico	CONTROL	RHZ	JD2	COINO
Ac. Grasos	...	...	...	Caproico
	Palmítico	Palmítico	Palmítico	Palmítico
	Valérico	Valérico	...	Valérico
	Mirístico	...	...	...
	Láurico	...	...	...
	Estéarico	Estéarico	Estéarico	Estéarico
	Pentadecanoico	...	...	Pentadecanoico
	Nonanoico	...	...	...
	Linoleico	...	...	...
	Oleico	...	...	...
	Araquidónico	...	...	...
	Monopalmitina	...	...	...
Ac. Carboxílicos y sus derivados	Butírico	...	Butírico	...
	...	Succínico	Succínico	Succínico
	Benzoico	...	...	...
	...	...	...	...
	...	Málico	Málico	Málico
	Propanoico	Propanoico	Propanoico	Propanoico
	...	...	Malónico	Malónico
	Glucónico	...	Glucónico	Glucónico
Amidas, aminas, aminoácidos y otros N-compuestos	Treónico	Treónico	Treónico	Treónico
	...	Butanamina	Butanamina	Butanamina
	Alanina	Alanina	Alanina	Alanina
	Valina	Valina	Valina	Valina
	Serina	Serina	Serina	Serina
	Treonina	Tronina	Treonina	Treonina
	...	Prolina	Prolina	...
	...	...	...	Glutamina
	...	...	...	Aspartato
	Tirosina	...	Tirosina	...
Carbohidratos	...	Urea	Urea	...
	Arabinosa	Arabinosa	Arabinosa	Arabinosa
	Ribosa	...	Ribosa	Ribosa
	Myo-Inositol	Myo-Inositol	Myo-Inositol	Myo-Inositol
	...	...	...	Fructosa
	Manosa	Manosa	Manosa	...
	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa
	...	Xylitol	Xilitol	Xilitol
	Xilosa	Xilosa	...	...
	Galactosa	...	...	Galactosa
	Maltosa	...	...	...
	Sacarosa	Sacarosa	Sacarosa	...
Fitoesteroles	Campesterol	...	...	...
	Estigmasterol	...	Estigmasterol	...
	Sitoesterol	...	Sitoesterol	...

Se detectó una gran cantidad de azúcares en las raíces de todos los tratamientos. Se ha reportado que en alfalfa y soja, los azúcares y polioles, como el inositol, estarían relacionados con la tolerancia al estrés hídrico y salino (Brechenmacher *et al.*, 2010). Pero además, constituyen una fuente de carbono para sostener la simbiosis.

Dos de los principales ácidos dicarboxílicos encontrados en las raíces de plantas inoculadas y co-inoculadas fueron el ácido succínico y el ácido málico, ambos intermediarios del ciclo de Krebs. Los ácidos orgánicos, como los ácidos dicarboxílicos, son fuente de carbono para el metabolismo y la fijación de nitrógeno de los bacteroides (Udvardi & Poole, 2013). El malato, o su forma ionizada, el ácido málico, se considera como la principal fuente de carbono transportada a los bacteroides (Udvardi & Poole, 2013). Es posible que el ácido málico presente en las raíces de la soja inoculada provenga del ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs como vía metabólica central en los rizobios, proporciona equivalentes de reducción (NADH y FADH₂), compuestos con alto potencial de transferencia de grupos fosfato, como el GTP o ATP e intermediarios metabólicos para la producción de aminoácidos y otras vías biosintéticas. En resumen, la detección de metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs en raíces de plantas co-inoculadas, así como de metabolitos relacionados a la asimilación de nitrógeno, sugiere que estas plantas se encuentran produciendo activamente poder reductor y energía, que podría utilizarse para la fijación de nitrógeno.

El perfil de aminoácidos detectados fue similar tanto en raíces de plantas del tratamiento RHZ como del tratamiento COINO. Se detectó la presencia de alanina, valina, serina y treonina en raíces de ambos tratamientos. Sin embargo, los aminoácidos glutamina y aspartato se detectaron sólo en las raíces de plantas del tratamiento COINO.

La glutamina, el glutamato y la asparagina pueden actuar como señales que indican el estado nitrogenado en la planta (Gemperline *et al.*, 2015). El amonio liberado por los bacteroides se asimila bajo la forma de glutamato, el cual se obtiene a través de la ruta GS/GOGAT de las células vegetales (Patriarca *et al.*, 2002 ; Barsch *et al.*, 2006). Las transaminasas utilizan este glutamato para generar todos los demás aminoácidos, que luego se usan para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas que contienen nitrógeno (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Por ejemplo, la enzima aspartato aminotransferasa (AAT) cataliza la conversión de oxalacetato en aspartato, siendo el glutamato el dador del grupo amino. El aspartato producido puede transformarse en asparagina por la acción de la enzima asparagina sintetasa (AS), siendo la glutamina la molécula dadora del nitrógeno amídico (Sulieman & Phan Tran, 2013). Por lo tanto, la

presencia de glutamina y aspartato en las raíces de plantas COINO puede indicar una temprana asimilación de nitrógeno por parte de estas plantas

El sitoesterol y el estigmasterol son dos de los más abundantes fitoesteroles que se encuentran de forma natural en aceites vegetales. La composición en fitoesteroles es característica de la especie vegetal (Careri *et al.*, 2001). Entre los varios tipos de fitoesteroles presentes en soja, el campesterol, estigmasterol y β -sitosterol son los más abundantes en las semillas y fueron los detectados en las plantas control y en las inoculadas con JD2. Los fitoesteroles son precursores de los brasinoesteroides, fitorhormonas implicadas en el desarrollo embrionario, en la división celular, y el crecimiento vegetal (Housome *et al.*, 2008), principalmente actuando junto a las auxinas (Yoshimitsu *et al.*, 2011). La promoción del crecimiento de las plantas co-inoculadas observada en el Capítulo I puede deberse, al menos en parte, al aumento en el contenido de fitohormonas, como los brasinoesteroides, que lleva a su vez la disminución del contenido observado de fitoesteroles en estas plantas, para la producción de estas hormonas.

Estadio R2 – (100 días después de la simbra)

Al igual que en el estadio V4, se detectaron diversos compuestos en los extractos de las raíces colectadas en el estadio R2. Sólo algunos de ellos pudieron identificarse mediante la base de datos del software empleado y confirmar su identidad mediante compuestos estándares (Tabla 4.6).

A diferencia de lo ocurrido en la etapa vegetativa, en R2 las raíces de las plantas co-inoculadas acumularon una gran diversidad de ácidos grasos. Dentro de los ácidos grasos identificados se encuentran el palmítico, valérico, esteárico, oleico, linolénico y araquidónico. Todos estos ácidos grasos se encuentran comúnmente en las plantas. Estos ácidos grasos, con diferentes largos de cadena y grado de insaturaciones, están implicados en la fluidez de la membrana vegetal y el cambio en su contenido está relacionado con la colonización bacteriana de las raíces (Brenchenmacher *et al.*, 2010).

Dentro de los aminoácidos detectados en la etapa reproductiva se destaca la presencia de prolina sólo en las raíces de las plantas inoculadas (tratamientos JD2, RHZ y COINO). Se ha reportado que la prolina tienen una función osmoprotectora durante la respuesta de las plantas a la sequía, el frío, la sal, y el tratamiento con metales pesados (Charlton *et al.*, 2008; Shulaev *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2009).

Tabla 4.6. Composición química de extractos de raíces (estadio R2, 100 días después de la siembra): compuestos de bajo peso molecular (CBPM, derivados trimetilsil). Control: tratamiento de plantas sin inocular; RHZ y JD2: tratamientos de plantas inoculadas con bradyrizobios o JD2, respectivamente; y COINO: tratamiento de plantas co-inoculadas.

Compuesto químico	CONTROL	RHZ	JD2	COINO
Ac. grasos	Estearico	Estearico	Estearico	Estearico
	Palmítico	Palmítico	Palmítico	Palmítico
	...	...	...	Oléico
	...	...	...	Linolenico
	...	...	...	Araquidónico
	...	...	...	Monopalmitina
	Valérico	...	Valérico	...
Ac. Carboxílicos y sus derivados	...	...	Linoleico	...
	Láurico	...	...	...
	...	...	...	Hidroxibutírico
	...	...	Butanoico	...
	Succínico	Succínico	...	...
	...	Propanoico	Propanoico	Propanoico
	...	...	Glucónico	Glucónico
	...	Benzoico	...	Benzoico
	...	...	Glucurónico	...
	...	Málico	Málico	Málico
	...	...	Malónico	...
	...	...	Maleico	...
	...	...	Láctico	...
	...	...	Cinámico	...
Amidas, aminas, aminoácidos y otros N-compuestos	...	Alanina	...	Alanina
	Prolina	..	...	Prolina
	...	Serina	Serina	Serina
	...	...	...	Glutamina
	Aspartato	...	...	...
	Lisina	...	...	...
	...	Glicina	...	Glicina
	...	Valina	...	...
	...	Urea	...	Urea
Carbohidratos y polioles	Butanamina	...	...	...
	Acetamida	...	...	...
	...	Ribosa	Ribosa	Ribosa
	Inositol	Inositol	Inositol	Inositol
	Galactosa	...	Galactosa	Galactosa
	...	Glucosa	Glucosa	Glucosa
	Arabinosa	Arabinosa	Arabinosa	Arabinosa
	Fructosa	Fructosa	Fructosa	Fructosa
	...	...	...	Galacitol
	...	...	Glicerol	Glicerol
	...	...	Maltosa	...
	...	...	Manosa	...
	...	...	Xilosa	...
Fitoesteroles	...	...	Xilitol	Xilitol
	...	...	Melobiosa	...
	...	Campesterol	...	Campesterol
	Estigmasterol	Estigmasterol	...	Estigmasterol
	Sitoesterol	Sitoesterol	...	Sitoesterol

4.2.2.4. CBPM en nódulos

En la *Tabla 4.7* se detallan los compuestos detectados en los extractos de los nódulos muestreados en las plantas en estadio R2, según el grupo químico al que pertenecen.

Tabla 4.7. Composición (derivados trimetilsil) de extractos de nódulos colectados en estadio R2 de la raíz principal y de las raíces secundarias de las plantas inoculadas con bradyrizobios (RHZ) o co-inoculadas con bradyrizobios y *Delftia* sp. JD2 (COINO).

Compuesto químico	Nódulos de raíz principal		Nódulos de raíces secundarias	
	RHZ	COINO	RHZ	COINO
Ac. grasos	Tetracosenoico	...	...	...
	Octadecanoico	Octadecanoico	...	...
	Oléico	Oléico	...	...
	Mirístico	Mirístico	...	...
	Butanedioico	Butanedioico	Butanedioico	Butanedioico
	Hexadecanoico	Hexadecanoico	...	Hexadecanoico
	...	...	...	Propenóico
	Propanodioico	Propanodioico	Propanodioico	...
	Octadecadienoico	Octadecadienoico	...	...
	Metilcitríco	Metilcitríco	...	...
Ac. Carboxílicos y sus derivados	...	...	Tetradecanoico	Tetradecanoico
	...	Malónico	Malónico	Malónico
	Acético	...	Acético	Acético
	Propanoico	Propanoico	Propanoico	Propanoico
	Benzoico	Benzoico	Benzóico	Benzóico
	Málico	Málico	Málico	Málico
	Hidroxibutírico	Hidroxibutírico	Hidroxibutírico	Hidroxibutírico
	Benzendicarboxílico	Benzendicarboxílico	Benzendicarboxílico	Benzendicarboxílico
	Ceto-d-gluconico	...	Ceto d- glucónico	...
	...	...	Octadecenoico	Octadecenoico
	...	...	Octadecadienoico	Octadecadienoico
	...	...	Hexadecanoico	...
	...	...	...	Glucurónico
	Hexanoico	...	...	...
	Pentónico	...	...	...
	Altrónico	...	...	...
	Butanóico	Butanoico	...	...
	Ribónico	...	...	...
	...	...	...	...
	Manónico	Manónico	...	...

Amidas, aminas, aminoácidos y otros N-compuestos	...	...	...	Etanamídico
	Alanina	Alanina	Alanina	Alanina
	Glicina	Glicina	Glicina	Glicina
	Valina	Valina	Valina	Valina
	...	...	...	...
	Pirimidina	Pirimidina	Pirimidina	Pirimidina
	Serina	Serina	Serina	Serina
	Treonina	Treonina	Treonina	Treonina
	...	...	...	Prolina
	...	...	Aminobutanoico	Aminobutanoico
	Fenilalanina	Fenilalanina	Fenilalanina	Fenilalanina
	Urea	Urea	Urea	...
	...	Glutamina	...	...
	Tirosina	Tirosina	...	...
Carbohidratos y polioles	Arabinosa	Arabinosa	...	...
	Galactopiranososa	Galactopiranososa	...	...
	...	...	...	Galactofuranosa
	Inositol	Inositol	Inositol	Inositol
	...	...	Arabinopiranososa	Arabinopiranososa
	Glucopiranososa	Glucopiranososa	Glucopiranososa	Glucopiranososa
	Galactosa	...	...	Galactosa
	...	...	...	Maleato
	...	Manosa	Manosa	Manosa
	...	Melobiosa	Melobiosa	...
	Ribosa	Ribosa	Ribosa	...
	...	...	Lactosa	...
	...	...	...	Turanosa
	Gulosa	Gulosa	Gulosa	Gulosa
	Glucosa	Glucosa	...	Glucosa
	Maltosa	Maltosa	...	Maltosa
	Fructosa	Fructosa	Fructosa	Fructosa
	Xilitol	Xilitol	Xilitol	Xilitol
Fitoesteroles	Campesterol	Campesterol	Campesterol	Campesterol
	Estigmasterol	Estigmasterol	Estigmasterol	Estigmasterol
	Sitoesterol	Sitoesterol	Sitoesterol	Sitoesterol

Comparando los tratamientos RHZ y COINO, se encontraron pocas diferencias en el perfil de CBPM presentes en los extractos de nódulos. No se detectaron ni sacarosa ni trealosa en los extractos de nódulos a pesar de ser los azúcares solubles predominantes en soja (Vauclare *et al.*, 2010), así como tampoco se detectó sacarosa, el mayor producto fotosintético que se transporta a

los nódulos vía el floema (Copeland & Morell, 1985). Por otro lado, el malato, un compuesto mayoritario en nódulos, se detectó en todos los extractos (*Tabla 4.7*). Este ácido dicarboxílico, junto a otros como el succinato y fumarato, son intermediarios del ciclo de Krebs, donde se oxidan para la generación de poder reductor que se utiliza durante la respiración en el nódulo (bacteroides y células hospederas). Esta respiración provee de la energía necesaria para la FBN (Lodwig *et al.*, 2003).

El perfil de aminoácidos identificados fue similar en los nódulos de las plantas de los tratamientos RHZ y COINO. Sin embargo, del mismo modo que sucedió en las raíces de las plantas co-inoculadas, sólo en los nódulos de estas últimas se identificó glutamina, aminoácido que junto al glutamato son *interconvertibles* y están directamente relacionados con el metabolismo central del nitrógeno. La presencia de glutamina en los nódulos podría sugerir que la fijación ocurre de forma eficiente. La alanina se detectó en todos los extractos de nódulos testeados. Este aminoácido, al igual que el aspartato, se transporta desde el nódulo hacia las otras partes de la planta para la síntesis de asparagina (Lodwig *et al.*, 2003), pero no se detectaron asparagina, glutamato ni ureídos. Vauclare *et al.* (2010) no detectaron glutamina en nódulos de soja a los 41 días post-inoculación, sugiriendo una alta y rápida transformación de este aminoácido.

La presencia de hidroxibutirato en nódulos de soja es una característica ampliamente reportada en los bradyrizobios. El ácido β -hidroxibutírico está presente en los bacteroides en hasta el 30% de su peso seco y su presencia en raíces y nódulos no es extraña (Wong & Evans, 1971). Los bacteroides lo utilizan cuando el aporte de carbohidratos desde la planta es limitado, ya sea por la falta de luz, la senescencia, etc. Algunos autores proponen que su utilización en los nódulos mantiene la demanda de oxígeno de los bacteroides durante la oscuridad, preservando la actividad del nódulo y la FBN hasta el estadio de desarrollo del grano (Bergersen *et al.*, 1991).

Los efectos de la co-inoculación de las semillas de soja sobre el crecimiento vegetal, el rendimiento final en grano del cultivo y la composición en metabolitos en hojas, raíces y nódulos, en especial de flavonoides y pigmentos fotosintéticos, se resumen en la *Figura 4.4*.

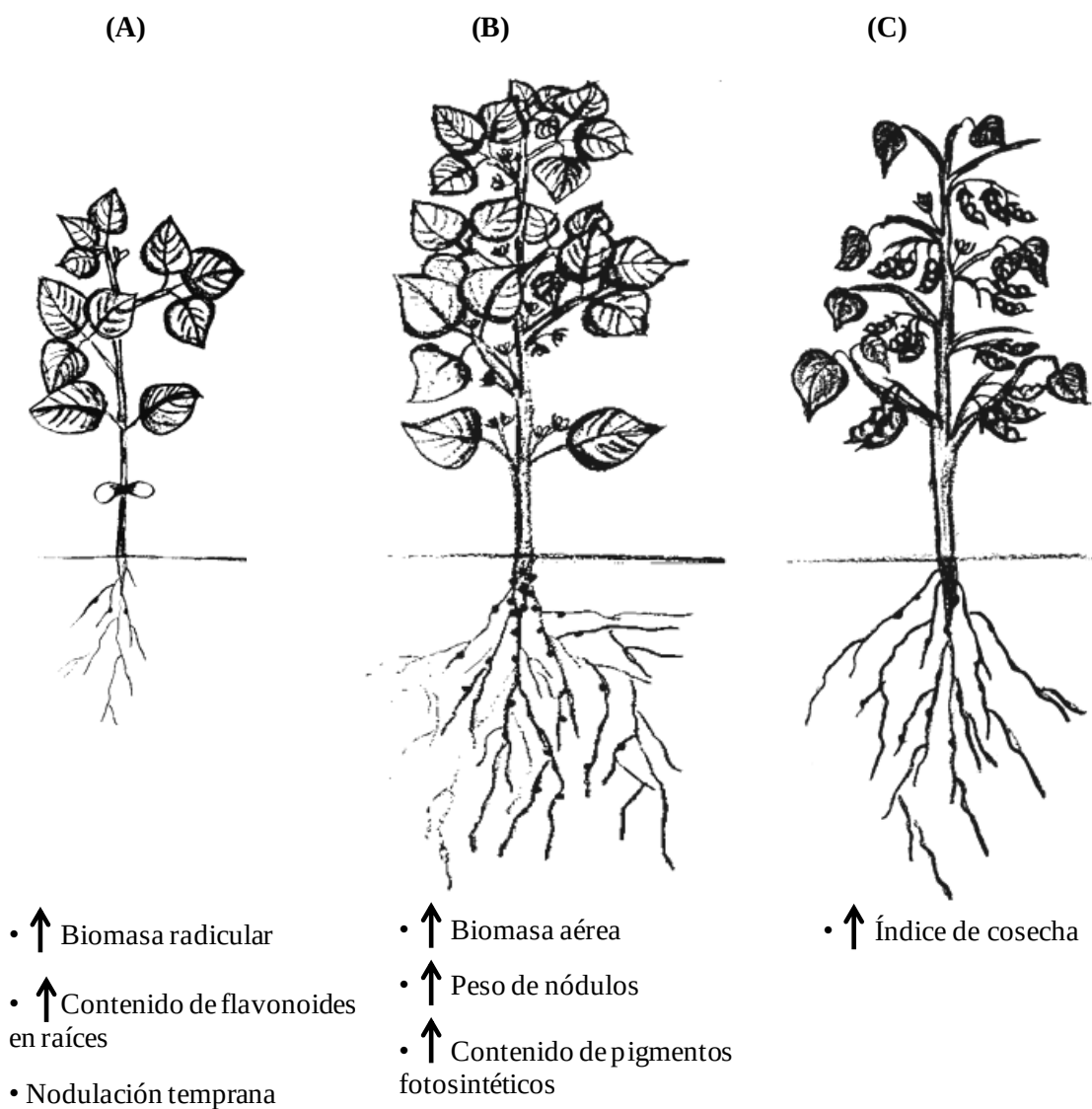


Figura 4.4. Efectos de la co-inoculación *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2 sobre las plantas de soja. (A) estadio V4; (B) estadio R2; (C) estadio MF. Las flechas indican aumentos relativos, respecto al tratamiento de plantas inoculadas con bradyrizobios.

5. DISCUSIÓN

La aplicación de PGPRs en los sistemas agrícolas mejora el crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluyendo el rendimiento de muchos cultivos de importancia comercial (ver *Tabla 1.1*). Su efecto promotor se ha estudiado principalmente en leguminosas y cereales, y sobre todo realizando estudios a campo. Por ejemplo, existen muchos reportes sobre el efecto benéfico de las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Rhizobium* sobre una variedad de plantas, entre otros, debido a su capacidad para promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas (AIA y citoquininas) y/o fijar N₂. Por mayor información se puede consultar en Morel *et al.* (2012).

El efecto de la inoculación por bacterias fijadoras de nitrógeno, así como el efecto sinérgico de la co-inoculación de algunas leguminosa con sus rizobios y *Delftia* sp. JD2 están ya confirmados y reportados (Morel *et al.*, 2011; 2012; 2015). Los experimentos de inoculación realizados en trébol demostraron que la inoculación con aislamientos de *Delftia* spp. aumenta significativamente la biomasa vegetal, hasta valores similares a los obtenidos cuando se inocula con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* U204 (Ubalde *et al.*, 2012). Pero también se ha reportado que JD2 puede funcionar como una bacteria colaboradora de rizobios durante la co-inoculación de alfalfa y trébol en condiciones gnotobióticas, mejorando así el rendimiento de la planta (Morel *et al.*, 2011). Por otro lado, también en Morel *et al.*, (2015) se informó sobre el efecto positivo de la co-inoculación con *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 sobre el crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de invernáculo. Durante esta tesis, el efecto positivo de la co-inoculación de *B.elkanii* y *Delftia* sp. JD2 sobre el crecimiento de las plantas de soja se confirmó según los resultados obtenidos de los ensayos de invernáculo. Además, los ensayos *in vitro* confirmaron el efecto de la co-inoculación sobre la nodulación de las plantas, específicamente se detectó una nodulación temprana y un mayor número de nódulos por planta.

El empleo de inoculantes mixtos en los cultivos agrícolas, en general, se asocia a una mayor captación de nitrógeno, comparado con los cultivos sometidos a inoculantes simples (Dardanelli *et al.*, 2008; Volpin *et al.*, 1996; Itzigsohn *et al.*, 1983). Se han reportado muchos ejemplos de bacterias y hongos micorrízicos que aumentan la absorción de nutrientes por las plantas y favorecen la FBN (Morel *et al.*, 2012; Silveira, 1992). Probablemente, el ejemplo más estudiado sea la co-inoculación con *Azospirillum*. Este microorganismo presenta la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre, producir fitohormonas y sideróforos (Perotti & Pidello, 1999). Según algunas experiencias

reportadas para PGPRs, el incremento del rendimiento de leguminosas co-inoculadas se asocia, en general, con una mayor FBN, redundando en un aumento de la producción vegetal. Pero en el caso de *Azospirillum* el mayor rendimiento se debe al aumento del volumen radical, lo cual se acompaña con un aumento en la capacidad de explorar el suelo en la búsqueda de nutrientes, y el aumento en el número de potenciales nichos para la infección y nodulación (Itzigsohn *et al.*, 1993; Okon, 1993; Dardanelli *et al.*, 2008). En el presente trabajo, y según los resultados de los ensayos en plantas *in vitro*, la co-inoculación de soja con bradyrizobios y JD2 aumenta el tamaño de la raíz y la tasa de nodulación. La mejora en la nodulación se acompañó de un incremento significativo en la producción vegetal de las plantas de soja y el rendimiento en grano.

Desde el punto de vista comercial, el grano es el insumo más importante producido por soja. En su conjunto, los resultados indican que la co-inoculación con *B.elkanii* y JD2 tiene un efecto positivo en el rendimiento en grano de soja. Este aumento sustancial en el índice de cosecha de las plantas co-inoculadas parece muy prometedor a la hora de traducirlo a valores comerciales. Si comparamos estos rendimientos con los obtenidos hasta el momento en los cultivos a campo (3,2 millones de toneladas de grano y 370 – 378 USD por tonelada; DIEA, 2017), un aumento del 47% en la cosecha de grano significaría un impresionante aumento en las ganancias, superando los 500 millones de dólares para la superficie en la que actualmente se cultiva soja en nuestro país. Por supuesto, aun resta confirmar estos resultados tan promisorios en estudios a campo.

Los rendimientos de soja han aumentado en los últimos años, principalmente debido a una mejora en la combinación de los factores genéticos. El uso de la planta de soja para la producción de biodiesel puede requerir la expansión del área dedicada a su cultivo, pero desde el punto de vista del cuidado del recurso natural “suelo” es más importante mejorar la productividad por hectárea, y no aumentar el número de hectáreas cultivadas. Por lo tanto, los aumentos de rendimiento se convierten en el principal foco de estudio relacionado al sostenimiento del cultivo de soja.

La gran expansión de la población mundial y por tanto una mayor demanda de alimentos, combustible y fibra, así como la escasez de tierra, agua y energía, y un cambio climático cada vez mas acelerado hacen difícil satisfacer las demandas de hoy en día. Parece imperante entonces abordar estos desafíos empleando los conocimientos generados por las ciencias y la biotecnología, para así aumentar los rendimientos de los cultivos reduciendo los insumos y mejorando la cantidad y calidad de los recursos. El foco se pone entonces en la mejora de los procesos biológicos de captación y asimilación de nitrógeno por parte de la planta.

Se ha reportado que existe una correlación positiva entre la fotosíntesis y el rendimiento de los cultivos. Para aumentar el rendimiento vegetal, las plantas deben acumular grandes cantidades de compuestos nitrogenados en las semillas, y para ello deben incrementar su tasa fotosintética (Paradisco *et al.*, 2017; Stefan *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010).

En primer lugar, y como se mencionó anteriormente, la toma de dióxido de carbono y el crecimiento dependen de las concentraciones de pigmentos, ya que a bajas concentraciones se limita el potencial fotosintético y por lo tanto la producción primaria (Richardson *et al.*, 2002). En segundo lugar, los niveles de pigmentos son indicadores indirectos de senescencia (Brown *et al.*, 1991) y estrés, tanto ambiental como biótico (Hendry & Price, 1993; Pandey *et al.*, 2005; Sinha & Mukherjee 2008; Gonçalves *et al.*, 2005). Por otro lado, existen numerosos estudios que indican una relación positiva entre el contenido de nitrógeno y el contenido de clorofila en hojas (Clevers & Kooistra, 2012; Dordas & Sioulas, 2008; Pagano & Maddonni, 2007; Houles *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2006; Torres Netto *et al.*, 2002). Ligado al primer punto, generalmente hay una fuerte relación entre la cantidad de nitrógeno por unidad de área foliar y la capacidad fotosintética (Makino, 2003; Sinclair, 2004). Esta relación se debe a que el nitrógeno en las hojas se encuentra principalmente en los cloroplastos, mayoritariamente formando parte de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). Esta enzima es imprescindible para la fijación del dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, y representa entre el 15–35% del nitrógeno total, y entre el 30–60% del total de proteínas solubles de la planta (Hirel & Gallais, 2006). Por lo tanto, esta enzima se transforma en una gran fuente de nitrógeno almacenado para su translocación hacia los órganos de reserva, sobre todo durante la senescencia (Hirel & Gallais, 2006). Se ha demostrado que la cantidad de RuBisCO aumenta con el aumento del contenido del nitrógeno foliar (salvo en hojas senescentes) y su síntesis se relaciona con el influjo de nitrógeno hacia las hojas durante la expansión foliar (Makino, 2003; Mae, 1997). Uno de los principales desafíos en pos de aumentar la eficiencia del uso del nitrógeno por las plantas es lograr el aumento en la relación entre la Rubisco y el nitrógeno foliar total (Irimashu *et al.*, 2001). El cultivo debe entonces tener una gran capacidad para tomar y almacenar suficientes compuestos nitrogenados en las hojas, mantener sus sistemas fotosintéticos sin limitaciones, producir biomasa y, finalmente producir granos.

Según se pudo evidenciar durante el trabajo realizado en esta tesis, la co-inoculación de las plantas de soja con *B. elkanii* y *Delftia* sp. JD2 aumentó el contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas, lo que probablemente le confiere una mayor capacidad de recolección de luz y una mejora en la capacidad para realizar fotosíntesis, en relación a las plantas inoculadas solo con bradyrizobios.

Además, es posible que estas plantas puedan utilizar y convertir la luz de manera más eficiente, reduciendo los posibles riesgos del daño oxidativo mediante el aumento en el contenido de carotenoides, tal como se describió en el punto 4.2.1.

Los fotosintatos generados en las hojas se transportan a los nódulos a través del floema bajo la forma de sacarosa, la cual se pone a disposición de los bacteroides como fuente de energía para llevar adelante la FBN (Crawford *et al.*, 2000). Se espera entonces que la mayor capacidad fotosintética de las plantas co-inoculadas genere un mayor aporte de carbono a los nódulos y por tanto una fijación de nitrógeno más eficiente.

Por otro lado, la acumulación de daidzeína, genisteína, luteolina y coumestrol en las raíces de las plantas co-inoculadas (estadio V4), puede explicar la activación temprana de los genes *nod* y la subsiguiente nodulación temprana, así como un mayor número de nódulos por plantas observado en los ensayos *in vitro* y de invernáculo.

Durante la simbiosis soja-*Bradyrhizobium*, la genisteína y la daidzeína están presentes en los exudados radicales, actuando como moléculas quimioatrayentes (Caetano-Anollés *et al.*, 1988) e induciendo la expresión de los genes *nod* de *B. japonicum* (Cheng-Wu Liu & Murray, 2016) y *B. elkanii* (Peters & Long, 1988). Dado que la genisteína y la daidzeína son indispensables para el establecimiento de la simbiosis entre bradyrizobios y soja (Brechenmacher *et al.*, 2010), se esperaba un aumento en estos compuestos en las plantas inoculadas, tal como se observó en los resultados (Figura 4.2.). En estudios llevados a cabo por Couto *et al.* (2011), Brechenmacher *et al.* (2010) y Silva *et al.* (2013), trabajando con soja inoculada con *B. japonicum*, se encontraron aumentos en el contenido de alguno de estos dos flavonoides, en parte aérea, raíces y semillas, respectivamente. Sin embargo, no se debería descartar la contribución de otros flavonoides (Cheng-Wu Liu & Murray, 2016). Couto *et al.* (2011) por ejemplo, encontraron un aumento en el nivel de apigenina en las partes aéreas de plantas inoculadas con *B. japonicum*, respecto a las plantas no inoculadas. Como fue informado por Morel *et al.* (2015), *Delftia* sp. JD2 es capaz de inducir el aumento del contenido de luteolina en exudados de raíces de alfalfa cuando se co-inocula con *Sinorhizobium meliloti*. Aunque durante este trabajo de tesis no se analizó la presencia de flavonoides en exudados radicales, los resultados permiten proponer que en la planta de soja se produciría un efecto similar debido a la co-inoculación. Además, el resultado obtenido con las plantas inoculadas solo con JD2, en cuyos extractos radicales se detectaron todos los flavonoides reportados como compuestos claves en la simbiosis, sugiere nuevamente que JD2 podría actuar como una bacteria que ayuda a la planta a establecer una simbiosis más eficiente. Como consecuencia, cuando las plantas se co-inoculan el

contenido de los flavonoides en las raíces aumenta respecto a la inoculación simple. Esta acumulación de flavonoides, en caso de que sean secretados, podría llevar a la activación temprana de los genes *nod* y provocar una nodulación temprana e inducir la formación de un mayor número de nódulos por plantas, respecto a aquellas que sólo se inocularon con bradirizobios, tal como se mostró en los ensayos de nodulación expuestos en el Capítulo I.

El mayor contenido de compuestos fenólicos, en especial de isoflavonas, observado en las plantas inoculadas y co-inoculadas es de particular relevancia a nivel fisiológico, debido a que poseen actividad antioxidante. Durante la simbiosis se da una alta acumulación de especies reactivas de oxígeno debido a la fijación de nitrógeno y a la alta tasa fotosintética (Couto *et al.*, 2011). Tal como se mostró en el Capítulo II, la co-inoculación aumenta la capacidad fotosintética de la planta, lo que se traduce en un mayor crecimiento vegetal, y probablemente en un mayor contenido de compuestos antioxidantes (Chang *et al.*, 2009). La co-inoculación de soja con JD2 y bradyrizobios aparece entonces como una buena estrategia agrícola en pos de aumentar el contenido fenólico de esta planta de consumo humano, ya que su consumo se asocia a numerosos efectos beneficiosos sobre la salud (Kładna *et al.*, 2016; Waqas *et al.*, 2015; Jackman *et al.*, 2007; Pietta, 2000).

Subramanian *et al.* (2006) reportaron que las isoflavonas (genisteína y daizeína) actúan como precursores de fitoalexinas, compuestos de defensa que inhiben el crecimiento de varios microorganismos patógenos. Los niveles de flavonoides en raíces de plantas inoculadas con JD2 disminuyeron hasta su ausencia en el estadio R2. Estos resultados podrían indicar que la planta reconoce a *Delftia* sp. JD2 como socio beneficioso, tal como lo sugieren Juge *et al.* (2012) en su trabajo con *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* en asociación con plantas de soja, y como fue propuesto para JD2 previamente en el punto 4.2.2.1.

El nódulo, como órgano que aloja a los bacteriodes que realizan la FBN, se forma como respuesta de la producción de los Factores Nod por los rizobios. A su vez, los bradyrizobios producen Factores Nod luego de la detección de los flavonoides secretados por la planta hacia la rizosfera. En el orden cronológico de eventos, la producción y secreción de flavonoides es anterior a la formación del nódulo y probablemente no sean compuestos relevantes para el nódulo una vez que el mismo está establecido y funcionando. En esta situación, es posible que estos flavonoides ya hayan sido excretados o degradados por la planta para su uso como fuente de carbono. En la zona de FBN, donde los niveles de nitrógeno son elevados, es baja la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de flavonoides (Liu & Murray, 2016). Por otro lado, la ausencia de flavonoides en el nódulo (recordar el punto 4.2.2.2) puede deberse a que la expresión de los genes de la planta

relacionados a la biosíntesis de flavonoides es más alta en el ápice de la raíz, donde los niveles de nitrógeno son bajos. El nódulo, al ser un órgano tan especializado, es posible también que tenga totalmente apagada la expresión de los genes relacionados a la síntesis de flavonoides y dedique toda su maquinaria a la producción de otros compuestos más relevantes desde el punto de vista energético. Por lo tanto, es importante determinar también el contenido de compuestos carbonados y nitrogenados en los nódulos, pero este estudio también se extendió a otras partes de la planta.

No se distinguieron patrones o perfiles de ácidos grasos insaturados o de cadena corta entre los diferentes tratamientos, aunque sí resalta la presencia del ácido caproico (C6:0) en raíces de plantas co-inoculadas. Este tipo de ácidos grasos se ha relacionado con la fluidez de membrana. Su presencia puede estar indicando la existencia de cambios en la membrana celular, necesarios para la colonización bacteriana, por ejemplo de soja por *Bradyrhizobium* (Brechenmacher *et al.*, 2010). El mismo resultado se obtuvo en los estudios previos realizados en exudados radicales de alfalfa: la presencia del ácido caproico en exudados de 15 días de plantas co-inoculadas con JD2 y *S. meliloti* U143 (Morel *et al.*, 2015).

Existen varios ácidos grasos tanto de plantas terrestres como acuáticas que son inhibitorios de crecimiento vegetal. Se pueden citar entre otros los ácidos linoleico, mirístico, palmítico, láurico e hidroxiesteárico. Su rol en alelopatía no está completamente investigado. Algunos de ellos, como el láurico y el mirístico solo se detectaron en las raíces de las plantas control. El ácido láurico posee propiedades antifúngicas y su ausencia en las raíces de plantas inoculadas y co-inoculadas puede reflejar una disminución de la respuesta de defensa de la soja frente a las bacterias inoculadas (Walters *et al.*, 2003). Por otro lado, durante la transducción de señales, diversas proteínas son N – miristiladas. La ausencia de ácido mirístico en las raíces inoculadas y co-inoculadas, puede sugerir una disminución de la N-miristilación de las proteínas, lo que podría tener un efecto sobre los procesos de señalización celular durante la interacción simbiótica (Brechenmacher *et al.*, 2010).

Se ha informado que el ácido α -linolénico posee actividad antifúngica (Brechenmacher *et al.*, 2010). La acumulación de α -linolénico en las plantas co-inoculadas puede ser un indicador de una respuesta de defensa de estas plantas. Estos tipos de ácidos grasos también juegan un papel en la respuesta de la planta a las tensiones abióticas, incluyendo el frío y el calor (Conconi *et al.*, 1996 ; Matsuda e Iba, 2005). El ácido linolénico es un precursor del ácido jasmónico, y se ha informado que la incubación de *B. japonicum* con jasmonato o metil jasmonato induce la expresión de los genes *nod* y mejorara la nodulación y la fijación de nitrógeno (Mabood & Smith, 2005).

La relación simbiótica entre los rizobios y las leguminosas implica un gran aporte de esqueletos carbonados y energía por parte de la planta para mantener el crecimiento y la actividad de los bacteroides (Couto *et al.*, 2011). Según Kaschuk *et al.* (2009), los simbioses aumentan la tasa fotosintética de la planta en un 28% cuando se la compara con la tasa en plantas no fertilizadas ni inoculadas. De esta forma, compensan el costo carbonado de su convivencia. Cuando la leguminosa se co-inocula con rizobios y micorrizas arbusculares la tasa fotosintética aumenta un 51% (Kaschuk *et al.*, 2009). Las plantas co-inoculadas aumentarían su tasa respiratoria para obtener así más energía, debido posiblemente a la mayor nodulación. La mayor tasa fotosintética permite que haya más esqueletos carbonados para transferir hacia otras rutas metabólicas como la síntesis de flavonoides, llevando a un aumento en su producción. Para sostener la actividad de la nitrogenasa y el crecimiento de los simbioses, es necesario el suministro de carbono por parte de la planta a los bacteroides. Esta fuente de carbono deriva principalmente de la sacarosa que se transporta desde las hojas, a través del floema, hasta los nódulos (Clarke *et al.*, 2014). Sin embargo, las raíces inoculadas de soja acumularon elevados niveles de inositol, arabinosa y glucosa durante los estadios vegetativos. Posiblemente estos azúcares solubles constituyeron la fuente principal de carbono para sostener la simbiosis. Los fotoasimilados que proporciona la planta se metabolizan en los bacteroides para generar ATP. Se ha visto que en nódulos de soja, las células no infectadas acumulan activamente azúcares y los convierten en ácidos orgánicos, que luego pueden liberarse al apoplasto (Kavroulakis *et al.*, 2000).

6. CONCLUSIONES

En su conjunto, los resultados de esta tesis muestran que la co-inoculación con bradyrizobios y JD2 cambia el metabolismo primario y secundario de la soja (*Figura 4.4.*). Los datos sugieren que JD2 puede ser utilizado, junto a los bradyrizobios, para manipular la composición química de los tejidos vegetales, promoviendo los beneficios nutricionales y la salud de la leguminosa en estudio. Esto se suma a la contribución de una mayor producción de biomasa e índice de cosecha de grano de soja (*Figura 4.4.*), con el concomitante beneficio para la economía agrícola. El uso de *Delftia* sp. JD2 como PGPR para aumentar los rendimientos favorece además al medio ambiente, en especial a los recursos suelo y agua, si su uso lleva a disminuir el uso de fitoquímicos en los cultivos.

7. PERSPECTIVAS

Las perspectivas de trabajos futuros se orientan en cuatro direcciones que se describen a continuación.

i) Desde el punto de vista de la *FBN*, proponemos realizar estudios relativos a la cuantificación de la FBN en plantas co-inoculadas. Para ello sería conveniente realizar ensayos de reducción de acetileno sobre nódulos de plantas co-inoculadas, y así poder relacionar su tasa de FBN con el efecto promotor observado en las plantas co-inoculadas.

ii) A nivel de *promoción del crecimiento vegetal*, es fundamental repetir los ensayos en plantas en condiciones agronómicas. Este es un requisito imprescindible para corroborar el efecto de JD2 sobre la simbiosis soja-bradyrizobios y el rendimiento del cultivo.

iii) Desde el punto de vista *metabólico*

* Sería fundamental completar los análisis de perfiles de metabolitos en raíces, hojas y nódulos.

Este punto incluiría la cuantificación de flavonoides empleando un patrón interno y un patrón externo, algo que por problemas técnicos no se pudo completar durante este trabajo. Este procedimiento implica nuevas extracciones orgánicas en los tejidos, utilizando el patrón interno en el proceso de extracción y la realización de curvas de calibración empleando el compuesto patrón externo.

Es conveniente además, repetir los análisis empleando otra técnica analítica, en especial la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Esta herramienta podría contribuir a resolver los problemas de identificación y cuantificación de los compuestos presentes en los extractos. Además es una técnica que proporciona una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo. Sería necesario entonces, poner a punto la técnica de detección y cuantificación de compuestos fenólicos entre otros por LC-MS.

- * Otros metabolitos para cuantificar, importantes para el crecimiento vegetal, son las fitohormonas, principalmente el ácido 3-indol acético, especialmente relevante para JD2 que puede sintetizarlo. La cuantificación de fitohormonas permitirá relacionar su producción, tanto microbiana como vegetal, con los resultados obtenidos en plantas.

- * Igualmente interesante será estudiar las señales secretadas hacia la rizosfera durante el proceso de comunicación molecular planta – microorganismo. Para ello es necesario obtener los exudados radicales de soja co-inoculada mediante, por ejemplo, experimentos hidropónicos, tal cual se realizara previamente en alfalfa. Los sistemas hidropónicos permitirían además determinar y cuantificar mediante LC-MS y/o GC-MS, los metabolitos implicados en el diálogo durante los primeros días de la interacción.

- * Otro punto que sería interesante realizar es el análisis de los metabolitos presentes en granos, principalmente la cantidad y composición de ácidos grasos. Esto permitirá conocer la calidad de grano producido y su contenido nutricional.

iv) A nivel de *cepa*, sería interesante realizar estudios de toxicología y eco-toxicología sobre *Delftia* sp. JD2. Estos estudios permitirán conocer un poco más el potencial de este microorganismo para uso como inoculante.

8. EPÍLOGO: Una serie de eventos desafortunados

Como dice Susana, “aprendemos más de los errores o problemas que de los aciertos”, y esta tesis estuvo repleta de problemas que hubo que superar y de los cuales se aprendió mucho. Quizás sea interesante plasmar algunos de los aprendizajes adquiridos, sobre todo los relacionados con aspectos técnicos, y plantear cómo detectar los problemas y como solucionarlos.

El trabajo con plantas es difícil, y aunque es inmensamente gratificante ver crecer tus plantas verdes y saludables, el trabajo en invernáculo es muchas veces frustrante. Encontrarte que las plantas se infectaron no solo con cochinilla o pulgones o trips sino también oidio, puede poner a prueba tu tolerancia y llevarte a la frustración. Saber que debes descartar todo tu ensayo, el cual llevó semanas armar e implicó además un gran esfuerzo físico y gasto de materiales, así como esperar meses para tomar las muestras y no poder hacerlo, es realmente desalentador. De ahí aprendes que debes cuidar que cuando otros usuarios (y nosotros mismos) traen plantas desde el campo, no las dejen almacenadas en el invernáculo, ya que éstas pueden estar contaminadas. La forma de deshacerte del hongo oídio una vez que infectó la planta es deshacerte del ensayo por completo. El odio es un patógeno común de soja en campo, y se intenta prevenir su infección antes de que ataque a la planta. En nuestro caso, la infección por este patógeno la detectamos una vez que aparecieron los síntomas, es decir “demasiado tarde”. Intentamos combatir este patógeno, en primera instancia fumigando las plantas con Bifentrin al 10%. Esto no dio resultado así que como segundo intento se usó una solución de leche descremada al 30% con 20 g/l de bicarbonato de sodio, como fue recomendado por algunos agrónomos consultados. Este tratamiento es preventivo, así que no se consiguió detener la infección. En cuestión de días el ensayo entero, de 240 macetas, estaba totalmente infectado, y por lo tanto, perdido. Más allá de todo, éste no era el final del problema. El oídio es muy difícil de combatir, las condiciones de temperatura y humedad del invernáculo son propicias para el crecimiento de este hongo. A pesar de que retiramos todas las plantas contaminadas, el oídio seguía allí, en cada rincón del invernáculo. Como solución definitiva se desalojó todo el recinto y se fumigó cada rincón con el esporicida Sporekill. Finalmente, se realizó una segunda fumigación con el producto. Luego de una semana desde la segunda aplicación, el invernáculo estaba en condiciones para volver a utilizarse. Una vez más, debimos comenzar a preparar el sustrato (1320 kg de mezcla arena:tierra:vermiculita), tarea que se realizaba por cuarta vez y que lleva aproximadamente 60 horas de trabajo por persona.

No menos desafiante fue el trabajo con el GC-MS. Enfrentarte a un equipo de este porte tan solo con conocimientos básicos de cromatografía no es trivial. Uno cree que estas máquinas todo lo pueden y todo lo resuelven, que uno inyecta la muestra y sin más, se obtienen los resultados. Sin embargo, una vez que nos enfrentamos a él nos dimos cuenta que esto sería un largo camino. Nunca imaginamos que tan largo. No solo porque es abrumador el análisis cromatográfico de muestras complejas, sino porque algunos obstáculos no previstos se presentaron para complicar la situación aún más.

En el transcurso de algunos experimentos se detectó la aparición de picos muy abundantes correspondientes a lo que serían azúcares. Estos en realidad no provenían de las muestras inyectadas, sino que eran polímeros de la fase estacionaria detectados como resultado del “sangrado de la columna”. El “sangrado o activación de la columna” consiste en la degradación normal del polímero de la fase estacionaria, es decir pérdida de fase estacionaria, y que se produce debido al uso prolongado de la columna. La posible contaminación y activación de la columna no sólo contribuye significativamente al ruido, sino que también incide sobre la variación de los tiempos de retención de los compuestos efectivamente presentes en las muestras. Por lo tanto, cuando se detecta el “sangrado” es necesario cambiar la columna, ya que para técnicas analíticas como GC-MS es esencial que el “sangrado” sea minimizado. El problema se solucionó comprando una nueva columna. Eso implicó dinero (el costo varía entre 800 y 1000 USD) y algunos meses de espera por la importación.

Ya trabajando con la nueva columna dejamos sorpresivamente de detectar los iones correspondientes a los flavonoides, incluyendo los de la solución estándar. ¿Qué podía estar pasando? ¿Las nuevas muestras no tenían flavonoides? ¿Se había degradado el estándar? La inyección de muestras en las que ya se había observado la presencia de flavonoides con la vieja columna, sugirió que el equipo no los estaba detectando con la nueva columna. En algunos casos aparecía un pico correspondiente a la genisteína, pero no era la genisteína sililada, es decir derivatizada. ¿Sería entonces que el derivatizante comercial no estaba funcionando bien? Se analizó a continuación un estándar derivatizado con un derivatizante que se sabía estaba en buenas condiciones. El problema persistió. Entonces, ¿por qué no se derivatizaba? Este problema coincidió con la finalización de una botella de DMS que presentaba una tapa de goma precintada. La extracción del solvente de esa botella se realizaba con aguja y jeringa, evitando o minimizando la hidratación del solvente. Si el solvente que contiene a la muestra está hidratado, la derivatización completa de los compuestos no funcionará, ya que se pierde la sililación por hidrólisis. La nueva botella de DMF utilizada no tenía tapa de goma, y seguramente el solvente se hidrataba apenas se

abría la misma. ¿Sería entonces que el solvente utilizado para la sililación estaba hidratado? Empleamos sulfato de sodio anhidro (una punta de espátula) para detectar una posible hidratación del solvente. La precipitación y formación de agregados de la sal en el fondo del tubo confirmó su hidratación. Afortunadamente habíamos realizado una nueva compra de DMS: el mismo código, el mismo proveedor, que la botella primera. Finalmente el problema se solucionó comprando una nueva botella precintada que implicó nuevamente dinero y, más importante a esta altura, algunos meses de espera por la importación. En síntesis: ¡cuidado con usar solventes hidratados en el GC!, este es uno de los problemas más comunes en cromatografía gaseosa. Además, es de suma importancia en este tipo de técnicas utilizar siempre una jeringa nueva para evitar la contaminación de los reactivos.

Parecía un final feliz. Hasta que se acabó el gas *carrier*, el helio. No es conveniente utilizar la última porción del tanque de gas, ya que ésta contiene las impurezas acumuladas, por lo que es importante reemplazar el tanque de gas antes de que se acabe por completo. Para ello, es importante controlar el volumen del gas durante el experimento, dado que no siempre es fácil conseguir el gas de inmediato. La importación del mismo llevó, una vez más, mucho tiempo.

Una vez que el equipo estaba en condiciones para su uso (columna nueva, solvente anhidro, tanque de helio repleto) retomamos los experimentos y comenzamos a inyectar muestras. El desafío ahora era hacer las curvas de calibración con los compuestos patrón interno y externo. Un nuevo obstáculo se nos presentó a la hora de diferenciar el patrón interno del externo. Ambos compuestos patrón co-eluyeron, lo que puede conducir a la identificación y cuantificación incorrecta de los analitos correspondientes. La forma de diferenciar estos compuestos es empleando el perfil de iones correspondientes a la fragmentación de cada compuesto. Esto no resultó nada fácil, ya que ambos compuestos patrón compartían el ión más abundante. Una solución era utilizar el ión molecular de cada uno. Otra solución era emplear otro ión presentes en los perfiles, que no fuera compartido entre ambos compuestos. Una vez decidido que ion o iones se emplearían para la identificación y cuantificación inequívoca de cada uno, comenzamos a detectar problemas con la reproducibilidad de los resultados. Al repetir un punto de la curva de calibración varias veces (¡hasta 10 veces!), el resultado variaba una enormidad. Es importante tener en cuenta que cuando se trabaja con concentraciones menores a 1 ppm se acepta un error igual o menor a 15%, mientras que para concentraciones mayores a 1ppm se acepta menos de 5% de error. Esto de acuerdo al ex técnico de la plataforma del GC-MS (Manuel Minteguiaga), que sin ser técnico ya, sin estar en el país y sin esperar nada a cambio, estuvo presente vía virtual con sus soluciones. En nuestro caso, no logramos obtener una curva de calibración adecuada, ya que el desvío estándar obtenido con los valores de

cada repetición de la curva superaba el 20%. Entonces ¿cuál era el problema? Las respuestas podían ser varias: el método cromatográfico empleado no es el más conveniente para flavonoides; el estándar interno deuterado no se está fragmentando del mismo modo que el estándar externo (genisteína sin deuterar); el estándar deuterado es inestable; entre otros. Pero quizás la más clara de todas era: “la fuente de ionización está sucia”. Chequeando entre los parámetros medidos por el equipo, referentes a su funcionamiento, notamos que las horas de uso de la fuente de ionización habían llegado a su límite (1500 h). Es de suma importancia que la fuente se limpie en tiempo y forma, ya que el uso prolongado de la fuente en mal estado deteriora el detector, y eso si puede ser un problema grave y mucho más costoso, y que debe resolver el servicio técnico del equipo. Probablemente este problema sea el resultado de la falta de mantenimiento en el equipo y de la falta de un técnico/persona capacitada al respecto que se encargue del mismo.

Es importante conocer el problema que se nos presenta, ver qué posibilidades de solución existen, cuáles están a nuestro alcance y cuáles no. Cuales obstáculos podemos hacer a un lado para continuar el trabajo, y cuando debemos detenernos y reformular nuestras preguntas.

Durante esta tesis nos hemos acercado, al menos en parte, al “arte cromatográfico”, y parece imperativo destacar algunos puntos claves a la hora de trabajar con este tipo de técnicas.

A pesar de su robustez, su inmensa fortaleza analítica y la confiabilidad con la que se destaca la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es importante tener claro sus alcances y también sus limitaciones. Sus principales limitaciones estarán dadas en gran parte por el tipo de muestra que pretendamos analizar (peso molecular, volatilidad, termoestabilidad y polaridad de sus componentes). El uso adecuado del equipamiento y el correcto mantenimiento del mismo será tan importante como el uso adecuado de la técnica.

El camino es largo pero no imposible.

9. ANEXO

Composición de medios de cultivo y solución buffer

Medio Jensen	*Solución Micronutrientes	Medio TY alto Ca
CaHPO ₄ -----1 g	H ₃ BO ₃ ----- 0,2 g	Tryptona ----- 5 g
K ₂ HPO ₄ (anh. 5%)-----4 mL	MnSO ₄ .H ₂ O ----- 0,15 g	YE *-----3 g
MgSO ₄ (anh. 5%)-----2 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O ----- 0,02 g	CaCl ₂ 2,5%-----7 mL
NaCl (anh. 1%)-----20 mL	MoO ₄ .H ₂ O ----- 0,008 g	H ₂ O c.s.p -----1000 mL
FeCl ₃ (6 H ₂ O 3,4%)-----5 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O ----- 0,008 g	
H ₂ O dest -----1000 mL	c.s.p-----100 mL	*extracto de levadura
* Soluc. Micronut-----1mL/L		
pH 7		
Agar-----0,8%		

Buffer Fosfato

Solución Stock

A: Solución NaH₂PO₄.H₂O 0,2 M (27,8g en 1000 mL)

B: Solución Na₂HPO₄.7H₂O 0,2 M (53,63g en 1000mL)

pH 7 : 39,0 mL sol.A + 61,0 mL sol.B en un total de 200mL

10. BIBLIOGRAFÍA

Antunes PM, de Varennes A, Rajcan I, Goss MJ. 2006. Accumulation of specific *flavonoids* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a function of the early *tripartite* symbiosis with *arbuscular mycorrhizal fungi* and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. *Soil Biol & Biochem.*38: 1234–1242

Arbona V, Manzi M, Ollas CD, Gómez-Cadenas A. 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Inter. J. Mol. Sci.* 14(3): 4885-4911

Ardley JK, Reeve WG, O'Hara GW, Yates RJ, Dilworth MJ, Howieson JG. 2013. Nodule morphology, symbiotic specificity and association with unusual rhizobia are distinguishing features of the genus *Listia* within the southern African crotonarioid clade *Lotononis s.l.*, *Ann. Bot.* 112(1): 1–15

Ariel F, Brault-Hernandez M, Laffont C, Huault E, Brault M, Plet J, Moison M, Blanchet S, Ichanté JL, Chabaud M, Carrere S, Crespi M, Chan RL, Frugier F. 2012. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 24:3838–3852

Arnon D. 1949. Copper enzymes isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM .2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–266

Bapaume L, and Reinhardt D. 2012. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front. Plant sci.* 3

Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, and Azcon-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417):1761-1778

Barsch A, Carvalho HG, Cullimore J V, Niehaus K. 2006. GC–MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules. *J. Biotechnol.* 127(1):79-83

Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol.Biotechnol.*84:11-18

Bergersen FJ, Peoples MB, Turner GL. 1991. A role for poly- β -hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 245 59-64

Bhattacharjee RB, Singh A, & Mukhopadhyay SN. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *App. Microbial. Biotechnol.* 80(2):199-209

Biswas JC, Ladha JK, & Dazzo FB. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. 1644-165

- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:874–880
- Bomfeti CA, Florentino LA, Guimarães AP, Gomes Cardoso P, Guerreiro MC, de Souza Moreira FM. 2011. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of Leguminosae. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 35:657–671
- Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky MJ, Sumner LM, Stacey G. 2010. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* 153: 1808–1822
- Brown SB, Houghton JD & Hendry GAF. 1991. Chlorophyll breakdown. In Scheer H. (Ed.) *Chlorophyll*, pp. 465–89
- Burd GI, Dixon DG, & Glick BR. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canad. J. Microbiol.* 46(3): 237-245
- Burdman S, Kigel J, Okon Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29(5-6): 923-929
- Busheva M, Garab G, Liker E, Toth Z, Szèll M, Nagy F. 1991. Diurnal fluctuations in the content and functional properties of the light harvesting chlorophyll a/b complex in thylakoid membranes correlation with the diurnal rhythm of the mRNA level. *Plant Physiol.* 95(4): 997-1003
- Camacho M, Santamaria C, Temprano F, Rodriguez-Navarro DN, Daza A. 2001. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Canad. J. Microbiol.* 47(11): 1058-1062
- Campos BC, Hungria M & Tedesco B. 2001. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. *R. Bras. Ci. Solo.* 25:583-592
- Careri M, Elviri L, Mangia A. 2001. Liquid chromatography–UV determination and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. *J. Chromatogr. A.* 935: 249-257
- Carvalho HG & Cullimore JV. 2003. Regulation of glutamine synthetase isoenzymes and genes in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 157-175
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol.* 45:28–35
- Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G, & Okon Y. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS microbiology letters.* 209(1):119-125

- Cesco S, Mimmo T, Tonon G, Tomasi N, Pinton R, Terzano R, Neumann G, Weisskopf L, Renella G, Landi L, Nannipieri P. 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A. Review. Biol. Fertil. Soils
- Chang C, Damiani I, Puppo A & Frendo P. 2009. Redox changes during the legume–rhizobium symbiosis. Mol. Plant. 2(3):370–377
- Charlton AJ, Donarski, JA, Harrison, M, SA Jones, GodwardSarah J, Oehlschlager S, Arques JL, Ambrose M, Chinoy C, Mullineaux PM, Domoney C.2008. Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Metabol. 4:312-327
- Chen WM, Lin YS, Sheu DS, & Sheu SY. 2012. *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond. Int. J. System. Evol. Microbial. 62(10):2315-2321
- Choudhury NK, Behera RK. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. Photosynthet. 39(4): 481–488
- Clarke VC, Loughlin PC, Day DA, Smith PMC. 2014. Transport processes of the legume symbiosome membrane. Front. Plant Sci. 5:699
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, & Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71(9): 4951-4959
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA. 1996. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. Plant Physiol. 111(3):797-803
- Cooper JE. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Adv Bot Res. 41: 1 – 62
- Copeland L, Morell M. 1985. Hexose kinases from the plant cytosolic fraction of soybean nodules. Plant Physiol. 79(1):114-117
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J & Moënné-Loccoz Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. Lett. Appl. Microbiol. 48, 505–512
- Couto C, Silva LR, Valentão P, Velázquez E, Peix A & Andrade PB. 2011. Effects induced by the nodulation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* (soybean) metabolism and antioxidant potential. Food Chem.127: 1487–1495
- Dardanelli MS, Fernández de Córdoba FJ, Espuny MR, Rodríguez Carvajal MA, Soria Díaz ME, Gil Serrano AM, Okon Y and Megías, M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculation with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. Soil Biol. Biochem. 40:2713-2721

- Dazzo FB, Yanni YG, Rizk R, De Bruijn FJ, Rademaker J, Squartini A, Aand Biswas JC. 2000. Progress in multinational collaborative studies on the beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice. The quest for nitrogen fixation in rice. 167-189
- Desbrosses GG, Kopka J, Udvardi M K. 2005. *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. Plant Physiol. 137(4):1302-1318
- Dey RK, Pal KK, Bhatt DM, & Chauhan SM. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 159(4): 371-394
- Dhanapal AP, Ray JD, Singh SK, Hoyos-Villegas V, Smith JR, Purcell LC & Fritschi FB. 2016. Genome-wide association mapping of soybean chlorophyll traits based on canopy spectral reflectance and leaf extracts. BMC Plant Biol. 16:174
- Ding Y, & Oldroyd GE. 2009. Positioning the nodule, the hormone dictum. Plant Signal. & Behav. 4(2): 89-93
- Doerfler H, Lyon D, Nägele T, Sun X, Fragner L, Hadacek F, Egelhofer V, Weckwerth W. 2013. Granger causality in integrated GC-MS and LC-MS metabolomics data reveals the interface of primary and secondary metabolism. Metabolomics. 9:564-574
- Drogue B, Combes-Meynet E, Moënné-Loccoz Y, Wisniewski-Dyé F and Prigent-Combaret C. 2013. Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signals. Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere (ed F. J. de Bruijn). (1-2): 281-294
- Drogue B, Dore H, Borland S, Wisniewski-Dyé F & Prigent-Combaret C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? Res. Microbiol. 163:500-510
- Dubois F, Tercé-Laforgue T, Gonzalez-Moro MB, Estavillo JM, Sangwan R, Gallais A, Hirel B. 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? Plant Physiol. Biochem. 41(6):565-576
- Espinosa-Urgel M. 2004. Plant-associated *Pseudomonas* populations: Molecular Biology, DNA dynamics and gene transfer. Plasmid. 52:139-150
- Etesami H, Ali Alikhani H, Ali Akbari A. 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils Rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. World Appl. Sci. J. 6:1576-1584
- Fallik E, Okon Y, Epstein E, Goldman A, & Fischer M. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. Soil Biol. Biochem. 21(1):147-153
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. J. Integrat. Plant Biol. 52(1): 61-76

- Figuerola JA, Castro SA, Marquet PA, & Jaksic FM. 2004. Exotic plant invasions to the mediterranean region of Chile: causes, history and impacts. *Revista Chilena de Historia Natural*. 77:465-483
- Fisher RF, Long SR. 1992. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*. 357: 655-660
- Fischer S, Miguel M, Mori G. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:53–62
- Franche C, Lindström K, Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 321:35–59
- Gamalero E, Lingua G, Capri FG, Fusconi A, Berta G, Lemanceau P. 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microb. Ecol.* 48:79–87
- Gemperline, E., Jayaraman, D., Maeda, J., Ané, J.-M., & Li, L. 2015. Multifaceted investigation of metabolites during nitrogen fixation in medicago via high resolution MALDI-MS imaging and ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26(1):149–158
- German MA, Burdman S, Okon Y, Kigel J. 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biol. Fertil. Soils*. 32(3): 259-264
- Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:346–352
- Gibson KE, Kobayashi H, & Walker GC. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Ann. Rev. Genet.* 42: 413-441
- Glick BR. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica.
- Glinski M, Weckwerth W. 2006. The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spectrom. Rev.* 25:173 – 214
- Gray EJ & Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37:395–412
- Grob K. 2003. Split and Splitless injection for quantitative gas chromatography. Concepts, processes, practical, guidelines, sources off error. Wiley –VCH, 4th Ed. Germa. 393-396
- Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RK, Fraser PD, Bramley PM. 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/ MS/MS. *J. Exp. Bot.* 56: 219–243

- Hammer O, Harper D & Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistic software package foreducation and data analysis. *Paleo Electronica*. 4:1-9
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:66-76
- Hayat R; Ali S; Amara U; Khalid R; Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60:579–598
- Hendry GAF & Price AH.1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F. and Grime J.P. (Eds.) *Methods in comparative plant ecology*. Chapman & Hall, London. 148-152p.
- Hernández GR. 2002. Nutrición mineral en plantas. Universidad de los Andes-Mérida - Venezuela. Disponible: <http://www.forest.ulla.ve/rubenhg/nutricionmineral/>
- Hirel B & Gallais A. 2006. Rubisco synthesis, turnover and degradation: some new thoughts on an old problem. *New Phytologist*. 169:443–445
- Hirsch AM & Fujishige NA. 2012. Molecular signals and receptors: communication between nitrogen-fixing bacteria and their plant hosts. In *Biocommunication of Plants* (pp. 255-280). Springer Berlin Heidelberg
- Hungria M, Araujo RS. 1994. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa
- Itzigsohn R, Kapulnik Y, Okon Y & Dovrat A. 1993. Physiological and morphological aspects of interaction between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. *Can J. Microbiol.* 39:610-615
- Jackman KA, Woodman OL, Sobey CG.2007. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights.*Curr Med Chem*. 14(26):2824-30
- Johnson EA, Rossman GR. 2003. The concentration and speciation of hydrogen in feldspars using FTIR and ¹H MAS NMR spectroscopy. *Americ. Mineral.* 88(5-6):901-911
- Jørgensen NO, Brandt KK, Nybroe O, & Hansen M. 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int. J. System. Evol. Microbial.* 59(9): 2195-2199
- Juge C, Prévost D, Bertrand A, Bipfubusa M, Chalifour FP. 2012. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *App. soil Ecol.* 61:147-157
- Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungria M, KE Giller. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol & Biochem.* 41:1233–1244

- Kavroulakis N, Flemetakis E, Aivalakis G & Katinakis P. 2000. Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Mol. Plant Micro. Inter.* 13(1):14-22
- Kennedy AC, & Smith KL. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In *The significance and regulation of soil biodiversity* (pp. 75-86). Springer Netherlands.
- Khakipour N, Khavazi K, Mojallali H, Pazira E, Asadirahmani H. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent Pseudomonads. *Am. Eurasian. J. Agric. Environ. Sci.* 4:687-692
- Khalid A, Sultana S, Arshad M, Mahmood S, Mahmood T, Tariq Siddique M. 2011. Performance of auxin producing rhizobacteria for improving growth and yield of wheat and rice grown in rotation under field conditions. *Int. J. Agric. Appl. Sci.* 3:44-50
- Kladna A, Berczyński P, Kruk I, Piechowska T, & Aboul-Enein HY. 2016. Studies on the antioxidant properties of some phytoestrogens. *Luminescence.* 31:1201-1206
- Kloepper JW, Schroth MN. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Angers, France.* 879-882
- Koester RP, J Skoneczka JA, Cary TR, Diers BW, Ainsworth EA. 2014. Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. *J. Exp. Bot.* 65(12): 3311-3321
- Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7428-7432
- Kumar R, Bohra A, Pandey AK, Pandey MK, Kumar A. *Metabolomics for Plant Improvement: Status and Prospects.* *Front. Plant Sci.* 8:1302
- Kyungseok P, Kloepper J, Ryu C. 2008. Rhizobacterial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *J Microbiol. Biotechnol.* 18:1095-1100
- Labandera C. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En Izaguirre - Mayoral ML. ed., Labandera C ed., Sanjuán J. ed. *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica científica y empresarial.* Montevideo, Cooperación Iberoamericana CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo - MGAP. 75-78
- Li CT, Yan ZF, Chu X, Hussain F, Xian WD, Yunus Z, & Li WJ. 2015. *Delftia deserti* sp. nov., isolated from a desert soil sample. *Ant. van Leeuwenhoek,* 107(6): 1445-1450
- Lim J, Kim S. 2009. Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *J Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52:531-538
- Liu CW & Murray JD. 2016. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants.* 5(3): 33

- Lodwig E & Poole P. 2003. Metabolism of Rhizobium Bacteroids. Crit. Reviews Plant Sci. 22(1): 37-78
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, JA Downie & Poole PS. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis. Nature. 422: 722-726
- Lopez-Bucio J, Campos-Cuevas J, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez L, Valencia-Cantero E. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Microb. Inter. 20:207–217
- Lorkiewicz, Z. 1997. Nodulation genes in the Rhizobium-plant signal exchange. Acta Biochim. polonica-english ed. 44:1-12
- Lugtenberg B & Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63:541–55
- Mabood F & Smith DL. 2005. Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. Physiol. Plant. 125: 311–323
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson CW, James EK and Stougaard J. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. Nat. Commun. 1:10
- Mae T. 1997. Physiological nitrogen efficiency in rice: Nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. Plant and Soil. 1996:201-210
- Makino A. 2003. Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and plant growth. Soil Sci. Plant Nutr. 49 (3):319-327
- Mandal SM, Chakraborty D, & Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Plant Signal. Behav. 5(4): 359-368
- Marek-Kozaczuk M, Kopcińska J, Lotocka B, Golinowski W, Skorupska A. 2000. Infection of clover by plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* studied by mTn5-gusA. A. Van Leeuwenhoek. 78(1):1-11
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, y Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann. Bot. 105 (7), 1141-1157
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? Trends Microbiol. 17:458–466
- Matsuda O & Iba K. 2005. Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. Plant Biotechn. 22(5):423-430

- Matsuura H, Aoi A, Satou C, Nakaya M, Masuta C, Nabeta K. 2009. Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regul.* 57: 293
- Mattiello L, Riaño-Pachón DM, Camara Mattos Martins M, Prado da Cruz L, Bassi D, Ribeiro Marchiori PD, Vasconcelos Ribeiro R, Veneziano Labate MT, Labate C & Menossi M. 2015. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. *BMC Plant Biology.* 15:300
- Morel M, Iriarte A, Jara E, Musto H & Castro-Sowinski S. 2016. Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioengineering.* 3(2):156-175
- Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli M, and Castro-Sowinski S. 2015. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An interaction that improves plant yield. *Mol. Plant Microb. Inter.* 28(2): 134–142
- Morel MA & Castro-Sowinski S. 2013. The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction. In: *Plant M. Symbio.* Naveen Arora (Ed). Springer. 169-199
- Morel MA, Braña V, & Castro-Sowinski S. 2012. Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production. *Plant Crop*, Aakash Goyal (Ed. Intech). 217-240
- Morel MA, Ubalde MC, Braña V, & Castro-Sowinski S. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI) reducing agent with plant growth promoting activity. *Arch.Microbiol.* 193: 63-68
- Mortier V, Holsters M, Goormachtig S. 2012. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ.* 35:245-58
- Mulley G, White JP, Karunakaran R, Prell J, Bourdes A, Bunnewell S, Poole PS. 2011. Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources. *Mol. Microbiol.* 80(1):149-167
- Okon Y. (Ed). 1994. *Azospirillum* /plant associations. CRC-Press, ISBN 0849349257, Boca Raton, FL, USA
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Ann. Rev. Genet.* 45:119-44
- Op den Camp R, De Mita S, Lillo A, Cao Q, Limpens E, Bisseling T, Geurts R. 2011. A phylogenetic strategy based on a legume-specific whole genome duplication yields symbiotic cytokinin type-A response regulators. *Plant Physiol.* 157:2013–2022
- Pandey MK, Roorkiwal M, Singh VK, Ramalingam A, Kudapa H, Thudi M. 2016. Emerging genomic tools for legume breeding: current status and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 7:455

- Paradisco R, Arena C, De Micco V, Giordano M, Aronne G, De Pascale S. 2017. Changes in leaf anatomical traits enhanced photosynthetic activity of soybean grown in hydroponics with plant growth-promoting microorganisms. *Front. Plant Sci.* 8:674
- Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 234:201-62
- Pélessier HC, Frerich A, Desimone M, Schumacher K & Tegeder M. 2004. PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiol.* 134(2):664-675
- Pérez – Amaro JA, García ME, Enriquez QJ, Quero CA, Pérez PJ, Hernández GA. 2004. Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto “mulato” (*Brachiaria híbrido*, cv). *Tecnología Pecuaria Mexicana.* 42(3):447-458.
- Trueba GP, Sanchez GM. 2001. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense.* 20(4): 297-306
- Perotti EB & Pidello A. 1999. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on urease activity in soil and gamma sterilized soil. *Rev. Argent. Microbiol.* 31: 36-41
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J.Nat. Prod.* 63 (7): 1035–1042
- Pinkard EA, Patel V, Mohammed C. 2006. Chlorophyll and nitrogen determination for plantation-grown *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* using a non-destructive meter. *For. Ecol. Manag.* 223(1):211-217
- Podile AR & Kishore KG. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. plant-associated bacteria. S.S Gnananickam ed. 195-230
- Pompelli MF, França SC, Carvalho Tigre R, Teixeira de Oliveira M, Sacilot M & Pereira EC. 2013. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. *R. bras. Bioci.* 11(1): 52-58
- Prell J, Poole P. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14:161-8
- Pueppke SG, Bolanos-Vasquez MC, Werner D, Bec-Ferte MP, Prome JC, Krishnan HB. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars mccall and peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol.* 117:599–608
- Qurashi AW, Sabri AN. 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Br. J. Microbiol.* 43(3):1183-1191
- Ralston-Hooper K, Hopf A, Oh C, Zhang X, Adamec J, Sepúlveda M. S. 2008. Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 88: 48–52

Ramos Solano B, Barriuso J, Gutierrez Mañero J. 2009. Biotechnology of the rhizosphere. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds) Recent advances in plant biotechnology. Springer, Dordrecht/New York, p 137

Redmond JW, Batley M, Djordjevic MA, Innes RW, Kuempel PL, Rolfe BG. 1986. Flavones inducen la expresión de genes de nodulación en *Rhizobium*. Nature. 323:632 – 634

Reeve W, van Berkum P, Ardley J, Tian R, Gollagher M, Marinova D, Elia P, Reddy T, Pillay M, Varghese N, Seshadri R, Ivanova N, Woyke T, Baeshen MN, Baeshen NA & Kyrpides N. 2017. High-quality permanent draft genome sequence of the *Bradyrhizobium elkanii* type strain USDA 76T, isolated from *Glycine max* (L.) Merr. Stdr. Genomic Sci.12:26

Reid DE, Li D, Ferguson BJ, Gresshoff PM. 2013. Structure-function analysis of the GmRIC1 signal peptide and CLE domain required for nodulation control in soybean. J Exp Bot. 64: 1575-85

Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM. 2011. Inoculation- and nitrate induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. Mol.Plant Micro.Inter. 24: 606-18

Richardson AD, Berlyn GP. 2002. Changes in foliar spectral reflectance and chlorophyll fluorescence of four temperate species following branch cutting. Tree Physiol. 22(7): 499-506

Ripullone F, Grassi G, Lauteri M, Borghetti, M. 2003. Photosynthesis–nitrogen relationships: interpretation of different patterns between *Pseudotsuga menziesii* and *Populus* × *euroamericana* in a mini-stand experiment. Tree Physiol. 23(2): 137-144

Ricoult C, Orcaray Echeverria L, Cliquet JB, Limami AM. 2006. Characterization of alanine aminotransferase (*AlaAT*) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. J Exp Bot. 57 (12): 3079-3089

Roesch LFW, de Quadros PD, Camargo FA, & Triplett EW. 2007. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. W. J. Microbiol. Biotechnol. 23(10): 1377-1383

Rothballer M, Schmid M, & Hartmann A. 2003. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. Symbiosis. 34: 261–279

Rubio LM, Ludden PW. 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Ann. Rev. Microbiol. 62:93-111

Ryu H, Laffont C, Frugier F, Hwang I. 2017. MAP Kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. Mol. Cell. 40(1):17-23

Salvagiotti F, Cassman KG, Specht JE, Walters DT, Weiss A & Dobermann A. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybean. Field Crops Res. 108:1-13

- Scheres B, Van De Wiel C, Zalensky A, Horvath B, Spaink H, Van Eck H, Bisseling T. 1990. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction. *Cell*. 60(2): 281-294
- Schmidt PE, Broughton WJ, Werner D. 1994. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:384–390
- Seabra AR, Vieira CP, Cullimore JV, Carvalho HG. 2010. *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC plant biol.* 10(1): 183
- Sérandour J, Reynaud S, Willison J, Patouraux J, Gaude T, Ravanel P, Raveton M. 2008. Ubiquitous water-soluble molecules in aquatic plant exudates determine specific insect attraction. *PloS one*. 3(10): e3350
- Shapiro AD & Gutsche AT. 2003. Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in Arabidopsis disease resistance. *Anal. Biochem.* 320(2):223-233
- Shi Y, Lou K, & Li C. 2010. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth. Res.* 105: 5–13
- Shi L, Twary SN, Yoshioka H, Gregerson RG, Miller SS, Samac DA, Gantt JS, Unkefer PJ, Vance CP. 1997. Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell*. 9: 1339–1356
- Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Numaguchi M, Morimura S, Kida K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Intern. J. System. Evol. Microbial.* 53(5):1479-1483
- Shulaev V, Cortes D, Miller G & Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* 132:199–208
- Silva LR, Pereira MJ, Azevedo J, Mulas R, Velazquez E, González-Andrés F, Valentão, Andrade PB. 2013. Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* enhances the organic and fatty acids content of soybean (*Glycine max* L.Merrill) seeds. *Food Chem.* 141:3636–3648
- Silveira AD. 1992. Micorrizas . Microbiología do Solo. Sociedade Brasileira de Ciencioa do Solo Campinas (SP) Brasil. 360 p
- Somasegaran P & Hoben HJ. 1994. Handbook for rhizobia. Methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, NewYork
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425–448

- Stashenko EE, Martínez JR. 2006. Sample preparation: a crucial step in GC-MS analysis. *Sci. Chrom.* 3(1):25-49
- Stefan M, Munteanu N, Stoleru V, Mihasan M & Hritcu L. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Sci. Hortic.* 151, 22–29
- Suliman S & Phan Tran LS. 2013. Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33(3): 309-327
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochem.* 62: 817-36
- Taiz L & Zeiger E. 2006. *Fisiologia vegetal*. Universitat Jaume I. (ed). ISBN: 8480216018, 9788480216012
- Tegeder M & Rentsch D. 2010. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Mol. Plant.* 3(6): 997–1011
- Tercé-Laforgue T, Dubois F, Ferrario-Méry S, de Crecenzo MAP, Sangwan R, Hirel B. 2004. Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiol.* 136(4):4308-4317
- Terpolilli JJ, Hood GA, Poole PS. 2012. What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses. *Adv. Microb. Physiol.* 60:325-89
- Torres Netto A, Campostrini E, Gonçalves de Oliveira J Y Kiyoshi Yamanishi O. 2002. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 14(3):203-210
- Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A, Hirata A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS microbiol. lett.* 223(2):287-292
- Ubalde MC; Braña V; Sueiro F; Morel MA; Martínez-Rosales C; Marquez C; Castro-Sowinski S. 2012. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Curr. Microbiol.* 64:597-603
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, MCadisch G, Boddey B, Giller K, Alves B, Chalk P. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *ACIAR.* 258
- Upadhyay SK, Singh JS, Saxena AK, Singh DP. 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biol.* 14(4):605-611
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K. 2009. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J.* 57:1065–1078

- Udvardi M & Poole P. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Ann. Rev. Plant Biol.* 64(1): 781-805
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moënné-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 17(4):356
- Vauclare P, Bligny R, Gout E, De MEuron V, Widmer F. 2010. Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: an electron microscopy and ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Plant.* 231: 1495
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571–586
- Volpin H, Burdman S, Castro-Sowinski S, Kapulnik Y, Okon Y. 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod-gene inducers by alfalfa roots. *Mol. Plant Micro. Inter.* 9(5): 388-394
- Walters DR, Walker RL & Walker KC. 2003. Lauric Acid Exhibits Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi. *J. Phytopathol.* 151:228–230
- Waqas MK, Akhtar N, Mustafa R, Jamshaid M, Khan HM, Murtaza G. 2015. Dermatological and cosmeceutical benefits of *Glycine max* (soybean) and its active components. *Acta. Pol Pharm.* 72(1):3-11
- Weston LA, Mathesius U. 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 39(2):283-297
- Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI. 1999. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Intern. J. Systema. Evol. Microbiol.* 49(2):567-576
- White J, Prell J, James EK & Poole P. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144:604-614
- Wilson RF. 2008. Soybean: Market Driven Research Needs. G. Stacey (Ed.), *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. 1st edition, Springer, New York. 1: 3–15
- Winning H, Roldán-Marín E, Dragsted LO, Viereck N, Poulsen M, Sánchez-Moreno C, & Engelsen SB. 2009. An exploratory NMR nutri-metabonomic investigation reveals dimethyl sulfone as a dietary biomarker for onion intake. *Analyst.* 134(11): 2344-2351
- Wong PP, Evans HJ. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 47 (6) 750-755

- Xu Z, Ma J, Qu C, Hu Y, Hao B, Sun Y, Liu Z, Yang H, Yang C, Wang H, Li Y & Liu G. 2017. Identification and expression analyses of the alanine aminotransferase (AlaAT) gene family in poplar seedlings. *Sci. Rep.* 7:45933
- Yadegari M, Rahmani HA, Noormohammadi G, Ayneband A. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Nutr.* 33:1733–1743
- Yoshimitsu Y, Tanaka K, Fukuda W, Asami T, Yoshida S, Hayashi K-i, Kamiya Y, Jikumaru Y, Shigeta T, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S. 2011 Transcription of DWARF4 plays a crucial role in auxin-regulated root elongation in addition to brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one.* 6(8): e23851
- Yuan SL, Li R, Chen HF, Zhang CJ, Chen LM, Hao QN, Chen SL, Shan ZH, Yang ZL, Zhang XJ, Qiu DZ & Zhou XA. 2017 RNA-Seq analysis of nodule development at five different developmental stages of soybean (*Glycine max*) inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain 113-2. *Scientific Reports* 7:42248
- Zuanazzi JAS, Clergeot PH, Quirion JC, Husson HP, Kondorosi P, Ratet P. 1998. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activation and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol. Plant Micro.Inter.* 11:784–794