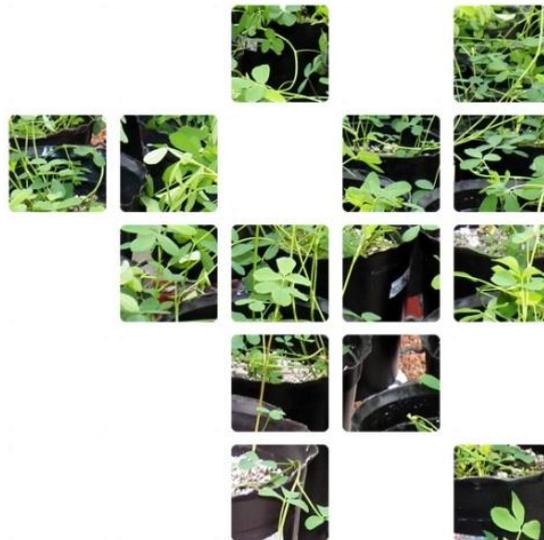


# Evaluación de la co-inoculación *Delftia-Sinorhizobium* y el agregado de rizodeposiciones como biofertilizantes mejorados para el cultivo de alfalfa



Tesina de Grado

**CÉLICA CAGIDE**

---

Orientadora: María Morel

Unidad de Microbiología Molecular (IIBCE)

Co-orientadora: Dra. Susana Castro

Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR

Febrero, 2014

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Influencia de las PGPRs en el crecimiento vegetal .....	2
1.1.2. PGPRs como inoculantes microbianos .....	3
<b>1.2. Asociación rizobio –leguminosa</b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Rizobios y FBN .....	5
1.2.2. Interacción temprana: moléculas involucradas .....	6
1.2.2.1. Flavonoides y Factores Nod .....	7
1.2.2.2. Fitohormonas.....	11
1.2.2.3. Polisacáridos y oligosacáridos .....	15
1.2.2.4. Otros metabolitos secundarios.....	16
<b>1.3. Mejoramiento de la simbiosis leguminosa-rizobio: co- inoculación con PGPRs</b> .....	<b>17</b>
1.3.1. Delftia .....	17
1.3.2. Formulaciones mixtas comerciales.....	18
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1. Hipótesis de trabajo</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2. Objetivos</b> .....	<b>21</b>
2.2.1. Objetivo general .....	21
2.2.2. Objetivos específicos .....	21
2.2.3. Objetivos educativos .....	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Material biológico</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2. Determinación de efectos antagónicos</b> .....	<b>22</b>

**3.3. Evaluación de los efectos del agregado de exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa, sobre el crecimiento vegetal..... 24**

3.3.1. Obtención de exudados .....	24
3.3.1.1. Sistema de hidroponia .....	24
3.3.1.2. Desinfección superficial de semillas .....	25
3.3.1.3. Germinación y desarrollo de las plántulas .....	25
3.3.1.4. Preparación de inóculo e inoculación de plántulas.....	25
3.3.2. Ensayo de plantas in vitro .....	27
3.3.2.1. Desinfección y pre-germinación de semillas.....	27
3.3.2.2. Agregado de exudados y transferencia de plántulas a tubos	27
3.3.2.3. Inoculación y co-inoculación .....	28
3.3.2.4. Tasa de nodulación .....	29
3.3.2.5. Evaluación del crecimiento vegetal.....	29
3.3.3. Ensayo de plantas bajo condiciones de invernáculo.....	29
3.3.3.1. Preparación de macetas, desinfección y siembra de semillas .....	30
3.3.3.2. Inoculación y co-inoculación de semillas .....	30
3.3.3.3. Condiciones de riego.....	30
3.3.3.4. Raleo.....	31
3.3.3.5. Evaluación del crecimiento vegetal.....	32
3.3.4. Análisis estadístico .....	32

**3.4. Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa..... 32**

3.4.1. Contenido de ácido indol-acético (AIA).....	33
3.4.2. Contenido de flavonoides totales .....	33
3.4.3. Contenido de fenoles totales.....	34
3.4.4. Contenido de aminoácidos libres .....	34
3.4.5. Determinación de azúcares .....	35
3.4.6. Determinación de compuestos de bajo peso molecular (CBPM) .	35

**4. RESULTADOS .....** 37

**4.1. Determinación del potencial antagonista de *Delftia* sp. JD2....** 37

<b>4.2. Efecto de los exudados hidropónicos sobre la nodulación y el crecimiento vegetal de alfalfa</b> .....	<b>38</b>
4.2.1. Ensayo de plantas in vitro .....	38
4.2.1.1. Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de alfalfa.....	38
4.2.1.2. Tasa de nodulación.....	39
4.2.1.3. Evaluación del crecimiento vegetal "in vitro" .....	42
4.2.2. Ensayo de plantas bajo condiciones de invernáculo.....	47
4.2.2.1. Evaluación del crecimiento vegetal.....	47
<b>4.3. Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa</b> .....	<b>51</b>
4.3.1. Curvas de calibración .....	52
4.3.2. Determinación de azúcares .....	53
4.3.3. Determinación de compuestos de bajo peso molecular (CBPM) .	54
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. Capacidad antagónica</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2. Evaluación de los efectos del agregado de exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa, sobre el crecimiento vegetal</b> .....	<b>57</b>
<b>5.3 Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa</b> .....	<b>60</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>67</b>
<b>7. ANEXO</b> .....	<b>68</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Aislamientos utilizados en el trabajo .....	23
<b>Tabla 3.2.</b> Tratamientos realizados en sistemas hidropónicos para la producción de exudados .....	26
<b>Tabla 3.3.</b> Descripción de los exudados utilizados en ensayo de plantas <i>in vitro</i> .....	28
<b>Tabla 3.4.</b> Tratamientos y controles realizados en los ensayos de plantas <i>in vitro</i> .....	28
<b>Tabla 3.5.</b> Tratamientos y detalle de los riegos realizados en ensayos de plantas en condiciones de invernáculo .....	31
<b>Tabla 4.1.</b> Tasas de nodulación (número de nódulos por planta por día) de alfalfa por <i>S. meliloti</i> U143 en ensayos de inoculación simple con U143 y co-inoculación con U143 y JD2. ....	41
<b>Tabla 4.2.</b> Concentración de azúcares de exudados producidos a los cuatro días luego de la inoculación y co-inoculación de plantas de alfalfa.....	54
<b>Tabla 4.3.</b> Compuestos de bajo peso molecular detectados GC-MS en exudados colectados a los cuatro días desde la inoculación de las plantas. Se indica sólo la presencia (+) o ausencia (-) del compuesto en estudio. ....	55
<b>Tabla 5.1</b> Composición de AIA y Trp ( $\mu\text{M}$ ) de exudados radiculares a los cuatro días de inoculación determinada por LC-MS. ....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Reacción general catalizada por la nitrogenasa.....	5
<b>Figura 1.2.</b> Estructura general de flavonoides.....	8
<b>Figura 1.3.</b> Estructura básica de factor de nodulación producido por rizobios.....	9
<b>Figura 1.4.</b> Fases de pre-infección. ....	10
<b>Figura 1.5.</b> Estructura de fitohormonas involucradas en el metabolismo vegetal .....	11
<b>Figura 1.6.</b> Vías de síntesis de AIA en bacterias.....	12
<b>Figura 1.7.</b> Producción bacteriana de AIA en la interacción microorganismo-planta. ....	13
<b>Figura 3.1.</b> Sistema de hidroponía utilizado para la obtención de exudados. ....	25
<b>Figura 4.1.</b> Estudio de la capacidad antagonista de <i>Delftia</i> sp. JD2 frente a i) <i>Delftia</i> sp. 3C, ii) <i>Delftia</i> sp. 6C y iii) <i>Stenotrophomonas</i> sp. JD1 .....	37
<b>Figura 4.2.</b> Plantas de alfalfa en ensayos <i>in vitro</i> . ....	39
<b>Figura 4.3.</b> Cinética de nodulación por <i>S. meliloti</i> U143 en alfalfa inoculada sólo con U143 (A) y co-inoculada con JD2 y U143 (B).....	39
<b>Figura 4.4.</b> Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa <i>in vitro</i> en plantas control negativo (S/N) y plantas control positivo (C/N). (A y C) Peso seco de parte aérea/planta. (B y D) Longitud de parte aérea/planta.....	43
<b>Figura 4.5.</b> Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa <i>in vitro</i> en condiciones de inoculación con U143. (A) Peso seco de parte aérea/planta. (B) Longitud de parte aérea/planta. ....	45
<b>Figura 4.6.</b> Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa <i>in vitro</i> .....	46

<b>Figura 4.7.</b> Efecto de la co-inoculación y el agregado de exudados hidropónicos producidos por alfalfa-JD2-U143, sobre el crecimiento de plantas de alfalfa en invernáculo.....	49
<b>Figura 4.8.</b> Efecto de la co-inoculación con JD2 y U143 y el agregado de exudados hidropónicos producidos por alfalfa-JD2-U143, sobre la longitud parte aérea/planta de alfalfa en ensayo de invernáculo. ....	51
<b>Figura 4.9.</b> Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de AIA (A) y aminoácidos libres (B).....	52
<b>Figura 4.10.</b> Curvas de calibración para la cuantificación de Flavonoides (A) y fenoles totales (B) .....	53
<b>Figura 4.11.</b> Curva de calibración para la cuantificación de azúcares. ....	53

## RESUMEN

*Delftia* sp. JD2 es una  $\beta$ -Proteobacteria capaz de promover el crecimiento vegetal de alfalfa cuando se co-inoculan con *Sinorhizobium meliloti* U143 en condiciones gnotobióticas. Como otras *Delftia* spp., JD2 produce ácido indolacético (AIA), sideróforos y fija nitrógeno en vida libre. El objetivo de esta tesis fue: 1) cuantificar la presencia de algunas moléculas presentes en los exudados producidos por alfalfa durante la co-inoculación con JD2 y U143, y analizar su composición, y 2) evaluar el efecto de JD2 y del agregado de los exudados sobre el crecimiento de alfalfa, tanto *in vitro* como en invernáculo. Para ello se obtuvieron los exudados en hidroponia, en presencia de U143 y/o JD2, a los 4 días de inoculación. Estos exudados (libre de células) se utilizaron como suplemento en el sustrato de crecimiento de las plantas y se analizó su composición por GC-MS. Los ensayos de invernáculo, revelaron que la co-inoculación promueve el crecimiento de alfalfa frente a la inoculación simple con el rizobio, reflejado en un aumento de biomasa aérea y radicular. Además, el agregado de exudados potenció el crecimiento vegetal en todos los casos, en relación a plantas que no recibieron exudados. Por GC-MS, se detectaron azúcares, ácidos orgánicos, amidas y compuestos orgánicos volátiles, entre otros. No se detectó AIA en los exudados de plantas co-inoculadas e inoculadas. Entre los compuestos detectados en plantas co-inoculadas, se destacan el limoneno, ácido hidroxibutírico, ácido oleico, butanodiol, nonanoico y amidas. Estos y otros compuestos podrían estar involucrados en la promoción del crecimiento vegetal evidenciado en los ensayos de invernáculo.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las PGPR 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. Esta promoción se puede dar tanto en vida libre como mediante asociaciones mutualistas con las plantas de formas epífita o endófitas, infectando el interior de los tejidos vegetales (Podile y Kishore, 2006). 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) (Vessey 2003; Hayat *et al*, 2010).

#### ***1.1.1. Influencia de las PGPRs en el crecimiento vegetal***

Los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal incluyen la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etc), la solubilización de fosfatos, la captación de hierro del entorno (mediante sideróforos), y la fijación biológica de nitrógeno (FBN, Glick *et al*, 1999; Podile y Kishore, 2006). También se ha descrito la producción y liberación de compuestos fenólicos que estimulan la germinación de las semillas, así como la emergencia y establecimiento de las plántulas (Podile y Kishore, 2006).

Por otro lado, los mecanismos indirectos de acción de las PGPRs se relacionan con la protección de las plantas frente a fitopatógenos (Compant *et al*, 2005). Dentro de los mecanismos indirectos están la producción de exo-proteasas, antibióticos y antifúngicos; inducción de resistencia sistémica en la planta; y competencia por nutrientes (por ejemplo,

agotamiento de hierro en la rizosfera) o por un nicho específico (Podile y Kishore, 2006).

### 1.1.2. PGPRs como inoculantes microbianos

Las 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).

Recientemente se ha definido el término biofertilizante como 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 rizosfera y/o el interior de la planta y promueven su crecimiento, por proporcionar o aumentar la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta hospedera (Vessey, 2003).

En comparación con los fertilizantes químicos, los biofertilizantes presentan grandes ventajas:

1) se asocian a un menor daño ambiental, mantienen la conservación del suelo desde el punto de vista de su fertilidad y biodiversidad y además su uso conlleva a un menor riesgo potencial para la salud humana al contener microorganismos no patógenos.

2) permiten un menor costo de producción, una reducción en la fertilización química y su costo de distribución y aplicación es menor (Berg, 2009)

3) presentan un rango de actividad mucho más específica.

4) son efectivos en menor cantidad y generalmente no es necesaria la sobre-fertilización en el ciclo del cultivo para ser activos.

5) se multiplican por sí mismos, aunque su número puede ser controlado por las propias plantas así como también por las poblaciones microbianas nativas (Berg, 2009).

Por lo antes expuesto, el uso de biofertilizantes a gran escala para implementar sistemas de producción agrícola sustentables, traería grandes beneficios ya que constituyen un medio para reducir insumos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos.

## **1.2. Asociación rizobio –leguminosa**

La atmósfera contiene alrededor de un 78% de su volumen en nitrógeno (N), en forma de dinitrógeno (N<sub>2</sub>). Pero a pesar de su abundancia, el N suele ser, después del agua, un factor limitante en el crecimiento de las plantas. El N<sub>2</sub> atmosférico es un gas inerte no utilizable por la mayoría de los seres vivos. Solamente un pequeño grupo de seres vivos, todos ellos procariotas, conocidos como bacterias diazotróficas, son capaces de fijar el N<sub>2</sub> atmosférico, en un proceso conocido como fijación biológica del N (Hardy y Holsten 1977; FBN; Roesch *et al*, 2007).

Las bacterias diazotróficas pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellas que son capaces de fijar el N<sub>2</sub> cuando se encuentran en asociación con una planta y las que realizan el proceso de FBN en condiciones de vida libre (Freiberg *et al*, 1997). Dentro de las primeras, las más estudiadas son las bacterias llamadas colectivamente rizobios. Entre las segundas se incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, entre otros (Vessey, 2003; Hayat *et al*, 2010).

### 1.2.1. Rizobios y FBN

Una de las relaciones simbióticas más importantes desde el punto de vista agrícola y ambiental, es la asociación mutualista establecida entre los rizobios y las leguminosas. El proceso de fijación es sumamente importante a nivel agrícola debido no sólo a la cantidad de N<sub>2</sub> que se fija e introduce al sistema suelo/planta (Lorkiewicz, 1996), sino también porque el proceso de FBN permite el desarrollo sustentable de vegetales, que directa o indirectamente son la base de la alimentación humana (Zahran, 2009; Morel *et al*, 2012).

Las bacterias colectivamente llamadas rizobios son bacilos Gram negativos, aerobios y heterótrofos, que pertenecen a diferentes géneros dentro de las clases α- y β-Proteobacterias (ICSP, 2013; NZrhizobia, 2013). Todos los rizobios comparten una característica fundamental: son capaces de fijar el N<sub>2</sub> atmosférico luego de establecerse en forma endosimbiótica en plantas leguminosas. Esta interacción rizobio-leguminosa lleva a la formación de estructuras características llamadas nódulos radiculares, donde las bacterias se diferencian en bacteroides, los cuales realizan el proceso de FBN.

Durante la FBN, el N<sub>2</sub> atmosférico se reduce a amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) gracias al complejo enzimático nitrogenasa, que es capaz de romper el triple enlace del N<sub>2</sub> en una reacción altamente consumidora de energía (Figura 1.1). El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> producido de este modo pasa a formar parte de aminoácidos que quedan disponibles para la planta, mientras que ésta le aporta fotosintatos a la bacteria.



**Figura 1.1.** Reacción general catalizada por el complejo nitrogenasa. Los productos finales son el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, la forma hidratada del gas amoníaco (NH<sub>3</sub>), y el gas H<sub>2</sub>, que se pierde como tal (Taiz y Zeiger, 2006). El proceso demanda al menos 16 moles de ATP por cada mol de N<sub>2</sub> fijado.

### 1.2.2. Interacción temprana: moléculas involucradas

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.

La primera etapa, la pre-infección, comienza antes de que exista contacto físico entre la planta y la bacteria, y en este período ambos simbioses intercambian señales de reconocimiento con un alto grado de especificidad. Este grado de especificidad varía con el rizobio y con la planta, determinando el éxito de una simbiosis, en términos de FBN. El rizobio deberá reconocer la presencia de la planta a través de compuestos exudados por la raíz, y frente a los cuáles responderá induciendo los genes implicados directamente en la nodulación.

Los exudados radiculares o rizodeposiciones secretadas durante la interacción PGPR-planta, se componen de una amplia gama de moléculas, que actúan en conjunto durante la interacción. Su cantidad y composición química está influenciada por las condiciones ambientales, genotipo de la planta y por las interacciones que ocurren en la rizosfera, entre otros factores (de la Peña *et al*, 2008).

Los compuestos a base de carbono son los constituyentes principales de los exudados, pero los iones y ácidos inorgánicos son también componentes importantes durante las interacciones rizosféricas (Badri y Vivanco, 2009). Las moléculas exudadas por las raíces incluyen: compuestos de bajo peso molecular tales como azúcares (mono y oligosacáridos) y metabolitos secundarios; y compuestos de alto peso molecular tales como polisacáridos y proteínas, que a menudo componen una mayor proporción de la masa total del exudado (Bais *et al*, 2006).

Los metabolitos secundarios son compuestos que tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente y a condiciones adversas, así como en el

establecimiento de simbiosis con otros organismos. Entre ellos destacan los flavonoides y otros compuestos fenólicos, alcaloides, aceites esenciales, esteroides y terpenos (Sepulveda-Jimenez *et al*, 2003).

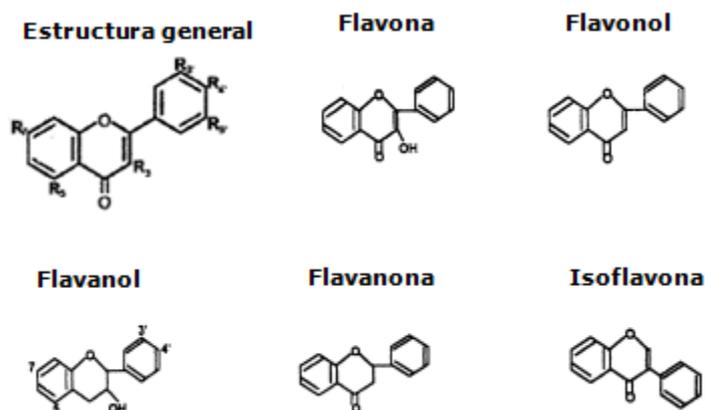
A pesar de que estos compuestos químicos son secretados por la raíz, muchos rizobacterias también segregan metabolitos que median las interacciones rizosféricas (Cai *et al*, 2012).

A continuación se describen las principales moléculas-señal implicadas en la interacción entre el rizobio y su planta hospedera.

#### 1.2.2.1. Flavonoides y Factores Nod

En el intercambio de señales previo a la nodulación, ocurre una atracción quimiotáctica de la bacteria hacia la planta, seguida por cambios estructurales en los pelos radiculares. Esta quimiotaxis se debe en parte a que la planta exuda metabolitos secundarios hacia la rizosfera, como aminoácidos y ácidos dicarboxílicos, que actúan como atrayentes nutritivos. Pero la principal contribución a la interacción son los flavonoides exudados por la raíz, moléculas que la bacteria reconoce específicamente y que actúan como señales inductoras de los genes de nodulación.

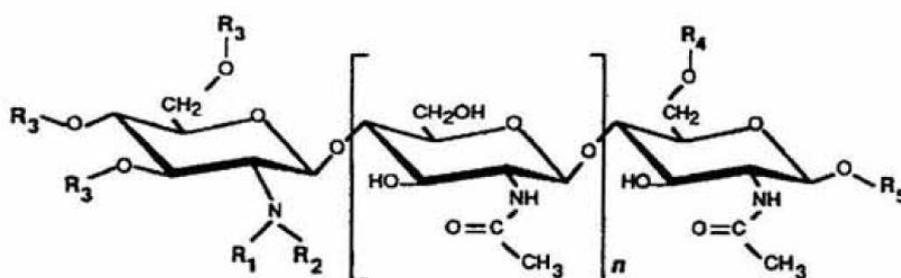
Los flavonoides son metabolitos secundarios fenólicos de origen vegetal que están involucrados en la mayoría de las interacciones planta-microorganismo conocidas. Se han encontrado más de 4000 tipos en plantas vasculares y una gran parte de ellos en leguminosas (Bais *et al*, 2006). Si bien existen 13 subclases de flavonoides, los más estudiados son las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas (Figura 1.2.). Estos poseen como unidad básica una estructura de 15 carbonos 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 y Martínez Sánchez, 2001; Cesco *et al*, 2012).



**Figura 1.2.** Estructura general de flavonoides. Cambios en el anillo o en algunos de los grupos R determinan las diferentes sub-clases de flavonoides. Como ejemplos se muestra los flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, e isoflavonas (Hirsch *et al*, 2001; Martínez-Flórez *et al*, 2002).

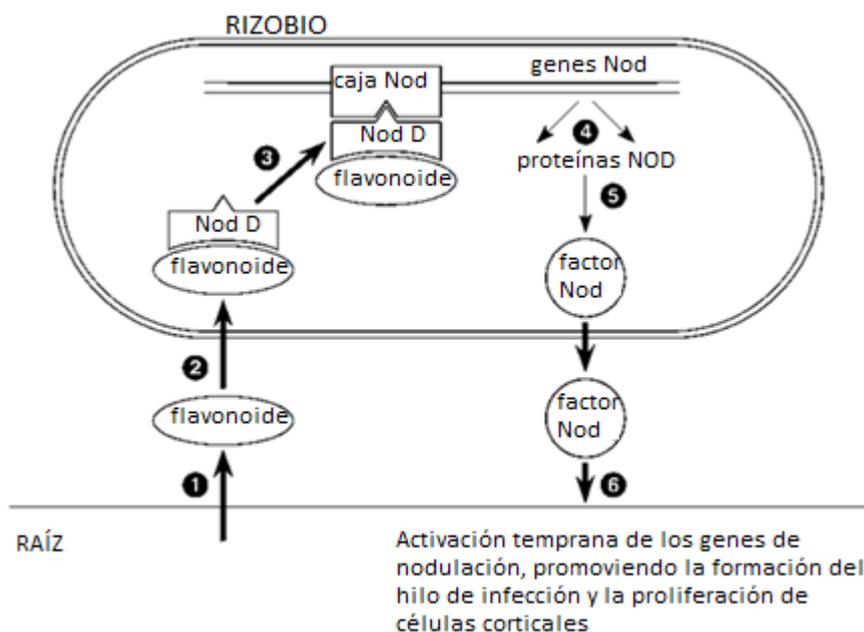
Los genes bacterianos esenciales para la infección por los rizobios se pueden dividir en dos clases. Una clase incluye varios conjuntos de genes implicados en la síntesis de las estructuras superficiales de la célula bacteriana, tales como los que determinan la síntesis de exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*) y  $\beta$ -1,2-glucanos (genes *ndv*). La segunda clase se compone de los genes de nodulación (genes *nol* y *nod*). Los flavonoides actúan como señales inductoras de los genes *nod* (Lorkiewicz, 1996; Mandal *et al*, 2010), mediante el activador transcripcional Nod D. La expresión de los genes *nod* es imprescindible para la formación del nódulo, y la ausencia o mutación de los mismos impide o afecta el proceso de infección (Scheres *et al*, 1990).

La activación de los genes *nod* deriva en la síntesis de varias proteínas involucradas en la producción y secreción de un lipoquitooligosacárido (LCO) conocido como Factor de Nodulación, o FactorNod. Los Factores Nod son moléculas complejas, constituidas generalmente por un esqueleto de tres a cinco N-acetil glucosaminas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, con varias decoraciones y una N-acetilación en el extremo no reductor. Las sustituciones determinan la especificidad de la interacción entre la leguminosa y el rizobio (Figura 1.3.).



**Figura 1.3.** Estructura básica de factor de nodulación producido por rizobios. R indica los grupos variables, n indica el número de repeticiones (1,2 o3) y el sustituyente R<sub>2</sub> es un ácido graso de cadena larga (Lorkiewicz, 1997)

Los LCOs son responsables de inducir una serie de respuestas y modificaciones visibles en la planta, incluyendo la deformación de los pelos radicales, la formación del hilo de infección, y la inducción de sucesivas divisiones celulares en la capa cortical interna de la raíz, que lleva a la formación de los nódulos (Lorkiewicz, 1996; Downie y Walker, 1999; Hayat *et al*, 2010). La Figura 1.4. resume los primeros eventos que ocurren durante la pre-infección.



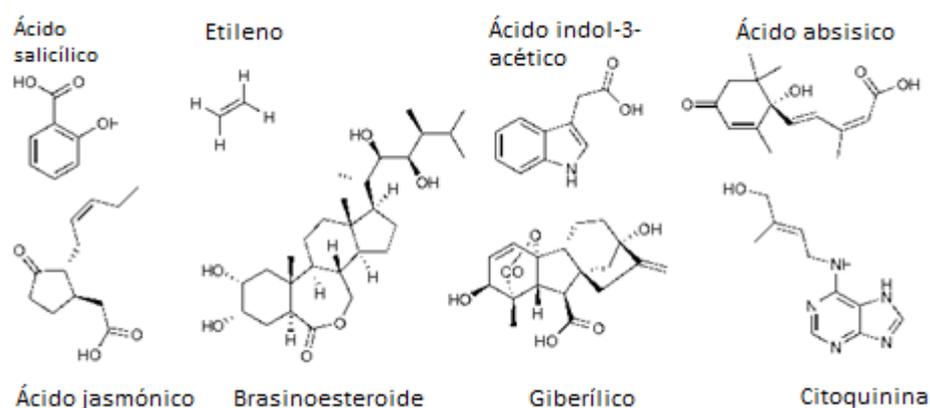
**Figura 1.4.** Fases de pre-infección. 1) La planta secreta flavonoides; 2) estos son reconocidos por la proteína receptora bacteriana NodD; 3) se produce el reconocimiento de la caja *nod* (secuencia de ADN reconocida por el factor de transcripción Nod D); 4) se activan los genes de nodulación y se sintetizan las proteínas NOD; 5) el rizobio responde sintetizando y secretando el factor Nod; 6) las raíces de las leguminosas reconocen el Factor Nod a través de receptores específicos, y se produce la formación de los nódulos y su infección. Extraída y adaptada de [http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08\\_22print.html](http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08_22print.html).

Son muchos los flavonoides descritos, y cada planta secreta un perfil específico, sin embargo, solo algunos de ellos actúan específicamente como inductores de la producción de un Factor Nod particular (Morel y Castro-Sowinski, 2013). Este reconocimiento de determinados flavonoides constituye el primer nivel de especificidad en la interacción. Por ejemplo, en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti* –alfalfa (*Medicago sativa*), el flavonoide secretado por las raíces de alfalfa es la luteolina, encargada de la inducción de los genes implicados en la síntesis del Factor Nod de *S. meliloti* (Morel et al, 2013).

### 1.2.2.2. Fitohormonas

Las fitohormonas son mensajeros químicos producidos por plantas y algunos microorganismos, que regulan un gran número de procesos relacionados al crecimiento y desarrollo vegetal, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Las fitohormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desencadenan cambios en la expresión génica, la regulación de las vías metabólicas y el cambio de flujos. Éstas actúan en bajas concentraciones (Ferguson y Beveridge, 2009).

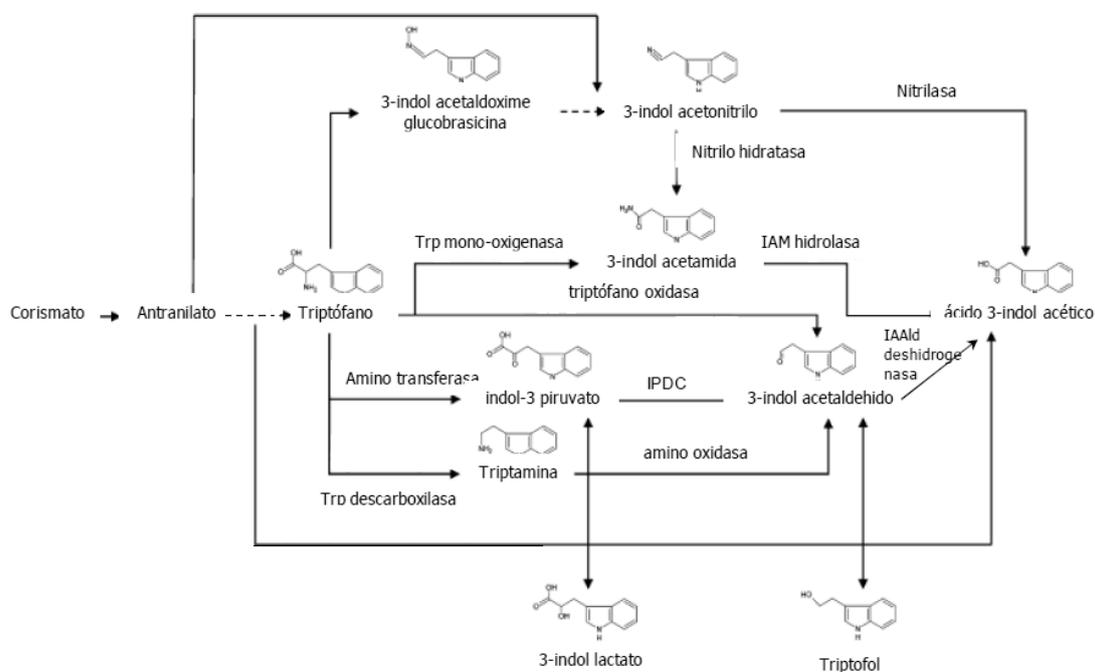
De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las fitohormonas se han clasificado en varios grupos. Las más estudiadas son las auxinas, las citoquininas (CK), el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GA) y el etileno. Otras moléculas pequeñas que también actúan como fitohormonas son los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinosteroides, y algunas poliaminas (Figura 1.5.; Pieterse *et al*, 2009).



**Figura 1.5.** Estructura de fitohormonas involucradas en el metabolismo vegetal

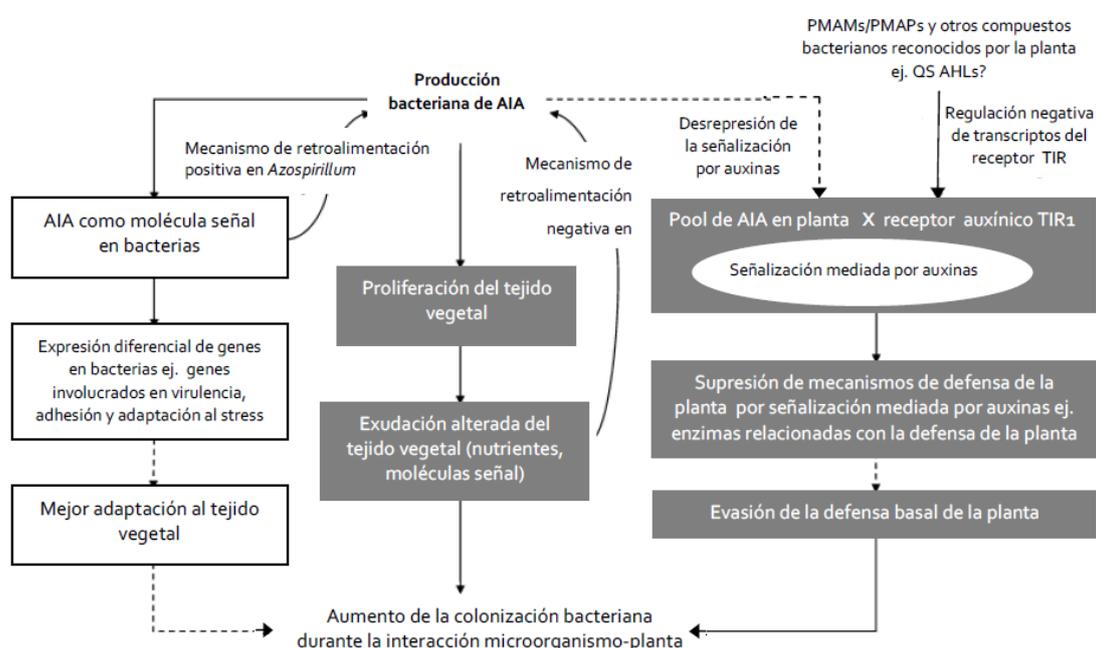
Se conocen algunos microorganismos capaces de secretar fitohormonas, principalmente auxinas y CKs, que actúan como moléculas señal coordinando cambios en la división y diferenciación celular vegetal, así como afectando la arquitectura tanto de raíz y como del tallo (Boiero *et al*, 2007; Lopez-Bucio *et al*, 2007). Algunos ejemplos de bacterias productoras de fitohormonas incluyen representantes de los géneros *Pseudomonas* (Khakipour *et al*, 2008), *Azospirillum* (Khalid *et al*, 2011), *Rhizobium* (Etesami *et al*, 2009), *Bacillus* (Lim y Kim, 2009) y *Delftia* (Morel *et al*, 2011).

Las auxinas son compuestos formados por anillos aromáticos y grupos ácidos carboxílicos. Son las fitohormonas más estudiadas, y dentro de ellas, la acción del ácido 3-indol acético (AIA) es la más caracterizada. El aminoácido triptófano (Trp) es el principal precursor fisiológico de la síntesis de auxinas en plantas superiores, así como de la biosíntesis microbiana de dicha fitohormona. En bacterias, existen seis vías metabólicas responsables de la síntesis del AIA (Figura 1.6.). Cinco de ellas tienen al Trp como principal precursor (Spaepen *et al*, 2006).



**Figura 1.6.** Vías de síntesis de AIA en bacterias (Spaepen *et al*, 2006). IAAld, 3-indol acetaldéhid; IAM, 3-indol acetamida; IPDC, 3-indol piruvatodecarboxilasa; Trp, triptófano.

El AIA producido 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 a los tejidos vegetales, favoreciendo la colonización de la planta (Spaepen *et al*, 2006; Figura 1.7.). En la planta, el AIA de origen microbiano es responsable, al menos en parte, de la promoción de su crecimiento, principalmente debido a que induce el aumento del volumen radicular, incrementando de esta forma el área activa para la absorción de nutrientes minerales y agua, así como también sitios donde establecer interacciones con posibles huéspedes.



**Figura 1.7.** Producción bacteriana de AIA en la interacción microorganismo–planta. Modelo propuesto por Spaepen *et al* (2006).

Otras hormonas sintetizadas tanto por plantas como bacterias son capaces de promover la división celular, el desarrollo radicular y la germinación de semillas (Hayat *et al*, 2010). Además de estos efectos, las CKs, al igual que el AIA liberado por los microorganismos, desempeñan un papel importante en la simbiosis rizobio-planta. Ambas hormonas se han relacionado con la organogénesis del nódulo (Ariel *et al*, 2012; Op den Camp *et al*, 2011; Oldroyd y Downie, 2008; Murray *et al*, 2007; Tirichine *et al*, 2007). Las GA están asociadas con modificaciones morfológicas de la planta por extensión del tejido vegetal, particularmente del meristemo (Salisbury, 1994). Algunas rizobacterias, como por ejemplo algunas *Azospirillum* spp., son capaces de sintetizar GAs, siendo este uno de sus mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (Bottini *et al*, 1989; Cassan *et al*, 2001).

Muchas rizobacterias producen etileno, un potente regulador del crecimiento vegetal, que en bajas cantidades es capaz de promover la formación de raíces, y estimular la germinación y floración. El etileno está implicado en la maduración, abscisión de flores y hojas, senescencia y dormancia, entre otros efectos. Sin embargo, en exceso y en ciertas condiciones, es perjudicial para la planta ya que puede detener el crecimiento vegetal, inhibir la elongación de raíces y de manera adversa, acelerar la senescencia de flores, causar la maduración prematura y abscisión de flores y frutos y acelerar el proceso de envejecimiento (Vessey, 2003; Jordan y Casaretto, 2006; Podile y Kishore, 2006; Hayat *et al*, 2010). Algunas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas, a través de la acción de una enzima que desamina al precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC): la enzima ACC desaminasa (Glick *et al*, 1998).

### 1.2.2.3. Polisacáridos y oligosacáridos

Los polisacáridos y oligosacáridos son componentes esenciales en la comunicación microorganismo-planta (Upadhyay *et al* 2011). Los polisacáridos extracelulares bacterianos, entre los que se incluyen los exopolisacáridos (EPS), los lipopolisacáridos (LPS), los polisacáridos capsulares (CPS) y los  $\beta$ -glucanos cíclicos, se acumulan en la superficie celular bacteriana. Estos poseen variadas funciones, tales como la protección contra el estrés (Qurashi y Sabri, 2012; Upadhyay *et al*, 2011), la adhesión a superficies bióticas y abióticas (Tsuneda *et al*, 2003) y la inhibición de la respuesta de defensa de las plantas en 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 radicular, en la formación e infección de los nódulos, y en el desarrollo del bacteroide dentro de los mismos. 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). Los LPS son componentes importantes de las membranas de bacterias Gram-negativas y en rizobios cumplen diferentes roles durante las etapas endosimbióticas de la interacción. Además, al igual que los EPS, se relacionan con la adaptación y sobrevivencia de los rizobios bajo diferentes condiciones ambientales, posiblemente debido al enmascaramiento de la superficie bacteriana, evitando de ese modo el desencadenamiento de una respuesta de defensa en la planta (Fischer *et al*, 2003).

En el caso de alfalfa y *S. meliloti*, este último produce dos diferentes exopolisacáridos capaces de promover la simbiosis: i) el succinoglicano (también conocido como EPS I) y ii) el galactoglucano (o EPS II) (Rinaudi y Giordano, 2009). Dependiendo de la concentración de fosfatos del ambiente, *S. meliloti* produce uno u otro. De este modo, las bajas concentraciones de fosfatos (condiciones típicas de los suelos; Bielecki, 1973) estimulan la producción de EPS II, mientras que bajo condiciones de

alta concentración de fosfatos (como las que se encuentran en los nódulos), se induce la producción de EPS I (Israel, 1987).

#### 1.2.2.4. Otros metabolitos secundarios

Como ya se mencionó antes, además de los flavonoides, las plantas producen una serie muy diversa de compuestos de bajo peso molecular, entre los que se incluyen alcaloides, esteroides y terpenos, entre otros. Algunos de estos metabolitos secundarios se encuentran comúnmente en las plantas, pero otros son específicos de sólo unas pocas especies y/o se producen en condiciones particulares.

Algunas rizobacterias pueden producir compuestos orgánicos volátiles (COVs) como señales que estimulan el crecimiento de las plantas (Gutierrez-Luna *et al*, 2010). Por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, producen acetoina y 2,3-butanodiol, CVOs involucrados en el diálogo microorganismo-planta y considerados relevantes en la promoción del crecimiento vegetal por estas bacterias (Ryu *et al*, 2003).

Otros grupos importantes de compuestos de bajo peso molecular que se encuentran entre los exudados radiculares son los aminoácidos y algunos compuestos nitrogenados alifáticos, como las poliaminas. Éstos tienen varios efectos sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones y son secretados tanto por bacterias como por plantas. Entre los aminoácidos más relevantes destacan la fenilalanina y la tirosina, intermediarios metabólicos en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos, y el Trp como el precursor de la síntesis de AIA (ver punto 1.2.2.1.). Las poliaminas, a pesar de encontrarse en niveles de concentración altos en relación al resto de las fitohormonas, se consideran reguladores del crecimiento vegetal. Se les han descrito varias funciones biológicas en plantas, entre ellas, la regulación de la división y proliferación celular, el desarrollo floral, la senescencia y la maduración de frutos. Debido a su naturaleza policatiónica, que les permite unirse a los grupos fosfatos son capaces de alterar la expresión génica y de generar cambios conformacionales en los ácidos nucleicos (Jordan y Casaretto, 2006).

Además, actúan como fuente o reserva de N para plantas y bacterias. Las poliaminas junto a los L-aminoácidos tirosina, lisina, fenilalanina y triptófano, son precursores biosintéticos de los alcaloides relacionados con la defensa vegetal (Valdés y Balbín, 2000; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Bais *et al*, 2006; Bertin, 2003).

### **1.3. Mejoramiento de la simbiosis leguminosa-rizobio: co-inoculación con PGPRs**

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, aumentando 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. (Itzigsohn *et al*, 1993; Burdman *et al*, 1997; German *et al*, 2000) y *Bacillus* spp. (Camacho *et al*, 2001).

#### **1.3.1. *Delftia***

Las bacterias del género *Delftia* son  $\beta$ -Proteobacterias que pertenecen a la familia Comamonadaceae (Wen *et al*, 1999). Hasta el momento se han identificado *D. acidovorans* (Wen *et al*, 1999), *D. tsuruhatensis* (Shigematsu *et al*, 2003), *D. lacustris* (Jørgensen *et al*, 2009) y *D. litopenaei* (Chen *et al*, 2012). Entre los aislamientos reportados se han descrito funciones tan variadas como la capacidad de degradar peptidoglucano (Jørgensen *et al*, 2009), de degradar tereftalato de

polietileno (PET, Shigematsu *et al*, 2003), o de producir y acumular poli  $\beta$ -hidroxibutirato (Chen *et al*, 2012).

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

El aislamiento *Delftia* sp. JD2 en particular, es capaz de promover el crecimiento de alfalfa, trébol blanco (*Trifolium repens*) y soja (*Glycine max*) cuando se co-inocula con los rizobios específicos para dichas plantas. Durante la co-inoculación de alfalfa y trébol blanco con rizobios y JD2 se produce un aumento de la tasa de nodulación y del rendimiento vegetal comparado con la inoculación simple, tanto en ensayos llevados a cabo en condiciones gnotobióticas como en invernáculo (Morel *et al*, 2011; Ubalde *et al*, 2012).

### 1.3.2. Formulaciones mixtas comerciales

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 aunque sí existen en la región. Nitrasoil Argentina S.A., produce un inoculante para soja, llamado "Bio-Enhance", que contiene *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Esta formulación estimula la producción de señales químicas en la rizósfera, entre la raíz y las bacterias, en respuesta a la interacción de ambos organismos ([www.nitrasoil.com.ar](http://www.nitrasoil.com.ar)). Por otro lado, Signum<sup>®</sup> 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>). Más que explotar a la bacteria *per se*, éste último preparado innovador explota a las sustancias que se secretan cuando la bacteria está en contacto con la planta. La comercialización de inoculantes mixtos que incluyen bacterias del género *Delftia* se resumen, hasta donde conocemos, a solo uno (BioBoost +, BRETYYOUNG™, [www.brettyoung.ca](http://www.brettyoung.ca)).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis de trabajo**

En base a que:

i) en condiciones gnotobióticas, *Delftia*sp.JD2 promueve el desarrollo de alfalfa y la infectividad del inoculante nacional (*S. meliloti* U143) en ensayos de co-inoculación (Morel *et al*, 2011);

ii) el diseño de nuevas formulaciones derivadas de bacterias PGPRs contribuye a la mejora del crecimiento de plantas agrícolas;

iii) la co-inoculación con PGPRs (o alguno de sus productos) puede tener un efecto positivo en la estimulación del crecimiento de leguminosas;

iv) el establecimiento de las praderas de leguminosas es relevante para el área agrícola-ganadera del país,

se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

Los metabolitos relacionados con la actividad promotora del crecimiento vegetal de alfalfa producidos en condiciones de co-inoculación con *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2, pueden utilizarse como suplementos de riego en formulaciones bacterianas para aumentar el rendimiento vegetal.

## **2.2. Objetivos**

### 2.2.1. Objetivo general

Analizar la composición y el potencial de las rizodeposiciones de alfalfa obtenidas en condiciones de co-inoculación con *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 en el establecimiento de una simbiosis más eficiente en este cultivo.

### 2.2.2. Objetivos específicos

- i) Analizar la composición parcial de los exudados de alfalfa obtenidos en condiciones de co-inoculación con *S. meliloti* U143 *Delftia* sp. JD2, durante los primeros cuatro días de la interacción planta-microorganismo.
  
- ii) Evaluar el efecto del uso de los exudados como suplemento de riego, sobre las plantas de alfalfa creciendo en condiciones gnotobióticas.
  
- iii) Evaluar el efecto del uso de los exudados como suplemento de riego, sobre las plantas de alfalfa en condiciones de invernáculo.

### 2.2.3. Objetivos educativos

Adquirir entrenamiento en el manejo de plantas, la determinación de moléculas por métodos cromatográficos y espectrofotométricos, así como entrenarse en el trabajo en condiciones asépticas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

El aislamiento bacteriano en el cual se basó el presente trabajo (JD2) pertenece al género *Delftia*, y fue obtenido de muestras de suelo con altos niveles de metales pesados (Morel *et al*, 2011). Además, se empleó el rizobio capaz de nodular alfalfa, *S. meliloti* U143 (rizobio que forma parte del inoculante comercial). En la Tabla 3.1. se describen todos los aislamientos que fueron utilizados a lo largo del trabajo.

Las semillas de alfalfa utilizadas fueron de la variedad Crioula Grupo 8.

#### 3.2. Determinación de efectos antagónicos

Dado que *Delftia* sp. JD2 es una bacteria promotora del crecimiento vegetal, no solo de alfalfa sino también de trébol y soja (Morel *et al*, 2011; Ubalde *et al*, 2012), se evaluaron los posibles efectos antagónicos de la misma sobre el crecimiento de los rizobios que nodulan estas leguminosas. Se testeó además el antagonismo sobre otros aislamientos provenientes de suelo y rizósfera, presentes en la colección del laboratorio. El antagonismo se determinó siguiendo la metodología básica del ensayo de difusión en agar con discos, mediante el enfrentamiento dual de JD2 y un aislamiento del suelo por vez (Hewitt y Vincent, 1989).

Se prepararon cultivos frescos en medio TY (Anexo) de *Delftia* sp. JD2 y de los diferentes aislamientos de suelo: *Stenotrophomonas* sp. JD1, *Delftia* spp. 3C y 6C, *Agrobacterium* sp. 3B, *R. leguminosarum* bv *trifolii* U204, *A. brasilense* Sp7, *S. meliloti* 1021, *E. coli* DH5 $\alpha$ , *Pseudomonas* spp.  $\alpha$ p271 y  $\alpha$ c119 (Tabla 3.1.).

**Tabla 3.1.** Aislamientos utilizados en el trabajo

<b>Microorganismo</b>	<b>Características de interés</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
<i>Delftia</i> sp. JD2	Productor de AIA y sideróforos. Fijador de N <sub>2</sub> en vida libre. Promotor del crecimiento vegetal de alfalfa y trébol	Morel <i>et al</i> , 2011; Ubalde <i>et al</i> , 2012
<i>Stenotrophomonas</i> sp. JD1	Resistente a Cr (VI) y Pb(II). Sin capacidad promotora del crecimiento informada	Morel <i>et al</i> , 2009
<i>Agrobacterium</i> sp. 3B	Resistente a Pb (II). Sin capacidad promotora del crecimiento informada	Ubalde, comunicación personal
<i>Delftia</i> sp. 3C	Productor de AIA y sideróforos. Promotor del crecimiento vegetal de trébol	Ubalde <i>et al</i> , 2012
<i>Delftia</i> sp. 6C	Productor de AIA y sideróforos. Promotor del crecimiento vegetal de trébol	Ubalde <i>et al</i> , 2012
<i>Sinorhizobium meliloti</i> U143	Fijador de N <sub>2</sub> en asociación simbiótica con alfalfa	Castro-Sowinski <i>et al</i> , 2002
<i>S. meliloti</i> 1021	Fijador de nitrógeno en asociación simbiótica con alfalfa	Fisher y Long, 1992
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1301	Fijador de N <sub>2</sub> en asociación simbiótica con soja	Núñez, 2012
<i>B. elkanii</i> U1302	Fijador de N <sub>2</sub> en asociación simbiótica con soja	Núñez, 2012
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> U204	Fijador de N <sub>2</sub> en asociación simbiótica con trébol (rizobio del inoculante nacional)	Rodríguez Blanco <i>et al</i> , 2010
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Fijador de N <sub>2</sub> en vida libre; productor de AIA	Fallik <i>et al</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Microorganismo sin capacidad promotora del crecimiento vegetal	Sambrook <i>et al</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. $\alpha$ c119	Agente de biocontrol	Yanes, L. comunicación personal
<i>Pseudomonas</i> sp. $\alpha$ p271	Agente de biocontrol	Yanes, L. comunicación personal

Se inocularon mediante siembra en superficie 100 $\mu$ L de una suspensión bacteriana de los aislamientos cuya susceptibilidad frente a JD2 se iba a evaluar en placas conteniendo medio TY sólido. Se impregnaron discos de papel (Whatman N°2) estériles con 15 $\mu$ L de una suspensión bacteriana del aislamiento JD2 y se secaron bajo flujo de aire en cámara de flujo laminar. Posteriormente, los discos se colocaron sobre las placas sembradas con los diferentes aislamientos. Como control negativo se utilizaron discos de papel estériles impregnados en medio TY. No se utilizó control positivo por no disponer de alguna cepa frente a la cual JD2 presentara antagonismo conocido. La presencia de halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos, se consideró una respuesta cualitativa antagónica entre la cepa ensayada.

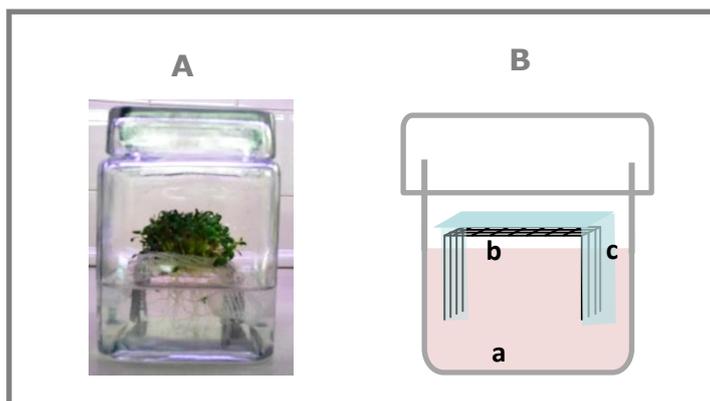
### **3.3. Evaluación de los efectos del agregado de exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa, sobre el crecimiento vegetal**

Con el propósito de evaluar el efecto de los exudados producidos durante la interacción entre *S. meliloti* U143-*Delftia* sp. JD2-alfalfa sobre el crecimiento de esta leguminosa, se obtuvieron exudados en sistema de hidroponía y se utilizaron en ensayos de plantas, tanto en condiciones controladas como en invernáculo.

#### ***3.3.1. Obtención de exudados***

##### ***3.3.1.1. Sistema de hidroponía***

Se trabajó con frascos de vidrio totalmente transparentes, conteniendo 450 mL de solución salina Howieson (Howieson *et al*, 1993; Anexo), un soporte de acero inoxidable y una gasa cubriendo al mismo (Figura 3.1.).



**Figura 3.1.** Sistema de hidroponía utilizado para la obtención de exudados. A. Fotografía de uno de los tratamientos. B. Representación gráfica del sistema. a. Medio nutriente de crecimiento; b. soporte de acero inoxidable y c. gasa.

### *3.3.1.2. Desinfección superficial de semillas*

Las semillas de alfalfa se lavaron con agua destilada estéril y se trataron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 20%, durante 15min en agitación. Luego de repetidos lavados con agua estéril, se dejaron en reposo en agua estéril por 15-20min.

### *3.3.1.3. Germinación y desarrollo de las plántulas*

Las semillas desinfectadas se transfirieron a los soportes de acero cubiertos con gasa (Fig. 3.1.; aproximadamente 230 semillas por soporte). Los frascos se incubaron durante cinco días en cuarto de plantas a 22°C, bajo un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad. La luz se suministró a través de tres tubos del tipo "Gro-lux" (Gro-lux™, Sylvania) fluorescentes de 36W.

### *3.3.1.4. Preparación de inóculo e inoculación de plántulas*

Las plántulas de alfalfa con cinco días de crecimiento se transfirieron a nuevos frascos con medio Howieson fresco, para ser inoculadas con

suspensiones bacterianas. Se realizaron controles en placa con medio rico LB (Anexo) por estriado de los líquidos hidropónicos para descartar posible contaminación, previo a la inoculación.

Se preparó un pre-inóculo a partir de los aislamientos *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 conservados en glicerol (20%) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello, se prepararon cultivos frescos, en medio líquido, transfiriendo 50 $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana almacenada en glicerol, a 5mL de medio TY. Se incubó en agitación (200rpm) a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, para la preparación del inóculo, se tomaron 500 $\mu\text{L}$  de cada cultivo fresco, se transfirieron a 50mL de medio TY y se incubó en agitación a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Se colectaron las células mediante centrifugación durante 10min a 12.000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  y el *pellet* celular se re-suspendió en buffer fosfato 50mM. La inoculación se realizó directamente sobre los medios de hidroponia. Las concentraciones bacterianas finales utilizadas fueron de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^6$  UFC/mL para el rizobio y JD2, respectivamente (Morel *et al*, 2011).

Los tratamientos de inoculación se describen en la Tabla 3.2. Se realizaron tres réplicas biológicas y cada tratamiento se realizó a su vez por triplicado.

**Tabla 3.2.** Tratamientos realizados en sistemas hidropónicos para la producción de exudados

Tratamientos	Descripción
Control negativo	Alfalfa sin inocular
U143	Alfalfa inoculada con U143
COINO	Alfalfa co-inoculada con JD2 y U143

### *3.1.1.5. Recolección y filtración de exudados*

A los cuatro días posteriores a la inoculación, se recolectaron y filtraron los líquidos de hidroponia conteniendo las secreciones vegetales y bacterianas producidas durante ese período. En una primera instancia, se filtraron utilizando papel Whatman N°2 de 8 $\mu$ m, para eliminar restos vegetales. Con el fin de esterilizar la solución hidropónica se filtraron por vacío con discos de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m. Para asegurar la esterilidad de los líquidos hidropónicos antes de su uso, se filtraron con filtros de poliestersulfona de 0,22 $\mu$ m.

Previamente a la filtración se realizaron controles en placa en medio TY y TY suplementado con Cr (VI), de los líquidos hidropónicos, para verificar la presencia de JD2 [resistente a Cr (VI)], y descartar posible contaminación. Además, se realizaron controles de contaminación luego de la filtración para verificar la esterilidad de los líquidos. Los exudados estériles destinados a ensayos de plantas se almacenaron hasta dos días a 4°C mientras que aquellos que se utilizarían para su caracterización química se concentraron por liofilización.

### *3.3.2. Ensayo de plantas in vitro*

#### *3.3.2.1. Desinfección y pre-germinación de semillas*

Las semillas de alfalfa se desinfectaron como se describió en el punto 3.3.1.2. Posteriormente se germinaron en placas conteniendo agar/agua (0,8%) durante 24h a 30°C y oscuridad.

#### *3.3.2.2. Agregado de exudados y transferencia de plántulas a tubos*

Las semillas pre-germinadas se transfirieron a tubos de vidrio (20cm largo; 2,2cm diámetro; 2 semillas por tubo) conteniendo 20mL de medio Jensen con agar al 0.8% (Anexo). Previo al pasaje de las plántulas, se le agregó a los tubos con Jensen 2,5mL de exudados producidos en los

sistemas hidropónicos (ver punto 3.3.1.). Los detalles de los exudados agregados se detallan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Descripción de los exudados utilizados en ensayo de plantas *in vitro*

<b>Exudados agregado</b>	<b>Descripción del líquido hidropónico utilizado en el agregado de exudados</b>
<i>Exudados U143</i>	Exudados producidos por U143 y alfalfa a los 4 días de su inoculación
<i>Exudados COINO</i>	Exudados producidos por JD2, U143 y alfalfa a los 4 días de suco-inoculación
<i>Exudados aa</i>	Exudados producidos por alfalfa sin inocular
<i>s/exudados</i>	Medio Howieson

### 3.3.2.3. Inoculación y co-inoculación

Las plántulas se inocularon y co-inocularon con 100µL de suspensión bacteriana, preparadas como se describió en el punto 3.3.1.4. Las concentraciones finales de U143 y JD2 fueron de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^6$  células por semilla pre-germinada, respectivamente.

Los tratamientos realizados se detallan en la Tabla 3.4. Los tratamientos fertilizados con N (tomados como control positivo) recibieron  $\text{KNO}_3$  a una concentración final de 0,05%.

**Tabla 3.4.** Tratamientos y controles realizados en los ensayos de plantas *in vitro*

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
S/N(Control negativo)	Alfalfa sin inocular
C/N (Control positivo)	Alfalfa sin inocular, fertilizada con N
<i>U143</i>	Alfalfa inoculada con U143
<i>COINO</i>	Alfalfa co-inoculada con JD2 y U143

Cada tratamiento (Tabla 3.4.) se realizó en cada una de las cuatro condiciones detalladas en la Tabla 3.3., constando de 14 tubos (28 plantas) por variable de exudado. En total, se realizó un total de 224 (4x4x14) tubos por ensayo. Las plántulas se incubaron en cuarto de plantas a 22°C, bajo un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad por 30-35 días. El ensayo completo se realizó dos veces.

#### *3.3.2.4. Tasa de nodulación*

En aquellos tratamientos en que las plantas fueron inoculadas con rizobio se contó diariamente el número de nódulos por planta. Se realizaron curvas de tasa de nodulación (número de nódulos por planta en función de los días post-inoculación). En plantas que no fueron inoculadas se constató durante todo el ensayo la ausencia de nódulos.

#### *3.3.2.5. Evaluación del crecimiento vegetal*

A los 30-35 días de inoculación se cortó la parte aérea (PA) de las plantas de alfalfa y se midió la longitud del tallo principal. Posteriormente, se determinó el peso fresco (PF) de la PA. Para determinar el peso seco (PS), las plantas se secaron a 60°C durante 48 horas hasta peso constante.

Las variables evaluadas fueron: longitud de la PA (cm), PF de PA y PR (mg) y PS de PA y PR (mg).

#### *3.3.3. Ensayo de plantas bajo condiciones de invernáculo*

Los ensayos en invernáculo se desarrollaron de forma paralela a los *in vitro*, con un diseño completamente al azar, con ocho tratamientos que recibieron las soluciones hidropónicas producidas en condiciones de co-inoculación conteniendo las secreciones de JD2, U143 y alfalfa.

### *3.3.3.1. Preparación de macetas, desinfección y siembra de semillas*

Se utilizaron macetas conteniendo 600g de sustrato, que consistió en una mezcla de tierra:arena:vermiculita en una proporción 2:2:1. Las semillas se desinfectaron siguiendo las indicaciones mencionadas en el punto 3.3.1.1. Se transfirieron cinco semillas por maceta.

### *3.3.3.2. Inoculación y co-inoculación de semillas*

Las semillas se inocularon al momento de la siembra con 100uL de suspensiones bacterianas de U143 y JD2 según el tratamiento correspondiente (Tabla 3.5.). El inóculo se preparó como se describió en el punto 3.3.1.4. La concentración utilizada de U143 y de JD2 fue de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^6$  células por semilla, respectivamente. Se realizaron controles sin inocular, con y sin el agregado de N ( $\text{KNO}_3$  a una concentración final de 0.05%). Cada tratamiento constó de seis macetas.

### *3.3.3.3. Condiciones de riego*

El día previo a la siembra, las macetas correspondientes a los tratamientos con exudados, se regaron con 100mL de soluciones hidropónicas libres de células, producidas en condiciones de co-inoculación. El resto de los tratamientos fueron regados con agua.

Durante el cultivo, las plantas se regaron cada ocho días y de forma alternada, con 100mL de medio Jensen diluido al décimo, solución de hiperfosfato (N,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{K}_2$ ; 0,29,0) (1g/L), y N como  $\text{KNO}_3$  a una concentración final de 0.05% (sólo en tratamientos fertilizados).

**Tabla 3.5.** Tratamientos y detalle de los riegos realizados en ensayos de plantas en condiciones de invernáculo

Tratamiento	Descripción	Agregado inicial	Riego alternado a lo largo del cultivo		
		Exudados	KNO <sub>3</sub>	Jensen	Hiperfosfato
<i>S/N (Control negativo)</i>	Alfalfasin inocular y sin fertilizar	+	-	+	+
<i>C/N (Control positivo)</i>	Alfalfa sin inocular, fertilizadas con N todo el ciclo	+	+	+	+
<i>Control mínimo N</i>	Alfalfa sin inocular, fertilizada una vez al inicio con N	+	+	+	+
<i>JD2</i>	Alfalfainoculada con JD2, sin fertilización	+	-	+	+
<i>JD2 N</i>	Alfalfa inoculada con JD2, y fertilizadas con N todo el ciclo	+	+	+	+
<i>JD2mínN</i>	Alfalfa inoculada con JD2 y fertilizada una vez al inicio con N	+	+	+	+
<i>U143</i>	Alfalfainoculada con U143, sin fertilización	+	-	+	+
<i>COINO</i>	Alfalfaco-inoculada con U143 y JD2, sin fertilización	+	-	+	+

(+) y (-) Indica que la condición de riego fue realizada o no, respectivamente

#### 3.3.3.4. Raleo

Luego de 10 días desde la siembra, se realizó un raleo de plantas, dejando por maceta las tres plantas en el mejor estado de desarrollo.

### 3.3.3.5. Evaluación del crecimiento vegetal

El experimento se mantuvo bajo condiciones de invernáculo por 50 días. Al momento de la cosecha se procedió de igual forma que en 3.3.2.5.

### 3.3.4. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico univariado (ANOVA). En aquellos casos en que el conjunto de datos no mostraron distribución normal (test de Shapiro Wilk W) u homogeneidad de varianza (test de Levene), se aplicaron pruebas no paramétricas (test de Kruskal Wallis). Se utilizó el paquete estadístico PAST software versión 1.56 (Hammer *et al*, 2001). La significancia estadística fue determinada con un  $p=0,05$ .

## 3.4. Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa

Con el propósito de caracterizar los exudados producidos durante la interacción *S. meliloti* U143-*Delftia* sp. JD2- alfalfa, se obtuvieron estos exudados de un sistema de hidroponia (ver punto 3.3.) y se analizaron tanto por métodos espectrofotométricos convencionales como por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Se caracterizaron los exudados producidos en hidroponía durante cuatro días por: i) plantas sin inocular, sin N (S/N, control negativo); ii) plantas sin inocular, fertilizadas con N (C/N, control positivo); iii) plantas inoculadas con JD2 (*Exudados JD2*); iv) plantas inoculadas con U143 (*Exudados U143*) y v) plantas co-inoculadas con U143 y JD2 (*Exudados COINO*).

Se partió de 400mL de exudados para su caracterización los cuales fueron liofilizados y posteriormente resuspendidos en 500 $\mu$ L de agua ultra pura, luego se filtraron por discos de membrana de nylon de 0,45 $\mu$ m.

#### 3.4.1. Contenido de ácido indol-acético (AIA)

Para detectar y cuantificar el contenido de AIA en los exudados se utilizó el reactivo de Salkowski, preparado a base de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) (Glickmann y Dessaux, 1995). El reactivo empleado permite la oxidación de los compuestos indólicos por sales férricas, formándose una coloración rosada con un máximo de absorbancia a 540nm. Para su detección se adicionó reactivo de Salkowski a la muestra en una relación 1:1, se incubó a temperatura ambiente durante 60min y luego se midió absorbancia a 540 en espectrofotómetro (UV-Visible spectrophotometer UV-1603, Shimadzu). Se realizó una curva de calibración (rango de concentraciones 0, 2.5, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 y 100 $\mu$ g/mL de AIA) empleando un patrón de AIA (solución madre de 5mM preparada en etanol). Se utilizó como control positivo y negativo a los sobrenadantes de *Delftia* sp. JD2 y *Stenotrophomonas* sp. JD1 crecidos en medio TY suplementados con Trp, respectivamente.

#### 3.4.2. Contenido de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales en los exudados se utilizó el ensayo colorimétrico con tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ). La técnica se basa en la formación de un complejo estable entre flavonas y flavonoles con el  $AlCl_3$  con un máximo de absorbancia a 415nm (Jurd, 1962). Para ello se mezclaron en placas de ELISA 25 $\mu$ L de la muestra en etanol al 80%, 75 $\mu$ L de etanol al 95%, 75 $\mu$ L de  $AlCl_3$  al 0,7% y 75 $\mu$ L de acetato de potasio ( $KCH_3CO_2$ ) 0,07%. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 30min y se midió absorbancia a 415nm en un lector de placas (Varioskan<sup>®</sup>, Thermo Scientific). Se utilizó un patrón de quercetina (solución madre de 1mg/mL preparada en etanol 80%) para realizar la curva de calibración (rango de concentraciones 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 100 y 150 $\mu$ g/mL).

### 3.4.3. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por espectrofotometría (Singleton y Rossi, 1965). El método se basa en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilos de los fenoles presentes en la muestra por el reactivo de Folin-Ciocalteu; con un máximo de absorción a 760nm. Para su determinación se mezclaron en placas de ELISA, 18µL de muestra, 280µL de agua destilada y 35µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de 8min en reposo se adicionó 18µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 60min y se midió absorbancia a 760nm en un lector de placas (Varioskan<sup>®</sup>, Thermo Scientific). Para realizar la curva de calibración se empleó un patrón de ácido pirogálico (solución madre de 1mg/mL preparada en agua) en un rango de concentraciones de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 40 y 50µg/mL.

### 3.4.4. Contenido de aminoácidos libres

Dado que los aminoácidos se encuentran entre los compuestos involucrados en la comunicación planta-bacteria y que el precursor directo de la síntesis de AIA es el triptófano, se cuantificó el contenido de aminoácidos libres de los exudados. Para ello, se cuantificaron los grupos amino utilizando el método colorimétrico de TNBS a 420nm (Goodwin y Choi, 1970). Para ello se mezclaron 75µL de muestra, 750µL de buffer borato de sodio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) 0,1M pH 9,2 y 300µL DE TNBS. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. Luego se adicionaron 300µL buffer ácido (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2M + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18mM). La lectura de absorbancia a 420nm se realizó en un lector de placas (Varioskan<sup>®</sup>, Thermo Scientific). Se realizó una curva de calibración en un rango de concentraciones de 30, 50, 75, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 155 y 170µg/mL, empleando una solución madre de glicina de 172µg/mL preparada en agua. Esta técnica no permite diferenciar entre aminoácidos, sino sólo cuantificar aminoácidos totales presentes en los exudados. De esta forma, los aminoácidos totales quedarían expresados en equivalentes de glicina por mL de exudado.

#### 3.4.5. Determinación de azúcares

Para determinar el contenido de azúcares se utilizó el ensayo de Anthrona (Morris, 1948). Este método se basa en la conversión de azúcares en medio ácido en derivados furfuraldehídos, quienes reaccionan con anthrona, desencadenando una reacción colorimétrica con un máximo de absorbancia a 620nm. Para ello se mezclaron 3 volúmenes de solución de Anthrona 0,2% (preparada en ácido sulfúrico 95%) con 1 volumen de muestra. Se calienta durante 10 min a 80-90°C y luego se deja enfriar a temperatura ambiente durante 30min aproximadamente. La lectura de absorbancia a 620 nm se realizó en espectrofotómetro (UV-Visible spectrophotometer UV-1603, Shimadzu). Se realizó una curva de calibración a partir de un patrón de glucosa, entre concentraciones de 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 y 100µg/mL.

#### 3.4.6. Determinación de compuestos de bajo peso molecular (CBPM)

Para la extracción de los CBPM, se precipitaron proteínas y azúcares en los exudados acuosos. Para la precipitación, se mezclaron los exudados con tres volúmenes de acetona-etanol (1:1), y se mantuvo en frío (-20°C) por 24 horas. Luego de una centrifugación (10000rpm, 4°C, 15min), se obtuvo el sobrenadante que se secó por vacío en un evaporador centrífugo a vacío. A continuación, los residuos secos se resuspendieron en acetonitrilo. La derivatización se realizó mediante un proceso de silylación (volatilización) utilizando 100uL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), (Serandour *et al*, 2008). La reacción se llevó a cabo a 70°C por 20min, seguido de incubación a temperatura ambiente. Luego de una centrifugación (10min, 14000rpm), las muestras quedan listas para su inyección en el GC-MS. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en el equipo GCMS-QP 2010 ULTRA (Shimadzu), equipado con un auto-inyector (AOC-20i, Shimadzu), una columna HP-5MS (0.25µm×30m, Agilent) y un flujo de gas Helio de 28.9mL por min. La temperatura inicial del horno fue de 80°C, mantenida por 2min, luego se incrementó a 290°C

(8°C/min), se mantuvo por 3min, finalmente se incrementó a 310°C (20°C/min) y se mantuvo por 10min adicionales. La temperatura del inyector y detector fue de 300°C. La determinación de los compuestos presentes en los exudados (aminoácidos libres, ácidos grasos, etc.) se realizó por comparación con la base de datos de espectros de masa (NIST and Wiley libraries).

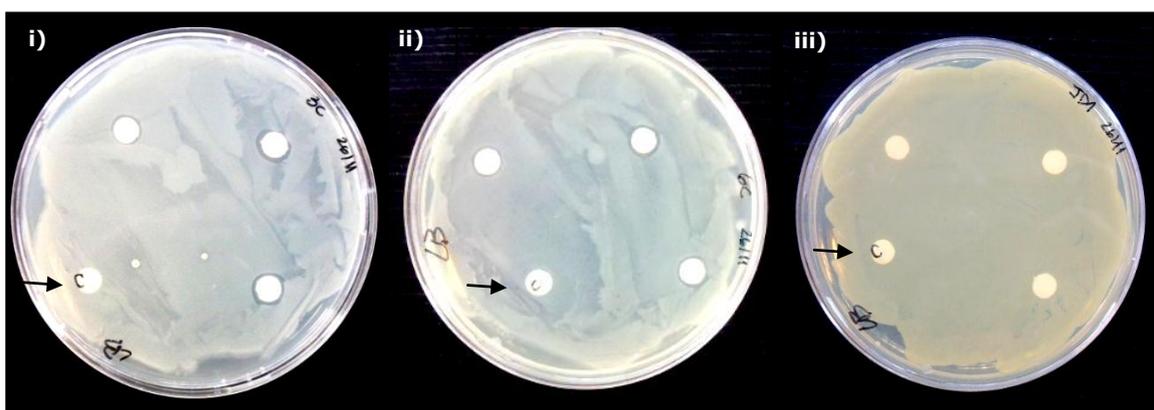
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinación del potencial antagonista de *Delftia* sp. JD2

Se evaluó *in vitro* la capacidad de *Delftia* sp. JD2 de inhibir el crecimiento de otros aislamientos bacterianos del suelo.

En la Figura 4.1. se muestran los resultados de antagonismo positivo, evidenciado por la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco conteniendo JD2. Se observó inhibición del crecimiento de *Delftia* spp. 3C y 6C (halos de inhibición menores a 1mm y muy transparentes), sugiriendo el posible efecto antagónico de JD2 frente a estos aislamientos. Al no contar con un control positivo reconocido, los resultados presentados en esta sección son preliminares.

No se observó inhibición del crecimiento de los restantes aislamientos ensayados (Tabla 3.1), sugiriendo la ausencia de efecto antagónico de *Delftia* sp. JD2 sobre dichos aislamientos (ej. *Stenotrophomonas* sp. JD1; Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Estudio de la capacidad antagonista de *Delftia* sp. JD2 frente a i) *Delftia* sp. 3C, ii) *Delftia* sp. 6C y iii) *Stenotrophomonas* sp. JD1 (ejemplo de ausencia de antagonismo). Cada placa presenta tres discos impregnados con JD2 y un control negativo (-), indicado con una flecha.

## **4.2. Efecto de los exudados hidropónicos sobre la nodulación y el crecimiento vegetal de alfalfa**

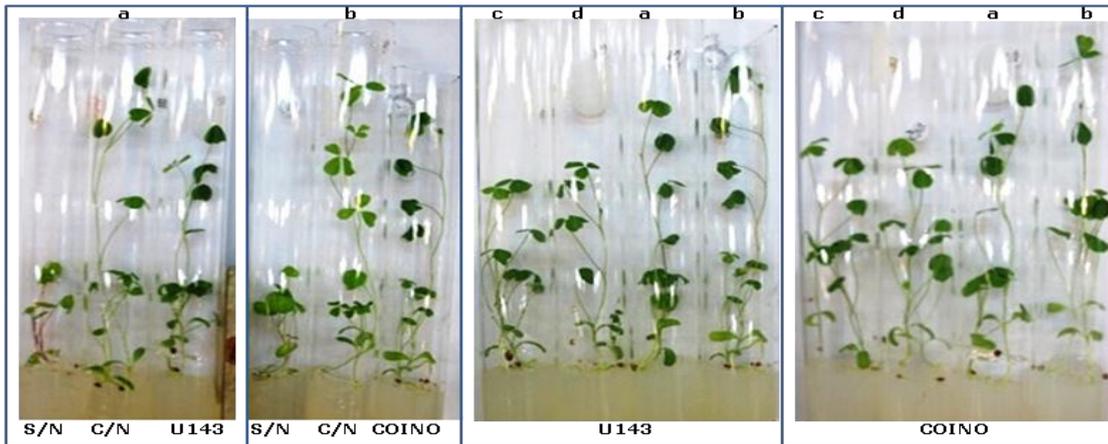
### *4.2.1. Ensayo de plantas in vitro*

La respuesta de las plantas de alfalfa frente a los exudados hidropónicos colectados a los cuatro días luego de la inoculación o co-inoculación, fue variable, dependiendo del exudado y del tratamiento de inoculación. Los resultados de estos ensayos se muestran a continuación.

#### *4.2.1.1. Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de alfalfa*

Luego de 30 días de crecimiento, se evaluó la promoción del crecimiento vegetal de las plantas mediante las tasas de nodulación, así como medidas de PS y PF y longitud de PA. En la Figura 4.2 se muestra la apariencia de las plantas en uno de los ensayos (o réplica biológica) realizados.

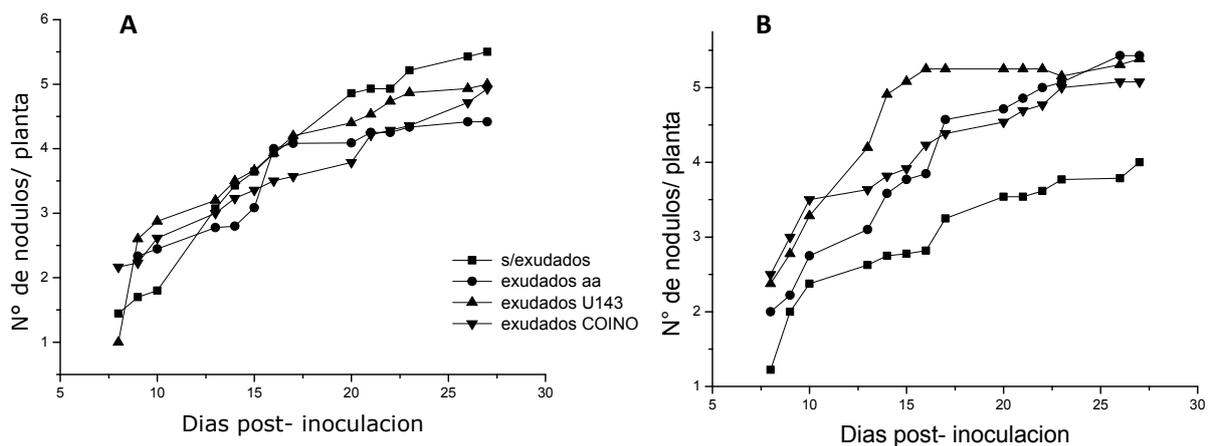
Se realizaron dos réplicas biológicas de cada tratamiento, mostrando en ambos casos la misma tendencia por tratamiento, por lo cual a continuación se muestran los resultados de uno de los ensayos.



**Figura 4.2.** Plantas de alfalfa en ensayos *in vitro*. En la parte superior de las figuras se indica la condición de exudados agregados: a. *exudados U143*, agregado de exudados de alfalfa y U143; b. *exudados COINO*, agregado de exudados producidos en condiciones de co-inoculación; c. *exudados aa*, agregado de exudados producidos por alfalfa; d. *s/exudados*, agregado de Howieson; y en la inferior el tratamiento de inoculación: *S/N*, plantas con déficit de N y sin inoculación; *C/N*, plantas fertilizadas con N y sin inocular; *U143*, plantas inoculadas con U143; *COINO*, plantas co-inoculadas con JD2 y U143.

#### 4.2.1.2. Tasa de nodulación

Las curvas de tasa de nodulación y las tasas de nodulación se muestran en la Figura 4.3. y Tabla 4.1., respectivamente.



**Figura4.3.** Tasa de nodulación por *S. meliloti* U143 en alfalfa inoculada sólo con U143 (A) y co-inoculada con JD2 y U143 (B). (■) *s/exudados*, medio conteniendo sólo Howieson; (●) *exudados aa*, adicionado de exudados de alfalfa; (▲) *exudados U143*, adicionado con exudados de alfalfa y U143;(▼) *exudados COINO*, adicionado con exudados producidos en condiciones de co-inoculación.

-Plantas inoculadas sólo con U143 (Figura 4.3A) -

Los nódulos activos (rosados) aparecieron 8 días después de la inoculación de las plantas (entre uno y dos nódulos por planta), en todas las condiciones ensayadas. En todos los casos su número aumentó hasta el día 20, alcanzando un número máximo de nódulos similar al final del ensayo. La única excepción fue el tratamiento de plantas crecidas en ausencia de exudados (s/exudados), el cual mostró la mayor tasa de nodulación (Tabla 4.1.), sugiriendo un posible efecto inhibitorio de las moléculas presentes en los exudados (producidos tanto en presencia como ausencia de inoculación) sobre la nodulación por U143.

-Plantas co-inoculadas (Figura 4.3 B) -

Al igual que en las plantas inoculadas sólo con U143 se evidenció la aparición de nódulos a los 8 días posteriores a la inoculación, y su número aumento hasta los 20 días, excepto para los tubos suplementados con exudados obtenidos en condiciones de inoculación con U143. En este último caso, el número de nódulos por planta fue máximo a los 15 días y fueron las plantas que mostraron mayor número de nódulos por planta a lo largo del tiempo. Al final del ensayo, todas las plantas (excepto aquellas que no recibieron el agregado de exudados) presentaron el mismo número de nódulos por planta. Sin embargo, las plantas que crecieron en presencia de exudados obtenidos de la co-inoculación de alfalfa, presentaron mayor tasa de nodulación (*exudados COINO*; Tabla 4.1). Las plantas crecidas en presencia de exudados de alfalfa sin inocular o inoculada con U143, mostraron una tasa de nodulación menor, incluso a la tasa presentada por plantas crecidas en ausencia de exudados, sugiriendo una vez más que la alfalfa produce y secreta sustancias que podrían estar involucradas en la inhibición de la nodulación. Esto podría estar relacionado con la secreción de sustancias que autorregulen una hipernodulación ineficiente.

-Comparación entre los tratamientos inoculados y co-inoculados (Tabla 4.1.)

Comparando los resultados obtenidos para plantas inoculadas y co-inoculadas, pero sin el agregado de exudados al sustrato de crecimiento de las plantas, se detectan diferencias en las tasas de nodulación, siendo mayores siempre en aquellas plantas co-inoculadas, comparado con las plantas sometidas a inoculación simple.

Analizando solamente los diferentes tratamientos con plantas co-inoculadas, se puede apreciar nuevamente una disminución de la tasa de nodulación cuando se agregan exudados de alfalfa producidos en presencia o ausencia de U143. Sin embargo, este efecto no se observa cuando se agregan exudados de alfalfa producidos en condiciones de co-inoculación, donde se registra la mayor tasa de nodulación. Estos resultados sugieren el efecto positivo de la co-inoculación con JD2 y U143 al momento de establecerse la asociación entre el rizobio y la planta, y la posible ventaja del agregado de exudados de alfalfa producidos en condiciones de co-inoculación.

**Tabla 4.1.** Tasas de nodulación (número de nódulos por planta por día) de alfalfa por *S. meliloti* U143 en ensayos de inoculación simple con U143 y co-inoculación con U143 y JD2. Las tasas de nodulación fueron calculadas entre los días 8 y 10.

<i>Exudados agregados</i>	<b>N° de nódulos/planta /día</b>	
	<b>Inoculación simple con U143</b>	<b>Co-inoculación con U143 y JD2</b>
<i>s/exudados</i>	0,46	0,56
<i>exudados aa</i>	0,24	0,41
<i>exudados U143</i>	0,20	0,44
<i>exudados COINO</i>	0,21	0,60

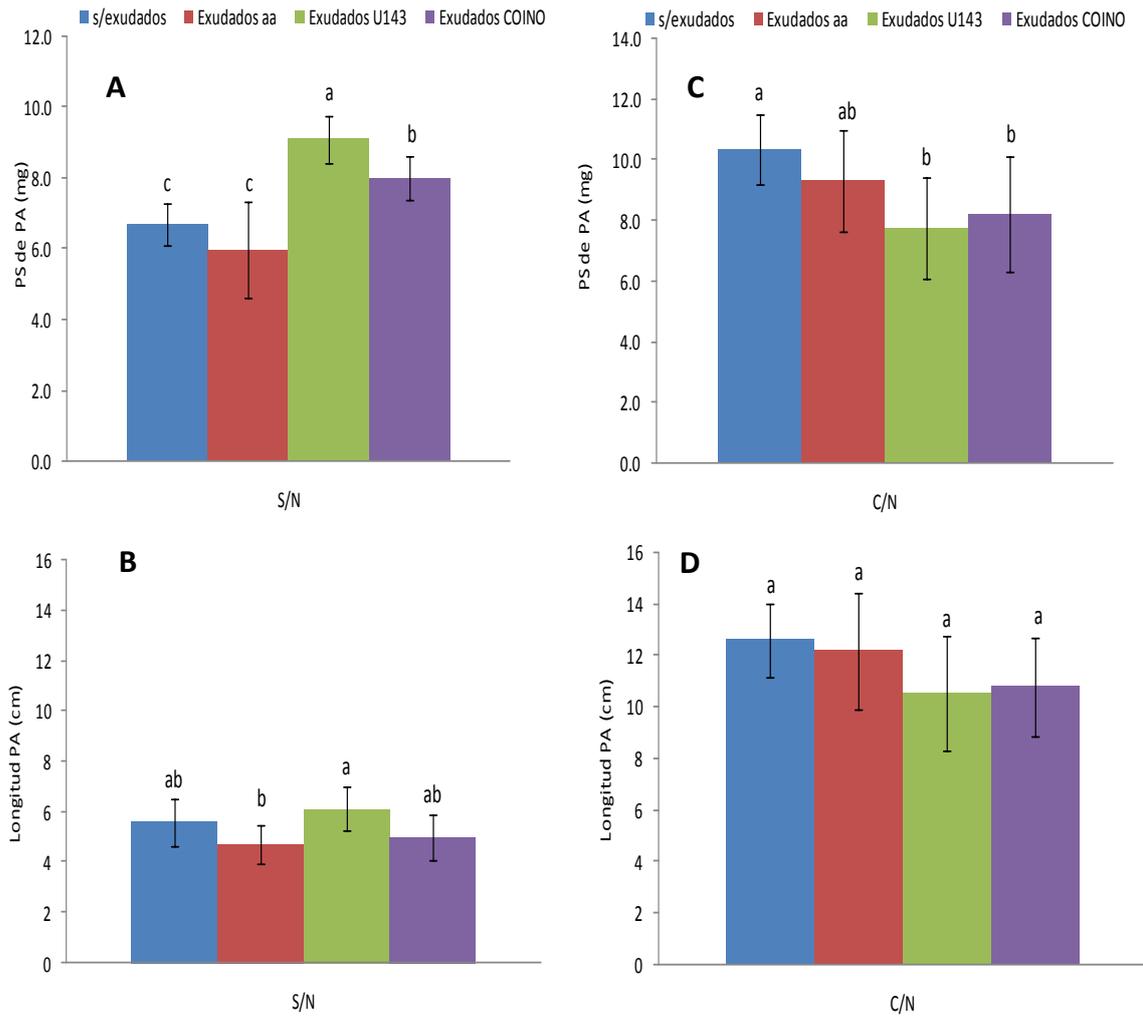
#### 4.2.1.3. Evaluación del crecimiento vegetal "in vitro"

Debido a la gran cantidad de tratamientos realizados y a la complejidad de los ensayos realizados *in vitro*, los resultados se analizarán por bloques, comparando por un lado los tratamientos de inoculación y co-inoculación y por otro, los tratamientos con el agregado de los diferentes tipos de exudados. No se realizó un análisis estadístico que relacione ambas variables: inoculación y agregado de exudados.

##### -Plantas control (Figura 4.4.) –

En las plantas control sin el agregado de fertilización nitrogenada, se detectó que el agregado de exudados producidos en condiciones de inoculación y co-inoculación promueven el crecimiento de alfalfa, sugiriendo que en estas condiciones se producen moléculas capaces de promover el crecimiento vegetal (Figura 4.4 A). Sin embargo, este efecto no se evidenció cuando se analizan los resultados de longitud de PA (Figura 4.4B).

En términos generales, el agregado de exudados no tiene efecto sobre las plantas de alfalfa fertilizadas con nitrógeno, pero sin inoculación (Figura 4.4C y D).



**Figura 4.4.** Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa *in vitro* en plantas control negativo (S/N) y plantas control positivo (C/N). (A y C) Peso seco de parte aérea/planta. (B y D) Longitud de parte aérea/planta. Las condiciones de agregado de exudados fueron: *exudados U143*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143; *exudados COINO*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143 y JD2 ; *exudados aa*, agregado de exudados producidos por alfalfa; *s/exudados*, agregado de Howieson. Letras iguales indican tratamientos sin diferencias significativas ( $p=0,05$ ).

-Plantas inoculadas sólo con U143 (Figura 4.5.) -

Los resultados obtenidos al comparar las plantas inoculadas con U143 muestran que el agregado de exudados de alfalfa-U143 (*exudados U143*) al medio tiene un efecto positivo en el crecimiento de la plantas. A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre este tratamiento y las plantas crecidas en ausencia de exudados (*s/exudados*), el incremento observado en la biomasa aérea fue del 11,8% (Figura 4.5 A).

Por otro lado, el agregado de exudados producidos en condiciones de co-inoculación (*Exudados COINO*) tiene un efecto negativo sobre el crecimiento vegetal, sugiriendo la secreción de moléculas inhibitorias del crecimiento.

Sólo se observaron diferencias significativas en la longitud de PA debido a la presencia de exudados de alfalfa-U143 (Figura 4.5B).

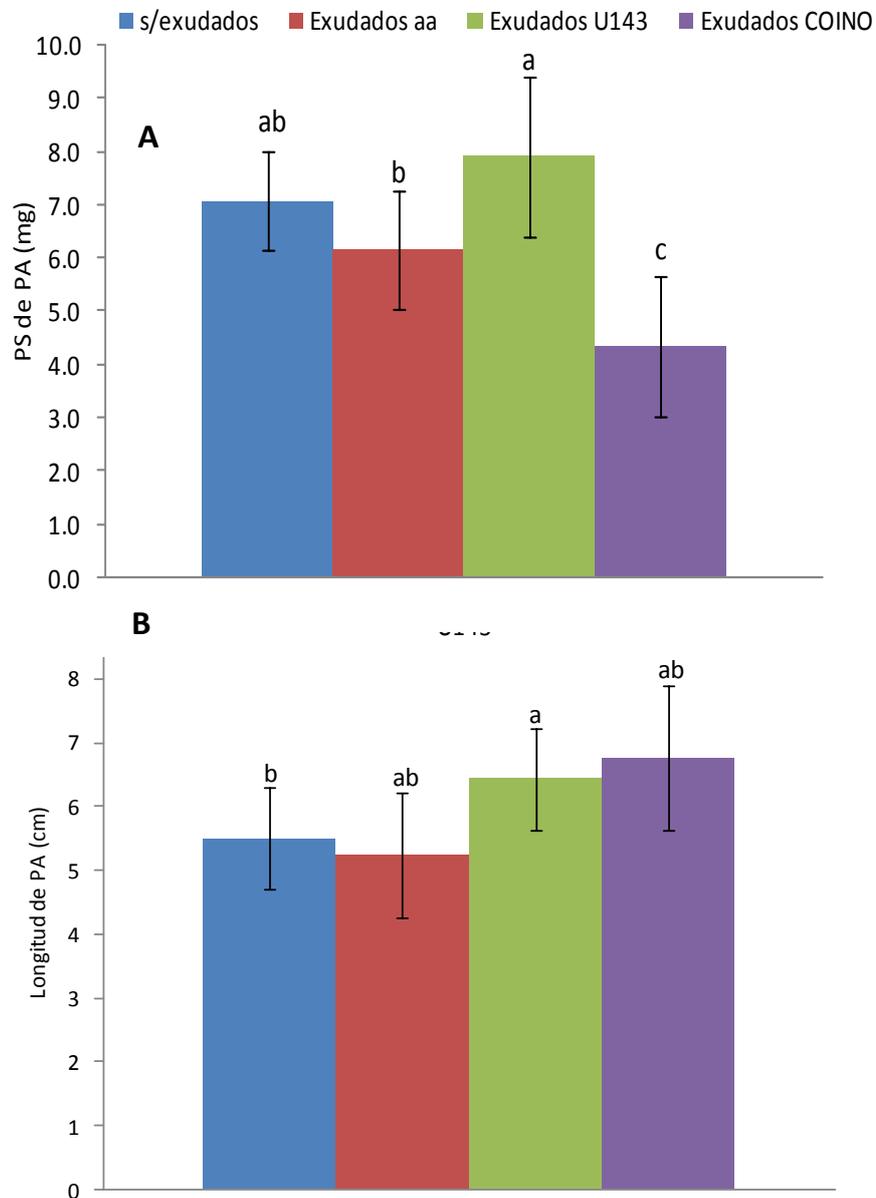
-Plantas co-inoculadas con U143 y JD2 (Figura 4.6.) -

Al contrario de lo que ocurre con las plantas inoculadas con el rizobio, en aquellas co-inoculadas se observó un efecto positivo tanto por el agregado de exudados de alfalfa inoculada (*exudados U143*) como de alfalfa co-inoculada (*exudados COINO*), comparado con las plantas que no recibieron exudados (*s/exudados*)(Figura 4.6A).

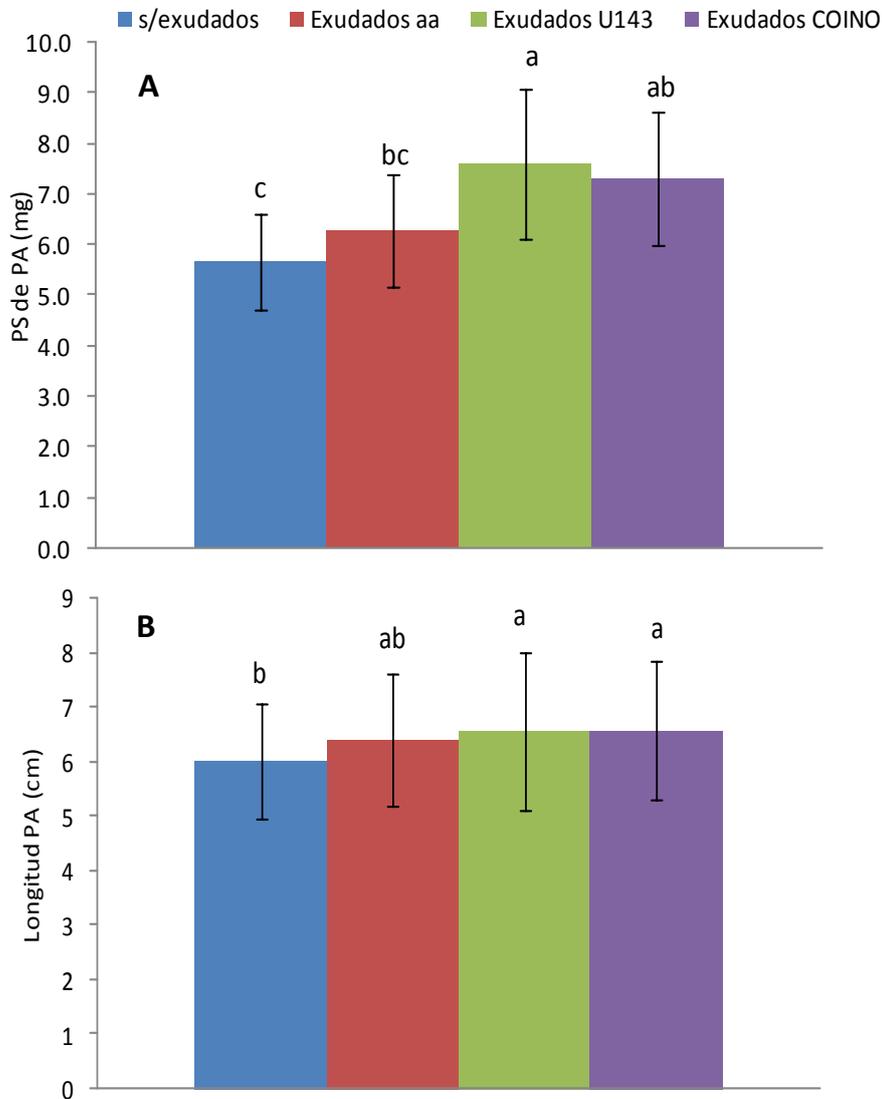
El agregado de exudados de alfalfa inoculada con U143 incrementó un 20% la biomasa aérea respecto a la obtenida con plantas crecidas en ausencia de exudados (Figura 4.6A).

No se observaron diferencias en el PS de PA entre las plantas crecidas en ausencia y presencia de exudados únicamente de alfalfa (*exudados aa*). Este resultado y los anteriores, sugieren la presencia de compuestos claves en la promoción del crecimiento vegetal, en los exudados producidos en presencia de U143 y/o de JD2, en las condiciones ensayadas.

No se observaron diferencias en la longitud de la PA entre las plantas co-inoculadas (Figura 4.6B).



**Figura 4.5.** Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa *in vitro* en condiciones de inoculación con U143. (A) Peso seco de parte aérea/planta. (B) Longitud de parte aérea/planta. Las condiciones de agregado de exudados fueron: *exudados U143*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143; *exudados COINO*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143 y JD2; *exudados aa*, agregado de exudados producidos por alfalfa sin inoculación; *s/exudados*, agregado de Howieson. Letras iguales indican tratamientos sin diferencias significativas ( $p=0,05$ ).



**Figura 4.6.** Efecto del agregado de exudados sobre el crecimiento de plantas de alfalfa *in vitro* en condiciones de co-inoculación con U143 y JD2. (A) Peso seco de parte aérea/planta. (B) Longitud de parte aérea/planta. Las condiciones de agregado de exudados fueron: *exudados U143*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143; *exudados COINO*, agregado de exudados de alfalfa producidos en presencia de U143 y JD2; *exudados aa*, agregado de exudados producidos por alfalfa; *s/exudados*, agregado de Howieson. Letras iguales indican tratamientos sin diferencias significativas ( $p=0,05$ ).

#### 4.2.2. Ensayo de plantas bajo condiciones de invernáculo

Se evaluó en forma paralela al ensayo *in vitro*, el efecto de la co-inoculación con JD2 y U143, y el agregado de exudados producidos en hidroponia por alfalfa en condiciones de co-inoculación, sobre el crecimiento vegetal de alfalfa en ensayos de macetas en invernáculo.

##### 4.2.2.1. Evaluación del crecimiento vegetal

Luego de 50 días de crecimiento se cortó, secó y pesó la PA y PR de las plantas. Estos resultados se muestran en la Figura 4.7.

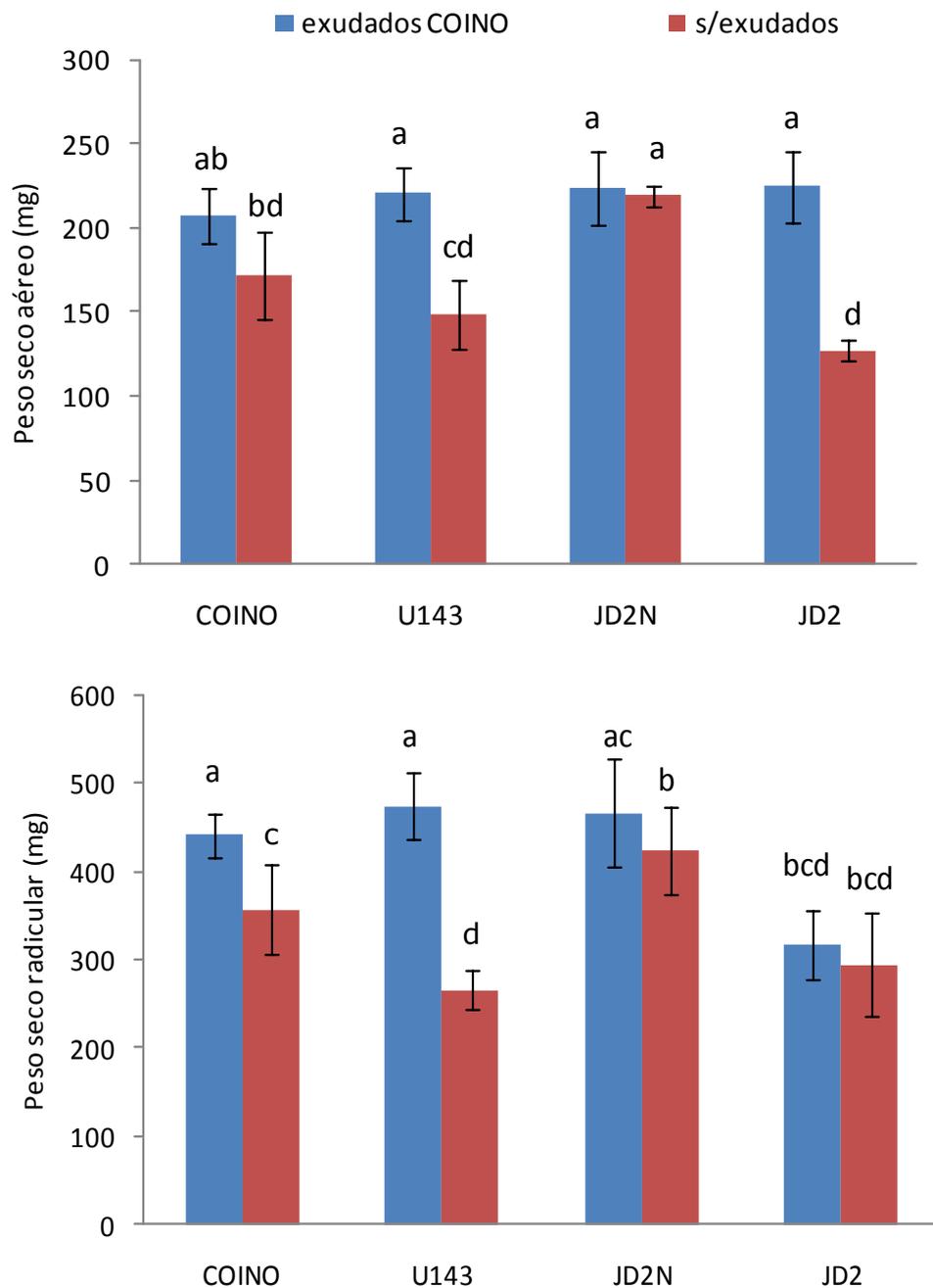
-Efecto de la inoculación y co-inoculación sobre la biomasa aérea de las plantas-

En ausencia de exudados (*s/exudados*), se observó un aumento del 15% en el PS de la PA de plantas co-inoculadas frente a las plantas inoculadas con rizobio e incluso de un 30% respecto a las plantas inoculadas con JD2 (Fig. 4.7 A). Sin embargo, a pesar de estos aumentos, el análisis estadístico de los resultados de PS de PA no mostró diferencias significativas entre estos tratamientos. La excepción fue el tratamiento de plantas inoculadas con JD2 y con fertilización nitrogenada (JD2N) que, en ausencia de exudados, fueron las que presentaron mayor PS de PA (Figura 4.7A).

-Efecto de los exudados sobre la biomasa aérea de las plantas-

Comparando entre sí los tratamientos de plantas que crecieron en presencia y ausencia de exudados, se observó en todos los casos un aumento del rendimiento en PS de PA debido a los exudados. Sin embargo, el análisis estadístico entre los tratamientos de plantas crecidas con exudados, no desprendió diferencias estadísticamente significativas entre los mismos (Figura 4.7A).

Las plantas inoculadas con U143 y crecidas en presencia de exudados, mostraron un aumento del 47% en la producción de biomasa aérea, comparado con el mismo tratamiento de plantas inoculadas pero sin exudados en el sustrato (Figura 4.7A). De forma similar, las plantas inoculadas con JD2, presentaron un 51% de aumento en la biomasa de PA debido a la presencia de exudados en el sustrato.



**Figura 4.7.** Efecto de la co-inoculación y el agregado de exudados hidropónicos producidos por alfalfa-JD2-U143, sobre el crecimiento de plantas de alfalfa en invernáculo. (A) Peso seco parte aérea/planta y (B) Peso seco de parte radicular/planta. Las condiciones fueron: s/exudados, agregado de Howieson; y *exudados COINO*, exudados producidos en condiciones de co-inoculación. Se muestran únicamente los tratamientos de inoculación: COINO, plantas co-inoculadas con JD2 y U143; U143, plantas inoculadas con U143; JD2N, plantas inoculadas con JD2 y fertilizadas todo el ciclo con N y JD2, plantas inoculadas con JD2. Iguales letras indican tratamientos sin diferencias significativas ( $p=0,05$ ).

-Efecto de la inoculación y co-inoculación sobre la biomasa radicular-

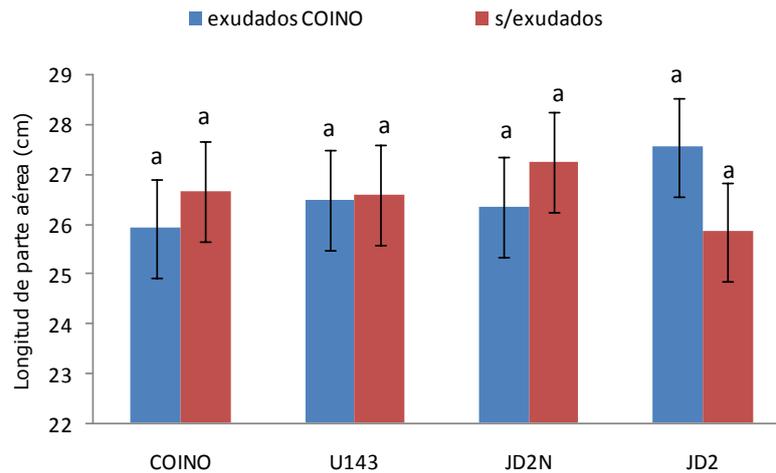
En ausencia de exudados, se observaron diferencias significativas en los resultados de PS de PR entre los diferentes tratamientos (Figura 4.7B). El tratamiento que mostró la mayor biomasa radicular fue el nitrogenado seguido por el tratamiento sometido a co-inoculación (Fig. 4.7B). En este último, se determinó una diferencia significativa en el rendimiento, con un 33% de incremento en relación al tratamiento inoculado con el rizobio.

-Efecto de los exudados sobre la biomasa radicular de las plantas-

Al igual que se observó con la PA, la presencia de exudados en el sustrato de crecimiento derivó en un aumento en la biomasa radicular de las plantas (Figura 4.7B).

Las plantas inoculadas con *S. meliloti* U143 y crecidas en presencia de exudados mostraron un incremento en el crecimiento radicular del 56% en relación a las plantas también inoculadas con U143 pero sin exudados en el sustrato de crecimiento. Para el caso de las plantas co-inoculadas, también se observó un incremento del 17% en el PS de PR debido a los exudados. El análisis estadístico de los datos indicó diferencias significativas para estas relaciones (Figura 4.7B).

La longitud de la PA no mostró diferencias entre las plantas crecidas en presencia y ausencia de exudados (Figura 4.8.).



**Figura 4.8.** Efecto de la co-inoculación con JD2 y U143 y el agregado de exudados hidropónicos producidos por alfalfa-JD2-U143, sobre la longitud parte aérea/planta de alfalfa en ensayo de invernáculo. Las condiciones fueron: *s/exudados*, agregado Howieson; y *exudados COINO*, agregado de exudados producidos en condiciones de co-inoculación. Se muestran únicamente los tratamientos de inoculación: COINO, plantas co-inoculadas con JD2 y U143; U143, plantas inoculadas con U143; JD2N, plantas inoculadas con JD2 y fertilizadas todo el ciclo con N y JD2, plantas inoculadas con JD2. Iguales letras indican tratamientos sin diferencias significativas ( $p=0,05$ ).

Tanto para PA como PR, JD2 no promueve el crecimiento vegetal de alfalfa cuando esta no tiene una fuente adicional de nitrógeno, hecho que ya había sido reportado en trabajos anteriores.

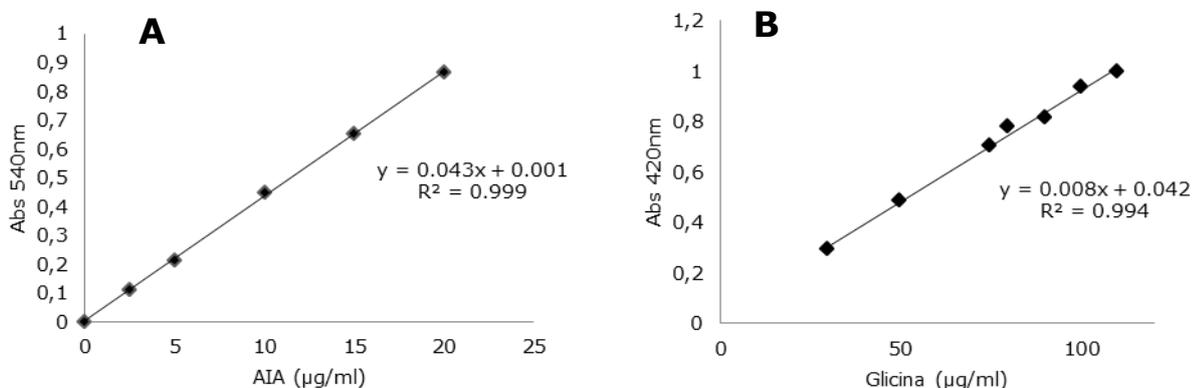
### 4.3. Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa

A excepción de los azúcares totales, no se logró detectar espectrofotométricamente ninguna de las moléculas analizadas en los exudados, para ninguno de los tratamientos. Sin embargo, sí se logró detectar algunas moléculas componentes de los mismos por GC-MS. Siendo esta última técnica más sensible que las técnicas espectrofotométricas es posible afirmar que la concentración de los componentes analizados fuera muy baja como para ser detectados por espectrofotometría.

Se muestran a continuación las curvas de calibración realizadas en paralelo al análisis espectrofotométrico de los diferentes compuestos y los resultados obtenidos por GC-MS.

#### 4.3.1. Curvas de calibración

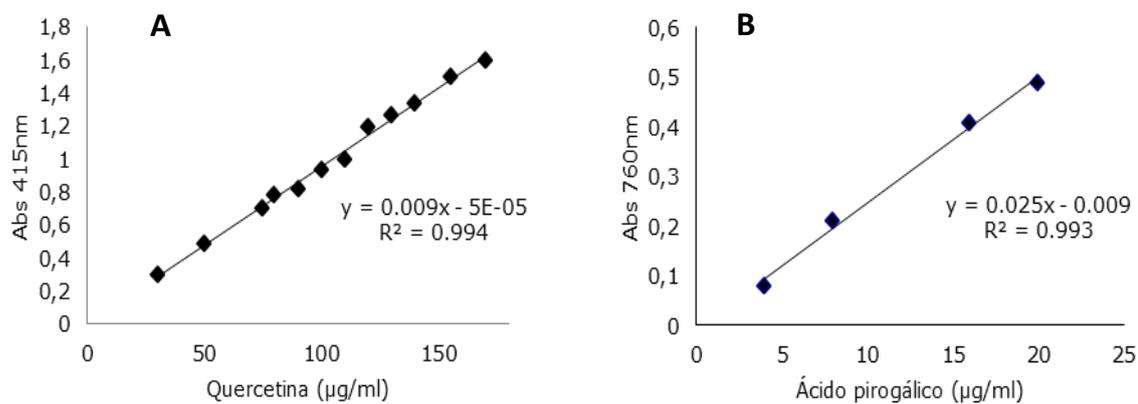
En la Figura 4.9A, se muestra la curva de calibración construida para la determinación de AIA, utilizando ácido indol-acético como estándar.



**Figura 4.9.** Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de AIA(A) y aminoácidos libres (B).

Para la cuantificación de aminoácidos libres se realizó la curva de calibración que se muestra en la Figura 4.9B, utilizando Glicina como aminoácido estándar.

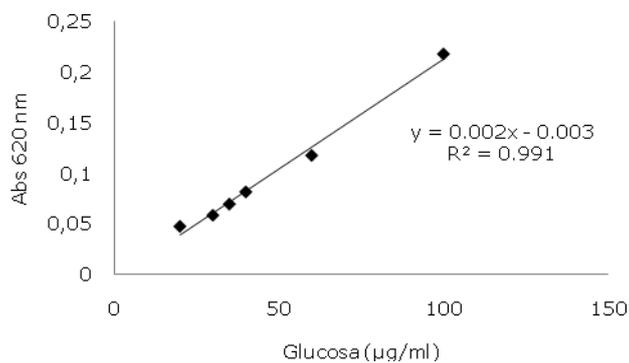
Si bien se lograron detectar flavonoides mediante la técnica colorimétrica con  $AlCl_3$ , los resultados no fueron concordantes entre los triplicados. Se observaron incluso problemas de suspensión de las muestras (muestras turbias), sugiriendo posibles interferencias debido a la técnica utilizada. Las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de los flavonoides totales y fenoles se muestran en la Figura 4.10.



**Figura 4.10.** Curvas de calibración para la cuantificación de Flavonoides (A) y fenoles totales (B), utilizando estándares de Quercetina y Ácido pirogálico, respectivamente.

#### 4.3.2. Determinación de azúcares

La concentración de azúcares en los exudados se determinó por el ensayo de Anthrona, empleando una curva de calibración a partir de glucosa como estándar (Figura 4.11.). La concentración azúcar para cada exudado se detalla en la Tabla 4.2.



**Figura 4.11.** Curva de calibración para la cuantificación de azúcares. El patrón utilizado fue Glucosa.

Se detectaron cambios en la concentración de azúcares de los exudados entre los diferentes tratamientos. La mayor concentración de azúcares se encontró en los exudados del tratamiento de plantas fertilizadas con nitrógeno y la menor en los tratamientos con déficit de nitrógeno. Por otro lado, las inoculaciones simples y la co-inoculación presentaron valores similares de producción de azúcares. Si bien la determinación se hizo por triplicado, cada medida representa una réplica biológica distinta y solo se muestra una de ellas en la Tabla 4.2. Por pertenecer a diferentes ensayos o réplicas biológicas, los valores no son promediados ni se puede calcular con ellos la desviación estándar de los datos. Este hecho imposibilita realizar con ellos un análisis estadístico que marque diferencias reales significativas.

**Tabla 4.2.** Concentración de azúcares de exudados producidos a los cuatro días luego de la inoculación y co-inoculación de plantas de alfalfa

<b>Exudados</b>	<b>Concentración de azúcar (<math>\mu\text{g/ml}</math> de exudado producido)</b>
COINO	1,2
U143	1,5
JD2	1,2
S/N	0,4
C/N	2,7

#### 4.3.3. Determinación de compuestos de bajo peso molecular (CBPM)

Los exudados producidos durante la interacción microorganismo - planta a los 4 días de inoculación, mostraron un perfil de compuestos de bajo peso molecular muy variado (Tabla 4.3.).

En los exudados se detectaron principalmente azúcares, ácidos orgánicos, amidas y COVs. En aquellos producidos en condiciones de inoculación y co-inoculación se detectaron, además de los compuestos anteriormente nombrados, otros compuestos que podrían tener mayor relevancia en la interacción planta-microorganismo tales como: limoneno,

ácido hidroxi-butírico, ácido oleico, butanodiol, ácido nonanoico, ácido benzoico y varias amidas. El limoneno se detectó solo en exudados obtenidos en condiciones de inoculación y co-inoculación; mientras que el ácido nonanoico se detectó solo en exudados obtenidos en condiciones de inoculación con JD2. El ácido benzóico, el ácido hidróxi-butírico y el ácido oleico sólo fueron detectaron en exudados COINO.

**Tabla 4.3.** Compuestos de bajo peso molecular detectados GC-MS en exudados colectados a los cuatro días desde la inoculación de las plantas. Se indica sólo la presencia (+) o ausencia (-) del compuesto en estudio.

Compuesto	Grupo	COINO	JD2	U143	S/N
Limoneno	terpeno	+	-	+	-
Benzenopropanoico	Fenol (fenilpropanoide)	+	+	+	+
Butanodiol	COV (alcohol)	+	+	+	+
Ácido bórico	ácido	+	+	+	+
Ácido fosfórico	oxoácido	+	+	+	+
Ácido acético	Ácido carboxílico	+	+	-	+
Ácido benzoico	Ácido carboxílico	+	-	-	-
Ácido hidroxibutírico	Ácido carboxílico	+	-	-	-
Ácido adípico (o hexanodioico)	Ácido dicarboxílico	+	+	+	+
Ácido malónico	Ácido dicarboxílico	-	+	-	-
Ácido propanoico (o propiónico)	Ácido graso saturado	+	+	+	+
Ácido nonanoico	Ácido graso saturado	+	+	-	-
Ácido mirístico	Ácido graso saturado	+	+	+	+
Ácido palmítico	Ácido graso saturado	+	+	+	+
Ácido esteárico	Ácido graso saturado	+	+	+	+
Ácido oleico	Ácido graso monoinsaturado	+	-	-	-
Isopropilmálico	Derivado de ácido carboxílico	+	+	+	+
Monopalmitin	Derivado de ácido graso	+	+	+	+
Hexanamida	Amida derivada del ácido hexanoico (o caproico)	+	-	+	-
Urea	Diamida	+	+	+	+
Amida sin identificar	Amida	-	+	-	-
Silanamina	Amina	+	+	+	+
Amina sin identificar	Amina	-	-	+	-
pentano o heptano	Alcano	+	+	+	+
propano	Alcano	-	+	-	+
bromosilanos	Compuesto bromado	+	+	+	+
Arabinosa	monosacárido	-	+	-	-
Inositol	polialcohol	-	+	-	-
Glucitol	polialcohol	-	+	-	-

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 5.1. Capacidad antagónica

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagonista de JD2 frente a diversos aislamientos bacterianos. Entre los aislamientos evaluados, *Delftia* sp. JD2 fue capaz de inhibir el crecimiento de las otras dos *Delftia* spp., pero no interfirió con el crecimiento de los rizobios de soja, alfalfa, ni trébol. Si bien no siempre las observaciones realizadas en laboratorio, en condiciones *in vitro*, se corresponden a lo que sucede en condiciones de campo, donde interaccionan muchos más factores (planta, suelo, actividad de otros microorganismos, supervivencia, capacidad de colonización, etc.), este estudio sugiere que una formulación comercial a base de rizobios, podría incluir también a *Delftia* sp. JD2 como co-inoculante.

Si bien existen numerosos antecedentes de estudios realizados sobre antagonismo en otras bacterias, principalmente bio-controladoras (Schippers *et al*, 1987), este es el primer estudio realizado con una bacteria del género *Delftia* como potencial inhibidor. Los mecanismos de inhibición del crecimiento podrían ser tan variados como complejos. Entre los más reportados están la producción de compuestos extracelulares como las proteasas, sideróforos, antibióticos, peróxidos, etc. (Schippers *et al*, 1987; Podile y Kishore, 2006; Hayat *et al*, 2010). Si bien la técnica utilizada durante este trabajo no permite determinar si la sustancia inhibidora es liberada al medio de cultivo, se podría comprobar si la difusión del sobrenadante libre de células de JD2 también provoca la aparición de halos de inhibición en las otras *Delftia* spp. La determinación del mecanismo de inhibición no fue parte del objetivo general de esta tesis aunque se podría abordar en trabajos futuros.

Los ensayos de antagonismo aquí realizados se basaron solamente en la presencia o ausencia de un halo de inhibición sin importar su tamaño.

Para que los resultados sean más confiables, se deberían realizar ensayos de difusión en disco con medidas de diámetro de la zona del halo correlacionadas con la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de JD2 y con cepas susceptibles y resistentes a la misma.

## **5.2. Evaluación de los efectos del agregado de exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa, sobre el crecimiento vegetal**

El efecto positivo de la sola co-inoculación JD2-U143 sobre el crecimiento de plantas de alfalfa fue confirmado en los ensayos de invernáculo durante este trabajo. Hasta donde conocemos, este es el primer reporte de promoción del crecimiento de alfalfa en condiciones de macetas en invernáculo, sometidas a co-inoculación (rizobio-*Delftia*). Además, los ensayos *in vitro* confirmaron el efecto positivo sobre la nodulación.

El efecto de la inoculación por fijadores de nitrógeno en leguminosas, así como el efecto sinérgico de la co-inoculación con U143 y JD2 en alfalfa están ya confirmados y reportados (Morel *et al*, 2012). 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). También ha sido reportado que JD2 puede funcionar como una bacteria colaboradora de rizobios durante la co-inoculación de alfalfa o trébol en condiciones gnotobióticas, mejorando así el rendimiento de la planta (Morel *et al*, 2011).

El empleo de inoculantes mixtos en los cultivos agrícolas, en general, se asocia a una mayor asimilación de nitrógeno, comparado con 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). El ejemplo más conocido es la inoculación con *Azospirillum*, debido a su capacidad de fijar nitrógeno en vida libre, producir fitohormonas y sideróforos (Perotti y Pidello, 1999). Según algunas experiencias reportadas para PGPRs, en general, el incremento del rendimiento de leguminosas co-inoculadas se asocia con una mayor FBN, redundando en un aumento de la producción vegetal. En el presente trabajo, se observó *in vitro* la mayor tasa de nodulación en aquellas plantas co-inoculadas. Sin embargo, esta mejora en la nodulación no se acompañó de un aumento en la producción vegetal, ni en el peso seco ni en la longitud de parte aérea de las plantas de alfalfa.

Para llegar a una conclusión definitiva acerca de la promoción de crecimiento vegetal de alfalfa sería interesante determinar el contenido de nitrógeno y clorofila.

Por otro lado, el agregado de nitrógeno provoca, además de una inhibición de la FBN por los rizobios, un aumento en la biomasa aérea, debido a la alta disponibilidad de este nutriente. En este trabajo, las plantas sin el agregado de nitrógeno (S/N) presentaron medidas de PS de PA comparables con las plantas inoculadas con U143 e incluso en algunos casos, con plantas fertilizadas con nitrógeno. Este resultado inesperado, si bien contradice lo antes expuesto, puede explicarse metodológicamente: hubo un cambio en la fuente de agar utilizada en la preparación del medio Jensen de los ensayos *in vitro*. Los ensayos *in vitro* previos a este trabajo se realizaron siempre utilizando una fuente de agar con bajo y conocido contenido de N (Difco). Sin embargo, para los ensayos aquí discutidos se utilizó un agar comercial del cual se desconoce el contenido de N (Sigma). Este hecho puede explicar al menos en parte el considerable crecimiento de estas plantas. Cabe resaltar que el cambio de agar y el posible efecto que pudo haber tenido en el desarrollo de las plantas, afectó por igual a todas ellas y no solo al control negativo.

En relación al agregado de exudados al medio de crecimiento, se observaron diferencias entre las plantas que crecieron sin nitrógeno agregado en presencia de exudados de alfalfa inoculada (U143) y co-inoculada (U143-JD2), respecto a las que crecieron en ausencia de los

mismos. Por otro lado, el agregado de exudados de alfalfa sin inocular no afectó la producción de biomasa aérea de las plantas. Mark *et al* (2013) recientemente reportaron la eficiencia en el uso de metabolitos producidos por rizobios para mejorar el efecto de los co-inoculantes a base de *Bradyrhizobium* spp. y *Azospirillum brasilense*, en soja y maíz. Sin embargo, hasta el momento no se conocen reportes acerca de la utilización de exudados producidos durante la interacción PGPR-rizobio-planta como parte del riego o como fertilización previa a la siembra.

Las plantas control positivo recibieron fertilización nitrogenada, la cual les permitió un mayor crecimiento, respecto a las restantes plantas, debido a la inmediata disponibilidad de este nutriente para su asimilación. El agregado de exudados al medio afectó a estas plantas de forma negativa, siendo menor el crecimiento en aquellas plantas que crecieron en presencia de exudados de alfalfa sometidos a co-inoculación (U143-JD2) e inoculación simple (U143). Como era de esperar, ninguna de estas plantas presentó nodulación, pero aún con nitrógeno agregado crecieron menos. Una de las posibles causas es que la planta invierta energía en procesos que se activan durante la nodulación por percibir señales de los compuestos presentes en los exudados, a pesar de que no se haya inoculado la bacteria. Otra de las posibles causas es la presencia en los exudados de compuestos que inhiben de alguna forma la asimilación del nitrógeno.

La presencia de exudados producidos durante la interacción JD2-rizobio-alfalfa en el sustrato de crecimiento determinó una mayor tasa de nodulación de las plantas co-inoculadas, respecto a las que crecieron en ausencia de exudados. Sin embargo, ni el rendimiento en PS, ni la longitud de PA fueron mayores en este tratamiento.

Los tratamientos de plantas que crecieron en presencia de exudados exhibieron una velocidad de nodulación diferente a la observada en plantas que crecieron en su ausencia. Todas las plantas co-inoculadas y crecidas en presencia de exudados mostraron una tasa de nodulación mayor que aquellas que crecieron en su ausencia.

Al ser la simbiosis leguminosa-rizobio un proceso tan complejo, se ve influenciado por un gran número de factores, tanto ambientales como genéticos propios de la planta y del rizobio. La cantidad, el tamaño y el momento de aparición de los nódulos, entre otros, son caracteres que dependen de la planta huésped y de la bacteria (Pogliani-Iglesias, 2001). En este trabajo se encontró que las plantas co-inoculadas y crecidas en presencia de exudados *COINO* (producidos en condiciones de co-inoculación), presentaron el mayor número de nódulos por planta por día. Este resultado confirma el efecto positivo de la co-inoculación sobre la asociación rizobio-leguminosa (Morel *et al*, 2011). Además, sugiere un efecto positivo del agregado de exudados producidos durante la interacción JD2-rizobio-alfalfa (*exudados COINO*) sobre el crecimiento vegetal.

Paralelamente, se evaluó en condiciones de invernáculo, la producción de materia aérea en plantas y crecidas en presencia de exudados.

Las plantas fertilizadas con concentraciones sub-óptimas de nitrógeno e inoculadas con JD2, mostraron el mayor desarrollo radicular en comparación con el resto de los tratamientos. Bajo déficit de nitrógeno y ausencia de exudados, JD2 indujo un incremento del sistema radicular. Un efecto similar fue reportado para bacterias del género *Azospirillum* por Okon y Labandera-Gonzalez (1994), quienes reportaron que *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal de trébol bajo condiciones limitadas de nitrógeno, aunque el mayor rendimiento se observó cuando las plantas son fertilizadas. Sugieren además, que esta promoción se debe mayoritariamente a la producción de AIA por *Azospirillum*.

### **5.3 Caracterización de los exudados producidos durante la interacción rizobio-JD2-alfalfa**

Varios microorganismos del suelo, comunes en la rizósfera, son capaces de producir metabolitos secundarios que tienen un pronunciado

efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Arshad y Frankenberger, 1992). Los compuestos exudados por plantas y microorganismos son una mezcla de diversos compuestos químicos de naturaleza muy particular y que forman parte de un diálogo químico en la rizosfera.

La mayoría de las técnicas utilizadas para el estudio de las señales de comunicación se basan en el cultivo en hidroponía, ya que permite la recolección de los exudados y su concentración para la posterior evaluación e identificación de las sustancias secretadas, tanto por las plantas como por los microorganismos (Bais *et al*, 2006). Generalmente, los extractos tomados de los líquidos de hidroponía, que contienen los exudados radiculares y bacterianos, se concentran, liofilizan y resuspenden en solventes polares o apolares para el posterior análisis de composición (Vivanco *et al*, 2004). En este trabajo se intentó caracterizar, sin éxito, la composición de los exudados hidropónicos producidos en condiciones de inoculación de alfalfa, por técnicas de espectrofotometría clásicas. Estas técnicas suelen tener una sensibilidad baja. Generalmente, el metabolito debe estar presente por encima de determinada concentración o ser concentrado lo suficiente para poder ser detectado y cuantificado por colorimetría.

Las técnicas más utilizadas para el análisis de composición química de exudados radiculares son las cromatográficas, y dada la baja concentración con la que suelen encontrarse los metabolitos, éstas se acoplan a espectrometría de masas (MS, del inglés Mass Spectrometry, Vivanco *et al*, 2004). La MS es una técnica instrumental universal y selectiva, altamente sensible y que permite la identificación casi inequívoca de una sustancia (Romero González *et al*, 2007). Su amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas suele acompañarse además de técnicas de espectrofotometría. Pero lo más remarcable de la MS es su sensibilidad, llegando a detectar en algunas condiciones, señales de compuestos en pMol, por lo que es ideal para la determinación de trazas en muestras químicas. Durante el desarrollo de esta tesina, se lograron caracterizar los exudados producidos en hidroponía a los cuatro días de la inoculación por GC-MS. Esta técnica además, aportó información variada

sobre los compuestos químicos presentes en las muestras, desde su masa molecular, su fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular. Además, permitió analizar comparativamente los perfiles químicos frente a distintas condiciones de inoculación en alfalfa. De esta forma, se obtuvo información sobre distintas clases de compuestos químicos, como flavonoides, terpenos, etc., en los exudados radiculares, de forma similar a lo presentado por otros autores (Bais *et al*, 2006; O'Callaghan *et al*, 2000). Existen además otros métodos de estudio más costosos, como es el caso del análisis proteómico (Washburn *et al*, 2001).

A pesar de que los resultados de AIA y Trp, obtenidos por métodos de detección espectrofotométricos fueron nulos, seguramente debido a la baja concentración presente en los exudados, se cuenta con datos proporcionados por el equipo de investigación de nuestro laboratorio, obtenidos por cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS), que permiten realizar algunas aproximaciones. Parte de estos resultados, que no forman parte de esta tesina, se muestran en la Tabla 5.1.

Los resultados de la Tabla 5.1. evidencian altos valores de Trp en los tratamientos de plantas inoculadas y co-inoculadas, detectados mediante LC-MS en exudados hidropónicos producidos a los cuatro días de la inoculación. Las plantas inoculadas con U143 fueron las que presentaron los mayores valores de Trp y niveles muy bajos de AIA, mientras que las plantas co-inoculadas e inoculadas con JD2, mostraron bajos valores de Trp y ausencia de AIA.

El AIA es utilizado por bacterias para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización, incluyendo la fitoestimulación y previniendo los mecanismos basales de defensa de las plantas. Por otra parte, se ha indicado que el AIA también actúa como molécula de señalización bacteriana y por lo tanto puede tener un efecto directo sobre la fisiología bacteriana (Spaepen *et al*, 2006 ).

Algunos resultados preliminares no presentados en esta tesina (Morel, comunicación personal) indican que la producción de AIA aumenta en etapas posteriores a los cuatro días de interacción, mientras que el Trp

disminuye. Dado que el Trp es el inductor principal de la síntesis de esta fitohormona, todo parece indicar que el Trp producido a los cuatro días desde la inoculación de las plantas explica la posterior aparición de AIA en los exudados. Además, esto podría explicar el mayor desarrollo radicular y rendimiento vegetal evidenciado en invernáculo a los 50 días de crecimiento.

**Tabla 5.1** Composición de AIA y Trp ( $\mu\text{M}$ ) de exudados radiculares a los cuatro días de inoculación determinada por LC-MS.

<b>Exudados Día 4</b>	<b>AIA</b>	<b>Trp</b>
<i>Exudados COINO</i>	-	0,15
<i>Exudados JD2</i>	-	0,16
<i>Exudados U143</i>	0,009	0,39

Los metabolitos secundarios presentes en los exudados intervienen como señales químicas en muchas interacciones microorganismo-planta, tanto benéfica como patogénica. Muchos compuestos atrayentes, tales como los azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos o aminas probablemente participan en las etapas iniciales de la asociación planta-bacteria (López de Victoria y Lovell, 1993). En este estudio, se logró detectar e identificar por GC-MS compuestos de bajo peso molecular que incluyen varias aminas y ácidos orgánicos, que podrían estar participando en la promoción del crecimiento vegetal.

Los flavonoides son compuestos de señalización en exudados radiculares y su importancia depende en gran medida de la interacción específica en la que participan. Por ejemplo, en las simbiosis leguminosa-rizobios, estos son quimio-atrayentes de bacterias de la rizosfera e inductores específicos de los genes que regulan la nodulación, interviniendo en la síntesis de los Factores Nod. Macchiavelli y Brelles-Mariño (2004) observaron una mayor nodulación cuando trataron raíces y semillas de *Medicago truncatula* con Factores Nod antes de la inoculación de las plantas

con rizobio. En este trabajo, se intentó analizar los compuestos fenólicos (principalmente flavonoides) en los exudados radiculares utilizados y a pesar de que no se logró detectar flavonoides, la elevada tasa de nodulación en las plantas co-inoculadas y crecidas en presencia de exudados de alfalfa-U143-JD2 sugiere su presencia en dichos exudados. Algunos autores sugieren que la presencia de *Pseudomonas* spp. (Parmar y Dadarwal, 1999) y *Azospirillum* spp. (Volpin *et al*, 1996) induce la síntesis de flavonoides por las raíces de garbanzo, frijol y alfalfa, en experimentos de co-inoculación con sus rizobios. Sin embargo, no sería necesaria la presencia de las bacterias para la inducción, ya que, la aplicación de exudados libres de células, genera un efecto similar al que ocurre durante la co-inoculación bacteriana (Star *et al*, 2011; Dardanelli *et al*, 2008; Burdman *et al*, 1996; Volpin *et al*, 1996).

La detección de flavonoides en plantas, en exudados radiculares y en otros fluidos biológicos puede realizarse con diferentes métodos, pero la técnica analítica más utilizada para la separación y detección es la LC (Stalikas, 2007). En este trabajo se utilizó GC para la identificación de los compuestos presentes en los exudados. La principal desventaja de esta técnica a la hora de detectar flavonoides es la baja volatilidad de los compuestos fenólicos (Stalikas, 2007). Esto puede explicar porqué no se detectó ningún flavonoide por GC-MS a pesar de la extremada sensibilidad de la técnica y de las altas concentraciones que se esperan encontrar de flavonoides en las secreciones radiculares.

Los CBPM incluyen una gran variedad de compuestos volátiles que están directamente involucrados en los procesos metabólicos primarios de crecimiento y desarrollo de las plantas (Ryu *et al*, 2003). En general, los COVs de origen vegetal se producen principalmente por tres rutas biosintéticas: la vía de los ácidos grasos/lipoxigenasa (proporciona productos de degradación de ácidos grasos como el ácido oleico, linoleico y linolénico), la ruta del ácido shikímico (alcoholes aromáticos y compuestos fenólicos volátiles) y la ruta que da origen a los terpenos e isoprenoides por la vía del mevalonato (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Muchos de los compuestos detectados por GC-MS en los exudados analizados en este trabajo son producidos por estas vías biosintéticas, y presentan funciones

reportadas como antioxidantes, antimicrobianos, moléculas relacionadas al Quorum Sensing, entre otras relacionadas a la comunicación planta-microorganismo.

Se detectaron en todos los tratamientos, azúcares, ácidos orgánicos, amidas y COVs, entre otros. Los compuestos más relevantes en plantas co-inoculadas fueron: el limoneno, el ácido hidroxibutírico, ácido oleico, butanodiol, ácido nonanoico y varias amidas. Cabe destacar que no se diferenció entre COVs de origen vegetal de aquellos de origen bacteriano.

Se ha reportado que algunas PGPRs secretan una mezcla de COVs que juegan un papel importante en las interacciones planta-bacteria de la rizósfera (Groenhagen *et al*, 2013; Blom *et al*, 2011). En este estudio, es significativa la detección de butanodiol, un COV detectado en exudados hidropónicos producidos durante la co-inoculación de alfalfa con U143 y JD2. Muy poco se conoce aún sobre las moléculas volátiles responsables de los mecanismos de percepción vegetal y los cambios inducidos en la planta (Bailly y Weisskopf, 2012). Los escasos estudios existentes en su gran mayoría se relacionan a *Arabidopsis thaliana*. Cho *et al*. (2008) por ejemplo, reportaron la producción de 2R, 3R-butanol por *Pseudomonas chlororaphis*, compuesto involucrado en la inducción de tolerancia sistémica a la sequía en *A. thaliana*. Groenhagen *et al* (2013) analizaron el efecto de los COVs producidos por *Burkholderia ambifaria* sobre el crecimiento de *A. thaliana* y algunos hongos fitopatógenos. Blom *et al* (2011) describen un completo abanico de COVs producidos por bacterias y que promueven el crecimiento de *Arabidopsis* e inducen en la planta resistencia contra fitopatógenos. Entre los COVs reportados se encuentran el 2,3-butanol y la acetona. Por otro lado, Bailly y Weisskopf (2012) describen al detalle el estado de las investigaciones sobre el efecto de los COVs bacterianos sobre el crecimiento vegetal. Los efectos propuestos para los COVs sobre las plantas van desde un incremento en biomasa vegetal hasta la muerte de la planta.

Se ha comprobado que los terpenos, como el limoneno detectado en exudados de alfalfa-U143-JD2, son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto antimicrobiano

está basado en su habilidad para dañar las membranas. En función de sus características lipofílicas, interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren en procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos (Luciniet *al*, 2006). Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el limoneno, el  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno inhiben el consumo de oxígeno, actuando de esta forma como antimicrobianos (Peñuelas *et al*, 1996).

En resumen, se verificó el efecto promotor del crecimiento de alfalfa debido a la co-inoculación con *Delftia* sp. JD2 y *S. meliloti* U143. A su vez, el agregado de exudados producidos en condiciones de co-inoculación incrementó el efecto promotor del crecimiento vegetal. Dentro de los compuestos detectados en los exudados se destacan: precursores de fitohormonas como el Trp; compuestos de bajo peso molecular reportados como antioxidantes, antimicrobianos, moléculas relacionadas al Quorum Sensing y a la comunicación microorganismo-planta. La presencia de estos compuestos respalda el efecto positivo evidenciado sobre el crecimiento vegetal de alfalfa cuando se suplementan con exudados producidos en condiciones de co-inoculación.

## 6. PERSPECTIVAS

Para verificar el efecto positivo del suplemento con exudados en los sustratos de crecimiento de plantas de alfalfa, se hace necesaria la realización de al menos una réplica biológica mas *in vitro* y en condiciones de invernáculo que corroboren los resultados obtenidos hasta el momento. Además, se debería establecer también cual es la mejor relación de microorganismos y exudados que promuevan la mayor productividad vegetal. Las medidas de PS de PA y PR, deberían también complementarse con estudios del contenido de nitrógeno total y clorofila. En caso positivo, estos resultados servirían para el futuro desarrollo de una formulación agrícola comercial con o libre de células para mejorar el rendimiento de cultivos en campo.

## 7. ANEXO

### Composición de medios de cultivo y solución Buffer

Medio Jensen	Howieson	Solución Micronutrientes
CaHPO <sub>4</sub> -----1 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ----- cf 1mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ----- 0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anh. 5%)-----4 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ----- cf 0,2 mM	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ----- 0,15 g
MgSO <sub>4</sub> (anh. 5%)-----2 mL	CaSO <sub>4</sub> ----- cf 1 mM	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O ----- 0,02 g
NaCl (anh. 1%)-----20 mL	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----cf 0,2 mM	MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ----- 0,008 g
FeCl <sub>3</sub> (6 H <sub>2</sub> O 3,4%)----5 mL	FeSO <sub>4</sub> -----cf 0,02 mM	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O ----- 0,008 g
H <sub>2</sub> O dest -----1000 mL	Soluc. Micronut.-----1 mL/L	c.s.p-----100 mL
Soluc. Micronut----- 1mL/L		
pH 7		
Agar-----0,8%		

Medio LB	Medio TY alto Ca	YEM
Triptona----- 10g	Triptona ----- 5 g	Manitol ----- 10 g
YE*----- 5g	YE -----3 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ----- 0,50 g
NaCl -----10g	CaCl <sub>2</sub> 2,5%-----7 mL	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O-----0,20g
H <sub>2</sub> O c.s.p -----1000 mL	H <sub>2</sub> O c.s.p -----1000 mL	NaCl----- 0,1 g
	Agar-----2 g/ 100 mL	YE-----0,75 g
		H <sub>2</sub> O mq-----csp 1L
		Agar -----16 g/L

\*extracto de levadura

### Buffer Fosfato

#### Solución Stock

A: Solución NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 M (27,8g en 1000 mL)

B: Solución Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 M (53,63g en 1000mL)

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

---

**Medio CAS**


---

Autoclavar:

NaOH 5,3 g

PIPES 30,2 g

Solución 10X MM9 0,1 L

Agar 15 g

Agua destilada 0,75 L

Ajustar pH 6,8

Enfriar a 50°C y añadir:MgCl<sub>2</sub> 1M----- 1mLCaCl<sub>2</sub> 100mM----- 1mL

Tiamina 500µg/mL -----4mL

ác. Nicotínico 500µg/mL -----4mL

aa CAS (10% desferrados)\* --30mL

solución CAS-HDTMA -----0,1L

Solución 10X MM9:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>----- 0,3 g

NaCl -----0,5 g

NH<sub>4</sub>Cl -----1 g

agua destilada c.s.p -----0,1 L

Solución CAS-HDTMA:

## Disolver:

ChromeAzurool S----- 60,5mg

agua destilada----- 50mL

## Agrega :

10mL de 1mM FeCl<sub>3</sub>. H<sub>2</sub>O en 10mM

## Añadir a solución HDTMA:

HDTMA-----72,9mg

agua destilada----- 40 mL

\*Para preparar Cas aminoácidos desferrados al 10%, se deben disolver 10g de CASaminoácidos en 100mL de agua bidestilada y mezclar en igual volumen de una solución de 8-hidroxiquinolina al 3 % en cloroformo, agitar hasta que el color azul intenso del complejo férrico del agente quelante desaparece de la capa de cloroformo. El proceso se repite únicamente con cloroformo para eliminar las trazas de 8-hidroxiquinolina.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

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; Frugiera F. 2012. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*.24:3838-3852.

Arshad M y Frankenberger WT. 1992. Microbial production of plant growth regulators. Blaine Metting F. Jr. *Soil Microbial Ecology*. 309-348

Azcón-Bieto J y Talón M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill/Interamericana ed, Barcelona, España.

Bais H; Weir T; Perry L; Gilroy S y Vivanco J. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-66.

Badri DV y Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ*32:666-681.

Bailly A y Wesskopf L. 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Pl. Sign.Behav.* 7:79-85.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Advances* 16:729-770.

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.

Bertin C; Yang X; Weston LA. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67-83.

Bieleski R L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.*24:225-252.

- Blom D; Fabbri C; Connor EC; Schiestl FP; Klauser DR; Boller T; Eberl L y Weisskopf L. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 13:3047-3058.
- 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. *R. Bras. Ci. Solo* 35:657-671.
- Bottini R; Fulchieri M; Pearce D; Pharis R. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol.* 90:45-47.
- Burdman S; Kigel J; Okon Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29:923-929.
- Cai Z, Kastell A; Knorr D; Smetansk I. 2012. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 31:461-477.
- Camacho M; Santamaria C; Temprano F; Rodriguez-Navarro DN; Daza A. 2001. Coinoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Can. J. Microbiol.* 47:1058-1062.
- Cassán F; Bottini R; Schneider G; Piccoli P. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology.* 125:2053-2058.
- Castro-Sowinski S; Martinez-Drets G; Okon Y. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:119-125.

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* DOI:10.1007/s00374-011-0653-2

Chen WM; Lin YS; Sheu DS; Sheu YS. 2012. *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:2315-2321.

Cho CM; Kang BM; Han H; Anderson AJ; Parque JY; Lee YH; Cho BH; Yang KY; Ryu CM; Kim H. 2008. 2R,3R-Butanediol, a Bacterial Volatile Produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, Is Involved in Induction of Systemic Tolerance to Drought in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 21(8):1067-1075

Compant S; Duffy B; Nowak J; Clément Ch; Ait Barka E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *App. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.

De la Peña C; Lei Z; Watson B; Summer L; Vivanco J. 2008. Root-microbe communications through protein secretion. *J. Biol. Chem.* DOI 10.1074/jbc.

D´Haeze W; Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiol* 12:79-105.

Downie JA; Walker SA. 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr.Op. Plant Biol.* 2:483-489.

Etesami H; Alikhani HA; Akbari AA. 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 YE; Goldman A; Fisher M. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21:147-153.

Ferguson BJ; Beveridge CA. 2009. Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol.* 149:1929-1944.

Figueiredo M; Burity H; Martínez C; Chanway C. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 40:182-188.

Fisher RF; Long SR. 1992. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* 357: 655-660.

Fischer SE; Miguel MJ; Mori GB. 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.

Fraysse N; Jabbouri A; Treilhou M; Couderc F; Poinot V. 2002. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides. *Glycobiol* 12:741-748.

Fraysse N; Couderc F; Poinot V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.

Freiberg C; Fellay R; Bairoch A; Broughton WJ; Rosenthal A; Perret X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401

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* 32:259-264

Glick BR; Patten CL; Holguin G; Penrose DM. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, ed. London

Glickmann E; Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:793-796.

Goodwin JF;Choi SY. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzenesulfonic acid. *Clinical Chem.* 16:24-31.

Groenhagen U; Baumgartner R; Bailly A, Gardiner A; Eberl L; Schulz S; Weisskopf L. 2013. Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *J. Chem. Ecol.* 39:892-906.

Gross JH. 2004. *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag, ed. Berlin.

Gutierrez-Luna F; Lopez-Bucio J; Altamirano-Hernández J; Valencia-Cantero E; Reyes de la Cruz H; Macías-Rodríguez L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 51:75.

Hammer O; Harper D y Ryan P. 2001. PAST: Paleontological Statistic software package for education 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.

Hardy R. y Holsten R. 1977. Methods for measurement of dinitrogen fixation. In: *treatise on dinitrogen fixation*. Edited by R.W.F. Hardy, John Wiley and Sons.

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.

Herridge. 1995. Enhancing legume N<sub>2</sub> fixation through plant and soil management. *Plant Soil.* 174:83-101.

Hewitt W; Vincent S. 1989. *Theory and application of microbiological assay*. Academic Press, San Diego.

Hirsch AM; Lum RM; Downie JA. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology.* 127:1484-1492.

Howieson J; Ewing M; Robson A; Abbot L. 1993. External phosphate and calcium concentrations, but not the products of rhizobial nodulation genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual legumes. *Soil Biol. and Biochem.* 25(5):567-573.

ICSP-Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium*, (International Committee on Systematics of Prokaryotes). 2013. Disponible online y accedido el 16 de Diciembre de 2013 en: <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>.

Israel D. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84:835-840.

Itzigsohn R; Kopuhik Y; Okon Y; Dourat 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.

Jordán M; Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Cap. 16. En: *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, Chile.

Jørgensen NOG; Brandt KK; Nybroe O; Hansen M. 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from freshwater, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2195-2199.

Jurd L. 1962. Spectral properties of flavonoid compounds. En: *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Geissman TA. (ed). Pergamon Press. pp. 107-155.

Kawamori T; Tanaka T; Hirose Y; Ohnishi M; Mori H. 1996. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis.* 17(2):369-372.

Khalid A; Sultana S; Arshad M; Mahmood S; Mahmood T; Siddique MT. 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.

Khakipour N; K. Khavazi, Mojallali H; Pazira E; Asadirahmani H. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 4:687-692.

Kloepper JW; Schroth MN. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bact. Gilbert-Clarey, Tours, Francia.* pp 879-882

Kyungseok P; Kloepper JW; Ryu CM. 2008. Rhizobacterial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:1095-1100.

Lim JH; Kim SD. 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.

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*. *MPMI.* 20:207-217

Lopez de Victoria G; Lovell CR. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2951-2955.

Lorkiewicz Z. 1997. Nodulation genes in the *Rhizobium*-plant signal exchange. *Acta Biochimica Polonica.* 44:1-12.

Lucini EI; Zunino MP; López ML; Zygadlo A. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathol.* 154:441-446

Mandal SM; Chakraborty D; Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Sign. Behavior* 5:359-368

Marks BB; Megías M; Nogueira MA; Hungria M. 2013. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*. 3:21

Marek-Kozaczuk M; Kopcidska 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 Leeuw. J. Microb.* 78:1-11

Marín-Loaiza JC; Céspedes CL. 2007. Volatile compounds from plants. origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:327-351.

Martínez-Flórez S; González-Gallego J; Culebras JM; Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.

Morel MA; Braña V; Castro-Sowinski S. 2012. Legume crops, importante and use of bacterial inoculation to increase production. In: *Plant Crop*, Aakash Goyal (Ed. Intech). pp 217-240. ISSN/ISBN: 978953308781

Morel MA y Castro-Sowinski S. 2013. The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction. In: *Plant Microbe Symbiosis*. Naveen Arora (Ed). Springer. pp 169-199.

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.

Morris DL. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254-255.

Murray JD; Karas BJ; Sato S; Tabata S; Amyot L; Szczyglowski K. 2007. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315:101-104.

NZ rhizobia- Bacterial and fungal systematics research.2013. Disponible online y accedido el 16 de Diciembre de 2013 en: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

O'Callaghan KJ; Stone PJ; Hu X; Griffiths DW; Davey MRand Cocking EC. 2000. Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2185-2191.

Okon, Y y Labandera-Gonzalez CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world-wide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.

Oldroyd GE; Downie A. 2009.Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes.*Annu. Rev. Plant Biol.* 59:519-546.

Oldroyd G; Murray J; Poole P; Downie A. 2011.The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis.*Annu. 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.

Parmar N; Dadarwal K. 1999.Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 86:36-44

Peñuelas J; Ribas-Carbo M; Giles L. 1996.Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase.*Journal of Chemical Ecology* .22:801-805.

Pérez Trueba G y Martínez Sánchez G. 2001.Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm.Bonaerense.* 20:297-306.

Perotti EBR y Pidello A. 1999. II Reunión Científico Técnica de Biología de Suelo, Fijación Biológica del Nitrógeno. F.C.A. UN de Catamarca. 181-184

Pieterse C; Leon-Reyes A; Van der Ent S; Van Wees S. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat.Chem.Boil.* 5:308-317.

Pogliani GJ e Iglesias MC. 2001. Inoculantes para soja. Formulación y la infectividad en siembra directa y labranza convencional. . Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas CD ROM. Facultad de Ciencias Agrarias.

Podile, AR y Kishore, KG. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. plant-associatedbacteria. S.S Gnananickam ed. pp 195-230.

Prinsen E; Chauvaux N; Schmidt J; John M,Wieneke U; Degreeef J; Schell J y Vanonckelen H. 1991. Stimulation of indole-3- acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Lett.* Vol.282: 53–55

Qurashi A y Sabri A. 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz. J. Microbiol.* 1183-1191.

Ramos Solano B. 2000. Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género *Bacillus* para promover el crecimiento vegetal. Tesis doctoral, Facultad de CC. Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo-CEU, Madrid. ISBN84-688-2232-9.

Rinaudi L y Giordano W. 2009. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. Editor: Simon Silver. DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01840.

Roesch L; Dörr de Quadros P; Camargo F y 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. Biotech.* 23:1377-1383.

Rodríguez Blanco A, Sicardi M y Frioni L. 2010. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Biol Fertil Soils.* 46:419–425.

Romero González R, Fernández Moreno JL, Plaza Bolaños P, Garrido Frenich A y Martínez Vidal JL. 2007. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev. Esp. Salud Publica 81:461-474.

Ryu CM; Farag MA; Hu CH; Reddy MS; Wei HX; Paré PW; Kloepper JW. 2003. Volatiles produced by PGPR elicit plant growth promotion and induced resistance in Arabidopsis. 6th International PGPR Workshop, Calicut, India.

Salisbury FB. 1994. The role of plant hormones. Plant-Environment Interactions. R E Wilkinson ed. pp. 39-81.

Sambrook, J; Fritsch, EF y Maniatis, TT. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Scheres B; Van de Wiel C; Zalensky A; Horvath B; Spaik H; van Eck H; Zwartkuis F; Wolters AM; Gloudemans T; van Kammen A y Bisseling T. 1990. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea Rhizobium interaction. Cell 60:281-294.

Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol. 25:339-358.

Sepúlveda-Jiménez G; Porta-Ducoing H y Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21:355-363.

Serandour J; Reynaud S; Willison J; Patouraux J; Gaude T; Ravanel P; Lemperiere G; Raveton M. 2008. Ubiquitous water-soluble molecules in aquatic plant exudates determine specific insect attraction. PLoS ONE. 3: e3350.

Shigematsu T; Yumihara K; Ueda Y; Numaghi M; Morimura S; Kida K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1479-1483.

Silveira APD. 1992. Micorrizas. Microbiología do Solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo Campinas (SP) Brasil. 360 p

Singleton VL y Rossi JA. 1965. Colormetry of total phenolics with phosphor - molybdcic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult. 16:144-58.

Skoog DA; Holler F J; Nieman T A. 2001. Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill(ed). Madrid.

Spaepen S; Vanderleyden J y Remans R. 2006. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31:425-448.

Stalikas C. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. J. Sep. Sci. 30:3268-3295

Star L, Matan O, Dardanelli MS, Kapulnik Y, Burdman S, Okon Y. 2011. The *Vicia sativa* spp. *nigra*-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. Plant Soil DOI 10.1007/s11104-010-0713-7.

Taiz L y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. (ed). ISBN: 8480216018, 9788480216012.

Tirichine L; Sandal N; Madsen L; Radutoiu S; Albrektsen AS; Sato S; Asamizu E; Tabata S; Stougaard J. 2007. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. Science 315:104-107.

Tsuneda S; Aikawa H; Hayashi H; Yuasa A; Hirata A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. FEMS Microbiol. Lett. 223:287-292.

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.

Upadhyay S; Singh JS; Singh DP. 2011. Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*. Vol. 21:214-222.

Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.

Valdés R. y Balbín MI. 2000. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. Universidad Nacional de Ciencias Agrarias de la Habana, La Habana, Cuba. pp. 89-73.

Volpin H; Burdman S; Castro-Sowinski S; Kapulink Y y Okon Y. 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa. *MPMI* 9:388-399.

Wen A; Fegan M; Hayward C; Chakraborty S; Sly LI. 1999. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Derftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tarnaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *J. Syst. Bacteriol.* 49:567-576.

Washburn MP; Wolters D; Yates JR. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 19(3):242-7.

Zahran HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.

Zehfuss; Gina Holguín. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Revista Ciencia.* 59:72-78.