



Aspectos bioquímicos, fisiológicos y agronómicos de la co-inoculación de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* y *Delftia* sp.



María A. Morel

TESIS DE DOCTORADO
2014



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA-Biología

**Aspectos bioquímicos, fisiológicos y
agronómicos de la co-inoculación de alfalfa
con *Sinorhizobium meliloti* y *Delftia* sp.**

Director de tesis: Dra. Susana Castro Sowinski

Tribunal: Q.F. Alicia Arias

Dr. Jorge Monza

Dra. Sabina Vidal

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Grupo de Microbiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Parte de los resultados y el *estado del arte* de la temática y sus avances, aparecen publicados en los siguientes artículos y capítulos de libro:

- Morel, M; Ubalde, M; Braña, V. y Castro-Sowinski, S. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI) reducing agent with plant growth promoting activity. Archives of Microbiology 193:63-68.
- Morel, M; Braña, V. y Castro-Sowinski, S. 2012. Legume Crops, importance and use of bacterial inoculation to increase the production, En: Goyal (Ed.), Crop Plant. A. Editorial INTECH. 217-240p.
- Morel, M. y Castro-Sowinski, S. 2013. The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction. En: Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. Naveen Arora (ed.). Springer. 169-199p.
- Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S. 2014. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. JD2: an interaction that improves plant yield. 2014. Molecular Plant Microbe Interaction DOI: 10.1094/MPMI-08-14-0229-R.

Y bueno si de agradecer se trata, en este momento me doy cuenta que debo agradecer a tanta gente que no me darían las hojas. Culmina una etapa clave y entonces si miro hacia atrás, ¿me pregunto hasta dónde agradecer?. ¿Desde los comienzos?, toda la gente que hizo de mi formación: mi niñez en EL barrio ¡el Túnel!, mi escuela de contexto crítico, mis cuatro gloriosos hermanos, la Parroquia, la barra del 94', los perros, los naranjos, el nogal, la rambla de Mercedes, la Fiesta de la Primavera, mis padres y abuelos y tios y freno porque son muchos, la familia que permitió que este proceso comenzara, sin ellos no estaría aquí. Si continuara: ¡Yama!, Facultad de Agronomía, el Fondo de Solidaridad por 5 años de beca, la barra del Gredimer, ¡los años en el comedor universitario!, Mechi, Gabriela, Facultad de Ciencias, Bienestar Universitario por 3 años de beca, IIBCE, DICYT por 2 años de beca, ¡Susan!...

Pero me remitiré a estos cuatro años de trabajo de tesis:

¡Muchas gracias Susan! Hay muchas cosas que podría resaltar de tu dirección y tutoría pero hay mil más que podría decir sobre tu presencia y cariño...ya tú sabes, ya yo se

¡Muchas gracias lab! Mucha gente ahí dentro hace que uno ame ir a trabajar todos los días. A las gurisas, a ¡Célica!, me facilitas las cosas de una manera increíble; Ana, lo que me haces reir en la oficina no tiene nombre...

Gracias a la ANII por el financiamiento de beca y FMV. A PEDECIBA. Gracias a la Universidad Nacional de Rio Cuarto y su gente, por recibirme de una forma tan linda y divertida, la Vicky y su banda: Maricel, Nico, Walter, Julio, Miguel, Oscar, Mirta, Natalia, Mariela, Florencia y Rafa, Sandra, Fer, Yanina, Fiore. De FQ, a Laura (FF) y Pablo (G) por la ayuda *enzimática*, de FCIEN, a Eugenio, Héctor (M) y Andrés por la ayuda *genómica*.

¡Yama! Te debo la mitad de la tesis y másgracias es poco... y a ti te la dedico...

porque tú has hecho infinito mi limite...

¡Gracias!

Indice general

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS _____	I
RESUMEN _____	1
ESTRUCTURA DE LA TESIS _____	4
INTRODUCCIÓN _____	5
1.1. Mejoramiento de la productividad vegetal en leguminosas _____	6
Capítulo I. Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production _____	6
1.2. Moléculas involucradas en la interacción entre plantas y microorganismos _____	31
Capítulo II. The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction _____	31

OBJETIVOS	32
2.1. Objetivos generales	64
2.2. Objetivos específicos	64
METODOLOGIA	65
3.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y modelo vegetal	66
3.1.1. Bacterias utilizadas	66
3.1.2. Modelo vegetal	66
3.1.3. Ensayos en hidroponia	68
3.2. Respuesta de la planta a la colonización bacteriana	72
3.2.1. Colonización de las raíces	72
3.2.2. Determinación de malondialdehído, clorofila y actividades enzimáticas	73
3.3. Mejoramiento de la productividad vegetal	77
3.3.1. Ensayos de plantas <i>in vitro</i>	77
3.3.2. Ensayos de plantas en invernáculo	80
3.4. Moléculas involucradas en la interacción temprana planta-microorganismos	83
3.4.1. Composición en flavonoides	83
3.4.2. Determinación de AIA y Trp	84
3.4.3. Composición relativa en monosacáridos	84
3.4.4. Composición relativa en ácidos grasos	85
3.4.5. Composición relativa en compuestos de bajo peso molecular	86
3.5. Análisis estadístico de los resultados	88
3.6. Estudios sobre la anotación genómica de <i>Delftia</i> sp. JD2	89
3.6.1. Secuenciación del genoma de <i>Delftia</i> sp. JD2	89
3.6.2. Caracterización funcional y comparación de secuencias	89
RESULTADOS y DISCUSIÓN	92
4.1. Respuesta de la planta a la infección bacteriana	93
4.1.1. Introducción	93
4.2.2. Objetivos planteados	98

4.2.3. Resultados	99
4.2.4. Discusión	103
4.2. Mejoramiento de la productividad vegetal	107
4.2.1. Introducción	107
4.2.2. Objetivos planteados	110
4.2.3. Resultados	110
4.2.4. Discusión	119
4.3. Moléculas involucradas en la interacción planta-microorganismo	122
4.3.1. Introducción	122
4.3.2. Objetivo planteado	124
4.3.3. Resultados	124
4.3.4. Discusión	132
4.4. Estudios sobre la anotación del genoma de <i>Delftia</i> sp. JD2	138
4.4.1. Introducción	138
4.4.2. Objetivo planteado	141
4.4.3. Resultados y Discusión	141
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES	167
ANEXOS	175
REFERENCIAS	205

Tabla de Cuadros

METODOLOGÍA

Cuadro 3.1. Tratamientos de desinfección superficial de semillas de alfalfa evaluados.	67
Cuadro 3.2. Ensayos de hidroponia destinados a la colecta de los líquidos y de las plantas para las futuras determinaciones	69
Cuadro 3.3. Tratamientos de inoculación y co-inoculación.....	78
Cuadro 3.4. Condiciones de agregado (riego pre-siembra) de líquidos hidropónicos, utilizadas durante los ensayos de plantas <i>in vitro</i>	79
Cuadro 3.5. Tratamientos de inoculación realizados durante los ensayos <i>in vitro</i> . El N se suministró en forma de KNO ₃ (0,05%, p/v, c.f.).	79
Cuadro 3.6. Tratamientos realizados durante los ensayos de invernáculo. El N se suministró en forma de KNO ₃ (0,05% p/v; c.f.).	81
Cuadro 3.7. Transiciones MRM de los flavonoides utilizados como estándares.	84
Cuadro 3.8. Temperatura (Temp) del horno (°C) y tiempos (min) utilizados en los análisis de azúcares y ácidos grasos.	86
Cuadro 3.9. Genomas bacterianos utilizados y disponibles en NCBI.	91

RESULTADOS

Cuadro 4.1. Actividades enzimáticas (UE/mg de tejido vegetal) y contenido en MDA (µmoles/mg de tejido vegetal), en extractos obtenidos de parte aérea (PA) y radicular (PR) de plantas colectadas a los cuatro días de su inoculación o co-inoculación, en condiciones de hidroponia.	101
Cuadro 4.2. Biomasa vegetal radicular (PR) y aérea (PA) y contenido en clorofila a y b (Chla y Chlb), de plantas colectadas a los cuatro días posteriores a la inoculación,	103
Cuadro 4.3. Efecto de la inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 y la co-inoculación con <i>S. meliloti</i> U143 sobre el crecimiento de plantas de alfalfa <i>in vitro</i>	111
Cuadro 4.4. Efecto de la inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 y su co-inoculación con <i>S. meliloti</i> U143 en el crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de invernáculo.	113

Cuadro 4.5. Tasas de nodulación (número de nódulos por planta y por día) y crecimiento vegetal (PS de parte aérea/planta) en ensayos de inoculación simple con U143 y co-inoculación con U143 y JD2 y bajo condiciones de suplemento con exudados hidropónicos.	115
Cuadro 4.6. Efecto del agregado de <i>exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)</i> sobre el crecimiento (Peso seco/planta) de plantas inoculadas o co-inoculadas, en condiciones de invernáculo	118
Cuadro 4.7. Composición química de los exudados: flavonoides (μM), ácido indol-3-acético (AIA; nM) y triptofano (Trp; μM).	125
Cuadro 4.8. Composición de los exudados: compuestos de bajo peso molecular (derivados de trimetil éster).	128
Cuadro 4.9. Composición de los <i>exudados</i> : CBPM (derivados de trimetil éster).	129
Cuadro 4.10. Composición de los exudados: CBPM (derivados de trimetil éster).	130
Cuadro 4.11. Comparación de secuencias (SCPs) entre <i>Delftia</i> sp. JD2 y otros genomas anotados y públicos dentro de la Clase β -proteobacteria, familia Comamonadaceae	143
Cuadro 4.12. Genes de <i>Delftia</i> sp. JD2 posiblemente involucrados en la biosíntesis de Trp y en el metabolismo de AIA.	149
Cuadro 4.13. Genes de adquisición y metabolismo de Fe, específicamente de sideróforos, presentes en JD2.	156
Cuadro 4.14. Número (N°) de genes anotados dentro del subsistema de transporte tipo Ton y Tol en el genoma de JD2.	159
Cuadro 4.15. Genes relacionados con resistencia a antibióticos y tóxicos, identificados en el genoma de JD2.	160
Cuadro 4.16. Búsqueda de homología por megablast utilizando las secuencias codificantes de los genes chr de JD2	161
Cuadro 4.17. Identificación de homólogos, por blastp, utilizando como referencia las secuencias codificantes de ChrB, ChrA, ChrC y ChrF de JD2	162
Cuadro 4.18. Dominios funcionales conservados (DFC) y superfamilias identificados para los genes de resistencia a cromatos (CrO_4^{2-}) presentes en JD2.	165
Cuadro 4.19. Dominios funcionales conservados (DFC) y superfamilias identificados para los posibles elementos móviles adyacentes a los genes de resistencia a cromatos (CrO_4^{2-}) en JD2.	166

Tabla de Figuras

METODOLOGÍA

Figura 3.1. Representación gráfica del sistema de hidroponía desarrollado	68
Figura 3.2. Producción y colecta de los líquidos hidropónicos y las plantas de alfalfa. Se muestra el destino de los mismos.	70

RESULTADOS

Figura 4.1. Colonización de raíces de alfalfa por <i>Delftia</i> sp. JD2.....	100
Figura 4.2. Cinética de nodulación en plantas de alfalfa inoculada con <i>S. meliloti</i> U143 (A) y co-inoculada con JD2 y U143 (B)	114
Figura 4.3. Distribución de secuencias codificantes dentro de subsistemas.	142
Figura 4.4. Relaciones evolutivas entre <i>Delftia</i> sp. JD2 y otros taxa inferida utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ).	144
Figura 4.5. Relaciones evolutivas entre <i>Delftia</i> sp. JD2 y otros taxa inferida utilizando el método de NJ.....	145
Figura 4.6. Vía de síntesis de Trp en bacterias, utilizando corismato como precursor	151
Figura 4.7. Vías de síntesis de ácido indol 3-acético en bacterias.....	153
Figura 4.8. Relaciones evolutivas inferidas utilizando secuencias aminoacídicas de ChrB(A); ChrA(B); ChrC(C) y ChrF(D) por NJ.	163
Figura 4.9. Ilustración gráfica del agrupamiento de genes <i>chr</i> en diferentes microorganismos de la familia Comamonadaceae y fuera de ella.	164
Figura 4.10. Ilustración gráfica de elementos móviles co-lineales y ubicados aguas-arriba y aguas-abajo de los genes relacionados a la resistencia a Cr(VI).	166

DISCUSION

Figura 5.1. Fenología del cultivo de alfalfa en hidroponía. Se indican los principales hitos del cultivo y del ensayo.....170

Figura 5.2. Representación temporal de los cambios detectados en relación a los compuestos secretados hacia la rizosfera durante la interacción alfalfa- U143 y JD2 y que explicarían el mayor rendimiento y nodulación de las plantas.172

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS¹

ϵ	Coeficiente de extinción molar
ABC	del inglés <i>ATP binding cassette protein</i>
Abs	absorbancia
ADNg	ADN genómico
AFR	5-fosforibosil antranilato
AIA	ácido indol 3-acético
ANI	del inglés <i>Average Nucleotide Identity</i>
ANOVA	del inglés <i>Analysis of variance</i>
AS	antranilato sintasa
BLAST	del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPCV	bacterias promotoras del crecimiento vegetal
c.f.	concentración final
CBPM	compuestos de bajo peso molecular
CD	del inglés <i>conserved domains</i>
Cdrp	1-o-carboxifenilamino-1-deoxiribulosa 5-fosfato
Chl	clorofila
CRISPRs	del inglés <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
diN	dosis inicial de nitrógeno
DMF	dimetilformamida
DNS	ácido 3,5 dinitrosalicílico
EC	del inglés <i>Enzyme Commission</i>
EPS	exo-polisacárido
ESI	del inglés <i>electro spray ionization</i>
FBN	Fijación Biológica del Nitrógeno
FID	del inglés <i>flame ionization detector</i>
FN	factor de nodulación
G3P	gliceraldehído 3-fosfato
GC	del inglés <i>gas chromatography</i>
GFP	del inglés <i>green fluorescent protein</i>
HMDS	hexametildisilazano
HPLC	del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Int	integrasas
IAM	indol 3-acetamida
LC	del inglés <i>Liquid Chromatography</i>
MDA	malondialdehído
MEGA	del inglés <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
MP	metales pesados
Mpb	mega pares de bases
MRM	del inglés <i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	del inglés <i>Mass Spectrometry</i>
MSTFA	N-Metil-N-(trimetil Silil) TriFluoroAcetamida
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	nitrofenol
NJ	Neighbor-Joining
ORF	del inglés <i>open reading frame</i>
p/v	relación peso/volumen
PA	parte aérea
PBS	del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>
PCH	Pioquelina

¹ No se incluyen las unidades aceptadas en el Sistema Internacional de Unidades (SI; Thompson y Tailor 2008) ni fórmulas químicas.

PF	peso fresco
PLP	piridoxal 5-fosfato
pNP-GlcNAc	p-nitrofenil-N-Acetil-B-D-Glucosamina
PPi	del inglés <i>pyrophosphate</i>
PR	parte radicular
PRP	del inglés <i>pathogenesis-related protein</i>
PRPP	del inglés <i>phospho- ribosil-pyrophosphate</i>
PVD	Pioverdina
Q	cuadropolo
QS	del inglés <i>quorum sensing</i>
RAST	del inglés <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RSA	Resistencia sistémica adquirida
RSI	Resistencia sistémica inducida
SCP	secuencias codificantes de proteínas
TAM	triptamina
TBA	del inglés <i>tiobarbituric acid</i>
TBDT	del inglés <i>tonB dependent-transporter</i>
Tc	tetraciclina
TCA	del inglés <i>tricloraacetic acid</i>
Temp	temperatura
THG	Transferencia horizontal de genes
Tnp	Transposasas
Trp	triptófano
UE	unidad de enzima
UPGMA	del inglés <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VOC	del inglés <i>volatile organic compound</i>

RESUMEN

Delftia sp. JD2 es una bacteria promotora del crecimiento de algunas leguminosas, capaz de fijar el nitrógeno atmosférico, producir sideróforos y ácido indol 3-acético (AIA), y de colaborar en la asociación entre algunas leguminosas y sus rizobios nodulantes *in vitro*. Además, resiste y tolera altas concentraciones de Cr(VI) en el medio de crecimiento y es capaz de reducirlo enzimáticamente a la forma menos tóxica de Cr(III). Por sus propiedades, este microorganismo podría utilizarse en procesos biotecnológicos: 1) agrícolas, para reducir el consumo, hasta ahora indiscriminado, de fertilizantes nitrogenados, y 2) ambientales, para remediar la contaminación por Cr(VI) de suelos y efluentes. Su uso como bio-estimulante de alfalfa, con el fin de mejorar su crecimiento y productividad, sería relevante en un país agro-exportador de leche y carne como el nuestro, ya que esta pastura se utiliza como alimento para el ganado.

Aunque se conoce el potencial de la bacteria para promover el crecimiento de la alfalfa *in vitro*, no se dispone de información sobre la asociación con las raíces y la bioquímica de la interacción. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar las condiciones de co-inoculación con *Delftia* sp. JD2 y *Sinorhizobium meliloti* U143 (inoculante comercial nacional de alfalfa) necesarias para lograr una mayor productividad de alfalfa y, 2) profundizar en el conocimiento de la interacción que se da a nivel de rizosfera, que permite el establecimiento efectivo de la asociación tripartita alfalfa-sinorizobio-*Delftia*.

Durante esta tesis se obtuvo evidencia que indica que, *in vitro* y en invernáculo, la co-inoculación de las semillas de alfalfa con sinorizobios y JD2 supera las expectativas agronómicas de rendimiento en peso, comparado con la inoculación simple con U143. Se observó un mayor desarrollo del sistema radicular, donde la co-inoculación provocó una mayor tasa de nodulación y un mayor rendimiento, este último determinado en función del peso seco de las raíces.

El establecimiento de la simbiosis entre la alfalfa y los sinorizobios involucra una secuencia de eventos coordinados y mediados por compuestos químicos específicos. Una de las preguntas formuladas durante esta tesis fue ¿en qué grado la presencia de JD2 en el escenario cambia el patrón de metabolitos secundarios secretados hacia la rizosfera durante la interacción entre alfalfa, sinorizobios y JD2 [al que llamaremos exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)], a tres períodos de tiempos (cuatro, siete y 15 días desde la inoculación de las plantas). Luego de analizar su composición por LC/MS, GC/MS y GC/FID, se observó que los flavonoides, en especial las flavonas, se presentaron a muy altas

concentraciones a los cuatro días de la inoculación y luego disminuyeron hacia los 15 días. Estos compuestos siempre se detectaron a concentraciones más elevadas en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* que en los exudados de plantas inoculadas solo con sinorizobios, a los que llamaremos *exudados radiculares-rizobianos*. Este hallazgo es de particular importancia, dado que estos flavonoides son los inductores de los genes *nod*, encargados de la producción de factor de nodulación (FN), un oligoquitosacárido de origen rizobiano que dispara la serie de eventos que llevan a la formación de los nódulos radiculares. Cuando JD2 interactúa, los niveles de flavonoides aumentan en la rizosfera y es probable que también lo hagan los niveles de FN, lo cual podría explicar la mayor nodulación encontrada en los ensayos de planta.

La co-inoculación de alfalfa con JD2 y sinorizobios cambió los niveles de triptófano (Trp) y AIA detectados en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. Mientras que a los cuatro días el AIA no se detectó y la secreción de Trp fue similar a la encontrada en los *exudados radiculares-rizobianos*, a los siete días la hormona se detectó en niveles muy superiores a los presentes en los demás exudados. Esta observación sugiere que el AIA podría ser un elemento clave en la interacción tripartita y responsable, al menos en parte, del aumento del sistema radicular observado en los ensayos de invernáculo. Un mayor sistema radicular lleva a un mayor área a explorar en busca de agua y nutrientes. No se detectó AIA a los 15 días de interacción, aunque si se detectó Trp. Siendo el Trp el principal precursor para la biosíntesis de AIA, es probable que la fitohormona se sintetice (por las plantas y/o JD2) tan rápido como se utiliza. A los 15 días, cuando los contenidos de AIA y flavonas disminuyeron respecto a los valores detectados en *exudados radiculares-rizobianos*, el número máximo de nódulos por planta ya estaba establecido en los ensayos de planta en condiciones *in vitro*.

Se detectaron también muchos otros compuestos en los *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* de forma diferencial, la mayor parte fueron azúcares, ácidos carboxílicos y compuestos nitrogenados. Fue interesante detectar compuestos relacionados con la degradación de la lignina, que podrían indicar que las paredes de las raíces se están flexibilizando para colaborar con la colonización bacteriana, especialmente por el rizobio.

La colonización de la raíz se monitoreó por microscopía de fluorescencia, observándose a JD2 asociada a la superficie de primordios radiculares y nódulos emergentes. La colonización de la planta por JD2 y los sinorizobios no afectaría la actividad de algunas enzimas vegetales relacionadas con la defensa de la planta, ni tampoco el balance de clorofila a/b, sugiriendo que la planta reconoce a la co-inoculación como una interacción compatible.

Los flavonoides determinantes de la producción del FN se acumularon notoriamente en los *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* a los cuatro días de interacción, pero ¿qué ocurre si estos metabolitos se agregan en forma de riego a las plantas? El agregado directo de los *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* colectados a los cuatro días de la inoculación, afectó el crecimiento de todas las plantas, desde las que se inocularon con sinorizobios hasta las plantas control sin inocular ni fertilizar. Este hecho es particularmente interesante, ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas, indicando que el “cóctel” de compuestos agregados en sí, tiene efecto promotor del crecimiento vegetal.

Finalmente, se estudiaron algunas vías de síntesis de moléculas involucradas en las propiedades de promoción del crecimiento vegetal y biorremediación de metales pesados (MP) analizando el genoma de JD2. Luego de la secuenciación, ensamblado y anotación del genoma de JD2, se determinó un tamaño de 6,72 Mpb y un total de 6051 genes, 500 de los cuales no se encontrarían en las dos *Delftia* spp. secuenciadas y disponibles en la base de datos de la NCBI. La información generada del análisis del borrador del genoma, evidencia la presencia de genes relacionados a la síntesis y degradación de Trp, biosíntesis de AIA (vía de la indol 3-acetamida), transporte y biosíntesis de sideróforos (piquelina, piverdina) y transportadores dependientes de TonB con varias especificidades de sustrato. Al igual que otras *Delftia* spp., JD2 presenta todos los genes para la biosíntesis de polihidroxicanoatos, moléculas de reserva energética, y para la producción de flagelos, probablemente involucrados en la quimiotaxis. Además, se encontraron muchos genes implicados en resistencia a antibióticos y tóxicos, entre ellos bombas de eflujo de MP y en particular un agrupamiento de genes de resistencia a cromatos (*chr*), en forma sinténica. Este *cluster* de genes, y sus productos, solo mostraron similitud de secuencia (nucleotídica y aminoacídica) con *Delftia tsuruhatensis*, *Alicyciphilus denitrificans* K601 y *Burkholderia xenovorans* LB400, cepas filogenéticamente cercanas a JD2. Además, se identificaron elementos móviles pertenecientes a las familias de las transposasas e integrasas en posiciones adyacentes al agrupamiento *chr*. Explorar el genoma de esta bacteria facilitará descifrar los mecanismos de tolerancia a MP y de promoción del crecimiento vegetal, y su potencial uso en programas de biorremediación.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La introducción de esta tesis se presenta en forma de dos capítulos publicados en libros. Cada uno de ellos está precedido por un pequeño resumen. El Capítulo I ubica al lector en la importancia a nivel mundial de la producción de leguminosas y de la co-inoculación como estrategia de mejoramiento de la productividad, y el Capítulo II se centra en los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la interacción entre las leguminosas y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

Los materiales y métodos se presentan en una sola sección, siguiendo en forma cronológica los experimentos realizados.

Los resultados se estructuraron en cuatro secciones, y cada una de ellas se inicia con una introducción corta a la temática. Cada sección de resultados se finaliza con una discusión.

Finalmente, se presenta una sección de discusión general, así como de conclusiones y perspectivas de futuro.

INTRODUCCIÓN

1.1. Mejoramiento de la productividad vegetal en leguminosas

La familia Leguminosae (o Fabaceae) incluye una variedad de plantas con un significativo valor económico, entre las que resaltan la soja, alfalfa, trébol, maní y porotos (Farag et al 2007). La inoculación de estas plantas con rizobios se utiliza como práctica habitual de manejo en los sistemas agrícolas desde hace mucho tiempo, como forma de mejorar la productividad en el campo. Estas bacterias llevan a cabo el proceso de fijación biológica del N (FBN) atmosférico en un fenómeno único: los rizobios transformados en bacteroides, se ubican en los nódulos de las raíces, donde reducen el N molecular a amonio y lo transforman a compuestos asimilables por la planta (Kirizii et al 2007).

En el siguiente capítulo se discuten las ventajas de la FBN y sus efectos en la productividad de las leguminosas; la importancia de la producción de este grupo de plantas en el contexto mundial; la evolución en su uso comercial como materia prima; y el uso de nuevas formulaciones con más de un microorganismo, bajo la premisa de que el uso de consorcios microbianos tiene un efecto positivo en la productividad de los cultivos de leguminosas.

Capítulo I. Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production

Morel M, Braña V y Castro-Sowinski S. 2012. En: Crop Plant. Goyal A. (ed.). INTECH. 217-240p.

Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production

María A. Morel^{1*}, Victoria Braña^{1*} and Susana Castro-Sowinski^{1,2}

¹*Molecular Microbiology, Biological Sciences Institute Clemente Estable*

²*Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, Montevideo, Uruguay*

1. Introduction

Legumes are flowering plants that produce seedpods. They have colonized several ecosystems (from rain forests and arctic/alpine regions to deserts; Schrire et al., 2005), and have been found in most of the archaeological record of plants. Early in 37 B.C. Varro said “Legumes should be planted in light soils, not so much for their own crop as for the good they do to subsequent crops” (Graham & Vance, 2003), recognizing the importance of multiple cropping and intercropping production.

Leguminosae or Fabaceae is the third most populous family of flowering plants (behind Asteraceae and Orchidaceae) with 670 to 750 genera and 18,000 to 19,000 species. Legumes include important grain, pasture and agro-forestry species. They are harvested as crops for human and animal consumption as well as used as pulp for paper production, fuel-woods, timber, oil production, sources of chemicals and medicines, and are also cultivated as ornamental, used as living fences and firebreaks among others (Lewis et al., 2005).

The legumes provide many benefits to the soil so they are usually utilized as cover crop, intercropped with cereals and other staple foods. They do produce substantial amounts of organic nitrogen (see below, Improving legume yield by inoculation with rhizobia), increase soil organic matter, improve soil porosity and structure, recycle nutrients, decrease soil pH, reduce soil compaction, diversify microorganisms and mitigate disease problems (U.S Department of Agriculture [USDA], 1998). In rotation with cereals, legumes provide a source of slow-release nitrogen that contributes to sustainable cropping systems. The improvement in the production of these crops will therefore contribute substantially to better human nutrition and soil health (Popelka et al., 2004).

Based on total harvested area and production, cereals are the most important crops, and they are followed by legumes (Fig.1). Close up to 180 million Ha (12-15% of the Earth's arable surface) are worldwide used to produce grain and forage legumes. These numbers point the central importance of world legumes production. In addition, the promise of low-cost production of legume biomass, mainly soybean, for bioenergy purpose focus attention of investors in the improvement of legume production, and deserves an entirely section for discussion.

* M. Morel and V. Braña contributed equally to this chapter

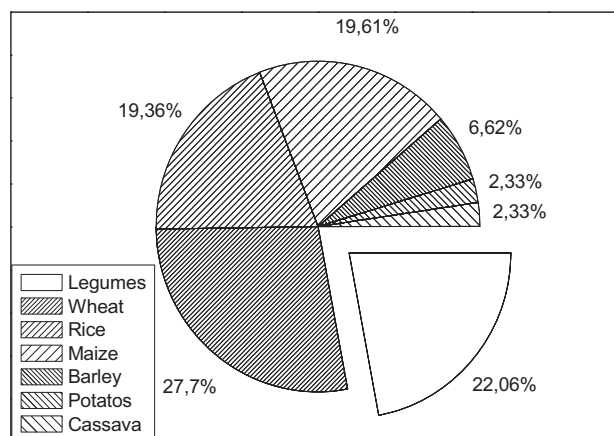


Fig. 1. Net worldwide harvested area for several crops, in the year 2009. Data obtained from Food and Agriculture Organization database [FAO] (<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>) and Graham & Vance (2003).

1.1 Forage and grain legumes

Forage legumes play an important role in dairy and meat production being sources of protein, fibre and energy. They are usually richer in protein, calcium, and phosphorus than other non-legume forages, such as grass. They include alfalfa (*Medicago sativa*), clover (*Trifolium* spp.), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and vetch (*Vicia* spp.) among others. Alfalfa is one of the most important forage crops. In 2006, the worldwide production was around 436 million tons. U.S. is the largest alfalfa producer, with 15 million Ha planted in 2010. Canada, Argentina (primarily grazed), Southern Europe, Australia, South Africa, and the Middle East have also considerable production (FAO, 2011).

Grain legumes also called pulses, which according to FAO are crops harvested exclusively for the dry seeds, play an important role in the nutrition of many people due to their high protein content in seeds. They represent a major source of protein in many developing countries, especially among the poorest population, and are rich in essential amino acids such as lysine, supplementing thus the nutritional value of cereal and tuber diets (Graham & Vance, 2003). The world pulse production has almost increased by half during the period of 1980 – 2004, overtaking the 60 million tons in 2005 (FAO, 2005). According to FAO Statistical Yearbook 2010, in the year 2008, Canada, China and United States were the main exporters of pulses (28%, 12% and 11% of total exports, respectively). Interestingly, India, the world's 12th largest economy and the third largest in Asia behind Japan and China, is the main importer, responsible of 21% of global trade in of pulses (2.5-3.5 million tons). India produces (15-18 million tons; the world's largest producer), imports and consumes (18.5-20.5 million tons) a wide range of pulses. Thus, considering pulse relevance in the world's largest economies such as U.S., China and India, incomes and a raising world population, it is obvious the interest of farmers and investors for improving pulse production.

1.2 Soybean – The new legume-star

The soybean (U.S.) (*Glycine max*), also called soya bean (U.K.), is an annual summer legume native of South-eastern Asia, which is used as human food (Liu, 1999) and livestock feed as well as for several industrial purposes (Ali, 2010). According to the newest available information, this legume is one of the main crops cultivated for oil extraction (35.9 million tons oil and 57% global oilseed production), preceded only by the oil of palm (FAO, 2011). Interestingly, over half of the world's 2007 soybean crop (58.6%) was genetically modified (GM), achieving 77% in the year 2009. These GM-soybeans possess a gene that confers herbicide resistance. The nations that produce almost exclusively GM-soybean are U.S. (85%) and Argentina (98%), tending to 100%. The global production and utilization of soybean have increased by ten during the last century (Qiu & Chang, 2010). In 2009, world's soybean cultivated area and production were 99.5 million Ha and 223.2 million tons (FAO, 2011), respectively. U.S. is the world's leader soybean producer and exporter, responsible of 41% global production, followed by Brazil (26%), Argentina (14%), China (7%) and India (4%) (FAO, 2011).

In U.S. the soybean farm gate value raised more than double, ranging from 12.6 billion USD (in 2001) to 29.6 billion USD (in 2009). The price of soybean has increased more than 80% because of soybean-oil's use in soy-biodiesel and as feed for fish farming. Biodiesel is in demand and soybean represents about 25% total worldwide global biodiesel raw material (Pahl, 2008). The net energy balance when the soybean-oil is used for fuel has improved since soybean is a legume, it fixes nitrogen and does not require nitrogen fertilizer (see below) (Kinney & Clemente, 2010).

2. Improving legume yield by inoculation with rhizobia

Leguminous plants are relevant economic and cultural important crops because their exceptional diversity, manifested in variety of vegetable forms that adapted to a wide range of ecological conditions, the high protein content of some grains, their use as pastures, increased world production and commodities. In this scenario, many farm investors, industries and researchers have focussed attention in the development of biological and eco-friendly technologies for legume growth improvement and establishment. The ability of many legumes to form associations with bacteria that fix atmospheric nitrogen (the symbiotic association that improve growth) is thus a big matter of ecological and economic interest (Zahran, 2009).

2.1 Biological vs chemical nitrogen fertilization

Microorganisms are essential to the Earth's nitrogen cycle and to the Biological Nitrogen Fixation (BNF) process in leguminous plants, playing a very important role in terms of plant production in agriculture. Nitrogen fixing microorganisms could be used in live formulations (biofertilizer) that when applied to seed, root or soil colonize the rhizosphere, or the interior of the plant, and promote growth by increasing the nitrogen supply to the host plant and building up soil health. The evaluation, in terms of economic and ecological costs, between chemical- and biological-nitrogen fertilizers support that BNF represents an economic, sustainable and environmentally friendly resource to guarantee the nitrogen requirement of an agro-ecosystem.

Chemical-fertilizer demand has historically been influenced by changing and often interrelated factors such as increasing populations and economic growth, agricultural production, prices, and government policies. In 2007, the production of chemical nitrogen fertilizers was 130 million tons which is likely to increase further in the coming years (FAO, 2011). Their production requires a great consumption of fossil fuels (1-2 % global fossil fuel) and is subjected of constant variations in prices (Vieira et al., 2010). Although their direct contribution to energy consumption seems minimal, it is unnecessary and unsustainable. On average, U.S. farmers apply 30-40 % more chemical nitrogen than is needed for optimal crop yield, thus wasting most of the applied chemical nitrogen. Given the rising cost of chemical nitrogen fertilizers, nitrogen fixation cover crops offer significant economic benefits. In 2006, the price of nitrogen fertilizers in U.S. raised to 521 USD per ton (Huang, 2007), estimating an over cost of 7 to 10 billion USD annually compared with FBN. For instance, the modest use of alfalfa in rotation with corn by U.S. farmers saved 200 to 300 million USD (Graham & Vance, 2003).

In addition to the inconvenience of increasing prices, chemical nitrogen fertilization is associated with environmental problems because watershed contamination by nitrogen leaching, volatilization and denitrification. These problems could be avoided offering to farmers low-cost biofertilizer technologies. These are ecologically sound and their application could help to minimize the global warming as well as to reduce the fertilizer input in farming practices (Herridge et al., 2008a).

2.2 The biological nitrogen fixation (BNF)

BNF benefits not only the legumes themselves but also any intercropped or succeeding crop, reducing or removing the need for nitrogen fertilization. In soils with low mineral nitrogen content, nitrogen fixing microorganisms provide ammonium into the legume biomass, allowing faster growing than their plant competitors. In contrast, if nitrogen is abundant, nitrogen fixing microorganisms tend to be competitively excluded by non-fixing species because the nitrogen fixation process is bio-energetically costly (Houlton et al., 2008). It means that there is a range of physiological and ecological situations that tend to constrain BNF in legume systems, mainly by the nitrogen demand of the plant and by the C:N stoichiometry of the ecosystem. In fact, the hypothesis of a feedback control between legume demand and BNF in a particular ecosystem has been now supported by evidence from both experimental and theoretical models (Soussana & Tallec, 2010).

There is the potential to increase BNF by the use of well adapted and efficient nitrogen fixing microorganisms and/or genetic modified plant species to ensure legume crop at high levels of productivity. Farmers are familiar with the application of commercially available microorganisms (inoculants) that have been especially selected for their ability to effectively nodulate plants and to fix nitrogen from the atmosphere. These kind of microbial inoculants, also known as soil inoculants, are agricultural amendments that use microorganisms known as rhizobia to promote legume growth. These bacteria form symbiotic relationships with the target leguminous plant, and both parts benefit. The legume supplies energy and photosynthates to rhizobia, and rhizobia provide the legume with nitrogen, mainly in the form of ammonium (Howard & Rees, 1996). The symbiosis is initiated through the legume root infection by the rhizobia and formation of root nodules where BNF occurs through the action of a bacterial enzyme, called "Nitrogenase" (Masson-Boivin et al., 2009).

2.3 Rhizobia: The master microbe

The current taxonomy of rhizobia consists of several genera in the subclass Alpha- and Beta-Proteobacteria. *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (formerly *Sinorhizobium*), *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Devosia* and *Ochrobactrum* are genera that belong to rhizobial Alpha-Proteobacteria. In rhizobial Beta-Proteobacteria the following genera have been described: *Burkholderia*, *Herbaspirillum* and *Cupriavidus* (NZ Rhizobia, 2011). It is important to clarify that this classification is based on taxonomically important strains that may not necessarily be important reference strains for legume growth improvement. Rhizobial strains commonly used in inoculants have good field performance and stability of symbiotic properties in culture, but are not necessarily well documented or used in taxonomy or molecular biology studies (Lindström et al., 2010). The legume-rhizobia association is specific (each rhizobial strain establishes a symbiosis with only a limited set of host plants and *vice versa*). Thus, there is a restricted number of inoculants that fit with a leguminous plant, and farmers must know which inoculant must be applied according plants and characteristics of soil (Mabrouk & Belhadj, 2010). In other words "Be sure to buy the right inoculant for the legume the farmer intends to plant". Such information must be given by the manufacturer and should be clearly specified in the label. Plants mutually compatible with the same species of rhizobia were listed in earlier years in so-called "cross-inoculation groups" (Table 1). This concept was used in rhizobial taxonomy, but is it unreliable as taxonomic marker because of aberrant cross-infection among plant groups.

Rhizobia	Legume Cross-inoculation group
<i>Ensifer meliloti</i>	Alfalfa Group: alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), sweet clover (<i>Melilotus</i> spp.) (yellow and white), fenugreek (<i>Trigonella</i> spp.)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	Clover Group (Clover I, II, III and IV): clovers (<i>Trifolium</i> spp.)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soybean Group: soybean (<i>Glycine max</i>)
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Cowpea Group: pigeon pea (<i>Cajanus cajan</i>); peanut (<i>Arachis hypogaea</i>); cowpea, mungbean, black gram, rice bean (<i>Vigna</i> spp.); lima bean (<i>Phaseolus lunatus</i>); <i>Acacia mearnsii</i> ; <i>A. mangium</i> ; <i>Albizia</i> spp.; <i>Enterlobium</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Stylosanthes</i> spp., Kacang bogor (<i>Voandzeia subterranea</i>), <i>Centrosema</i> sp., winged bean (<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>), hyacinth bean (<i>Lablab purpureus</i>), siratro (<i>Macroptilium atropurpureum</i>), guar bean (<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>), calopo (<i>Calopogonium mucunoides</i>), puero (<i>Pueraria phaseoloides</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	Pea Group: peas (<i>Pisum</i> spp.), lentil (<i>Lens culinaris</i>), vetches (<i>Vicia</i> spp.), faba bean (<i>Vicia faba</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Bean Group: beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>), scarita runner bean (<i>Phaseolus coccineus</i>)
<i>Mesorhizobium loti</i>	Chickpea Group: chickpea (<i>Cicer</i> spp.), Birdsfoot trefoil (<i>Lotus corniculatus</i> L.)
<i>Rhizobium lupini</i>	Group Lupines
<i>Rhizobium</i> spp	Crownvetch

Table 1. Cross-inoculation group and *Rhizobium*-legume association

The occurrence of a wide diversity of microorganisms in a particular soil increases the opportunity for a legume host to find compatible rhizobia. The principle of specific legume-rhizobia association is commonly used for the isolation of well adapted and efficient rhizobial strains (Castro-Sowinski et al., 2002; Florentino et al., 2010). Usually trap-plants are used to catch the rhizobial strain with highest performance and the strain is used for the design of new inoculants. Details about inoculation technology for legumes can be read in Herridge (2008b).

2.4 Formulation and low-cost are crucial aspect of producing inoculants

Formulation is the industrial “art” of converting a promising laboratory-proven microorganism into a commercial field product. But, the development of successful inoculants involves more than the selection of the most efficient rhizobial strain, it involves the choice of a carrier (powder, granule, and liquid), packaging and marketing, avoiding of microbial contaminations. Inoculant preparations for agricultural use constitute a stressful environment because bacterial cells may have to be stored for long periods, and should survive desiccation and transportation conditions. Some aspects related to inoculant preparation, production and application are described by Hungria et al. (2005).

The formulation should maintain or enhance activity in field. In order to survive in nutrient-poor ecosystems, bacteria use different strategies, among them, the use of polyhydroxyalkanoates (PHA) as intracellular carbon storage compounds. Cells with higher PHA content can survive longer than those with lower amounts, and PHA degraded elements can be used rapidly for numerous metabolic needs. Accumulation of PHA can provide the cell with the ability to endure a variety of harmful physical and chemical stresses (Castro-Sowinski et al., 2010; Kadouri et al., 2005).

A good formulation contains microorganisms (active ingredient) in an active metabolic state, immersed in a suitable carrier together with additives that are responsible for the microbial cells stabilization and protection during storage and transportation. Most of the research done in the improvement of inoculant quality is based on improving carrier properties, by adding elements that can prolong survival, such as nutrients, or other synthetic products (López et al., 1998). Most commercial inoculants are in powder (finely ground peat mixed with the nitrogen-fixing bacteria), ready for mixing with the seed. Granular formulations are designed to be placed in the seed rut at planting. Liquid inoculants and other non-peat-based inoculants are also being used. Liquid inoculants simplify the production of the inoculant and the application to seeds or field. However, bacterial survival in the inoculant and on inoculated seeds is not as good as when using peat as a carrier, because bacteria lack carrier protection (Tittabutr et al., 2007). Peat provides bacterial protection and prevents drying and death, compared to the inoculants that do not contain peat. However, alternative substrates to peat can be used as carriers: compost cork, perlite, volcanic pumice, alginate beads and coal, among many others, also gave good results in terms of supporting bacterial growth and long survival, as well survival on seeds (Albareda et al., 2008; Ben Rebah et al., 2007).

Another important consideration in formulation is the cost-effectiveness that must be low enough to allow sufficient incoming compared to chemical fertilization. In U.S. and Canada, a seed inoculant is sell for 5.00 and 2.50 USD per Ha, respectively, while granular inoculants

range from 15.00 to 18.00 (US) per Ha (Xavier et al., 2004). But, inoculants need only a modest increase in yield to offset the cost. A good inoculant will usually provide at least a 70- to 140-Kg per Ha return on yield.

2.5 The input of BNF in legume yield

The annual input of fixed nitrogen was calculated to be 2.95 Mton for the pulses and 18.5 Mton for the oilseed legumes, being the soybean the dominant crop legume (50% global crop legume area and 68% global production). In addition to the annual legume nitrogen fixation inputs of 12-15 Mton (pasture and fodder legumes), there is an input by nitrogen fixation in rice (5 Mton), sugar cane (0.5 Mton), non-legume crop lands (<4 Mton) and extensive savannas (<14 Mton). Thus, the total overall estimated in agricultural systems is of 50-70 Mton biologically fixed nitrogen (Herridge et al., 2008a). These numbers show that the process of BNF is an economically attractive and eco-friendly alternative to reduce the external nitrogen (chemical fertilizers) input, which improves the quality and quantity of crop resources.

A successful BNF is capable of improving agricultural productivity while minimizing soil loss and ameliorating adverse edaphic conditions. Conditions such as drought, salinity, unfavorable soil pH, nutrient deficiency, mineral toxicity, high temperature, insufficient or excessive soil moisture, inadequate photosynthesis, and plant diseases conspire against a successful symbiotic process. Many inoculant manufactures worldwide have developed formulations with high symbiotic efficiency under stress conditions. However, the actual view of plant growth promoting preparations focuses their investigations in the design and development of new-formulations supplemented with plant and/or microbe exudates. These exudates contain molecules involved in the microbe-plant interaction: flavonoids, sugars, acids, amino acids, amines and other low molecular weight compounds that promote plant growth (Skorupska et al., 2010; Garg & Geetanjali, 2009). Macchiavelli & Brelles-Mariño (2004) showed increased plant nodulation treating *Medicago truncatula* roots and seeds with Nod Factors prior to inoculation. Lipo-chito-oligosaccharides (LCOs), or Nod Factors (NFs), are bio-signals produced by the rhizobia which act as bacteria-to-plant communication molecule that mediates recognition and nodule organogenesis (Masson-Boivin et al., 2009). The inclusion of NFs in formulations might have technological applications since presoaking seeds with submicromolar concentrations of this oligo-saccharide before sowing led to increased nodulation under field conditions. In fact, a soybean inoculant based on NFs technology was introduced on the market many years ago (Zhang & Smith, 2002). Currently, many companies like Rizobacter (www.rizobacter.com.ar) and Nitragin (www.nitragin.com.ar) are marketing formulations with bio-signals that improve the symbiotic relationship, activate mechanisms to resist abiotic stress conditions, and induce defensive response.

3. The use of microbial consortium in legume agronomic production

The new fashion in agriculture is the use of microbial consortiums of plant-growth promoting bacteria (PGPB, which includes rhizobia). PGPB are exogenous bacteria introduced into agricultural ecosystems that act positively upon plant development (Castro-Sowinski et al., 2007). It is possible to increase agricultural productivity and, eliminate or decrease the use of chemical fertilizers and pesticides (Adesemoye et al., 2009a; Vessey, 2003) even in marginal soils (Gamalero et al., 2009) when the formulation contains different PGPB.

3.1 Getting more from legumes

Current studies indicate that we are still detecting new bacteria and fungi with diverse growth-promoting characteristics, and that the combination of different PGPB into a single-formulation increases plant yield, compared with single-inoculation. On the other hand, efforts have been done manipulating PGPB to produce master inoculants by the introduction of foreign DNA that provides new abilities (GMM, Genetic Modified Microorganisms). Globally, it was expected a big explosion in this area of research, the use of recombinant DNA-technological tools for the production of inoculants (Barea et al., 2005; Valdenegro et al., 2001). However, the use of GMM is in discussion and needs clear regulatory policies, controls and suitable legislation (Fedoroff et al., 2010).

Some cooperative microbial activities can be exploited for developing new sustainable, environmentally-friendly, agro-technological practices (Barea et al., 2005). In this regard, the plant co-inoculation with rhizobia and other PGPB received considerable attention for legume growth promotion (Cassán et al., 2009; Bai et al., 2002a; 2002b; Zhang et al., 1996). Results from many studies concerning the effect of co-inoculation on legume growth are summarized in Table 2. Several genera of bacteria have been identified as “helpers” of the rhizobia-legume symbiotic process (Beattie, 2006). Examples are bacteria of the genus *Azospirillum* (Cassán et al., 2009; Itzigsohn et al., 1993), *Azotobacter* (Qureshi et al., 2009; Yasari et al., 2008), *Bacillus* (Bullied et al., 2002), *Pseudomonas* (Barea et al., 2005; Fox et al., 2011), *Serratia* (Bai et al., 2002b; Lucas-Garcia et al., 2004a; Zhang et al., 1996), *Thiobacillus* (Anandham et al., 2007), and *Delftia* (Morel et al., 2011), among many other. The stimulation of the legume-rhizobia symbiosis by non-rhizobial-PGPB implicates different processes such as production of phytohormones (usually indole-acetic acid; IAA) that stimulates root growth; qualitative change of flavonoids pattern secreted for the plant; solubilization of non-available nutrients (mainly re-fixation of exogenously applied phosphorus), among others (Medeot et al., 2010). In this section, we summarize the knowledge about bacteria that promote the symbiotic relationship between legumes and rhizobia (from now, the symbiotic enhancer), and the mechanisms involved in this phenomenon. The effect of other microorganisms, such as micorrhizal fungi is not discussed.

Probably the most studied bacterial consortium is the rhizobia-azospirilla one. *Azospirilla* species are being used as seed inoculants under field conditions for more than a decade (Dobbelaere et al., 2001; Puente et al., 2009). The positive effect of *Azospirillum* in the nodulation and nitrogen fixation by rhizobia on several forage legumes was early reported (Yahalom et al., 1987). Since then, many works have been done and mostly are summarized in Bashan et al. (2004). It proven that the combined inoculation with rhizobia and azospirilla increases the shoot length and weight, root hairs number, root diameter, the main- and total-root nodule number and the percentage of infected root hairs, thus resulting in increased legume yields (Cassán et al., 2009). Worldwide, salinity is one of the most important abiotic stresses that limit crop growth and productivity. It was shown that the rhizobia-azospirilla co-inoculation significantly reduces the negative effects of abiotic stresses (such as caused by irrigation with saline water) on root development and nodulation (Dardanelli et al., 2008).

Under stress conditions, such as drought, salinity, S-deficient or heavy metal (HM)-contaminated soils, several associations between plants and beneficial bacteria showed a defensive response and an increased yield (Anandham et al., 2007; Dary et al., 2010; Fuentes-Ramírez & Caballero-Mellado, 2005; Han & Lee, 2005). However, the physiological mechanism

involved in stress mitigation is still unknown (Figueiredo et al., 2008; Furina & Bonartseva, 2007).

3.2 Enhancing the legume – Rhizobia symbiosis by co-inoculation: Modes of action

Many evidences have been accumulated showing that co-inoculation with beneficial microorganisms, having different mechanisms of plant-growth promotion, have additive or synergistic effect on plant growth and crop yield (Table 2). Diverse mechanisms are implicated in the co-inoculation benefits and some of them have been discussed in Barea et al. (2005).

Legume	Bacterial system	Increase (%) compared to single rhizobial inoculation	Experiments done in	Proposed mechanism of action	Reference
Soybean (<i>Glycine max</i>)	<i>B. japonicum</i> - <i>Serratia</i> spp.	50 in NN; 30 in SDW; 32 in RDW	Greenhouse	Production of LCO- analogue	Bai et al., 2002a Bai et al., 2002b
		40 in NN under sub-optimal temperature	Laboratory	Unknown	Zhang et al., 1996
	<i>B. japonicum</i> - <i>B. cereus</i>	10 in SDW	Field	Unknown	Bullied et al., 2002
	<i>B. japonicum</i> - <i>S. proteamaculans</i> / <i>B. subtilis</i>	12 in SDW; 10 in P-uptake	Greenhouse (saline stress)	Limited Na-uptake	Han & Lee, 2005
	<i>B. japonicum</i> - <i>A. brasilense</i>	47 in NN	Laboratory	Production of IAA, GA3 and Zeatin	Cassán et al., 2009
	<i>B. japonicum</i> - <i>A. brasilense</i>	16-40 in RDW; 200-700 in total RL	Laboratory	Unknown	Molla et al., 2001a
		30 in NN	Greenhouse	Production of plant hormones	Molla et al., 2001b
	<i>E. fredii</i> - <i>Chryseobacterium balustinum</i>	56 and 44 in SDW; 100 and 200 in RDW; 155 and 286 in NN under non-saline and saline conditions respectively	Laboratory (saline stress)	Unknown	Estevez et al., 2009
	<i>B. japonicum</i> - <i>P. putida</i>	40 in SDW; 80 in NN; 45 in RDW	Laboratory	P-solubilization and production of siderophores	Rosas et al., 2006

Legume	Bacterial system	Increase (%) compared to single rhizobial inoculation	Experiments done in	Proposed mechanism of action	Reference
Common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>R. tropici</i> /etli - <i>A. brasilense</i>	18-35 and 20-70 in RDW; 29 and 28 in SDW under non saline and saline conditions, respectively	Hydroponic (saline stress)	Production of flavonoid-like compounds	Dardanelli et al., 2008
	<i>R. etli</i> - <i>C. balustinum</i>	35 in SDW; 35 in NN under non-saline conditions; and 39 in SDW; 63 in RDW under saline conditions	Laboratory (saline stress)	Unknown	Estevez et al., 2009
	<i>R. tropici</i> - <i>Paenibacillus polymyxa</i>	50 in NN; 40 in N uptake in non-drought stress	Greenhouse (drought stress)	Unknown	Figuereido et al., 2008
	<i>Rhizobium</i> spp. - <i>A. brasilense</i> / <i>B. subtilis</i> / <i>P. putida</i>	30 in NN; 20 in SDW; 30-45 in RDW	Greenhouse (two levels of P-fertilization)	IAA production or 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity	Remans et al., 2007
	<i>Rhizobium</i> spp. - <i>A. brasilense</i>	70 in NN	Hydroponic	IAA production	Remans et al., 2008a
		30 total yield	Field	IAA production	Remans et al., 2008b
	<i>Rhizobium</i> spp. - <i>P. fluorescens</i> / <i>A. lipoferum</i>	25 in NN; 13 in SDW; 74 in seed yield	Field	P-solubilization; auxin and siderophores production	Yadegari et al., 2010

Legume	Bacterial system	Increase (%) compared to single rhizobial inoculation	Experiments done in	Proposed mechanism of action	Reference
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	<i>Rhizobium spp</i> - <i>Pseudomonas/ Bacillus spp.</i>	20 in SDW; 30-120 in RDW	Greenhouse	Production of flavonoid-like	Parmar & Dadarwal, 1999
	<i>Mesorhizobium sp. Cicer</i> - <i>Pseudomonas spp.</i>	70 in NN; 30 in SDW, 30 in N-uptake	Laboratory	Unknown	Goel et al., 2002
		1,2-1,86 in NN; 1,3-2,11 NFW; 1-2,93 in PDW	Laboratory	IAA production	Malik & Sindhu., 2011
	<i>Rhizobium</i> - <i>B. subtilis/ megaterium</i>	18 in SDW; 16-30 in RDW; 14 in total biomass yield in field	Laboratory and Field	N-fixation by <i>B. subtilis</i> or/ and P-solubilization by <i>B. megaterium</i>	Elkoca et al., 2008
	<i>M. ciceri</i> - <i>Azotobacter chroococcum</i>	15 in NN; 25 in P-soil availability	Field (two levels of N-fertilization)	Unknown	Qureshi et al., 2009
	<i>M. ciceri</i> - <i>Pseudomonas sp/ Bacillus sp.</i>	20 in PDW; 30 in NN; 100 in P-uptake	Field	P-solubilization by PGPB	Wani et al., 2007
Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	<i>Thiobacillus sp.</i> - <i>Rhizobium sp.</i>	50 in PDW; 80 in NN	Greenhouse (S-deficiency) and Field	S-oxidation	Anandham et al., 2007
Clover (<i>Trifolium repens</i>)	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i> - <i>P. fluorescens</i>	20 in SDW; 100 in NN	Laboratory	Production of B-group vitamins	Marek-Kozaczuk & Skorupska, 2001
	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i> - <i>Delftia sp.</i>	50 in SDW and 80 in nodulation rate	Laboratory	IAA production	Morel et al., 2011
Altramuz (<i>Lupinus luteus</i>)	<i>Bradyrhizobium sp.</i> - <i>Pseudomonas sp./ Ochrobactrum cytisi</i>	66 in SDW and 20-40, 25, and 30-50 decrease in Cd, Cu and Zn - accumulation in roots, respectively	Field (Heavy metal contaminated soil)	Phyto-stabilization: Biosorption of heavy metals by bacterial biomass	Dary et al., 2010
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>S. meliloti</i> - <i>Delftia sp.</i>	10 in SDW; 30 in nodulation rate	Laboratory	IAA production	Morel et al., 2011

Legume	Bacterial system	Increase (%) compared to single rhizobial inoculation	Experiments done in	Proposed mechanism of action	Reference
Galega (<i>Galega orientalis</i>)	<i>R. galegae</i> bv. <i>orientalis</i> - <i>Pseudomonas</i> spp.	70 in SDW; 60 in RDW; 30 in NN; 44 in N-uptake	Greenhouse	Production of IAA and/or cellulase by <i>Pseudomonas</i> spp.	Egamberdieva et al., 2010
Vetch (<i>Vicia sativa</i>)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> - <i>A. brasilense</i>	30 in SDW nod gene induction and decreased in indoles content	Greenhouse Hydroponic	IAA production and increased root secretion of flavonoids	Star et al., 2011
Pea (<i>Pisum sativum</i> L. cv. Capella)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> - <i>P. fluorescens</i>	1,3 in Pea DW; 0,5-0,69 in plants with disease	Greenhouse (<i>Fusarium oxysporum</i> infected soils)	Antifungal activity by production of siderophores	Kumar et al., 2001
	<i>R. leguminosarum</i> - <i>B. thuringiensis</i>	84 times in NN; 15 in SDW; 15 in RDW	Laboratory and greenhouse	Unknown	Mishra et al., 2009
Lentil (<i>Lens culinaris</i> L.)	<i>R. leguminosarum</i> - <i>B. thuringiensis</i>	73 in NN; 5 in SDW; 10-30 in RDW	Laboratory and greenhouse	Unknown	Mishra et al., 2009
Pigeon pea (<i>Cajanus cajan</i>)	<i>Rhizobium</i> sp.- <i>Bacillus</i> spp.	50 in PFW; 300 in NN	Greenhouse (sterile soil)	Cross-utilization of siderophores produced by <i>Bacillus</i> sp. and <i>Rhizobium</i>	Rajendran et al., 2008
	<i>Rhizobium</i> sp. - <i>P. putida</i> / <i>P. fluorescens</i> / <i>B. cereus</i>	73 in NN; 30 in grain yield	Greenhouse	Unknown	Tilak et al., 2006
Mung bean (<i>Vigna radiata</i> L.)	<i>B. japonicum</i> - <i>P. putida</i>	20 in total biomass; 48 in NN	Greenhouse	Reduced ethylene production	Shaharoon et al., 2006

Table 2. Ten years of studies on legume co-inoculation (2001-2011). Increase in legume symbiotic parameters and yield by co-inoculation compared to single-inoculation with rhizobia. Abbreviations are as follows: RDW: root dry weight; SDW: shoot dry weight; RL: root length; NN: nodule number; NFW: Nodule fresh weight; PDW: plant dry weight; PFW: plant fresh weight.

Probably, the most reported mechanism that explains the improved rhizobia-legume association by other PGPB is the production of plant-hormones (phytohormones), such as gibberellic acid (GA3) or auxin-type phytohormones (mainly indole-3-acetic acid; IAA; Beattie, 2006). That is the case for *Pseudomonas* (Egamberdieva et al. 2010; Malik & Sindhu, 2011) and *Azospirillum* (Cassán et al., 2009; Dobbelaere et al., 2001; Okon, 1994; Perrig et al., 2007). For information about IAA production and effects, we recommend Baca & Elmerich (2007) and Spaepen et al. (2007). However, the main mechanism involved in improved rhizobia-legume association is still under investigation (Dobbelaere & Okon, 2007). It might be possible that multiple mechanisms, rather than only one are acting. This is known as the "Additive Hypothesis" (Bashan et al., 2004; Bashan & de-Bashan, 2010).

Many other signal molecules or analogues involved in plant-rhizobia communication, different than phytohormones but produced by the non-rhizobial co-inoculant strain, have been implicated in the rhizobia-plant association (Lucas-Garcia et al., 2004b; Mañero et al., 2003). Some direct evidence suggests that the presence of *Pseudomonas* spp. (Parmar & Dadarwal, 1999) and *Azospirillum* spp. cells (Burdman et al., 1996; Dardanelli et al., 2008, Volpin et al., 1996) induce the synthesis of flavonoids by roots of chickpea, common bean and alfalfa, in experiment of co-inoculation with rhizobia. Interestingly, it is not strictly necessary the presence of the bacteria, the application of bacteria-free exudates of symbiotic enhancers to the root exert similar effect that during bacterial-co-inoculation (Molla et al., 2001b). For example, the application of NFs analogues produced by *Serratia proteamaculans* 1-102 promotes soybean-bradyrhizobia nodulation and soybean growth (Bai et al., 2002b). The list of metabolites produced by symbiotic enhancers might become bigger: vitamins that may supplement the nutritional requirement of rhizobia (Marek-Kozaczuk & Skorupska, 2001); hydrolytic enzymes that assist during rhizobial penetration in the root hair, or attack phytopathogenic fungi (Egamberdieva et al., 2010; Sindhu & Dadarwal, 2001; Sindhu et al., 2002); or P-solubilizing acids that increase phosphorus availability (Elkoca et al., 2008). However, in most cases the mechanism underlying the plant growth promotion by co-inoculation is unknown (Bullied et al., 2002; Goel et al., 2002; Lucas García et al., 2004a, 2004b; Vessey & Buss, 2002).

3.3 Increasing crop yield by co-inoculation

On average, an increase of 4-5% in crop yield has an important impact in agricultural production. The data obtained in different growth-systems (gnotobiotic laboratory conditions, hydroponics, greenhouse and field) shows that co-inoculation produces a major increase in legume yield compared with single inoculation (Table 2), overwhelming the agronomic expectations.

Inoculation and co-inoculation experiments must be done in field to provide a realistic assessment of the performance of a living-formulation in practical farming conditions. Table 2 shows examples of legume co-inoculation in field experiments. An increase of 74% in seed yield was detected when *Phaseolus vulgaris* was co-inoculated with *P. fluorescens* or *A. brasilense* compared with single-inoculation with *Rhizobium* spp. (Yadegari et al., 2010). As well, 14% total biomass chickpea yield was detected during co-inoculation with P-solubilizing *Bacillus* isolates compared with single-inoculation with *Rhizobium* sp (Elkoca et al., 2008). Vast areas of agricultural land are not appropriated for cropping because the soil has P-deficiency and the co-inoculation of legumes with rhizobia and P-solubilizing bacteria might supply nitrogen and phosphorus to these poor lands. The examples above provided show a huge increase in yield

during co-inoculation in field experiments, pointing the economically relevance of co-inoculation practices in countries with high pulse crop production.

Bacteria	Target crop	Formulation	Yield increase (%) ^a	Reference
Rhizobia - <i>B. subtilis</i>	Soybean; peanuts; dry beans	Co-inoculant ^b	4-6	www.histicknt.com
Rhizobia - <i>A. brasilense</i>	Soybean; peanut; pea; vetch	Co-inoculant	8-30	www.intxmicrobials.com
Rhizobia - <i>A. brasilense</i> - <i>P. fluorescens</i>	soybean	Co-inoculant	5-10	www.inoculantespalaversich.com
Rhizobia - <i>A. brasilense</i>	soybean	Co-inoculant	10	www.nitrosoil.com.ar
Rhizobia - <i>B. megaterium</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	All legumes ^c	Co-inoculant	Undeclared	www.iabiotec.com
<i>B. megaterium</i>	All crops ^d	Inoculant ^e	10	www.rajshreesugars.com
			Undeclared	www.manidharmabiotech.com
P-solubilizing bacteria (genus undeclared)	All crops	Inoculant	10-15	www.gsflimited.com
<i>Frateuria aurantia</i>	All crops	Inoculant	10-20	www.manidharmabiotech.com
P-solubilizing bacteria (genus undeclared)	All crops	Inoculant	20-30	www.varshabioscience.com
<i>Delftia acidovorans</i>	Canola (<i>B.napus</i>)	Inoculant	Undeclared	Banerjee & Yesmin, 2004 www.brettyoung.ca

^a - compared to single inoculation

^b -the formulation contains both rhizobia and non-rhizobial PGPB in the same package

^c - recommended for all kind of legumes

^d - recommended for many crops, including legumes

^e - the formulation does not contain rhizobia, but it can be used with rhizobial-formulation

Table 3. Some available commercial formulations (containing two PGPB) for legume crops.

Note: mycorrhiza and bio-control bacteria are not included in this list.

Chickpea is the most largely produced pulse crop in India accounting for 40% of total pulse crops production, being the leading chickpea producing country in the world. India annually produces around 6 Million tons of chickpea and contributes of approximately 70% in the total world production. On the other hand, Brazil is the world leader in dry bean production (3.3 Million ton), followed by India (3.0 Millon ton) and China (1.9 Millon ton). All these countries belong to "the BRICs". In economics, BRIC is a grouping acronym that refers to Brazil, Russia, India and China, which are considered to be at a similar stage of newly advanced economic development. The BRIC thesis, by Goldman Sachs, recognizes that Brazil, Russia, India and China have changed their political systems to embrace global capitalism, and predicts that China and India, respectively, will become the dominant global suppliers of manufactured goods and services, while Brazil and Russia will become similarly dominant as suppliers of raw materials. In this scenario, of countries with growing world economies and important production and consumption of pulses, the development of new formulations based in bacterial consortiums are being encouraged. However, a major constraint for exploiting living-formulation technologies has been that most farmers are not aware of the technology and its benefits.

3.4 New formulations: The use of bacterial consortium

Some bacterial symbiotic enhancers are promising microorganisms that would be used for the design of new formulations. These formulations could contain different bacteria in one pack, ready for direct placing in the seed at planting. However, some manufacturers also produce formulations that do contain non-rhizobial PGPB, but that can be mixed with rhizobial-formulation at the moment of planting. Information on both kinds of formulations is provided in Table 3.

Despite the great progress and the increasing interest in mixed formulations for legumes inoculation, there are few commercial products with different bacteria. Most of these products are based on *Bacillus* spp. *Azospirillum*-based inoculants are also abundant in the market, but most of them are available for non-legumes crops (Figueiredo et al., 2010). Most commercially available biofertilizers are biopesticides and biofungicides, but they are not described in this chapter.

4. Concluding remarks

The doubling time world's current growth is 54 years and we can expect the world's population to become 12 billion by 2054. This demographic growth has to be accompanied by an increase in food production. Thus, the humanity has to face a new challenge, by doing a good use of soils (Fedoroff et al., 2010; Godfray et al., 2010) and developing new technologies (Pretty, 2008), mainly based in eco-friendly microorganisms that control pest and improve plant growth. In such scenario, the use of biofertilizers, rhizobia or consortium of plant-beneficial microbes (rhizobia and symbiotic enhancers) in formulations provides a potential solution. The data showed in this chapter support that the design of new formulations with cooperative microbes might contribute to the growth improvement of legumes. The co-inoculation has a positive effect in growth stimulation of legume crops; however, we believe it is necessary to continue studying this subject.

5. Acknowledgments

The authors thank Prof. Yaacov Okon for his valuable suggestions during writing and PEDECIBA for partial financial support. The work of M. Morel and V. Braña was supported by ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación).

6. References

- Adesemoye, A.; Torbert, H. & Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, Vol. 58, pp. 921-929, ISSN 0095-3628
- Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, DN.; Camacho, M. & Temprano, FJ. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, pp. 2771-2779, ISSN 0038-0717
- Ali, N. (2010). Soybean Processing and Utilization, In: *The soybean: botany, production and uses*, Singh, G., (Ed.) 345-362, CAB International, ISBN 9781845936440, UK.
- Anandham, R.; Sridar, R.; Nalayini, P.; Poonguzhali, S.; Madhaiyan, M. & Tongmin, S. (2007). Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulfur-oxidizing bacteria and *Rhizobium*. *Microbiological Research*, Vol. 162, pp. 139-153, ISSN 0944-5013
- Baca, B. & Elmerich, C. (2007). Microbial production of plant hormones. In: *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Elmerich, C. & Newton, E. (Eds.), 113-143, Springer, ISBN 978-1-4020-3541-8, Dordrecht, The Netherlands
- Bai, Y.; Pan, B.; Charles, T. & Smith, L. (2002a). Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 34, pp. 1953-1957, ISSN 0338-0717
- Bai, Y.; Souleimanov, A. & Smith, D. (2002b). An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 373, pp. 1495-1502, ISSN 0022-0957
- Banerjee, M.R & Yesmin, L. (2004). BioBoost: a new sulfur-oxidizing bacterial inoculant for canola, 4th International Crop Science Congress, ISBN 1-920842-21-7, Brisbane, Australia, September 2004
- Barea, J.; Pozo, M.; Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 417, pp 1761-1778, ISSN 0022-0957
- Bashan, Y. & de-Bashan, L. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. In: *Advances in Agronomy*, Sparks, D. (Ed.), Vol.108, 77-136, ISBN 978-0-12-374361-9, Newark, USA
- Bashan, Y.; Holguin, G. & de-Bashan, L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 50, pp. 521-577, ISSN 0008-4166
- Beattie, G. (2006). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances, In: *Plant-associated bacteria*, Gnanamanickam, S. (Ed.), 1-56, Springer ISBN 978-1-4020-4537-0, Netherlands

- Ben Rebah, F.; Prévost, D.; Yezza, A. & Tyagi, RD. (2007) Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 3535-3546, ISSN 09608524
- Bullied, W.; Buss, T. & Vessey, J. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Fields studies. *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 82, pp. 291-298, ISSN 0008-4220
- Burdman, S.; Volpin, H.; Kapulnik, Y. & Okon, Y. (1996). Promotion of *nod* gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) root inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Applied Environmental Microbiology*, Vol.62, pp. 3030-3033, ISSN 0099-2240
- Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Masciarelli, O., Penna, C. & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, Vol. 45, pp. 28-35, ISSN 1164-5563
- Castro-Sowinski, S.; Burdman, S.; Matan, O. & Okon, Y. (2010). Natural functions on bacterial polyhydroxyalkanoates, In: *Plastics from bacteria. Natural Functions and applications*. Chen, GQ. (Ed.), 39-61, Springer, ISBN 1862-5576, New York.
- Castro-Sowinski, S.; Carrera, I.; Catalan, AI.; Coll, J. & Martinez-Drets, G. (2002). Occurrence, diversity and effectiveness of mild-acid tolerant alfalfa nodulating rhizobia in Uruguay. *Symbiosis*, Vol.32, pp. 105-118, ISSN 0334-5114
- Castro-Sowinski, S.; Herschkovitz, Y.; Okon, Y. & Jurkevitch, E. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.276, No.1, pp. 1-11, ISSN 0378-1097
- Dardanelli, M.; Fernández de Córdoba, F.; Espuny, M.; Rodríguez Carvajal, M.; Soria Díaz, M.; Gil Serrano, A.; Okon, Y. & Megías, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol.40, pp. 2713-2721, ISSN 0038-0717
- Dary, M.; Chamber-Pérez, M.; Palomares, A. & Pajuelo, E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 177, pp. 323-330, ISSN 0304-3894
- Dobbelaere, S. & Okon, Y. (2007). The plant growth-promoting effect and plant responses. In: *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*, Elmerich, C. & Newton, E. (Eds), 145-170, Springer, ISBN 978-1-4020-3541-8, Dordrecht, The Netherlands
- Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Vanderleyden, J.; *et al.* (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, Vol. 28, pp. 871-879, ISSN 0310-7841
- Egamberdieva, D.; Berg, G.; Lindström, K. & Räsänen, L.A. (2010). Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.) *European Journal of Soil Biology*, Vol.46, pp. 269-272, ISSN 1164-5563

- Elkoca, E.; Kantar, F. & Sahin, F. (2008). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, Vol.31, pp. 157-171, ISSN 0190-4167
- Estevez, J.; Dardanelli, M.S.; Megías, M. & Rodriguez-Navarro, D.N. (2009). Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions. *Symbiosis*, Vol.49, pp. 29-36, ISSN 0334-5114
- FAO. (2005). Pulses: Past trends and future prospects, access on August 30, available from: <http://www.fao.org/es/esc/en/15/97/highlight_98.html>
- FAO. (2010). FAO Statistical Yearbook, access on August 30, available from: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/en/>>
- FAO STAT. (2011). Food and Agriculture Organization Statistical Database, access on August 30, available from : <<http://faostat.fao.org>>
- Fedoroff, N.; Battisti, D.; Beachy, R.; Cooper, P.; Fischhoff, D.; Hodges, C.; Knauf, V.; Lobell, D.; Mazur, B.; Molden, D.; Reynolds, M.; Ronald, P.; Rosegrant, M.; Sanchez, P.; Vonshak, A. & Zhu, J. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science*, Vol. 327, No. 5967, pp. 833-834, ISSN 0036-8075
- 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*. *Applied Soil Ecology*, Vol. 40, pp. 182-188, ISSN 0929-1393
- Florentino, LA., Martins de Sousa, P., Silva, IS., Barroso Silva, K. & de Souza Moreira, FM. (2010). Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, Vol. 34, pp. 1113-1123, ISSN 0100-0683.
- Fox, S.L; O'Hara, G. & Bräü, L.(2011). Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant and Soil*, Vol. 348, No.1-2, pp. 245-254, ISSN 0032-079X
- Fuentes-Ramírez, L. & Caballero-Mellado, J. (2005). Bacterial biofertilizers. In: *PGPR: Biocontrol and biofertilization*, Siddiqui, Z. (Ed.), 143-172, Springer, ISBN , Dordrecht, Netherlands
- Furina, E. & Bonartseva, G. (2007). The effect of combined and separate inoculation of alfalfa plants with *Azospirillum lipoferum* and *Sinorhizobium meliloti* on denitrification and nitrogen-fixing activities. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 43, No. 3, pp. 286-291, ISSN 0003-6838
- Gamalero, E.; Berta, G. & Glick, B. (2009). The use of microorganisms to facilitate the growth of plants in saline soils, In: *Microbial strategies for crop improvement*, Khan, S.; Zaidi, A. & Musarrat, J. (Eds.), 1-22, Springer, ISBN 978-3-642-01978-4, New York.
- Garg, N. & Geetanjali, G. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling: a review, In: *Sustainable Agriculture*. Lichtfouse, E.; Navarette, M.; Véronique, S. & Alberola, C. (Eds.), 519-531, Springer, ISBN 978-90-481-2666-8, Netherlands.

- Godfray, H.; Beddington, J.; Crute, I.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S. & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, Vol.327, No.5967, pp. 812-818, ISSN 0036-8075
- Goel, A.; Sindhu, S. & Dadarwal K. (2002). Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, Vol.36, pp. 391-396, ISSN 0178-2762
- Graham, PH. & Vance, CP. (2003), Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, Vol. 131, No. 3, pp. 872-877, ISSN: 0032-0889
- Han, H. & Lee, K. (2005). Physiological responses of soybean-Inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in saline soil conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, Vol.1, No.3, pp. 216-221, ISSN 1816-1561
- Herridge, D. (2008b). Inoculation technology for legumes. In: *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*, Dilworth, M. J.; James, EK; Sprent, JI. & Newton, WE . (Eds.), 77-115, Springer, ISBN 9781402035456, Netherlands
- Herridge, DF., Peoples, MB. & Boddey, RM. (2008a). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, Vol. 311, pp. 1-18, ISSN 0032079X.
- Houlton, BZ.; Wang, YP.; Vitousek, PM. & Field, CB. (2008). A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, Vol. 454, No. 3, pp. 27-334, ISSN 0028-0836
- Howard, JB., & Rees, DC. (1996). Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chemical Review*, Vol. 96, pp. 2965-2982, ISSN 0009-2665
- Hungria, M.; Loureiro, M.; Mendes, I.; Campo, R. & Graham, P. (2005). Inoculant preparation, production and application, In: *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*, Werner, D. & Newton, W. (Eds.), 223-253, Springer, ISBN 10 1-4020-3542-X , Netherlands.
- Itzigsohn, R.; Kapulnik, Y.; Okon, Y. & Dovrat, A. (1993). Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.39, pp. 610-615, ISSN 0008-4166
- Kadouri, D.; Jurkevitch, E.; Okon, Y. & Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Review in Microbiology*, Vol. 31, No.2, pp. 55-67, ISSN 1040-841X
- Kinney, A., & Clemente, TE. (2010). Soybeans, In: *Energy Crops*, Halford, N., & Karp, A., (Eds.), (148-164), Royal Society of Chemistry Publishing, ISBN: 978-1-84973-204-8, UK
- Kumar, B.; Berggren, I. & Martensson, A. (2001). Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant and Soil*, Vol.229, pp. 25-34, ISSN 0032-079X
- Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B. & Lock, M. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew Publishing, ISBN 1 900 34780 6, UK
- Lindström, K.; Murwira, M.; Willems, A. & Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, Vol. 161, pp. 453-463, ISSN 0923-2508
- Liu, K. (1999). Chemistry and nutritional value of Soybean components, In: *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*, Liu, K., pp (25-94), Aspen Publisher, ISBN 0-8342-1299-4, New York.

- López, N.I.; Ruiz, J.A. & Méndez, B.S. (1998). Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.14, pp. 681-684, ISSN 0959-3993
- Lucas-García, J.; Probanza, A.; Ramos, B.; Barriuso, J. & Gutierrez-Mañero, F. (2004a). Effects of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. *osumi*. *Plant and Soil*, Vol. 267, pp. 143-153, ISSN 0032-079X
- Lucas-García, J.; Probanza, A.; Ramos, B.; Colon-Flores, J. & Gutierrez-Mañero, F. (2004b). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* L. cv. *multolupa*. *Engineering in Life Sciences*, Vol. 4, pp. 71-77, ISSN 1618-2863
- Mabrouk, Y., & Belhadj, O. (2010). The potential use of *Rhizobium*-legume symbiosis for enhancing plant growth and management of plant diseases, In: *Microbes for Legume Improvement*, Khan, MS., Zaidi, A., & Musarrat, J. (Eds.), 495-514, Springer-Verlag, ISBN 978-3-211-99752-9, New York
- Macchiavelli, RE. & Brelles-Mariño, G. (2004). Nod factor-treated *Medicago truncatula* roots and seeds show an increased number of nodules when inoculated with a limiting population of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, pp. 2635-2640, ISSN 0022-0957
- Malik, D. & Sindhu, S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, Vol.17, No.1, pp. 25-32, ISSN 0971-5894
- Mañero, F.; Probanza, A.; Ramos, B.; Flores, J. & Garcia-Lucas, J. (2003). Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupin on germination, growth, and biological nitrogen fixation of lupin seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, Vol.26, pp. 1101-1115, ISSN 0190-4167
- Marek-Kozaczuk, M. & Skorupska, A. (2001). Production of B-group vitamins by plant-growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biology and Fertility of Soils*, Vol.33, pp. 146-151, ISSN 0178-2762
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends in Microbiology*, Vol. 17, pp. 458-466, ISSN 0966-842X.
- Medeot, DB.; Paulicci, NS.; Albornoz, AI.; Fumero, MV.; Bueno, MA.; Garcia, MB.; Woelke, MR.; Okon, Y. & Dardanelli, MS. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria improving the legume-rhizobia symbiosis, In: *Microbes for Legume Improvement*, Khan, MS., Zaidi, A., & Musarrat, J. (Eds.), 473-494, Springer-Verlag, ISBN 978-3-211-99752-9, New York
- Mishra, P.; Mishra, S. & Selvakumar, G. (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol.25, pp. 753-761, ISSN 0959-3993
- Molla, A.; Shamsuddin, Z. & Saud, H. (2001b). Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Communication in Soil Science and Plant Analalysis*, Vol. 32, pp. 2177-2187, ISSN 0010-3624

- Molla, A.; Shamsuddin, Z.; Halimi, M.; Morziah, M. & Puteh, A. (2001a). Potential enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol.33, pp. 457-463, ISSN 0038-0717
- Morel, MA; Ubalde, M.; Braña, V. & Castro-Sowinski, S. (2011). *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of Microbiology*, Vol.193, No.1, pp. 63-68, ISSN 0302-8933
- NZ Rhizobia. (2011) New Zealand Rhizobia, access on September 14, available from: <<http://www.rhizobia.co.nz>>
- Okon, Y (Ed). (1994). *Azospirillum* /plant associations, CRC-Press, ISBN 0849349257, Boca Raton, FL, USA
- Osburn, RM.; Dénarié, JC.; Maillet, F.; Penna, C.; Díaz-Zorita, M.; Kosanke, JW. & Smith, RS. (2004). New patented growth promoter technology to enhance early season soybean development and grain yield. In: *Proceedings of the 19th North American Nitrogen Fixation Conference*, Bozeman, Montana, June 2004
- Pahl, G. (2008). Biodiesel 101, In: *Biodiesel: growing a new energy economy*, Pahl, G., (Ed.), 33-53, Chelsea Green Publishing, ISBN 978-1-933392-96-7, U.S.
- Parmar, N. & Dadarwal, K. (1999). Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.86, pp. 36-44, ISSN 1365-2672
- Perrig, D.; Boiero, ML.; Masciarelli, OA.; Penna, C.; Ruiz, OA; Cassán FD. & Luna, MV. (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiolog and Biotechnolog*, Vol.75, No.5, pp. 955, ISSN 0175-7598
- Popelka, C., Terryn, N. & Higgins, T. (2004). Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?. *Plant Science*, Vol. 167, No. 2, pp 195-206, ISSN 01689452.
- Pretty, J. (2008). Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Science*, Vol.363, pp. 447-465, ISSN 1471-2970
- Puente, M.; Garcia, J. & Alejandro, P. (2009). Effect of the bacterial concentration of *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. *World Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 5, No. 5, pp: 604-608, ISSN 1817-3047
- Qiu, L.J. & Chang, R.Z.. (2010). The origin and history of soybean. In: *The soybean: botany, production and uses*, Singh, G., (Ed.) 345-362, CAB International, ISBN 9781845936440, UK.
- Qureshi, M.; Ahmad, M.; Naveed, M.; Iqbal, A.; Akhtar, N. & Niazi, K. (2009). Co-inoculation with *Mesorhizobium ciceri* and *Azotobacter chroococcum* for improving growth, nodulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Soil & Environment*, Vol. 28, No. 2, pp. 124-129, ISSN 2074-9546
- Rajendran, G.; Sing, F.; Desai, A.J & Archana, G. (2008). Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, Vol.99, pp. 4544-4550, ISSN 0960-8524

- Remans, R.; Beebe, S.; Blair, M.; Manrique, G.; Tovar, E.; Rao, I.; Croonenborghs, A.; Torres-Gutierrez R.; El-Howeity, M.; Michiels, J. & Vanderleyden, J. (2008a). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, Vol.302, pp. 149-161, ISSN 0032-079X
- Remans, R.; Ramaekers, L.; Schelkens, S.; Hernandez, G.; Garcia, A.; Reyes, J.; Mendez, N.; Toscano, V.; Mulling, M.; Galvez, L. & Vanderleyden, J. (2008b). Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and Soil*, Vol. 312, pp. 25-37, ISSN 0032-079X
- Remans, R.; Croonenborghs, A.; Torres Gutierrez, R.; Michiels, J. & Vanderleyden, J. (2007). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant nutrition. *European Journal of Plant Pathology*, Vol.119, pp. 341-351, ISSN 0929-1873
- Rosas, S.; Andrés, J.; Rovera, M. & Correa, N. (2006). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol.38, pp. 3502-3505, ISSN 0038-0717.
- Schrire, BD., Lewis, GP., & Lavin, M. (2005). Biogeography of the Leguminosae, In: *Legumes of the world*, Lewis, G., Schrire, G., Mackinder, B., & Lock, M., (Eds.), 21-54, Royal Botanic Gardens, ISBN 8773043044, Kew, UK
- Shaharoon, B.; Arshad, M. & Zahir, Z. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiate* L.). *Letter in Applied Microbiology*, Vol.42, pp. 155-159, ISSN 1472-765X
- Sindhu, S. & Dadarwal, K. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. Antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research*, Vol.156, No.4, pp. 353-358, ISSN 0944-5013
- Sindhu, S.; Suneja, S.; Goel, A.; Parmar, N. & Dadarwal K. (2002). Plant growth promoting effects of *Pseudomonas* sp. on coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *ciceri* strain under sterile and "wilt sick" soil conditions. *Applied Soil Ecology*, Vol.19, No1, pp.57-64, ISSN 0929-1393
- Sindhu, S.S.; Dua, S.; Verma, M.K. & Khandelwal, A. (2010). Growth promotion of legumes by inoculation of rhizosphere bacteria, In: *Microbes for Legume Improvement*, Khan, MS., Zaidi, A., & Musarrat, J. (Eds.), 195-235, Springer-Verlag, ISBN 978-3-211-99752-9, New York
- Skorupska, A.; Wielbo, J.; Kidaj, D. & Marek-Kozaczuk, M. (2010). Enhancing *Rhizobium*-legume symbiosis using signaling factors, In: *Microbes for Legume Improvement*, Khan, MS., Zaidi, A., & Musarrat, J. (Eds.), 27-54, Springer-Verlag, ISBN 978-3-211-99752-9, New York
- Soussana, J-F. & Tallec, T. (2010). Can we understand and predict the regulation of biological N₂ fixation in grassland ecosystems?. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, Vol. 88, pp. 197-213, ISSN 1385-1314
- Spaepen, S.; Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review*, Vol.31, pp. 425-448, ISSN 0168-6445

- Star, L.; Matan, O.; Dardanelli, M.S.; Kapulnik, Y.; Burdman, S. & Okon, Y. (2011). The *Vicia sativa* spp. *nigra*-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, DOI 10.1007/s11104-010-0713-7, ISSN 0032-079X
- Tilak, K.; Ranganayaki, N. & Manoharachari, C. (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, Vol.57, pp. 67-71, ISSN 1351-0754
- Tittabutr, P.; Payakapong, W.; Teaumroong, N.; Singleton, P.W. & Boonkerd, N. (2007). Growth, survival and field performance of Bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *ScienceAsia*, Vol. 33, pp. 069-077, ISSN 1513-1874.
- USDA. (1998). Soil Quality – Agronomy Technical Note, access on 30 August 2011, available from: <http://soils.usda.gov/sqi/management/files/sq_atn_6.pdf>
- Valdenegro, M.; Barea, J. & Azcón, R. (2001). Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid Mediterranean area. *Plant Growth Regulation*, Vol. 34, pp. 233-240, ISSN 0167-6903
- Vessey, J. & Buss, T. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: controlled-environment studies. *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 82, No. 2, pp. 282-290, ISSN 0008-4220
- Vessey, J.k. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as bio-fertilizers. *Plant and Soil*, Vol. 255, pp. 571-586, ISSN 0032-079X
- Vieira, R.F., Mendes, I.C., Reis-Junior, F.B., & Hungria, M. (2010). Symbiotic Nitrogen Fixation in Tropical Food Grain Legumes: Current Status, In: *Microbes for Legume Improvement*, Khan, M.S., Zaidi, A., & Musarrat, J., (Eds.), 427-472, Springer-Verlag, ISBN 978-3-211-99752-9, New York.
- Volpin, H.; Burdman, S.; Castro-Sowinski, S.; Kapulnik, Y. & Okon, Y. (1996). Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *Molecular plant Microbe Interaction*, Vol.9, pp. 388-394, ISSN 0894-0282
- Wani, P.; Khan, M.S. & Zaidi, A. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance on field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol.170, pp. 283-287, ISSN 1522-2624
- Huang, W. (2007). Impact of Rising Natural Gas Prices on U.S. Ammonia Supply, access on August 30 2011, available from: www.ers.usda.gov/publications/WRS0702/wrs0702.pdf
- Xavier, I.; Holloway, G. & Leggett, M. (2004). Development of Rhizobial Inoculant Formulations, In: *Plant Management Network*, 14.01.2003, Available from <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/develop/>, Crop Manage. ISSN 1543-7833
- Yadegari, M.; Rahmani, H.A.; Noormohammadi, G. & Ayneband, A. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Nutrition*, Vol.33, pp. 733-1743, ISSN 0190-4167

- Yahalom, E.; Okon, Y. & Dovrat, A. (1987). *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 33, No. 6, pp. :510-514, ISSN 0008-4166
- Zhang, F.; Dashti, N.; Hynes, R. & Smith, D. (1996). Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany*, Vol. 77, pp. 453-459, ISSN 0305-7364
- Yasari, E.; Esmaili-Azadgoleh, A.M.; Pirdashti, H. & Mozafari, S. (2008). *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants as biofertilizers in Canola (*Brassica napus* L.) cultivation. *Asian Journal of Plant Sciences*, Vol. 7, No.5, pp.490-494, ISSN 1682-3974
- Zahran, H.H. (2009). Enhancement of Rhizobia-Legumes Symbioses and Nitrogen Fixation for Crops Productivity Improvement. In: *Microbial Strategies for Crop Improvement*, Khan, M.S.; Zaidi, A.; Musarrat, J. (Eds), 227-254, ISBN 9783642019784, Springer, Netherlands
- Zhang, F. & Smith, D. 2002. Interorganismal signaling in suboptimum environments: the legume-rhizobia symbiosis, In: *Advances in Agronomy*, Vol. 76, Spark, D. (Ed.), Elsevier, 125-161, ISBN 0-12-000794-0, U.S.

1.2. Moléculas involucradas en la interacción entre plantas y microorganismos

Los efectos que los microorganismos ejercen sobre las plantas son el resultado de un intercambio de señales en el cual se da el reconocimiento mutuo a través de algunas moléculas producidas tanto por los microorganismos como por la planta.

En el siguiente capítulo se discute sobre la relevancia de las moléculas secretadas durante una asociación beneficiosa para la planta, así como las funciones propuestas para esas moléculas y en especial su rol en las interacciones planta-microorganismo. La comprensión profunda de este sistema de señalización molecular puede sin duda ayudar a diseñar estrategias de mejoramiento de la productividad y sustentabilidad de los cultivos a nivel agrario.

Capítulo II. The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction

Morel M y Castro-Sowinski S. 2013. En: Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. N. Arora (ed.). Springer. 169-199p.

Chapter 6 The Complex Molecular Signaling Network in Microbe–Plant Interaction

María A. Morel and Susana Castro-Sowinski

Contents

Beneficial Rhizospheric Microbes	170
Rhizobia–Legume Symbiotic Association	171
<i>Azospirillum</i> –Plant Association	172
Other PGPR–Plant Interactions.....	173
Endophytes	173
<i>Pseudomonas</i>	173
<i>Delftia</i>	174
Early Signaling Events: The Role of Root Exudates	174
Phytohormones Production	176
Other Secondary Metabolites	179
Volatile Organic Compounds (VOCs).....	180
Phenolic Compounds.....	180
Quorum Sensing Responses	182
Extracellular Polysaccharides	183
PGPR and Plant Root Attachment	185
Proteins Involved in Rhizobia–Plant Interaction.....	186
Rhizobia–Legume Interaction Events	187
Concluding Remarks.....	190
Acknowledgements.....	191
References.....	191

M.A. Morel
Laboratory of Molecular Microbiology, Clemente Estable Institute
of Biological Research, Av. Italia 3318, CP 11600 Montevideo, Uruguay

S. Castro-Sowinski (✉)
Laboratory of Molecular Microbiology, Clemente Estable Institute
of Biological Research, Av. Italia 3318, CP 11600 Montevideo, Uruguay

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science,
University of the Republic, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay
e-mail: s.castro.sow@gmail.com; scs@fcien.edu.uy

N.K. Arora (ed.), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*,
DOI 10.1007/978-81-322-1287-4_6, © Springer India 2013

169

“El motivo no existe siempre para ser alcanzado, sino para servir de punto de mira.”

Joseph Joubert

OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Determinar las condiciones en las que se logra una mayor productividad vegetal de alfalfa y profundizar en el conocimiento de las bases bioquímicas y moleculares de la interacción entre alfalfa, *Delftia* sp. JD2 y *S. meliloti* U143.

2.2. Objetivos específicos

- I. Evaluar la respuesta de las plantas de alfalfa a la presencia de JD2 en la rizosfera
- II. Evaluar el potencial de la co-inoculación con U143 y JD2 para mejorar el crecimiento de alfalfa
- III. Identificar moléculas señal secretadas durante la interacción alfalfa-rizobio-*Delftia*
- IV. Evaluar la respuesta de las plantas frente al agregado del cóctel de señales en forma de riego
- V. Analizar el genoma de JD2 en búsqueda de funciones relacionadas con su fenotipo conocido

*“Planear: preocuparse por encontrar el
mejor método para lograr un resultado
accidental”*

Ambrose Bierce

METODOLOGIA

3.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y modelo vegetal

3.1.1. Bacterias utilizadas

Las cepas bacterianas utilizadas durante este trabajo fueron:

- *Delftia* sp. JD2, aislamiento nativo obtenido de un suelo contaminado con Cr(VI). JD2 es una bacteria productora de sideróforos y ácido 3-indol-acético (AIA), capaz de fijar nitrógeno en vida libre y de promover la asociación entre plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) o trébol (*Trifolium repens*) y sus rizobios nodulantes (Ubalde et al 2012; Morel et al 2011; Morel 2010);
- *Sinorhizobium meliloti* U143, fijador de nitrógeno en asociación simbiótica con alfalfa. Se utiliza para la producción del inoculante comercial nacional (Castro-Sowinski et al 2002).

Ambas bacterias se crecieron en medio rico TY (Anexo I) a 30°C y en agitación (200 rpm).

Se utilizaron además otras bacterias como controles positivos y negativos de las diferentes propiedades evaluadas a lo largo del trabajo. Las mismas se indican en cada sección, según corresponda.

Se corroboró el crecimiento bacteriano mediante medidas de turbidez a 620nm (0,05 unidades de absorbancia corresponderían a 10^8 UFC/mL). Los microorganismos se almacenaron en glicerol al 20% a -80°C.

3.1.2. Modelo vegetal

Como modelo vegetal se utilizaron plantas de alfalfa, *Medicago sativa* cultivar Crioula.

Desinfección superficial de semillas.- Se examinaron distintos tratamientos de esterilización superficial de las semillas de alfalfa utilizando tres agentes desinfectantes: cloruro de mercurio ($HgCl_2$), hipoclorito de sodio (NaClO) y etanol.

La estrategia consistió en variar el tiempo de contacto entre el agente desinfectante y las semillas y, en el caso del NaClO, también la concentración del mismo. Se seleccionó el tratamiento que garantizara la esterilidad de las semillas, sin comprometer la viabilidad de las mismas.

En todos los casos, las semillas (25 a 100) se lavaron con agua destilada estéril y se incubaron en los distintos agentes desinfectantes durante diferentes períodos de tiempo en agitación, tal como se muestra en el Cuadro 3.1. A continuación, las semillas se lavaron cuatro veces sucesivas con abundante agua estéril y se dejaron en reposo en agua estéril por 15-20 min. El ensayo se realizó al menos tres veces. Los tratamientos de desinfección con HgCl_2 siempre contaron con un tratamiento previo con etanol 70%.

Cuadro 3.1. Tratamientos de desinfección superficial de semillas de alfalfa evaluados.

Tratamiento de incubación	
1	Sin desinfección
2	Etanol 70% (2 min)
3	Etanol 70% (2 min) seguido de HgCl_2 0,2% (5 min)
4	Etanol 70%, 7 min
5	Etanol 70% (30 min) seguido de HgCl_2 0,2% (5 min)
6	Etanol 70% (30 min)
7	Toda la noche (16 hs) en etanol 70%
8	NaClO 5% (30 min)
9	NaClO 10% (15 min)
10	NaClO 20% (15 min)
11	NaClO 20% (30 min)
12	NaClO 100% (15 min)

Una vez desinfectadas, las semillas se dejaron pre-germinar en placas de petri con agar-agua (0,8%) a 30°C, en oscuridad. Se evaluó el número de semillas germinadas en función del tiempo.

Se seleccionó el método de desinfección que permitió el mayor porcentaje de germinación de semillas luego de 24-48 h de incubación, sin desarrollo de crecimiento microbiano sobre las placas de agar-agua.

Ensayos en plantas.- Durante toda la tesis, se llevaron a cabo experimentos de inoculación y co-inoculación de alfalfa con los dos aislamientos bacterianos, en tres condiciones experimentales:

- *Hidropónicas*, en frascos con medio mineral líquido
- *Gnotobióticas*, en tubos con medio mineral semi sólido como sustrato

- *Invernáculo*, en macetas con sustrato sólido (tierra, vermiculita, arena)

3.1.3. Ensayos en hidroponía

Con el fin de establecer una forma de crecimiento vegetal en hidroponía que permitiera obtener las moléculas exudadas por las raíces y las bacterias, se implementó el siguiente sistema de hidroponía:

- Se utilizaron frascos de vidrio transparentes, con tapa también transparente.
- Para el sostén de las semillas de alfalfa se utilizaron mallas de acero inoxidable.
- Debido al pequeño tamaño de las semillas (en relación a la malla de acero) y para mantenerlas hidratadas, los soportes de acero se cubrieron con gasa, lugar donde se depositan las semillas.

El sistema tripartito (frasco, acero y gasa) (Fig. 4.1) se esterilizó en autoclave, conteniendo ya la solución nutritiva.

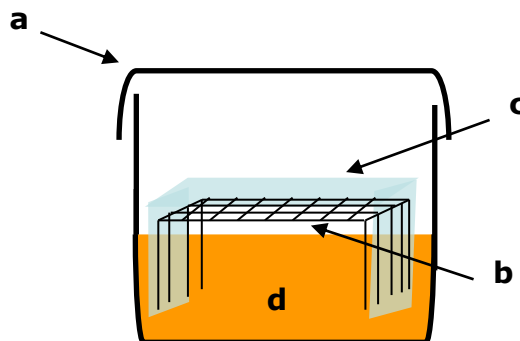


Figura 3.1. Representación gráfica del sistema de hidroponía desarrollado. a. Frasco estéril transparente; b. soporte de acero inoxidable (malla en red); c. gasa; d. medio mineral.

Selección de la solución nutritiva mineral para hidroponía. - Las semillas desinfectadas (ver punto 3.1.2) se transfirieron a los sistemas de hidroponía, en una relación aproximada de 10-14 semillas de alfalfa por cada mL de medio de hidroponía. Los frascos se incubaron durante cuatro días en cuarto de plantas a 20°C, bajo un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Para la iluminación se utilizaron los tubos Sylvania F36W/GRO Gro-Lux®.

Se evaluó el crecimiento de las plantas de alfalfa en las siguientes soluciones minerales nutritivas: Jensen (Vincent 1970); Murashige y Skoog (Murashige y Skoog 1962); Howieson

(Howieson 1993) y Hoagland (modificada por Johnson et al 1957). Las dos últimas soluciones se evaluaron también diluidas al décimo. La composición de estas soluciones se detalla en el Anexo I. Se seleccionó el medio donde las plantas mostraron mayor desarrollo vegetal y contenido de clorofila (Chl).

Inoculación de plántulas.- Las plantas de alfalfa se inocularon en estado de plántulas (cuatro días después de su esterilización y transferencia a los frascos de hidroponia). Los soportes de acero, conteniendo las plántulas, se transfirieron en forma aséptica a frascos de hidroponia conteniendo nuevo medio nutritivo mineral y se inocularon con suspensiones bacterianas previamente lavadas y suspendidas en buffer fosfato 50 mM, pH 7. El rizobio *S. meliloti* U143 se inoculó en una concentración de 10^7 UFC/mL de solución mineral. En el caso de *Delftia* sp. JD2, se utilizó la concentración óptima determinada en el punto 3.3.1. Los tratamientos realizados se muestran en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Ensayos de hidroponia destinados a la colecta de los líquidos y de las plantas para las futuras determinaciones. El nitrógeno (N) se suministró en forma de KNO_3 0,05% (c.f.).

Tratamiento	
Control	Sin inoculación y sin fertilización
Control N	Sin inoculación y fertilización con N
<i>S. meliloti</i> U143	Inoculación con U143
<i>Delftia</i> sp. JD2	Inoculación con JD2
Co-inoculación	Co-inoculación con rizobio y JD2

Colecta de solución de hidroponia y de plantas.- Luego de cuatro, siete y 15 días desde la inoculación, se tomaron las soluciones de hidroponia y se colectaron las plantas.

Las muestras de líquidos de hidroponia se centrifugaron para remover restos de raíces y microorganismos y se filtraron por membranas de $0,45 \mu\text{m}$. Una fracción de los líquidos colectados a los cuatro días se destinó a los ensayos de “Mejoramiento de la productividad vegetal” (ver punto 3.3) para lo cual se filtraron una segunda vez por membranas de $0,2 \mu\text{m}$ para asegurar su esterilidad. Los restantes líquidos se concentraron por liofilización y se almacenaron a -20°C hasta su uso en los diferentes ensayos.

Las plantas obtenidas se lavaron en agua destilada. Algunas plantas se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su uso en diferentes determinaciones analíticas; otras se

utilizaron para cuantificar el crecimiento vegetal; y por último, una tercer fracción de plantas se destinó al estudio de colonización radicular por microscopía.

La Fig. 3.2 muestra el destino final tanto de las plantas como de las soluciones de hidroponía colectadas a los diferentes tiempos. Las determinaciones realizadas en ellas se detallarán en los siguientes apartados.

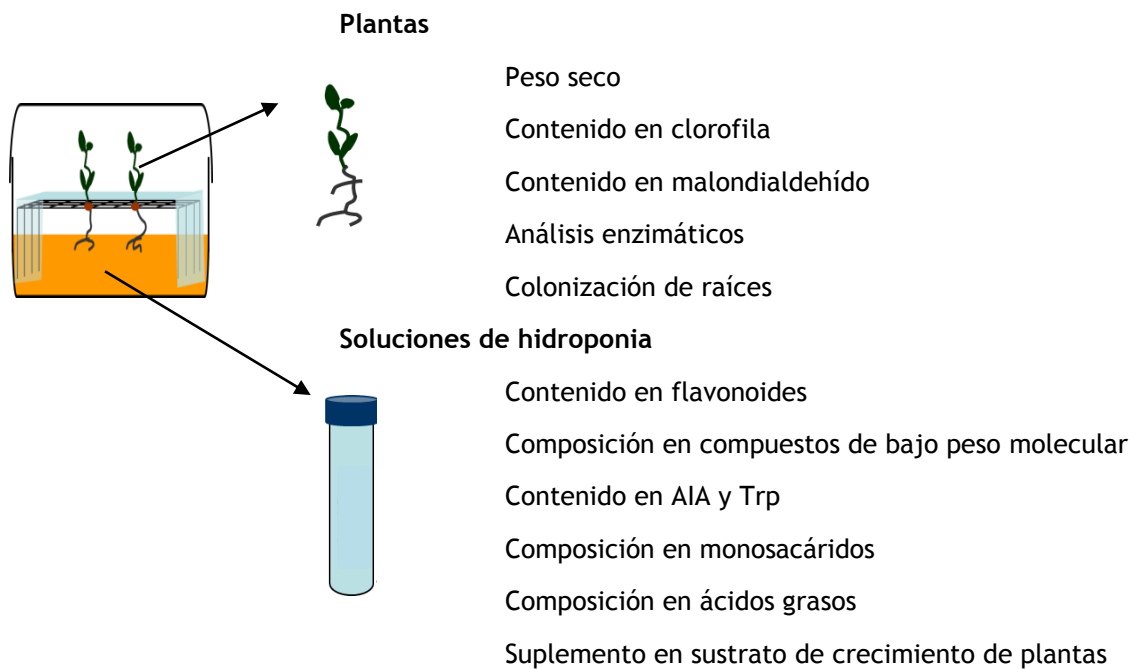


Figura 3.2. Producción y colecta de los líquidos hidropónicos y las plantas de alfalfa. Se muestra el destino de los mismos.

Para el resto de la tesis se distinguirán los líquidos hidropónicos libres de células como:

- 1) **exudados radiculares**, aquellos líquidos de hidroponía obtenidos del tratamiento de plantas control sin inocular. Estos contienen los exudados de raíces de alfalfa.
- 2) **exudados radiculares-rizobianos**, aquellos líquidos hidropónicos obtenidos del tratamiento de plantas inoculadas con U143. Contienen el conjunto de sustancias secretadas por los rizobios y las raíces.
- 3) **exudados rizo-bacterianos (JD2)**, aquellos líquidos hidropónicos obtenidos del tratamiento de plantas inoculadas únicamente con JD2. Contienen el conjunto de moléculas secretadas por las raíces y JD2 hacia el medio de hidroponía

4) *exudados rizo-bacterianos (U143 y JD2)*, aquellos líquidos hidropónicos obtenidos del tratamiento de plantas co-inoculadas con U143 y JD2. Contiene el conjunto de secreciones de U143, JD2 y raíces de alfalfa acumuladas durante el crecimiento en hidroponía.

3.2. Respuesta de la planta a la colonización bacteriana

Como ya se mencionó, una fracción de las plantas obtenidas en los ensayos de hidroponía se utilizó para evaluar la respuesta de la planta a la infección bacteriana.

3.2.1. Colonización de las raíces

Se transformaron células de *Delftia* sp. JD2 con el plásmido pMP4655, portador del gen de resistencia a tetraciclina (Tc) y del gen *gfp*, codificante de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*; Bloemberg et al 2000). El plásmido se propagó, mantuvo y purificó desde *Escherichia coli* DH5 α crecida en medio LB (Anexo I). Se emplearon procedimientos de rutina para la manipulación, purificación del ADN plasmídico y chequeo por restricción (Sambrook et al 1989).

Preparación y transformación de células competentes.- Las células competentes de *Delftia* sp. JD2 se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Ferri et al (2010). Para ello, las células se crecieron hasta fase exponencial tardía en medio TY, se centrifugaron (8000 rpm, 4°C, 10 min), el *pellet* celular se lavó dos veces con agua destilada estéril y luego con glicerol frío al 10%. Finalmente, las células se suspendieron en glicerol al 10% y se mantuvieron a -80°C. Para la electroporación, se utilizaron 110 μ l de células y 5 μ l de la preparación del plásmido, en cubeta de electroporación (0,1 cm) y aparato MicroPulser™ (Biorad). Para la recuperación de transformantes, las células se crecieron en 1 mL de medio TY, a 30°C (200 rpm) por 4 h y finalmente se sembraron diluciones seriadas del cultivo en medio TY suplementado con Tc 40 μ g/mL e incubaron a 30 °C. Las bacterias portadoras del plásmido con la *gfp* se examinaron utilizando un microscopio invertido equipado con detección epifluorescente (Olympus IX81) y filtro dicróico (UMWIB3) acorde a la eGFP (excitación 470/25-nm, emisión 510-nm).

Experimentos de colonización radicular.- Se inocularon y co-inocularon plantas de alfalfa en sistema de hidroponía, en las mismas condiciones descritas en el punto 3.1.3. Se utilizó *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 transformada con el plásmido pMP4655.

Las raíces de alfalfa, inoculada con la *Delftia* sp. JD2 capaz de expresar GFP, se colectaron desde el sistema de hidroponía a los cuatro, siete y 15 días post-inoculación, se lavaron en buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) para remover partículas adheridas a las raíces y se montaron en PBS sobre portaobjetos. Las muestras se

examinaron por microscopía de epifluorescencia en las mismas condiciones anteriormente descritas.

3.2.2. Determinación de malondialdehído, clorofila y actividades enzimáticas

Se colectó el material vegetal producido en condiciones de hidroponia a los cuatro días de la inoculación de las plantas, tomando por separado la parte radicular de la aérea. Estas se lavaron con agua para eliminar residuos, se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su utilización.

El material vegetal se homogeneizó por macerado (con arena estéril), manteniendo una relación material vegetal: solución de extracción de 1:10 (p/v). Como soluciones de extracción se utilizaron:

- ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*) preparado al 20% (p/v) para la extracción de malondialdehído (MDA)
- buffer acetato de sodio 50mM pH 5,6 para el análisis de las diferentes actividades enzimáticas
- acetona al 80% (preparada en agua destilada), para extraer Chl a partir de hojas verdes

Los homogeneizados se centrifugaron a 10000g durante 15min a 4°C y los extractos se almacenaron a -20°C por un máximo de dos semanas.

Se realizaron tres experimentos de hidroponia. En cada caso, se efectuaron tres extracciones (tres plantas) para cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado para cada actividad enzimática y para MDA.

Previo a las determinaciones de las actividades enzimáticas (glucanasas, glucosaminidasas y peroxidasas) los extractos vegetales se gel-filtraron para eliminar sales, utilizando columnas PD-10 (matriz de Sephadex G-25; GE Healthcare). Los extractos se recuperaron con buffer de elusión acetato de sodio 50 mM pH 5,3.

Cuantificación de malondialdehído (MDA).- La determinación se realizó según el método descrito por Heath y Packer (1968), midiendo las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA, del inglés *tiobarbituric acid*). Este método está basado en la reacción

del TBA con el grupo aldehído del MDA. La reacción del TBA con el MDA forma un producto cromóforo rosado con un máximo de absorción a 532 nm.

Se agregó al homogeneizado un volumen del reactivo de determinación (TBA al 0,5% p/v, preparado en TCA al 20%). Los tubos se agitaron vigorosamente y se calentaron a baño maría a 95°C durante 25 min, en oscuridad. La reacción se detuvo enfriando los tubos en hielo durante 5-10 min. Luego de una centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4°C, se midió la absorbancia (Abs) del sobrenadante a 532 nm, sustrayendo la Abs producida por turbidez a 600 nm.

La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones conocidas de MDA (0-20 μM). El contenido de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y se expresó en μmoles de MDA/g de material vegetal fresco.

Determinación de la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa.- Se determinó la actividad quitinasa mediante el ensayo colorimétrico descrito por Frandberg y Schnurer (1994), utilizando al p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (pNP-GlcNAc; SIGMA) como sustrato enzimático. La actividad se analizó a través de la liberación de nitrofenol (NF) del pNP-GlcNAc, que actúa como sustrato dimérico cromogénico, con el grupo nitrofenol como monómero.

La mezcla de reacción contenía 10 μl de extracto vegetal y 90 μl de solución de pNP-GlcNAc (0,2 mM en buffer acetato 50mM pH 5,6). Se incubó la mezcla durante 30 min a 40°C y la reacción se detuvo con el agregado de 10 μl de NaOH 1M, llegando a un pH final de 12,6. Se midió la absorbancia del NF liberado a 405 nm (en Varioskan).

Se realizó una curva patrón de NF (0,01 a 0,1 mg/mL). Se realizaron tres repeticiones independientes por tratamiento y tres réplicas por cada ensayo.

Se definió una unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 ng de p-NF por minuto, en las condiciones de reacción. La actividad enzimática se expresó como UE/mg de material vegetal liofilizado.

Determinación de la actividad glucanasa.- La actividad de β -1,3 glucanasa se determinó usando el ensayo descrito por Abeles y Forrence (1970), utilizando laminarina como sustrato (de *Laminaria digitata*; SIGMA). La laminarina se consume debido a la actividad laminarinasa (endo- β -1,3-glucanasa) produciendo β -1,3-glucanos. Estos glucanos son azúcares reductores que reacciona con agentes oxidantes, tales como el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). El producto de reducción del DNS, en presencia de calor, presenta

coloración amarillo café, cuya Abs puede ser determinada por espectrofotometría a 540 nm.

La mezcla de reacción conteniendo 63 µl de extracto vegetal y 63 µl de laminarina al 1% (10 mg/ml en buffer acetato 50mM, pH 4,8) se incubó durante 1 h a 37°C. Luego de agregar 125 µl de DNS (Anexo I) se incubó por 5 min a 100°C y se dejó enfriar. Finalmente, se agregó 940 µl de agua destilada y se midió la Abs a 540 nm.

Se realizaron tres repeticiones independientes por tratamiento y tres réplicas por muestra en cada ensayo.

Se realizó una curva patrón utilizando glucosa como estándar (0-4mg/mL). Se definió una unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 ng de azúcares reductores en equivalentes de glucosa, en las condiciones de reacción. La actividad enzimática se expresó como UE/mg de material vegetal liofilizado.

Determinación de la actividad peroxidasa.- La actividad peroxidasa se cuantificó mediante el método de Shannon et al (1966) con algunas modificaciones, utilizando o-dianisidina dihidroclorada (SIGMA) como sustrato.

La mezcla de reacción contenía 100 µl de extracto vegetal, 50 µl de o-dianisidina 0,5% (preparada en metanol), 100 µl de H₂O₂ 10 mM y 2,75 ml de buffer acetato 50mM pH 4,8. La aparición del producto de la oxidación de la o-dianisidina se siguió a 460 nm durante 2 min.

El control de reacción se realizó utilizando 100 µl de buffer acetato 50mM pH 4,8 en lugar de extracto vegetal. Se realizaron tres repeticiones independientes por tratamiento y tres réplicas por ensayo.

Se definió una unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 µmol de o-dianisidina por minuto en las condiciones de reacción. La actividad enzimática se expresó como UE/mg de material vegetal liofilizado.

Cuantificación de clorofila (Chl).- La concentración de clorofila se utiliza para estimar la biomasa vegetal en forma indirecta y como la misma cambia frente al estrés.

Su cuantificación se realizó directamente sobre los extractos verdes obtenidos en acetona al 80% (relación material vegetal:acetona de 1:10, p/v, tal como se describió al comienzo de la sección), midiendo la Abs. a 663 y 647 nm para clorofila a (Chla) y b (Chlb),

respectivamente. Debido a que el espectro de absorción de ambas Chls se superponen, se utilizó las *ecuaciones de Arnon* (Arnon 1949) para determinar la cantidad de ambos pigmentos:

$$chla = 12,25 \cdot Abs\ 663nm - 2,79 \cdot Abs\ 647nm$$

$$chlb = 21,15 \cdot Abs647nm - 5,1 \cdot Abs663\ nm$$

Los contenidos de Chla y Chlb se calcularon utilizando ambas ecuaciones y se expresaron en mg de Chl/mg de material vegetal.

3.3. Mejoramiento de la productividad vegetal

3.3.1. Ensayos de plantas *in vitro*

1. Determinación de la relación rizobio-JD2

Con el objetivo de encontrar la relación óptima de células necesarias para obtener el mayor crecimiento de alfalfa, se llevaron a cabo experimentos de inoculación y co-inoculación con el rizobio U143 y JD2, en condiciones gnotobióticas, en tubos conteniendo medio mineral semisólido.

Pre-germinación y siembra de semillas.- Las semillas se desinfectaron superficialmente con NaClO al 20% durante 15 min y se pre-germinaron en agar-agua tal cual se indicó en el punto 3.1.2. Las semillas pre-germinadas se transplantaron a tubos (20 x 2,2 cm) de vidrio conteniendo 20 mL de medio Jensen semi-sólido (Vincent, 1970, Anexo I), a razón de dos semillas por tubo. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas indicadas en el punto 3.1.3.

Inoculación de plantas.- La estrategia de trabajo consistió en mantener una concentración fija del rizobio (10^7 células por semilla) y utilizar dos concentraciones de JD2.

La inoculación se realizó en el estado de plántulas (5-6 días después de la transferencia a los tubos), con suspensiones bacterianas frescas, lavadas y resuspendidas en buffer fosfato 50 mM, pH 7. Las concentraciones utilizadas para el inóculo de JD2 fueron de 10^4 y 10^6 células por plántula. Se utilizó como control positivo a *Azospirillum brasilense* Sp7 (10^4 y 10^6 células por semilla). El Cuadro 3.3. muestra los diferentes tratamientos realizados, incluyendo los controles sin inocular, con y sin el agregado de N en forma de KNO_3 (c.f. 0,05%).

Cuadro 3.3. Tratamientos de inoculación y co-inoculación. Se indican los tratamientos Control sin fertilización nitrogenada y fertilizados con N (+). El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05%, p/v, c.f.) al inicio.

Tratamiento de inoculación	N	Número de células por semilla
Control	-	0
Control (+)	+	0
<i>S. meliloti</i> U143	-	1×10^7
<i>Delftia</i> sp. JD2	-	1×10^4
	-	1×10^6
	+	1×10^4
	+	1×10^6
<i>A. brasilense</i> Sp7	-	1×10^4
	-	1×10^6
	+	1×10^4
	+	1×10^6
Co-inoculación U143 y JD2	-	1×10^7 de U143 y 1×10^4 de JD2
	-	1×10^7 de U143 y 1×10^6 de JD2
Co-inoculación U143 y Sp7	-	1×10^7 de U143 y 1×10^4 de Sp7
	-	1×10^7 de U143 y 1×10^6 de Sp7

El ensayo se realizó al menos tres veces con 12-15 tubos por tratamiento (24-30 plantas).

Luego de 30 días de crecimiento se determinó el peso seco (PS) de parte aérea (PA) de las plantas mediante secado a 60°C hasta peso constante. Además, se determinó el número de nódulos activos (rosados) presentes en aquellas plantas inoculadas y/o co-inoculadas, y se realizaron curvas de cinética de nodulación.

Finalmente, para los siguientes ensayos se seleccionó la concentración de células de JD2 que garantizó el mayor efecto promotor del crecimiento de las plantas en condiciones de co-inoculación, en función del PS aéreo.

II. Evaluación del crecimiento vegetal y cinética de nodulación en presencia de exudados rizo-bacterianos

Se evaluó el efecto del agregado de diferentes exudados (2,5 mL) en forma de riego sobre el crecimiento vegetal (ver punto 3.1.3.). Los mismos se detallan en el Cuadro 3.4. Las semillas de alfalfa se desinfectaron, germinaron, transfirieron a los tubos de vidrio conteniendo Jensen semisólido y exudados, y se inocularon tal cual se describió en el punto anterior.

Cuadro 3.4. Condiciones de agregado (riego pre-siembra) de líquidos hidropónicos, utilizadas durante los ensayos de plantas *in vitro*.

	Descripción del contenido del líquido hidropónico
<i>Exudados radiculares-rizobianos</i>	Exudados producidos por U143 y alfalfa
<i>Exudados rizo-bacterianos (U143 y JD2)</i>	Exudados producidos por JD2, U143 y alfalfa
<i>Exudados radiculares</i>	Exudados producidos por alfalfa sin inocular
<i>Control</i>	Medio salino

Los tratamientos de inoculación se detallan en el Cuadro 3.5. Cada tratamiento se realizó en cada una de las cuatro condiciones indicadas en el Cuadro 3.4, constando en cada caso, de 14 tubos (28 plantas) por tratamiento. Las plantas se crecieron en condiciones controladas e indicadas en el punto 3.1.3.

Cuadro 3.5. Tratamientos de inoculación realizados durante los ensayos *in vitro*. El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05%, p/v, c.f.).

Tratamiento	Descripción
Control	Sin inoculación y sin fertilización
Control (+)	Sin inoculación y fertilización con N
U143	Inoculación con rizobio y sin fertilización
JD2	Inoculación con JD2 y sin fertilización
Co-inoculación	Co-inoculación con rizobio y JD2

Se contabilizó diariamente el número de nódulos por planta y se realizaron curvas de cinética de nodulación (número de nódulos por planta en función de los días post-inoculación). Finalmente, a los 30 días desde la inoculación se cortó la parte aérea (PA) de las plantas, y se determinó su peso fresco (PF). Para determinar el peso seco (PS), las PA de las plantas se secaron a 60°C hasta peso constante.

3.3.2. Ensayos de plantas en invernáculo

1. Evaluación del crecimiento vegetal en condiciones de co-inoculación

Con el fin de evaluar la respuesta de las plantas a la co-inoculación, se llevaron a cabo experimentos con semillas de alfalfa, en macetas e invernáculo, como paso intermedio entre las condiciones controladas del cuarto de plantas y las condiciones directas de campo (ensayos no realizados durante esta tesis).

Desinfección superficial de semillas, siembra y condiciones de crecimiento.- Las semillas se desinfectaron superficialmente con NaClO al 20% durante 15 min según se indicó en el punto 3.1.2.

Se utilizaron macetas de 1 kg contiendo una mezcla de suelo: arena: vermiculita (2:2:1). Antes de la siembra, las macetas se regaron con agua hasta la capacidad de campo. Se sembraron cinco semillas por maceta, y a los 10 días se ralearon dos plantas, dejando tres plantas por maceta. El raleo se realizó considerando el estado general de la planta (mejor estado de desarrollo). Cada tratamiento contó con cinco a siete macetas.

Inoculación de semillas.- La inoculación y co-inoculación se realizó directamente sobre las semillas desinfectadas y al momento de la siembra. Los tratamientos realizados se detallan en el Cuadro 3.6. Las semillas se inocularon con 100 µl de suspensiones bacterianas lavadas y suspendidas en buffer fosfato 50 mM, pH 7 por semilla. *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 se inocularon en concentraciones de 10⁷ y 10⁶ células por semilla (determinada en los ensayos gnotobióticos descritos en el punto 3.3.1), respectivamente.

Se evaluó también la capacidad de *Delftia* sp. JD2 de promover el crecimiento de las plantas en presencia de una dosis inicial de N (diN). Este tratamiento se realizó por dos motivos: para confirmar si JD2 es capaz de promover el crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de baja fertilización nitrogenada y para inhibir la formación de nódulos y FBN por rizobios que pudieran estar presentes en el sustrato no estéril de crecimiento.

Cuadro 3.6. Tratamientos realizados durante los ensayos de invernáculo. El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05% p/v; c.f.).

Tratamiento	
Control	Sin inoculación y sin fertilización
Control (+)	Sin inoculación y fertilización con N
Control (diN)	Sin inoculación y una diN
Inoculación con <i>S. meliloti</i> U143	Inoculación con rizobio y sin fertilización
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2	Inoculación con JD2 y sin fertilización
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 (+)	Inoculación con JD2 y fertilización con N
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 (diN)	Inoculación con JD2 y una diN
Co-inoculación	Co-inoculación con rizobio y JD2

Crecimiento de las plantas.- Las plantas se crecieron en invernáculo, durante 50 días, con riegos alternados (250 mL) cada cinco a siete días con hiperfosfato (1g/kg de sustrato; c.f.), medio nutritivo Jensen (diez veces diluido, c.f.) y agua. En el caso de los tratamientos nitrogenados, las plantas recibieron KNO_3 (0,05% p/v, c.f.) en lugar de agua. El ensayo se realizó tres veces con siete macetas por tratamiento. Se realizó un diseño completamente al azar.

Al momento de la cosecha se cortó la parte aérea (PA) de las plantas y se midió en ellas la longitud (cm) del tallo. Se determinaron los pesos fresco (PF) y seco (PS) de PA y radicular (PR).

II. Evaluación del crecimiento vegetal en condiciones de co-inoculación en presencia de exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)

Con el fin de evaluar la respuesta de las plantas a la presencia de *exudados rizo-bacterianos (U143 y JD2)* en el sustrato de crecimiento, se llevaron a cabo experimentos en condiciones de invernáculo, según se describe en el punto anterior.

El día previo a la siembra, la mitad de las macetas recibieron un riego inicial de 100 mL de *exudados rizo-bacterianos (U143 y JD2)* colectados a los cuatro días de la co-inoculación (ver punto 3.1.3), mientras que las restantes se regaron con agua.

Los tratamientos de inoculación fueron: 1) control (sin inocular); 2) control (+), plantas fertilizadas con N, sin inocular; 3) inoculación con U143; 4) inoculación con JD2 y 5) co-inoculación con U143 y JD2. Cada tratamiento constó de seis macetas.

Las condiciones de siembra, raleo, crecimiento de plantas, riego y toma de muestras de plantas fueron idénticas a las descritas en el punto anterior.

3.4. Moléculas involucradas en la interacción temprana planta-microorganismos

La presencia de diferentes moléculas en los líquidos (exudados) de hidroponia, colectados a los cuatro, siete y 15 días post-inoculación se realizó utilizando diferentes métodos cromatográficos. Los exudados concentrados por liofilización se suspendieron en agua para HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) y se fraccionaron en dos partes. Se destinó una fracción para la determinación de ácidos grasos y azúcares por cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) acoplada a detector de ionización de llama (FID, del inglés *flame ionization detector*), para lo que, previamente, se filtró por membranas de 0,2 µm. La otra fracción se destinó para la determinación de flavonoides, AIA y triptófano (Trp) por cromatografía líquida (LC, del inglés *Liquid Chromatography*) acoplada a espectrómetro de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) y compuestos de bajo peso molecular (CBPM) por GC/MS. La metodología de cada análisis cromatográfico se describe a continuación.

3.4.1. Composición en flavonoides

La composición de flavonoides se determinó por LC/MS (Perkin Elmer Series 200, Wellesley, USA) con analizador híbrido cuadrupolo-trampa iónica (QTRAP LC/MS/MS, Applied Biosystems, Foster City, USA) e interfase de ionización por electro-spray (ESI), según Dardanelli et al (2008). Esta actividad se realizó en el Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Físicas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Para las determinaciones, se inyectó 20 µL de cada muestra o estándar. Se utilizó la columna C18 en fase reversa Tracer Spherisorb ODS2 C18 de 5 µm (250 x 2,1 mm; Teknokroma, Barcelona, Spain) y una tasa de flujo de 0,3 mL por min.

El triple cuadrupolo se operó en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM, del inglés *Multiple reaction monitoring*). El Cuadro 3.7. muestra los flavonoides utilizados como estándares para generar el catálogo de transiciones MRM (Q1/Q3, donde Q es cuadrupolo) y el sub-grupo de flavonoides al que pertenece cada uno.

Cuadro 3.7. Transiciones MRM de los flavonoides utilizados como estándares.

Flavonoide	MRM	Sub-grupo
Daidzeina	253.0/133.0	Isoflavona
Genisteina	269.0/133.0	Isoflavona
Crisina	253.0/119.0	Flavona
Apigenina	269.0/117.0	Flavona
Naringenina	271.0/119.0	Flavanona
Naringina	271.0/119.0	Flavanona
Luteolina	285.0/133.0	Flavona
Morina	301.0/125.0	Flavonol

3.4.2. Determinación de AIA y Trp

La producción de AIA y Trp se determinó por LC/MS (Perkin Elmer Series 200, Wellesley, USA, con analizador híbrido cuadrupolo-trampa iónica, QTRAP LC/MS/MS, Applied Biosystems, Foster City, USA e interfase de ionización por electro-spray, ESI). La columna C18 en fase reversa utilizada fue una Tracer Spherisorb ODS2 C18 de 5 µm (250 x 2,1 mm; Teknokroma, Barcelona, Spain). Esta actividad se realizó en el Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Físicas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. Las condiciones de flujo y de inyección de las muestras, y de AIA y Trp (como estándares) fueron idénticas a las utilizadas en el punto anterior (3.4.1).

3.4.3. Composición relativa en monosacáridos

La extracción de los azúcares de las muestras se realizó en metanol (80%) a 60°C durante 10 min. Para ello se agregó 750 µl de metanol al 80% por cada ml de muestra. Luego de la incubación, se centrifugaron las mezclas a velocidad máxima y se colectó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces sobre el *pellet* obtenido y se juntaron los sobrenadantes. La derivatización de los azúcares se produjo por la formación de éteres, utilizando hexametildisilazano (HMDS) como fuente de grupos trimetilsiléteres y dimetilformamida (DMF) como disolvente acelerador de la reacción. Para ello, los sobrenadantes conteniendo los azúcares se secaron al vacío, se suspendieron en 100 µl de DMF y se incubaron a 70°C durante 30 min. Finalmente la derivatización se realizó en 100 µl de HMDS durante 1 h a temperatura ambiente.

Las muestras derivatizadas se inyectaron (2-10 µl) manualmente en GC/FID (Hewlett Packard 5890 Serie II). La temperatura inicial del horno fue de 190°C. El programa de aumento de temperatura a lo largo de los análisis se muestra en el Cuadro 3.8. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama fueron 250°C y 300°C, respectivamente. Se utilizaron como estándares de monosacáridos las azúcares: arabinosa, celobiosa, fructosa, fucosa, galactosa, glucosa, manosa, ramnosa y ribosa, preparadas en agua calidad HPLC.

3.4.4. Composición relativa en ácidos grasos

La extracción de ácidos grasos de los exudados se realizó según el método descrito por Bligh y Dyer (1959). Las muestras de exudados filtrados (0,6 mL) se homogeneizaron en 3,7 mL de cloroformo-metanol (1:2), durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego de una centrifugación a velocidad máxima durante 20 min, se separó el sobrenadante monofásico y se repitió la extracción sobre el *pellet*. Se juntaron los sobrenadantes monofásicos de las dos extracciones y se mezclaron con 2,5 y 2 mL de cloroformo y KCl 0,1 M, por mL de muestra, respectivamente. Esta última solución salina mantiene protonados a los lípidos de carácter ácidos de forma tal que estos queden en la fase de cloroformo durante la extracción. Luego de una incubación toda la noche a 4°C, se obtienen dos fases, una orgánica en el fondo de los tubos y una fase polar superior. Se separó la fase orgánica, donde se encuentra la fracción lipídica y se secó con N₂ gaseoso en campana de extracción. La derivatización de los ácidos grasos se produjo por metilación, utilizando metanol como agente metilante y trifluoruro de boro como catalizador de la reacción. Para la metilación, los residuos acídicos se suspendieron en 0,7 mL de trifluoruro de boro (en metanol 20%) y 0,3 mL de metanol y se incubaron durante 1 h a 40 °C. A continuación, se extrajeron los ácidos grasos metilados con 1 y 2 mL de hexano y agua respectivamente. Se tomó la fase superior lípidos-hexano y se repitió dos veces la extracción con hexano sobre la fase acuosa. Por último, se secó el hexano con N₂ gas y los residuos de metil-éster de ácidos grasos se almacenaron a 4°C. Antes de la inyección, los ácidos metil-ésteres se suspendieron en hexano (50-100 µl).

Las muestras derivatizadas (2-10 µl) se inyectaron manualmente en GC/FID (Hewlett Packard 5890 Serie II). La temperatura inicial del horno fue de 190°C. El programa de aumento de temperatura a lo largo de los análisis se muestra en el Cuadro 3.8. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama fueron 250°C y 300°C, respectivamente. Como estándares de ácidos grasos se utilizó: palmitoleico, palmítico,

oleico, esteárico, eicosenoico, lignocérico y araquírico derivatizados de igual forma que las muestras.

Cuadro 3.8. Temperatura (Temp) del horno (°C) y tiempos (min) utilizados en los análisis de azúcares y ácidos grasos.

Etapa	Aumento (°C/min)	Temp final	Mantenimiento de temp final (min)	Tiempo de análisis
Análisis de azúcares simples				
Inicial		190	4	4
Rampa 1	15	250	32	40
Rampa 2	0			
Análisis de metil-ésteres de ácidos grasos				
Inicial		180	25	25
Rampa 1	3	250	12	60,33
Rampa 2	0			

3.4.5. Composición relativa en compuestos de bajo peso molecular

Previo a la determinación de los compuestos de bajo peso molecular (CBPM), se precipitaron, en frío (-20°C) por 24 h, las proteínas y azúcares presentes en los exudados, utilizando como solvente una mezcla de acetona-etanol (1:1), y manteniendo una relación muestra:solvente de 1:4. Luego de una centrifugación (10000 rpm, 4°C, 15 min), se obtuvo el sobrenadante (libre de la mayor parte de proteínas y azúcares) que se secó bajo N gaseoso.

Para la derivatización, los residuos secos se resuspendieron en 50 µl de acetonitrilo. La derivatización se realizó mediante sililación utilizando 50 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA; Sigma-Aldrich), tal como se describe en Serandour et al (2008). La reacción se llevó a cabo a 70°C por 20 min, seguido de incubación a temperatura ambiente por al menos 2 h. Luego de una centrifugación (10 min, 14000g) las muestras estuvieron listas para su inyección en el GC/MS. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en GC/MS-QP 2010 ULTRA (Shimadzu), equipado con auto-inyector (AOC-20i, Shimadzu), con una columna HP-5MS (0,25 µm×30 m, Agilent) y un flujo de gas Helio de

28,9 mL/min. La temperatura inicial del horno se mantuvo por 2 min a 80°C, luego se incrementó hasta 290°C (8°C/min) y se mantuvo por 3 min, para finalmente incrementarla a 310°C (20°C/min) y mantenerla por 10 min adicionales. La temperatura del inyector y detector fue de 300°C. La determinación de los compuestos presentes en los exudados se realizó por comparación con base de datos de espectros de masa (NIST library, <http://webbook.nist.gov/>).

3.5. Análisis estadístico de los resultados

Los datos numéricos obtenidos de los diferentes ensayos se sometieron a análisis univariados para un modelo completamente al azar, utilizando el paquete estadístico PAST versión 3.02 (Hammer et al 2001).

Para la comparación de medias de tratamientos luego del ANOVA se aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). En los casos en que, ni los datos ni su transformación, presentaron distribución normal y/u homogeneidad de varianza, se aplicaron los tests no paramétricos de Kruskal Wallis y Mann-Whitney ($P \leq 0.05$).

Los resultados se presentaron en tablas y gráficas donde las diferencias entre medias de tratamientos se indicaron por letras diferentes en formato de subíndice.

3.6. Estudios sobre la anotación genómica de *Delftia* sp. JD2

Durante esta tesis se buscó contribuir al conocimiento de los aspectos funcionales y evolutivos de *Delftia* sp. JD2, focalizando el trabajo en la resistencia a Cr(VI) (cromo hexavalente) y a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (producción de AIA y sideróforos, FBN en vida libre) previamente reportados (Morel et al 2011; Ubalde et al 2012). Se realizó también un análisis comparativo con microorganismos relacionados del orden Burkholderiales, en el contexto de la clase β -proteobacteria.

3.6.1. Secuenciación del genoma de *Delftia* sp. JD2

El ADN genómico (ADNg) de *Delftia* sp. JD2 se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en Sambrook et al (1989). El control de la calidad del ADNg se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% en búfer TAE) y visualización con el agente intercalante Good View®. La concentración se estimó por fluorescencia utilizando un Nanodrop para cuantificar la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

La secuenciación del genoma de *Delftia* sp. JD2 se realizó a través del servicio de secuenciación de Macrogen, Inc., Corea, utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000. Las lecturas obtenidas se evaluaron en busca de la mejor calidad a través del programa FASTQC (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/). El ensamblado *de novo* se realizó en el Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma de Facultad de Ciencias (Udelar), utilizando el programa de ensamblado SPAdes (Bankevich et al 2012). El BLAST, unión y orientación de los contigs se realizó con el programa ABACAS (Assefa et al 2009, <http://abacas.sourceforge.net>) tomando como referencia a *Delftia* sp. Cs1-4 (Vacca et al 2005) y *Delftia acidovorans* SPH-1 (Schleheck et al 2004), cuyos números de acceso de NCBI a los genomas totalmente secuenciados y anotados son NC_015563.1 y NC_010002.1, respectivamente.

3.6.2. Caracterización funcional y comparación de secuencias

El genoma se anotó siguiendo los procedimientos para anotación de genomas de procariontes incluidos en los servidores RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al 2008) y RTMg (Real Time Metagenomics) (<https://edwards.sdsu.edu>). Mediante la herramienta ANI (*Average Nucleotide Identity*;

<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>) se calculó el promedio de identidad nucleotídica entre las secuencias de *Delftia* sp. JD2 y las *Delftia* SPH-1 y Cs1-4 (Goris et al 2007).

La información se categorizó funcionalmente usando el subsistema SEED en el servidor RAST (<http://rast.nmpdr.org>) (Overbeek et al 2014), estableciéndose el número de posibles secuencias codificantes pertenecientes a los diferentes subsistemas funcionales. Se buscaron regiones del ADN que codifican para proteínas en *Delftia* sp. JD2 que no estén presentes en los dos genomas de *Delftia* secuenciados y anotados. Luego, se seleccionaron las posibles secuencias codificantes relacionadas a actividades de interés mediante BLAST, incluyendo la secuencia del 16S ARNr para la subunidad menor de la ARN polimerasa.

Las secuencias se analizaron utilizando el servidor de la NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para la búsqueda manual de secuencias homólogas se utilizó la información disponible en la base de datos del NCBI para microorganismos, por fuera y dentro de la familia *Comamonadaceae* (Cuadro 3.9.).

Las secuencias proteicas, derivadas de la traducción de las nucleotídicas (por blastx), se alinearon utilizando ClustalW. Solo se consideraron aquellas secuencias con un mínimo de 30% de identidad aminoacídica respecto a *Delftia* sp. JD2. Los dominios funcionales conservados se identificaron utilizando el servicio de la NCBI *Conserved Domain Search Service* (CD Search).

La construcción de árboles de filogenia con las secuencias seleccionadas se realizó mediante el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versión 6.05 (Tamura et al 2013) utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining, UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) y “Maximum Likelihood”.

Cuadro 3.9. Genomas bacterianos utilizados y disponibles en NCBI.

Familia	Organismo	N° de acceso
Comamonadaceae (β-proteobacteria)	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	NC_015563.1
	<i>D.acidovorans</i> SPH-1	NC_010002.1
	<i>Verminephrobacter</i> sp. At4	FJ214311.1
	<i>V. eiseniae</i> EF01-2	CP000542.1
	<i>Acidovorax</i> sp. KKS102	CP003872.1
	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	CP000512.1
	<i>A.avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> AAC00-1	NC_008752.1
	<i>A. radialis</i> N35	NZ_AFBG00000000.1
	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860	NC_015138.1
	<i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601	CP002657.1
	<i>A. denitrificans</i> Bc	CP002449.1
	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NC_014931.1
	<i>V. paradoxus</i> S110	CP001635.1
	<i>V. paradoxus</i> B4	CP003911.1
	<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-1	NC_010935.1
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	NC_007948.1	
<i>P. naphthalenivorans</i> CJ2	NC_008781.1	
<i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236	NC_007908.1	
Burkholderiaceae (β-proteobacteria)	<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3	NC_015376.1
	<i>B.cepacia</i> R18194	CP000152.1
	<i>B. xenovorans</i> LB400	NC_007951.1
	<i>Ralstonia solanacearum</i> CMR15	NC_017559.1
	<i>R. solanacearum</i> Po82	NC_017574.1
	<i>R. solanacearum</i> CFBP2957	NC_014307.1
<i>C. metallidurans</i> CH34	NC_007973.1	
Oxalobacteraceae (β-proteobacteria)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	CP002039.1
Rhizobiaceae (α-proteobacteria)	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	NC_003047.1
Enterobacteriaceae (γ-proteobacteria)	<i>Escherichia coli</i> K12	NC_000913.3
Bacillaceae (Firmicutes)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	NZ_CM000487.1

*“Nuestra recompensa se encuentra en el
esfuerzo y no en el resultado. Un
esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1. Respuesta de la planta a la infección bacteriana

4.1.1. Introducción

Las plantas están expuestas continuamente a cambios en el ambiente, que independientemente de la fuente u origen, causan una variedad de estreses frente a los cuáles la célula debe responder (Scandalios 2005). Entre los factores bióticos, las bacterias y hongos de la rizosfera, benéficos y patógenos, activan en la planta mecanismos de reconocimiento y respuesta de defensa (Zamioudis y Pieterse 2012). El sistema de defensa incluye tanto respuestas que se inducen luego de la detección del potencial enemigo, como otras que pre-existen de forma pasiva (constitutiva) (Rose et al 2002). Los mecanismos de defensa en plantas incluyen barreras físicas como la cutícula y la pared celular, compuestos de expresión constitutiva que inhiben el crecimiento del invasor, y cambios fisiológicos internos que se producen luego de la infección bacteriana y que se asocian a estrés, entre otros.

En fisiología vegetal, el término estrés tiene muchas acepciones. Por ejemplo, Shulaev et al (2008) lo define como cualquier cambio en las condiciones de crecimiento que altera la homeostasis fisiológica. Bajo esta definición de estrés, una BPCV no se clasificaría como un factor estresante, al menos no a largo plazo. Sin embargo, frente a una invasión radicular por un microorganismo, es de esperar que se manifiesten respuestas en la planta que implican en primer lugar la percepción del mismo, su reconocimiento (sea patógeno, beneficioso o neutro) y luego el procesamiento de señales que determinen si finalmente se desarrolla o no, una respuesta de defensa, ante una posible enfermedad (Tadeo y Gómez-Cadenas 2008).

Cuando una planta se encuentra expuesta a una determinada situación de estrés, en su respuesta global se pueden distinguir tres fases, definidas en función de una escala temporal (Montoliú Vidal 2010; Shulaev et al 2008):

1. Alarma: Generalmente es de carácter perjudicial y ocurre en una escala de segundos a pocos días. Esta fase se relaciona con la activación de mecanismos inmediatos de defensa y que generalmente se asocian con una disminución en las funciones básicas de la planta.
2. Resistencia (aclimatación): Se da cuando al prolongarse la situación de estrés, el organismo intenta sobreponerse mediante mecanismos de adaptación y de ajuste, con

los cuales la función metabólica alterada tiende a normalizarse. Ocurre en una escala de días a semanas.

3. Agotamiento u adaptación: cuando el estrés supera la capacidad de resistencia de la planta, se da una de dos respuestas de largo plazo. Una, de carácter evolutivo, que ocasiona cambios genéticos en las poblaciones e involucra por tanto una escala temporal mucho mayor, de generaciones. La segunda se da cuando frente a la reiteración del estrés, se dan nuevas alteraciones, muchas de ellas irreversibles y que eventualmente conducen a la muerte de la planta.

La primera etapa, de percepción del estrés externo por la planta y su transformación en una señal interna, es sin duda clave (Montoliú Vidal 2010). Las señales internas inducidas por las condiciones de estrés incluyen cambios en los niveles de determinados iones (por ejemplo Ca^+) y moléculas varias. Desde el punto de vista metabólico, se distinguen varios compuestos implicados, como ser los antioxidantes; los subproductos que aparecen en las células derivados de la alteración de la homeostasis natural, como las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*); y las moléculas de señalización que median la respuesta de aclimatación (Shulaev et al 2008). Algunos ejemplos de compuestos que advierten a la célula de que se ha detectado una señal de estrés son algunas enzimas, hormonas y el ácido salicílico. En las interacciones incompatibles entre plantas y microorganismos, esta respuesta primaria de señalización de carácter inmediato, incluye además, un incremento en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa (Montoliú Vidal 2010).

Estrés oxidativo.- Una de las respuestas de defensa más rápidas frente a la invasión microbiana de las raíces de una planta es la producción de ROS (generalmente peróxido de hidrógeno y superóxido), con la inducción de una explosión oxidativa que se potencia si la infección produce la necrosis de los tejidos (Theocharis et al 2012). La explosión oxidativa se produce debido a la activación de oxidasas y peroxidasas frente a estímulos externos. En general, cualquier alteración de las condiciones óptimas de crecimiento incide de forma negativa en la planta, alterándose la cadena de transporte de electrones y generando un estrés oxidativo (Montoliu Vidal 2010).

Las ROS desempeñan funciones diversas en las células, tanto en condiciones normales como frente a estrés. En plantas son importantes en los procesos de señalización, y controlan procesos fundamentales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos externos y la muerte celular programada (Bailey-Serres y Mittler 2006). Pero su acumulación en exceso causa efectos tóxicos. El estrés oxidativo en las células ocurre cuando el balance entre las ROS y las moléculas antioxidantes se altera, debido a un

descenso en el número de moléculas antioxidantes, una acumulación de ROS, o ambos (Scandalios 2005). En caso de estrés, la destrucción celular y el desarrollo de la enfermedad dependerán entonces de la capacidad de la planta para eliminar las ROS generadas en exceso, evitando de esta forma la activación de las reacciones de defensa, principalmente en el sitio de colonización por el microorganismo.

Para minimizar los efectos deletéreos de las ROS acumuladas, los organismos han desarrollado defensas antioxidantes de carácter enzimático y no enzimático que actúan tanto en condiciones fisiológicas normales como bajo estrés. Entre las últimas se encuentran compuestos con propiedades antioxidantes intrínsecas, como las vitaminas C y E, y el glutatión, entre otros. Las defensas enzimáticas incluyen las catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas, entre otras, que convierten a los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en productos menos reactivos (Scandalios 2005).

Existen diversos indicadores de estrés oxidativo en células y tejidos. Entre ellos, uno de los más utilizados es el malondialdehído (MDA), que es un subproducto de la peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas (Del Rio et al 2005) y es por lo tanto un indicativo del incremento del daño oxidativo a lípidos. Este daño afecta de forma irreversible la estructura y función de las membranas celulares, con consecuencias directas como la pérdida del potencial de membrana, la alteración del transporte de metabolitos, y eventualmente la muerte celular. Además, la lipoperoxidación puede activar otras respuestas de defensa en la planta (Moller et al 2007). El MDA es además mutagénico y carcinogénico por su capacidad de interactuar con el ADN y proteínas (Marnett 1999).

Proteínas relacionadas a patogénesis.- Algunas bacterias no-patógenas de la rizosfera pueden inducir una resistencia sistémica en plantas (resistencia sistémica inducida, RSI) que fenotípicamente es similar a la resistencia sistémica adquirida (RSA) mediada por patógenos (Van Loon 2007; Schuegger et al 2006; Van Loon et al 1998). La RSA se caracteriza, entre otros, por la acumulación de ácido salicílico y de proteínas categorizadas como *proteínas relacionadas a patogénesis* (PRP, del inglés *pathogenesis-related proteins*) debido a que su expresión a menudo se induce luego de la infección (Sels et al 2008). Entre estas proteínas se encuentran las quitinasas, glucanasas, endoproteinasas y peroxidasas (Fuentes-Silva y Rodríguez-Romero 2006).

La expresión de PRPs se induce no solo por patógenos, también por estrés ambiental, por la presencia de químicos y por daños o heridas mecánicas (Fernández-Herrera 2011). En general las PRPs se consideran uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon y Bakker 2006), y su inducción se toma como marcador del estado inducido de defensa (Van Loon 2007; Rose et al 2002). En interacciones incompatibles, tanto las PRPs

como el ácido salicílico se incrementan en la planta, mientras que en las compatibles, estos generalmente se mantienen en concentraciones invariables, aunque pueden aumentar al inicio y luego “normalizarse” (Zamioduis y Pieterse 2012).

Entre las PRPSs, las glucanasas y quitinasas son típicamente - aunque no exclusivamente - expresadas frente al ataque de fitopatógenos (Van Loon et al 1998). Ambas enzimas desempeñan su función de protección o defensa a través de dos mecanismos: 1) directamente, por medio de la acción de hidrólisis de los componentes de las paredes celulares de los patógenos, dejándolos más susceptibles a la lisis; e 2) indirectamente, por medio de la activación de otras respuestas adicionales de defensa de la planta, inducidos ante el reconocimiento de algunos componentes que se hidrolizaron y liberaron de las paredes del patógeno (Rose et al 2002).

Las β -1,3-glucanasas pertenecen a la familia 2 de las PRPs (PR-2) y están ampliamente distribuidas en plantas. Están implicadas en la hidrólisis de las uniones endo β -1-3-glicosídicas de los β -1,3-glucanos (Fernández-Herrera 2011; Fuentes-Silva y Rodríguez-Romero 2006). Estos últimos son componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias. Además, intervienen en procesos fisiológicos como la maduración de frutos, respuestas a daño mecánico y luz UV, entre otros (Fernández-Herrera 2011).

La pared celular de la mayoría de los hongos y el exoesqueleto de animales está compuesta de quitina, que es el segundo compuesto más abundante en la naturaleza, sólo superado por la celulosa (Cohen-Kupiec y Chet 1998). La quitina está compuesta por residuos de N-acetilglucosamina y su única diferencia química con la celulosa es el reemplazo del grupo hidroxilo en el carbono 2 por un grupo amino acetilado (Nelson y Cox 2000). Las quitinasas son enzimas pertenecientes a las familias PR-3, -4, -8 y -11, que hidrolizan los enlaces poli- β -1,4-N-acetilglucosamina presente en las paredes celulares. Generalmente actúan contra hongos, nematodos y herbívoros, aunque algunas poseen actividad de lisozima y actúan por tanto contra bacterias (Van Loon et al 2006a;2006b). La inducción de enzimas con actividad quitinasas es un evento temprano provocado por las señales de reconocimiento, como interacciones lectina-carbohidratos. Este reconocimiento es el primer paso en una cascada de eventos que disparan la respuesta vegetal al patógeno (Pavone 2012).

Las peroxidasas pertenecen a la familia de las PR-9. Catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos orgánicos e inorgánicos por la acción del H_2O_2 (Gomez-Vasquez et al 2004). Contribuyen a la respuesta frente a diferentes tipos de estreses y pueden polimerizar compuestos de pared celular, engrosándola. Además, pueden generar ROS y regular los niveles de H_2O_2 como parte del estrés oxidativo generado durante las

interacciones principalmente incompatibles entre los microorganismos y la planta (Passardi et al 2005).

Clorofila como indicador.- La cuantificación de pigmentos fotosintéticos se utiliza para estimar de forma indirecta muchos aspectos de la fisiología de la planta, entre ellos de estrés, de la toma de dióxido de carbono y del crecimiento. Las clorofilas (Chl) son los pigmentos más importantes en la puesta en funcionamiento de la fotosíntesis y esenciales para la conversión oxigénica de la energía luminosa en energía química (Pinkard et al 2006).

En las plantas y otros organismos fotosintéticos existen al menos dos tipos de moléculas de Chl: la Chla, que se encuentra en todos los organismos fotosintéticos y la Chlb, que forma parte de los pigmentos accesorios. Estos últimos absorben la energía que la Chla es incapaz de captar, e incluyen además de la Chlb, a la xantofila y el caroteno, entre otros.

Desde el punto de vista fisiológico, el contenido foliar de Chl es indicador de varios aspectos fisiológicos:

- De biomasa: la cantidad de energía solar absorbida es función de las concentraciones foliares de pigmentos fotosintéticos. A bajas concentraciones de Chl se limita el potencial fotosintético y por lo tanto la producción primaria (Richardson et al 2002).
- De salud nutricional, respecto al contenido de N: La escasez de N en las hojas deriva en una concentración menor de Chl (Clevers y Kooistra 2012). Existen numerosos estudios que indican una relación positiva entre el contenido de N y el contenido de Chl en hojas (Dordas y Sioulas 2008; Pagano y Maddonni 2007; Houles et al 2007; Xiong et al 2006).
- De estrés: La concentración relativa de pigmentos varía cuando la planta se encuentra bajo un estrés (Pandey et al 2005). Por ejemplo, el contenido de Chl generalmente cambia con algunos factores abióticos, como la exposición a la luz solar directa, que aumenta la relación Chla/Chlb. Algunas condiciones estresantes bióticas (enfermedades) o abióticas (estreses ambientales) afectan esta relación, disminuyéndola en comparación con situaciones normales (Sinha y Mukherjee 2008; Gonçalves et al 2005).

La respuesta celular vegetal es un aspecto fundamental a monitorear durante las primeras fases de la interacción planta-microorganismo. Incluso en interacciones entre plantas y BPCV, existe un creciente número de evidencia que sugiere que las BPCV son reconocidas por las plantas como potenciales invasores y que dispararían la respuesta inmune en las plantas, al menos en etapas tempranas. Luego, en etapas mas avanzadas de la asociación

mutualista se frenarían las respuestas de defensa en la planta para permitir una colonización exitosa de las raíces (Zamioudis y Pieterse 2012). Existen una serie de características que identifican a esta respuesta inmediata de la planta a la colonización, como son los cambios en el flujo de iones y pH celular, la generación de ROS, la expresión de genes relacionados con la defensa, la acumulación de PRPs y otros metabolitos, el fortalecimiento de paredes celulares y la producción de compuestos antimicrobianos. La rapidez y magnitud con que se den esos cambios dependerá del tipo de interacción y de la forma en la que la planta reconoce a la colonización microbiana (Silvar et al 2008).

En el caso de alfalfa se desconoce el comportamiento de la planta ante la colonización de sus raíces por *Delftia* sp. JD2. Por dicha razón, en el presente estudio se propuso evaluar la actividad de algunas enzimas y la acumulación de metabolitos relacionados con estrés, en extractos de plántulas de alfalfa obtenidas cuatro días después de la inoculación. La finalidad de estos ensayos es evaluar la viabilidad de las células vegetales en respuesta a la colonización por JD2, y el grado de reconocimiento de la bacteria por parte de la planta, en condiciones *in vitro*. Además, esta información se acompañara de observaciones directas de la bacteria sobre la superficie radicular (colonización) y de la cuantificación de biomasa vegetal, en condiciones de hidroponia.

4.2.2. Objetivos planteados

Con base en los antecedentes, y con la idea de aportar información que ayude a comprender los mecanismos de respuesta de la planta a la colonización de las raíces por parte de JD2 en condiciones de hidroponia, se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Analizar la colonización de raíces de alfalfa por *Delftia* sp. JD2 (marcada con GFP), por microscopía de epifluorescencia a los cuatro, siete y 15 días post-inoculación.
- II. Analizar la respuesta de la planta cuando interacciona con JD2, en términos de resistencia vegetal frente a agentes bióticos
- III. Evaluar el estado de la planta mediante la cuantificación de Chla y Chlb, así como de la biomasa vegetal.

4.2.3. Resultados

I. Análisis de la colonización de raíces de alfalfa

Con el objetivo de conocer y evaluar la naturaleza de la interacción de *Delftia* sp.JD2 con las raíces de alfalfa, se transformaron células de JD2 con el plásmido pM4655 portador del gen *gfp* de expresión constitutiva. Se obtuvieron transformantes para JD2, seleccionados por su resistencia a Tc y se corroboró la incorporación del plásmido por visualización en el espectro de excitación/emisión adecuado mediante microscopía de epifluorescencia.

El uso de la proteína verde fluorescente (GFP) es una herramienta útil para el marcaje de microorganismos con objeto de visualizar, mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, el proceso de infección de los mismos bajo condiciones *in vivo*. En este sentido, la visualización de organismos marcados con GFP, mediante microscopía de epifluorescencia, es una herramienta rápida, efectiva y no invasiva que permite el análisis espacio-temporal de las interacciones planta-microbio.

Con el fin de estudiar los mecanismos de infección y localización de JD2, la cepa transformada fue inoculada y co-inoculada junto a U143 en semillas de alfalfa en condiciones de hidroponía. Muestras de raíces se cosecharon a los cuatro, siete y 15 días posteriores a la inoculación, con la finalidad de realizar el seguimiento de la infección durante el tiempo. Las muestras se observaron por microscopía de epifluorescencia.

Cuatro días luego de la inoculación de las plantas se logró observar las células de JD2 en los primordios radiculares de las raíces emergentes y tres días después a lo largo de toda la raíz. A partir del séptimo día desde la inoculación, y hasta el final de la evaluación, JD2 se observó además en la pared de nódulos radiculares (Fig. 4.1).

II. Contenido de MDA

El grado de daño oxidativo provocado por la colonización de las plantas por JD2, se estimó mediante la concentración de MDA en las raíces y parte aérea, de plantas colectadas luego de cuatro días desde la inoculación de las plantas, en condiciones de hidroponía (Cuadro 4.1). El MDA es uno de los principales indicadores de daño oxidativo y la magnitud de su acumulación se asociará con el grado de resistencia desarrollado por la planta frente al posible estrés debido a la presencia de JD2 (Montoliú Vidal 2010).

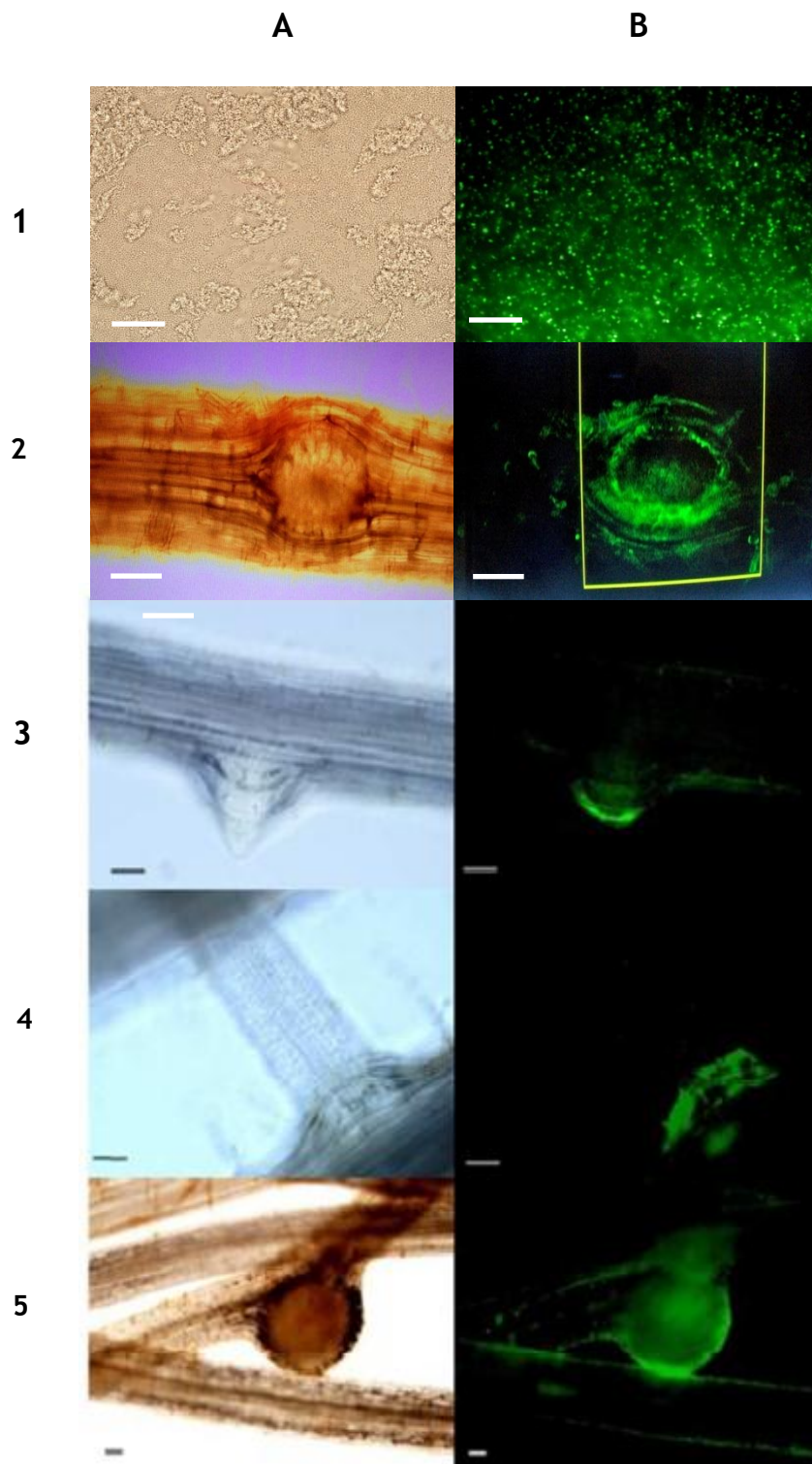


Figura 4.1. Colonización de raíces de alfalfa por *Delftia* sp. JD2. A) Luz transmitida. B) Microscopía de fluorescencia. Se muestra en 1, células de JD2, colectadas durante la fase exponencial de crecimiento; 2 y 3, raíces de plantas inoculadas con JD2 (cuatro días pos-inoculación); 4, raíces de plantas co-inoculadas con JD2 y U143 (cuatro días pos-inoculación); y 5, raíces a los siete días después de la co-inoculación. Las barras en 1 y 2 corresponden a 50 μm , mientras que en 3, 4 y 5 corresponden a 77,06 μm .

Algunos estudios realizados en cítricos, en invernadero (Arbona et al 2008) e *in vitro* (Montoliú Vidal 2010), indican que la incidencia del daño oxidativo es mayor en la PA de plantas expuestas a estrés hídrico, evidenciado por un aumento en la cantidad de MDA acumulado en los tejidos foliares. Sin embargo, frente a la invasión por un microorganismo de la rizosfera, son las raíces donde se espera que ocurra la explosión oxidativa inmediata. Nuestros resultados muestran que los tejidos aéreos de alfalfa acumulan cantidades similares de MDA a los encontrados en las raíces, sin diferencias significativas y sin importar el tipo de tratamiento de inoculación aplicado sobre la planta (Cuadro 4.1). Esto sugiere que no se induciría estrés oxidativo (en las condiciones ensayadas) debido a la colonización bacteriana por JD2, ni por U143, ni por ambas juntas.

Cuadro 4.1. Actividades enzimáticas (UE/mg de tejido vegetal) y contenido en MDA (μ moles/mg de tejido vegetal), en extractos obtenidos de parte aérea (PA) y radicular (PR) de plantas colectadas a los cuatro días de su inoculación o co-inoculación, en condiciones de hidroponía. Se muestran los resultados de uno de tres experimentos independientes, los cuales presentaron la misma tendencia. Letras diferentes en subíndices indican diferencias significativas entre tratamientos para cada columna ($P < 0,05$).

	Tratamiento de inoculación	Peroxidasas (UE/mg)	Glucosaminidasas (UE/mg)	Glucanasas (UE/mg)	MDA (μ moles/mg)
PA	JD2	339 \pm 63 _b	110 \pm 5 _b	175 \pm 49 _b	14 \pm 2,8 _a
	U143	169 \pm 6 _c	79 \pm 8 _b	116 \pm 12 _b	8,4 \pm 4 _a
	Co-inoculación	174 \pm 30 _c	94 \pm 13 _{ab}	129 \pm 35 _b	6,63 \pm 0,6 _a
	Control	157 \pm 24 _c	75 \pm 6 _a	130 \pm 20 _b	7 \pm 1,1 _a
PR	JD2	378 \pm 45 _b	72 \pm 9 _a	830 \pm 110 _d	9,9 \pm 0,1 _a
	U143	865 \pm 203 _a	58 \pm 4 _a	909 \pm 44 _d	6,4 \pm 0,9 _a
	Co-inoculación	142 \pm 15 _c	72 \pm 5 _a	47 \pm 10 _a	9,5 \pm 0,4 _a
	Control	161 \pm 19 _c	148 \pm 3 _b	382 \pm 18 _c	9,8 \pm 0,3 _a

III. Actividad enzimática total de peroxidasas, glucanasas y glucosaminidasas

La resistencia a patógenos en varias plantas se ha asociado a incrementos en la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasas, peroxidasas y otras actividades de PRPs (Fernández-Herrera 2011). Por lo tanto, la comparación de las actividades enzimáticas en presencia y ausencia de microorganismos permitiría determinar si el encuentro entre ambos dispara la respuesta de la planta en términos de resistencia.

La actividad de glucanasas y peroxidasas en las raíces de plantas inoculadas con JD2 o con el rizobio presentaron un incremento estadísticamente significativo en relación a las raíces de las plantas controles no inoculadas (Cuadro 4.1). Sin embargo, en condiciones de co-inoculación, los valores de ambas actividades enzimáticas se redujeron o presentaron valores similares al control. Para el caso de la actividad glucosaminidasa, tanto las inoculaciones simples como la co-inoculación de las plantas produjeron una disminución significativa de la actividad enzimática en sus raíces, respecto al control (Cuadro 4.1). Estos resultados sugieren que las raíces de alfalfa no reconocerían la co-inoculación como un factor estresante que justificara el desarrollo de una explosión oxidativa o la producción de enzimas hidrolíticas (en las condiciones ensayadas).

En los tejidos aéreos, las actividades enzimáticas en las plantas co-inoculadas no presentaron diferencias significativas con los valores detectados en las plantas control, sugiriendo nuevamente que no habría una respuesta a la presencia conjunta de JD2 y U143. Sin embargo, en plantas inoculadas con JD2, los valores de peroxidasas y glucosaminidasas se incrementaron en relación al control (Cuadro 4.1).

En conjunto, los resultados parecen indicar que las plantas de alfalfa no presentarían resistencia a la colonización bacteriana durante la co-inoculación con JD2 y U143.

IV. Cuantificación de Chl y biomasa vegetal

El estado general de las plantas de alfalfa (inoculadas, co-inoculadas y controles) se evaluó midiendo el contenido de Chl y la biomasa vegetal. Se observó que la inoculación con JD2 no causa alteraciones en el contenido de Chl ni un desbalance en la relación Chla/Chlb, en relación a las plantas control, y tampoco afecta significativamente el crecimiento (cuantificado en términos de biomasa) (Cuadro 4.2). Sin embargo, se determinó un aumento significativo del contenido de Chla y de la biomasa aérea en plantas co-inoculadas. La relación Chla/Chlb se mantuvo prácticamente constante en todos los tratamientos (Cuadro 4.2). Estos resultados estarían apoyando el efecto positivo de la co-inoculación sobre el desarrollo de las plantas de alfalfa.

Cuadro 4.2. Biomasa vegetal radicular (PR) y aérea (PA) y contenido en clorofila a y b (Chla y Chlb), de plantas colectadas a los cuatro días posteriores a la inoculación, en condiciones de hidroponía. Letras diferentes en subíndices indican diferencias significativas entre tratamientos para cada columna ($P < 0,05$).

Tratamiento de inoculación	Contenido en clorofila (mg/mg de tejido aéreo vegetal)		Relación Chla/Chlb	Peso (g) de material vegetal	
	Chla	Chlb		PA	PR
JD2	0,128 ± 0,06 _a	0,075 ± 0,014 _a	1,706	0,32 ± 0,14 _a	0,104 ± 0,001 _a
U143	0,234 ± 0,125 _{ab}	0,152 ± 0,051 _b	1,875	0,29 ± 0,06 _a	0,104 ± 0,001 _a
Co-inoculación	0,348 ± 0,108 _b	0,189 ± 0,019 _b	1,841	0,63 ± 0,11 _b	0,133 ± 0,079 _a
Control	0,179 ± 0,04 _a	0,100 ± 0,036 _{ab}	1,790	0,32 ± 0,08 _a	0,128 ± 0,004 _a

4.2.4. Discusión

JD2 colonizó las raíces de alfalfa en condiciones de hidroponía. Numerosos estudios se han focalizado en la colonización de la rizosfera por bacterias benéficas inoculadas. La mayoría de las BPCV estudiadas *in vitro* e *in situ* provienen del suelo (Compant et al 2010). Los pasos en la colonización incluyen el reconocimiento bi-direccional planta-bacteria, adherencia, colonización y crecimiento, posible invasión de los tejidos vegetales (patógenos o endófitos), y comienzo del intercambio molecular (Berg 2009). La colonización de la rizosfera es importante no solo en las primeras etapas de la patogénesis, sino que también es crucial cuando se aplican microorganismos con fines beneficiosos (Lugtenberg et al 2001). A partir de su inoculación, las bacterias deben colonizar la rizosfera y el rizoplano durante un período de tiempo relativamente largo para asegurar su competitividad en el medio y ejercer sus efectos benéficos sobre la planta a lo largo de todo el ciclo (Compant et al 2010). Eventualmente, las células se adhieren a las superficies radiculares y pueden finalmente formar una capa celular que puede extenderse por toda la superficie de la raíz y/o formar microcolonias o biofilms (Gamalero et al 2003). Algunos estudios reseñados por Lugtenberg et al (2001), muestran que la distribución de las bacterias en las raíces no es uniforme. Algunas áreas específicas, como el extremo o *tip* de la raíz principal en crecimiento, se presentan prácticamente libres de células bacterianas, tal como se observó en este estudio, mientras que otras se hallan densamente colonizadas. Ejemplos de estas últimas incluyen los sitios donde se presume ocurre la mayor secreción de compuestos, como las zonas de heridas y los sitios de emergencia de raíces secundarias (Lugtenberg et al 2001). Nuestros resultados sugieren que las plantas inoculadas y co-inoculadas con JD2 son colonizadas por JD2 a nivel de las raíces, en los

primordios o rudimentos de raíces secundarias, en la fase más temprana, aunque también coloniza la superficie de los nódulos y aparece a lo largo de la raíz, aparentemente sin formar microcolonias.

Muchos factores influyen sobre la competitividad de las BPCV en la rizosfera, hacia donde son atraídos por la quimiotaxis impartida por los exudados (Lugtenberg et al 2001) y frente a los cuáles responden produciendo otras moléculas con las que comienzan el proceso de colonización (Bais et al 2006; Lugtenberg et al 2001). Ya mucho se ha escrito entre el vínculo entre la colonización de la rizosfera y del rizoplaneo y la exudación radicular (Morel y Castro Sowinski 2013; Compant et al 2010; Lugtenberg y Kamilova 2009; Berg 2009; Walker et al 2003). Pero antes y durante la exudación de factores quimiotácticos, la planta debe asegurarse de que no se encuentra frente a un patógeno potencial y la respuesta inmediata de la planta condiciona el tipo de interacción que se da entre ella y la bacteria (Benizri et al 2001).

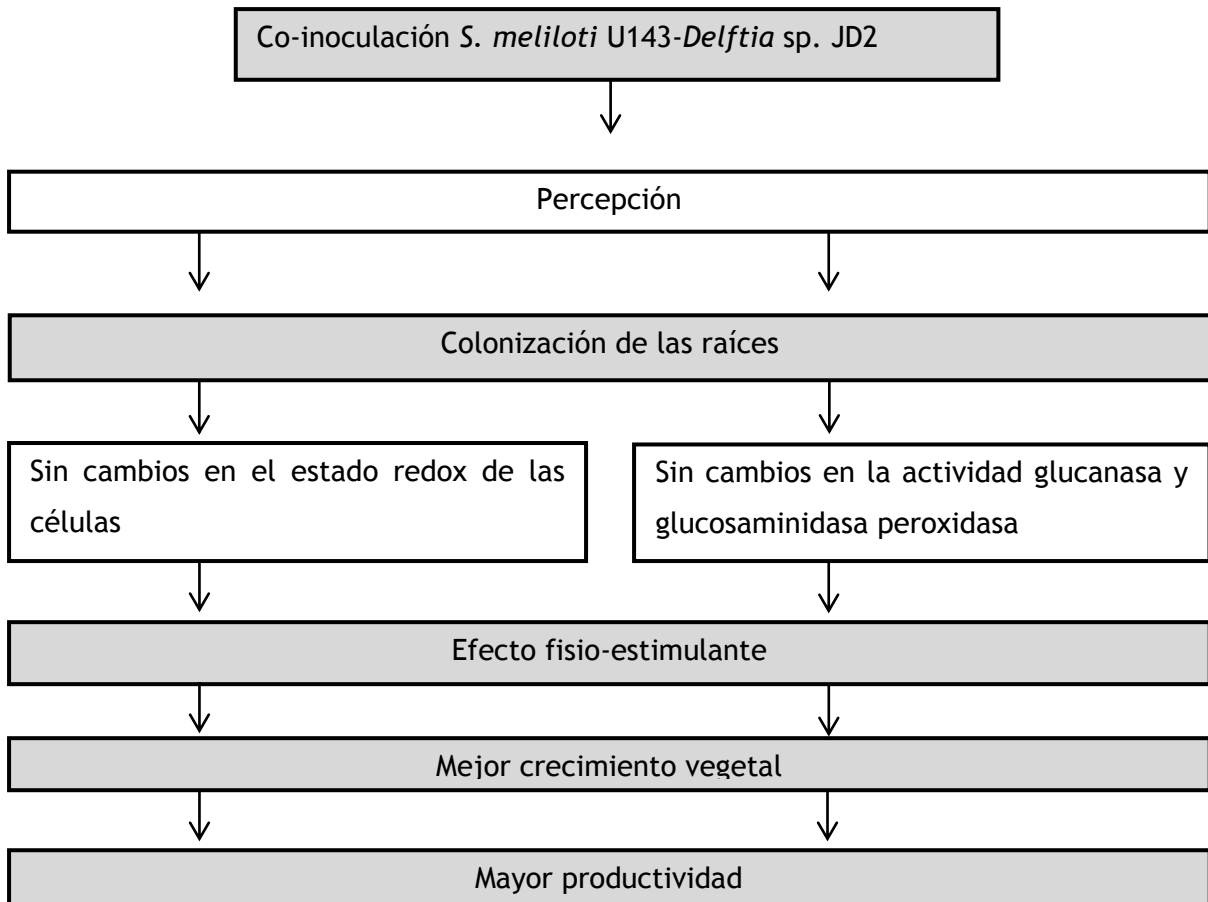
Previamente se sugirió que las PRPs estarían presentes en tejidos sanos en pequeñas cantidades (Pavone 2012). En concordancia con esta afirmación, durante el presente estudio se observó una actividad basal de las enzimas evaluadas, lo que le permitiría a los vegetales desmontar la pared celular y continuar con su crecimiento (Adams 2004).

Los reportes indican que se produce un aumento de la actividad de peroxidasas y de la concentración de metabolitos relacionados con la defensa en las interacciones incompatibles (Zamioudis y Pieterse 2012; Fernández-Herrera 2011), aunque este aumento también ocurre al inicio de algunas compatibles, como en las simbiosis rizobio-leguminosas (Islam et al 2010), actinorrizas (Kim y An 2002) y micorrizas (Frettinger et al 2006). En nuestro estudio, se observó que la inoculación simple con JD2 afectó significativamente, en la mayoría de los casos, las actividades enzimáticas monitoreadas, lo que indica que la planta reconocería a la bacteria como posible patógeno, aunque se desconoce si los aumentos registrados son relevantes (en términos de patogenicidad), por no contarse con un patógeno reconocido de alfalfa en el laboratorio. Van Loon et al (1998) informan que se necesita un intervalo de tiempo de días entre la inducción de defensa por parte de una bacteria, y el desarrollo de protección en la planta. En ese intervalo de tiempo, la bacteria puede manifestar, o no, mecanismos de control en la planta que interfieran con la defensa en desarrollo de la planta (Zamioudis y Pieterse 2012; Mitra y Long 2004). A pesar del aumento observado en algunas actividades, durante el tiempo evaluado en nuestro estudio, no se desarrollaron síntomas visibles de enfermedad en las plantas que justifique considerar a JD2 como un agresor.

En las plantas co-inoculadas, los niveles de actividades fueron similares a los valores detectados en las plantas control. Este resultado está en concordancia con las observaciones que demuestran que en las interacciones compatibles, la expresión y actividad de PRPs, se mantienen controladas. Muchas veces ese control es ejercido por los mismos microorganismos o alguno de sus productos (Zamioudis y Pieterse 2012). Por ejemplo, los rizobios han desarrollado mecanismos que eficientemente controlan los niveles de ácido salicílico en la planta, lo que les permite establecer simbiosis efectivas, manteniendo el sistema de defensa “al margen” (Zamioudis y Pieterse 2012). La expresión de algunas glucanasas en *Medicago truncatula*, es inhibida por *S. meliloti* o por los factores Nod (FN) de la bacteria (Mitra y Long 2004) y se ha sugerido la degradación de los lipooligoquitosacáridos por quitinasas secretadas por tejido de la raíz (Kim y An 2002). Se postula que los FN además de ser indispensables para el correcto establecimiento de la simbiosis, son necesarios como agentes que interrumpen el sistema inmune de la planta, aunque los mecanismos moleculares de esta interfrecuencia aún se desconocen (Zamioudis y Pieterse 2012). En relación a las plantas inoculadas con el rizobio, los valores de actividad detectados en plantas co-inoculadas fueron similares y en algunos casos menores a los mismos. El sistema de defensa de la planta o bien se frenaría por el rizobio, por JD2 o por ambos.

Varios autores reportaron reducciones en los contenidos de pigmentos fotosintéticos foliares y en la relación Chla/Chlb debido a la infección por patógenos (Gonçalves et al 2005) o a la presencia de estreses abióticos (Kumar et al 2008; Pandey et al 2005). Los reportes muestran que existe un aumento en el contenido de Chl en plantas inoculadas con BPCV, acompañado de una mayor biomasa vegetal (Xiong et al 2008; Kumar et al 2009; Xiong et al 2008; Sinha y Mukherjee 2008). En el presente estudio, se encontró que la inoculación con JD2 no afectó los niveles de Chla y Chlb ni la relación entre ambas Chls. Sin embargo, el contenido de Chla y la biomasa aérea fueron mayores en los tejidos aéreos de plantas co-inoculadas, en relación al resto de los tratamientos. Otras actividades enzimáticas que quedan pendientes de análisis son algunas enzimas de asimilación de amonio, como la glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa y glutamato sintasa, útiles para evaluar, al igual que lo hace la Chl, el estado fisiológico de la planta.

Las plantas inoculadas y co-inoculadas con JD2 son visiblemente sanas, y responden a la co-inoculación con JD2 y U143 sin resistirse a la colonización. En un diagrama de flujos la co-inoculación fomentaría en la planta:



Los resultados de colonización radicular (primer objetivo) aparecen en el manuscrito: The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. JD2: an interaction that improves plant yield. 2014. Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S. Molecular Plant Microbe Interaction. DOI: 10.1094/MPMI-08-14-0229-R. El mismo se adjunta en el Anexo III.

4.2. Mejoramiento de la productividad vegetal

4.2.1. Introducción

Las raíces de las plantas y el suelo bajo su influencia (rizosfera) son un hábitat propicio para el desarrollo de microorganismos. Las raíces exudan azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, vitaminas y proteínas que satisfacen muchos requerimientos nutricionales básicos para sus microorganismos asociados; así como también sustancias atrayentes y promotoras del establecimiento bacteriano en la propia rizosfera (Zehfuss 2008). Los efectos positivos, asociados a la promoción del crecimiento vegetal, que las poblaciones microbianas ejercen sobre las plantas van desde la producción de sustancias que aumentan la bio-disponibilidad de nutrientes, a la síntesis de compuestos químicos que estimulan el crecimiento vegetal, o antagonizan patógenos de plantas (antibióticos, biofilms), entre otros (Bais et al 2006). Las bacterias que desarrollan alguno de estos efectos beneficiosos para las plantas se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) (Kloepper y Schroth 1978).

Inoculantes microbianos.- La importancia de las BPCV a nivel agronómico se ha demostrado luego de muchos años de investigación y comprobación a nivel de campo. Su inoculación en semillas o su aplicación directa al suelo mejora la productividad, calidad y salud vegetal, y/o reduce la aplicación de pesticidas y fertilizantes químicos (Morel et al 2012; Berg 2009; Adesemoye et al 2009). La promoción del crecimiento vegetal por las BPCV se logra luego que éstas colonizan la rizosfera y/o las raíces, y ocurre a través de la producción de macro y micronutrientes, fitohormonas y otros mecanismos (Bajsa et al 2013).

Existe en la actualidad una fuerte tendencia hacia la reducción del uso de fertilizantes y plaguicidas químicos y al desarrollo de una agricultura sostenible. Esto incluye la introducción a los agro-ecosistemas de BPCV que actúan positivamente sobre el desarrollo vegetal (Morel et al 2012). De esta forma, se busca un manejo integrado de plagas (biocontrol), en conjunto con un aumento de la productividad por el uso de fertilizantes eco-amigables conteniendo microorganismos.

Los inoculantes microbianos pueden clasificarse en:

- Bio-fertilizantes. Contienen BPCV que mejoran el estado nutricional de la planta al incrementar el suministro o disponibilidad de los nutrientes (Morel et al 2012; Pliego et al 2011). Algunos ejemplos, son los rizobios y *Azotobacter* spp. que fijan el N atmosférico en asociación con leguminosas (Lindström et al 2010) y cereales (Mahfouz y

Sharaf-Eldin 2007), respectivamente; y las bacterias solubilizadoras de fosfato, que aumentan el fósforo disponible para la planta (Das et al 2007).

- Fito-estimuladores. Contienen BPCV que colaboran con el desarrollo del sistema radicular, la germinación de las semillas y el crecimiento general de la planta (Hussain y Hasnain 2011). Algunos ejemplos son: 1) las bacterias del género *Azospirillum*, cuyos efectos incluyen cambios morfológicos y fisiológicos en el sistema radicular (aumentos en la proliferación y en las tasas de elongación radicular), con el consiguiente aumento en la toma de agua y nutrientes (Baudoin et al 2009; El Zemrany et al 2006); y 2) las micorrizas arbusculares, que aumentan el desarrollo del sistema radicular colaborando en la absorción de nutrientes desde el suelo, y aumentan la tolerancia a sequías y factores bióticos (Rao et al 2007; Chen 2006).
- Bio-pesticidas. Contienen microorganismos, o productos derivados, que controlan poblaciones fitopatógenas (Glare et al 2012; Ash 2010). Generalmente poseen efectos letales o inhibitorios sobre el crecimiento y desarrollo de las plagas (por parasitismo, antagonismo o alelopatía) (Bailey et al 2010). Los ejemplos más frecuentes en la literatura son algunas bacterias del género *Bacillus* (Chandler et al 2008; Brar et al 2006), y *Pseudomonas* spp. (Molloy et al 2013; Chakravarty y Kalita 2013; Hynes y Boyetchko 2006).
- Bio-saborizantes o agentes biológicos mejoradores del sabor. Aunque no se comercializan aún, esta categoría de inoculantes presentaría bacterias que *in vitro* afectan el metabolismo de la planta influyendo directamente sobre la calidad y el sabor de los frutos (Berg 2009). El ejemplo reportado hasta la fecha es *Methylobacterium*, que mejora el sabor de las frutillas (Verginer et al 2010).

Hoy en día, los agricultores están familiarizados con la aplicación de inoculantes microbianos disponibles comercialmente, cuyos microorganismos han sido especialmente seleccionados por su capacidad para promover eficazmente el crecimiento de las plantas, protegerlas y/o aumentar la biodisponibilidad de nutrientes del suelo (Morel et al 2012). Los nuevos avances en la investigación sobre inoculantes utilizan la estrategia de la co-inoculación, que integra varias BPCV, y que sería más efectiva que el tratamiento de las plantas con una sola BPCV (Morel et al 2012; Berg 2009). Por ejemplo, Star et al (2012) demostraron que el uso combinado de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *A. brasilense*, en arveja (*Vicia sativa*), resulta en una mayor nodulación y un aumento significativo de la biomasa vegetal, comparado con la inoculación simple con el rizobio. Los reportes en la literatura sobre co-inoculantes o formulaciones múltiples son abundantes (Younesi et al 2013; Juge et al 2012; Malik et al 2011; Fox et al 2011). A pesar del gran progreso y el

creciente interés en las formulaciones mixtas, sobre todo para el cultivo de leguminosas, hay pocos productos comerciales disponibles.

Se ha demostrado que la inoculación combinada de leguminosas con rizobios y otras BPCV aumenta la productividad vegetal cuando se compara con la inoculación simple tradicional (Morel y Castro-Sowinski 2013; Okon y Vanderleyden 1997). El ejemplo más conocido es la co-inoculación con *Azospirillum*, un microorganismo capaz de fijar N en vida libre y de producir fitohormonas y sideróforos (Perotti y Pidello 1999). Se han reportado también muchos ejemplos de bacterias y hongos micorrícicos que favorecen la absorción de nutrientes por las plantas y la FBN (Morel et al 2012; Silveira 1992). Según algunas experiencias reportadas para BPCV, en general el incremento del rendimiento de leguminosas co-inoculadas se asocia con una mayor FBN, redundando en un aumento de la producción vegetal.

El uso de varias BPCV en formulaciones puede suplementarse con el agregado de protectores microbianos que aumentan la sobrevivencia de las BPCV, o que permiten una inoculación anticipada a la siembra sin afectar la eficiencia en la nodulación, entre otros. En la misma línea de pensamiento, Marks et al (2013) reportaron que el uso de metabolitos producidos por rizobios en paralelo a la aplicación de co-inoculantes a base de *Bradyrhizobium* spp. y *Azospirillum brasilense* aumenta el desarrollo de soja y maíz.

Delftia sp. JD2 es un microorganismo capaz de promover el crecimiento de trébol (*Trifolium repens*) y alfalfa cuando se co-inocula con sus rizobios en condiciones gnotobióticas (Ubalde et al 2012; Morel 2010). Durante la co-inoculación *in vitro* de alfalfa y trébol con rizobios y JD2 se produce un aumento de la tasa de nodulación y del rendimiento vegetal, comparado con la inoculación simple (Ubalde et al 2012; Morel et al 2011). A su vez, algunos estudios realizados en condiciones de invernáculo demostraron un efecto similar de promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas de soja (*Glycine max*) en condiciones de co-inoculación con *Delftia* sp. JD2 y *Bradyrhizobium elkanii* U1301 (Braña V, comunicación personal). Hasta el momento no se había evaluado el crecimiento de alfalfa en condiciones de co-inoculación, en invernáculo. Por ello, se decidió continuar con el escalado experimental agregando una variable más al análisis: los exudados producidos por la planta y las bacterias (conteniendo los metabolitos relacionados con la actividad promotora del crecimiento vegetal de alfalfa) recolectados desde soluciones de hidroponia (ver sección 4.3).

En base a estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: *La productividad del cultivo de alfalfa aumenta mediante el uso de una formulación mixta*

conteniendo *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 y esta además es aún mayor si la formulación se aplica en conjunto con metabolitos rizo-bacterianos.

4.2.2. Objetivos planteados

- I. Determinar la concentración de JD2 óptima para promover el crecimiento de alfalfa en el contexto de una co-inoculación con el sinorizobio del inoculante comercial nacional, en condiciones controladas de gnotobiosis.
- II. Evaluar el efecto de la co-inoculación sobre el crecimiento en invernáculo
- III. Evaluar el crecimiento vegetal y cinética de nodulación en presencia de líquidos conteniendo exudados, en condiciones gnotobióticas y de invernáculo.

4.2.3. Resultados

- I. *Determinación de la relación rizobio-JD2 óptima para la promoción del crecimiento vegetal*

Con el fin de determinar la mejor concentración de células de JD2 capaz de producir el mayor efecto promotor del crecimiento de alfalfa, se evaluaron dos condiciones (manteniendo constante el número de células de U143), en ensayos de inoculación y co-inoculación de plantas de alfalfa, *in vitro*.

Co-inoculación con U143 y JD2.- Los resultados muestran que la co-inoculación de las plantas de alfalfa con el sinorizobio del inoculante comercial y 1×10^6 células de JD2 por semilla aumentó el rendimiento en PS de las plantas, en términos absolutos, con un incremento en el rendimiento vegetal del 10% (Cuadro 4.3). Aunque dicho aumento no fue estadísticamente significativo en relación a las plantas inoculadas con el sinorizobio, los resultados son promisorios si se considera que un aumento del 5% en el rendimiento vegetal es de gran relevancia en términos agronómicos. Se observó además una mayor tasa de nodulación (0,44 nódulos por planta por día) en plantas co-inoculadas con 1×10^6 células de JD2 por semilla, en comparación con la inoculación simple con U143 (0,33 nódulos por planta por día).

Los tratamientos de co-inoculación con U143 y *A. brasilense* Sp7 se utilizaron como controles positivos de co-inoculación, debido a que se conocen sus efectos sobre el

crecimiento y nodulación (Dardanelli et al 2008; Burdman et al 1997; Volpin et al 1996). Los resultados obtenidos para la co-inoculación con U143 y JD2 fueron de hecho similares a los de este control positivo: aumento del rendimiento vegetal para las plantas co-inoculadas con U143 y Sp7, en relación a la inoculación simple con U143 y promoción de la nodulación. Los resultados indicarían que JD2 y Sp7 presentan efectos similares.

Cuadro 4.3. Efecto de la inoculación con *Delftia* sp. JD2 y la co-inoculación con *S. meliloti* U143 sobre el crecimiento de plantas de alfalfa *in vitro*. La biomasa vegetal se cuantificó en términos de peso seco (PS). El rizobio se inoculó en una concentración de 1×10^7 células por semilla. Se muestran dos concentraciones de células de JD2 por semilla. Se utilizó a *A. brasilense* Sp7 como control positivo (promotor del crecimiento en co-inoculación), en las mismas concentraciones de células utilizadas para JD2. Se indican los tratamientos sin fertilización nitrogenada (-) y los fertilizados con N (+). El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05%, p/v, c.f.). Los tratamientos control corresponden a plantas sin inocular. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Tratamiento	Células de JD2 o Sp7/semilla	N	PS(mg/planta)
Control (-)	-	-	$4,2 \pm 0,8_d$
Control (+)	-	+	$8,4 \pm 0,3_b$
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2	1×10^4	-	$4,8 \pm 1,0_{cd}$
	1×10^4	+	$11,6 \pm 1,3_a$
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2	1×10^6	-	$4,0 \pm 0,9_d$
	1×10^6	+	$10,8 \pm 1,7_a$
Inoculación con <i>S. meliloti</i> U143	-	-	$6,3 \pm 0,3_c$
Co-inoculación con U143 y JD2	1×10^4	-	$5,2 \pm 1,0_{cd}$
	1×10^6	-	$7,0 \pm 0,5_{bc}$
Inoculación con <i>A. brasilense</i> Sp7	1×10^4	-	$4,6 \pm 1,1_{cd}$
	1×10^4	+	$10,5 \pm 2_{ab}$
Inoculación con <i>A. brasilense</i> Sp7	1×10^6	-	$4,0 \pm 1,3_d$
	1×10^6	+	$11,8 \pm 3_a$
Co-inoculación con U143 y Sp7	1×10^4	-	$8,8 \pm 2_{abc}$
	1×10^6	-	$6,5 \pm 0,8_c$

Inoculación simple con JD2.- Dada la similitud en efectos entre la co-inoculación de JD2-U143 y de Sp7-U143, se evaluó si JD2 es también capaz de promover el crecimiento de alfalfa cuando las plantas se fertilizan con una dosis inicial de N (diN), tal como se ha reportado en *Azospirillum* (Okon y Labandera-Gonzalez 1994).

Se compararon los efectos sobre el crecimiento vegetal, de ambas bacterias (JD2 y Sp7) inoculadas en condiciones de baja fertilización con N (diN) y por lo tanto de inhibición de la actividad nitrogenasa. Se observó que la inoculación con JD2 o Sp7 aumentó significativamente el PS aéreo de plantas en relación a las plantas control con fertilización mínima. Este aumento se observó en las dos concentraciones de células ensayadas (Cuadro 4.3). Estos resultados sugieren que el efecto promotor observado para JD2 probablemente se explique por la producción de AIA, tal cual se ha reportado para los azospirillos (Dardanelli et al 2008; Burdman et al 1997; Volpin et al 1996).

La inoculación con JD2 o Sp7 en plantas que no recibieron fertilización nitrogenada no mejoró el rendimiento vegetal final de las plantas, independientemente de la concentración de células utilizada (Cuadro 4.3). Este dato sugiere que JD2 y Sp7 no contribuirían al *pool* de N disponible para el crecimiento de las plantas, y que la capacidad de FBN (probada en vida libre para ambas bacterias) probablemente no esté involucrada en el efecto promotor.

II. Evaluación del crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de co-inoculación, en invernáculo

Como forma de escalado, se realizaron experimentos de co-inoculación de plantas en condiciones de invernáculo, utilizando macetas conteniendo un sustrato no estéril (mezcla de tierra, arena y vermiculita). El objetivo fue confirmar el efecto promotor del crecimiento de alfalfa por *Delftia* sp. JD2 cuando se co-inocula con el sinorizobio, utilizando la relación de células determinada en el punto anterior.

Además, se agregaron al diseño experimental tratamientos de plantas que recibieron una dosis inicial de N, para confirmar si JD2 es capaz de promover el crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de baja fertilización nitrogenada (ver punto anterior).

Inoculación simple con JD2.- Los resultados se muestran en el Cuadro 4.4. En el mismo se observa que la inoculación simple con JD2, de plantas que no se fertilizaron con N, no aumentó el rendimiento vegetal. Sin embargo, su inoculación en plantas que recibieron una dosis inicial de N (diN) al comienzo del ensayo, tuvo efectos importantes sobre el crecimiento radicular, logrando aumentos del 59 y 48% en PS, en relación a las plantas control y control (diN), respectivamente (Cuadro 4.4). Este aumento significativo en la biomasa radicular no se vio reflejado en la biomasa aérea, aunque se detectó un incremento no significativo del 6% en el rendimiento de la parte aérea. Sería interesante

determinar el estado fisiológico de la planta mediante otras determinaciones, por ejemplo, determinando el contenido de Chl. En conjunto, los resultados confirman que JD2 afectaría el desarrollo del sistema radicular y esto posiblemente se deba a la producción de AIA. Muchos de los efectos positivos de esta fitohormona sobre el crecimiento vegetal se producen a nivel del sistema radicular de las plantas (Morel y Castro-Sowinski 2013).

Cuadro 4.4. Efecto de la inoculación con *Delftia* sp. JD2 y su co-inoculación con *S. meliloti* U143 en el crecimiento de plantas de alfalfa en condiciones de invernáculo. La biomasa se expresó en mg de peso seco (PS) por planta. Los tratamientos control (-) corresponden a plantas sin inocular. Los símbolos (diN) y (+) indican los tratamientos que recibieron fertilización de N una única vez previo a la siembra y a lo largo de todo el ciclo, respectivamente. El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05%, p/v, c.f.). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Tratamiento	PS aéreo (mg/planta)	PS radicular (mg/planta)
Control (-)	120±8 _b	270±50 _c
Control (diN)	178±14 _c	290±50 _c
Control (+)	280±30 _a	450±60 _a
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2	130±6 _{bc}	300±60 _{abc}
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 (diN)	189±24 _c	430±60 _a
Inoculación con <i>Delftia</i> sp. JD2 (+)	195±20 _c	301±50 _{abc}
Inoculación con <i>S. meliloti</i> U143	150±26 _c	270±20 _c
Co-inoculación	170±26 _c	360±50 _{ab}

Co-inoculación con U143 y JD2. - La co-inoculación de las plantas aumentó la biomasa aérea (en términos de PS) en un 13% (aunque el valor no fue estadísticamente significativo en relación a las plantas inoculadas con U143) (Cuadro 4.4). La biomasa radicular presentó un incremento significativo del 33%, en relación tanto a las plantas control como aquellas inoculadas con U143. Los resultados plantean un efecto beneficioso de la co-inoculación sobre el desarrollo del sistema radicular, y en las condiciones ensayadas.

III. Evaluación del crecimiento vegetal y cinética de nodulación en presencia de exudados, en condiciones gnotobióticas

Se evaluó el efecto del agregado de exudados libres de células, en la forma de un riego inicial al medio mineral (Jensen semisólido), sobre el crecimiento y nodulación de las plantas. Estas a su vez se inocularon con U143 o co-inocularon con U143 y JD2. Se evaluó el efecto del riego con los *exudados radiculares*, *exudados radiculares-rizobianos* y *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* sobre el crecimiento vegetal. Todos los exudados fueron producidos en hidroponía y colectados a los cuatro días posteriores a la inoculación de las plantas, según se describe en Materiales y Métodos.

Los nódulos activos se detectaron a los ocho días desde la inoculación de las plantas, en todas las condiciones ensayadas. En todos los casos el número aumentó hasta el día 20, alcanzando un máximo de nódulos similar, excepto en las plantas co-inoculadas y crecidas en medio suplementado con *exudados radiculares-rizobianos*, que presentaron siempre el mayor número de nódulos por planta a lo largo del monitoreo, alcanzando el máximo número a los 15 días (más temprano que el resto de los tratamientos) (Fig. 4.2).

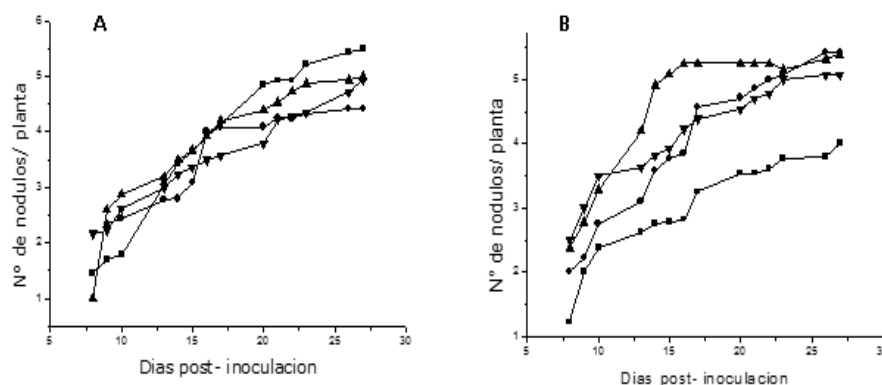


Figura 4.2. Cinética de nodulación en plantas de alfalfa inoculada con *S. meliloti* U143 (A) y co-inoculada con JD2 y U143 (B). Se muestra los tratamientos de plantas control (■) (sin agregado de exudados de ningún tipo), y plantas suplementadas con: exudados radiculares de alfalfa (●), exudados radiculares-rizobianos (▲) y *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* (▼). En todos los casos se empleó una concentración de 1×10^7 y 1×10^6 células de *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 por semilla, respectivamente.

Analizando el Cuadro 4.5, se observa que las tasas de nodulación fueron mayores en las plantas co-inoculadas, en relación a las plantas inoculadas con U143 (sin importar que tipo de exudado recibieron como riego), sugiriendo el efecto positivo de la co-inoculación *per se* en la velocidad de nodulación.

Cuadro 4.5. Tasas de nodulación (número de nódulos por planta y por día) y crecimiento vegetal (PS de parte aérea/planta) en ensayos de inoculación simple con U143 y co-inoculación con U143 y JD2 y bajo condiciones de suplemento con exudados hidropónicos. En todos los casos se empleó una concentración de 1×10^7 y 1×10^6 células de *S. meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 por semilla, respectivamente. Los exudados hidropónicos utilizados como suplemento se produjeron en hidroponía tal como se describió en el punto 3.1.3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma columna ($P < 0,05$).

Suplemento agregado al sustrato de crecimiento	Número de nódulos/planta.día		Peso seco de parte aérea/planta	
	Inoculación con U143	Co-inoculación	Inoculación con U143	Co-inoculación
Control	0,46	0,56	2,94±0,47 _a	3,54±0,57 _{bc}
Exudados radiculares de alfalfa	0,24	0,41	3,08±0,55 _{ab}	3,14±0,40 _{ab}
<i>Exudados radiculares-rizobianos</i> (U143)	0,20	0,44	3,91±0,43 _c	4,18±0,5 _c
<i>Exudados rizo-bacterianos</i> (U143-JD2)	0,21	0,60	2,64±0,43 _a	3,83±0,48 _{bc}

Si analizamos el efecto del agregado de cada tipo de exudado sobre la inoculación y co-inoculación, encontramos que:

- 1) En el control (sin agregado de exudados) se confirma el efecto positivo de la co-inoculación sobre el PS aéreo y nodulación de las plantas, tal como se reportó en el punto I de resultados (Cuadro 4.5).
- 2) El agregado de *exudados radiculares* (de alfalfa sin inocular) no promovió un aumento del PS aéreo de las plantas co-inoculadas, ni inoculadas con U143. Si bien se duplicó la tasa de nodulación en plantas co-inoculadas, respecto a las inoculadas con U143 (0,41 vs 0,24), en ambos tratamientos las tasas fueron menores a las observadas en plantas control (0,56 y 0,46). Este resultado sugiere que existiría un efecto inhibitorio sobre la nodulación producido por las moléculas presentes en estos exudados de alfalfa (Cuadro 4.5).
- 3) El agregado de *exudados radiculares-rizobianos*, aumentó significativamente el PS aéreo de las plantas inoculadas, pero no de las plantas co-inoculadas, respecto a las plantas

control. También se duplicó la tasa de nodulación de plantas co-inoculadas (0,44 vs 0,20). Sin embargo, ambas fueron menores en relación a las plantas control sin riego (0,46). (Cuadro 4.5).

4) El agregado de *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, aumentó significativamente el PS aéreo de las plantas co-inoculadas y triplicó su tasa de nodulación (0,6 vs 0,21), en relación a las inoculadas con el rizobio. No hubo efectos significativos en relación a las plantas control sin riego, aunque se notó un ligero aumento en la tasa de nodulación de las plantas co-inoculadas con riego frente a las control (0,60 vs 0,56).

El hecho de que las plantas inoculadas con el sinorizobio presente siempre una disminución en la tasa de nodulación debido al agregado de exudados de cualquier tipo, sugiere que ocurriría una inhibición de la nodulación debido a las moléculas presentes en los exudados, posiblemente originados por la planta.

Esta inhibición de la nodulación ocurre también, pero en menor grado, en plantas co-inoculadas y suplementadas con *exudados radiculares* y *radiculares-rizobianos*, pero no en las suplementadas con *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* (siempre en relación a las plantas control sin riego) (Cuadro 4.5).

Los resultados en su conjunto permiten proponer que::

1) la co-inoculación *per se* promueve el crecimiento vegetal y mejora la nodulación de las plantas; y 2) la co-inoculación y el suplemento con *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* podría tener un mayor efecto promotor del crecimiento vegetal que la co-inoculación sola.

A continuación, se decidió analizar el efecto de la co-inoculación y el agregado de *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)* sobre el crecimiento de las plantas, en condiciones de invernáculo. La selección este tipo de exudado se basó además en la mayor concentración de señales moléculas involucradas en la interacción microorganismo-planta detectadas según se mostrará en la próxima sección de resultados (4.3, “Moléculas involucradas en la interacción temprana planta-microorganismos”).

IV. *Evaluación del crecimiento vegetal de plantas creciendo en presencia de exudados rizo-bacterianos (U143-JD2), en invernáculo*

Se evaluó el efecto del agregado de *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* sobre el PS aéreo y radicular de alfalfa en ensayos de macetas, en invernáculo. Los exudados se agregaron al sustrato de crecimiento previo a la siembra de las semillas, tal como se indicó en el punto 3.3.2 de *Materiales y Métodos*. Se evaluaron además cuatro condiciones de inoculación: control sin inocular; inoculaciones simples con U143 o JD2 y co-inoculación con U143 y JD2. El crecimiento se evaluó en función del PS de los tejidos aéreos y radiculares de las plantas (Cuadro 4.6).

Evaluación del crecimiento aéreo.- La presencia de *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* en el sustrato de crecimiento provocó un aumento en la biomasa aérea de las plantas, independientemente del tratamiento de inoculación que éstas hayan recibido. El agregado incrementó en un 85% el rendimiento de plantas control, sugiriendo que los exudados presentan moléculas capaces de estimular el crecimiento vegetal. A excepción de las plantas fertilizadas, todas aumentaron su PS aéreo debido al agregado de exudados, aunque este efecto no fue significativo en las plantas co-inoculadas (Cuadro 4.6).

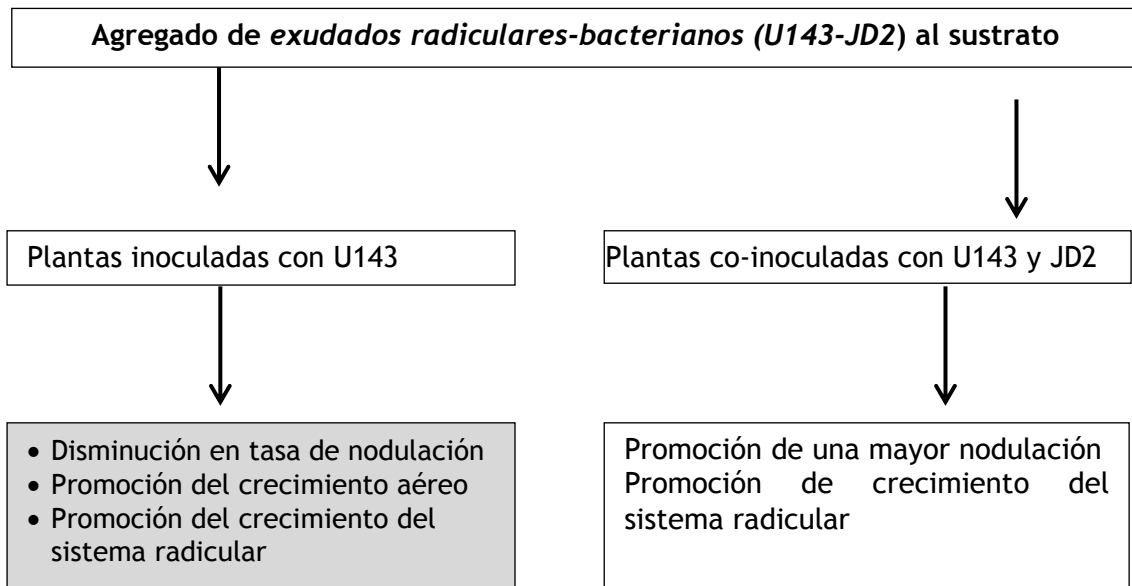
Al examinar entre si los tratamientos que recibieron exudados (segunda columna, Cuadro 4.6), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, excepto con el control nitrogenado, sugiriendo que el agregado del exudado *per se* es suficiente para aumentar el rendimiento vegetal.

Cuadro 4.6. Efecto del agregado de *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* sobre el crecimiento (Peso seco/planta) de plantas inoculadas o co-inoculadas, en condiciones de invernáculo. Los tratamientos control (-) y (+) corresponden a plantas sin inocular sin fertilización y fertilizadas con N, respectivamente. El N se suministró en forma de KNO_3 (0,05%, p/v, c.f.). Los exudados hidropónicos *rizo-bacterianos (U143-JD2)* utilizados como suplemento se produjeron en hidroponia en condiciones de co-inoculación de alfalfa con U143 y JD2, tal como se describió en el punto 4.1.3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). Se muestran entre paréntesis en la segunda y cuarta columna, los porcentajes (%) de aumento de PS en relación a la primera y tercera columna, respectivamente, indicadas como “sin agregado”.

Tratamiento	Peso seco aéreo (mg/ planta)		Peso seco radicular (mg/ planta)	
	Sin agregado	Con agregado	Sin agregado	Con agregado
Control (-)	120±8 _d	223±25 _b (85%)	270±50 _{cbd}	315±40 _{bcd} (17%)
Control (+)	281±14 _a	262±14 _a (0)	421±41 _a	448±59 _a (6%)
Inoculación con JD2	127±60 _d	225±21 _b (77%)	296±5 _{bcd}	318±40 _{bcd} (7%)
Inoculación con U143	149±21 _{cd}	220±16 _b (47%)	267±10 _b	475±38 _a (77%)
Co-inoculación	170±30 _{ed}	207±26 _{eb} (22%)	360±50 _d	442±25 _a (23%)

Evaluación del crecimiento radicular.- Al igual que se observó con la biomasa aérea, la presencia de exudados en el sustrato de crecimiento provocó aumentos en la biomasa radicular de las plantas, independientemente de la inoculación que estas hayan recibido. Sin embargo, estos aumentos solo fueron estadísticamente significativos en las plantas co-inoculadas y las inoculadas con U143 (Cuadro 4.6.).

En conjunto, los resultados de las secciones III y IV sugieren que los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, presentan moléculas capaces de promover el crecimiento de alfalfa, produciendo un mayor desarrollo de parte aérea y radicular. Los efectos se resumen en el siguiente diagrama:



4.2.4. Discusión

Los resultados del ensayo del crecimiento de alfalfa inoculada con JD2 (no fertilizadas) no mejoró el rendimiento vegetal; sin embargo, se destaca el fuerte efecto de JD2 sobre el PS de plantas que recibieron una dosis inicial exógena de N, y en especial su impacto sobre el desarrollo del sistema radicular, evidenciado en los ensayos de invernáculo. Estos resultados sugieren que el efecto promotor de JD2 probablemente se deba a su capacidad de producir AIA (hormona que promueve el desarrollo radicular), y que la fijación de N (inhibida por la presencia de N) probablemente no contribuya al *pool* de N disponible para la planta. El AIA es la principal auxina en plantas, y controla múltiples procesos, entre ellos, estimula el desarrollo de raíces adventicias, la formación de raíces laterales, la diferenciación tisular de células radiculares y ejerce control sobre la respuesta de la raíz y el tallo a luz y a la gravedad (Davies 1995). En plantas, la hormona se sintetiza a partir de Trp o de indol, principalmente en los primordios foliares, las hojas jóvenes y en las semillas en desarrollo, aunque muchas bacterias rizosféricas son capaces también de sintetizar AIA, principalmente utilizando Trp como precursor (Etesami et al 2009).

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, se comprobó que JD2 es capaz de producir AIA y sideróforos, y fijar N en vida libre (detectada por ensayos de reducción de acetileno) (Morel 2010); sin embargo, los resultados actuales indicarían que la nitrogenasa de JD2 no sería activa durante la interacción de la bacteria con la planta.

Igualmente es necesario corroborar esta hipótesis realizando ensayos de fijación de N en plantas bajo las diferentes condiciones planteadas en este trabajo. Las defltias podrían tener un papel importante para el desarrollo vegetal, siendo miembros habitué de la microbiota asociada a algunas plantas que crecen en condiciones de fertilización nitrogenada, tal cual lo sugieren Rodriguez Coelho et al (2008). Estos autores, en estudios de diversidad de diazotrofos en la rizosfera de sorgo bajo dos condiciones de fertilización contrastantes de N, detectaron el gen *nifH* de *Delftia* spp. únicamente en la condición de mayor fertilización de N. Probablemente, la capacidad de JD2 de producir AIA y sideróforos puedan entonces explicar su efecto promotor del crecimiento de alfalfa.

En general, los resultados obtenidos para plantas inoculadas con JD2 fueron similares al comportamiento reportado para la inoculación con cepas de *A. brasilense*. Este último es un fijador de N en vida libre, que promueve el crecimiento vegetal al incrementar la superficie radicular de las plantas, debido a la producción de AIA y no a la FBN (Pliego et al 2011; Burdman et al 1997; Okon y Vanderleyden 1997). Las observaciones que avalan esta afirmación son: la emulación del efecto promotor del desarrollo de las raíces por la aplicación de auxinas exógenas (Dobbelaere et al 1999); la falta de efecto sobre las raíces de mutantes de *A. brasilense* con reducida capacidad de producción de AIA; el mayor efecto promotor del crecimiento por cepas de *A. brasilense* que sobre-expresan la producción de AIA (Spaepen et al 2008); y el mayor efecto sobre la productividad vegetal por cepas de *Azospirillum* cuando las plantas reciben fertilización nitrogenada (se inhibe por tanto la nitrogenasa) (Okon y Labandera-Gonzalez 1994).

Los resultados también muestran que en las diferentes condiciones ensayadas (hidroponia, semi-sólido e invernáculo), la co-inoculación incrementa la productividad vegetal, superando las expectativas agronómicas. Tomados en conjunto, los resultados confirman el efecto promotor de JD2 cuando se co-inocula junto con U143, probablemente auxiliando al sinorizobio durante su interacción con la planta, tal como se ha reportado previamente para *Azospirillum* spp. (Dardanelli et al 2008; Burdman et al 1997; Volpin et al 1996).

Existen numerosos trabajos con resultados positivos sobre el mejoramiento de la productividad vegetal cuando se co-inoculan leguminosas (Morel et al 2012). Los géneros más estudiados al respecto, e identificados como cooperadores de las simbiosis rizobio-leguminosa, son: *Azospirillum* (Cassán et al 2009); *Bacillus* (Mishra et al 2009, Bullied et al 2002) y *Pseudomonas* (Fox et al 2011; Egamberdieva et al 2010), entre otros. Finalmente, los resultados sugieren que *Delftia* podría ser incluido en la lista de bacterias potencialmente útiles para el diseño de formulaciones comerciales, especialmente para leguminosas.

Se determinó además que el complejo coctel de moléculas presentes en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* colectados a los cuatro días tiene un efecto promotor, *per se*, sobre el crecimiento vegetal en invernáculo. Una mirada general sobre los resultados muestra que el agregado de exudados al sustrato de crecimiento, afecta a las plantas y produce un incremento del sistema radicular y aéreo, sugiriendo que los exudados presentan moléculas que tendrían un rol importante sobre el establecimiento de la interacción planta-bacteria, mejorando la actuación o función del sinorizobio en las plantas co-inoculadas. Estas moléculas serían parte de las señales de comunicación tanto entre los microorganismos y la planta, como entre los diferentes microorganismos entre si y además incluyen moléculas producidas en forma constitutiva por alfalfa.

El efecto del agregado de metabolitos bacterianos sobre el crecimiento de plantas se ha estudiado previamente. Marks et al (2013) por ejemplo, demostraron que el agregado de metabolitos producido por *Bradyrhizobium spp.*, mejora el rendimiento de las plantas de soja, incrementando en un 4,8% el rendimiento en grano. Incluso el agregado de concentraciones submolares de FN a semillas de *Medicago truncatula*, inoculadas con rizobios, incrementa el número de nódulos por planta (Macchiavelli y Brelles-Marino 2004). En soja, Molla et al (2001) encontraron una promoción del crecimiento radicular por el agregado de sobrenadantes libres de células de *A. brasilense Sp7* o de AIA, en condiciones de invernáculo.

Más allá de estos reportes, no se encontraron referencias publicadas sobre los beneficios de combinar la co-inoculación y el agregado de *exudados rizo-bacterianos* sobre el crecimiento y rendimiento de alfalfa. La presencia de compuestos claves, producidos y acumulados en los *exudados rizo-bacterianos* en los primeros cuatro días de interacción (ver siguiente sección 4.3), explicaría el efecto positivo evidenciado sobre el crecimiento vegetal.

Parte de los resultados de esta sección aparecen en los siguientes manuscritos:

- Morel M, Ubalde M, Braña V y Castro-Sowinski S. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI) reducing agent with plant growth promoting activity. Arch. Microbiol.193:63-68. El mismo se adjunta en el Anexo II.
- Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S. 2014. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. JD2: an interaction that improves plant yield. 2014. DOI: 10.1094/MPMI-08-14-0229-R. El mismo se adjunta en el Anexo III.

4.3. Moléculas involucradas en la interacción planta-microorganismo

4.3.1. Introducción

Desde un punto de vista agrario, la FBN es un proceso importante por incrementar la productividad vegetal de leguminosas, gracias a que los rizobios aumentan el N disponible para el crecimiento de las plantas. Al ser la simbiosis leguminosa-rizobio un proceso tan complejo, se ve influido 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 e Iglesias 2001).

Una mayor y más eficiente nodulación se logra si la planta se inocula de forma combinada con rizobios y BPCV seleccionadas especialmente para ello. Este incremento de la productividad puede deberse a que cambia el patrón de moléculas de comunicación entre la planta y los microorganismos, induciendo un aumento importante de la actividad biológica en el entorno radicular (Tan 1994). Se estima que entre el 10 y el 50% del carbono asimilado por las plantas, a través de la fotosíntesis, se elimina por las raíces como exudados en la forma de varios tipos de moléculas (Hinsinger et al 2006). El papel que desempeñan estas moléculas en la mayoría de las plantas superiores es de gran importancia para los microorganismos rizosféricos, ya que estos compuestos estimulan la movilidad de los microorganismos hacia las raíces, actúan como nutrientes y se encargan también de inducir la expresión de genes, entre otros.

Los exudados radiculares están constituidos por ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, aminoácidos, fitohormonas, azúcares y enzimas, y muchos otros compuestos (Morel y Castro-Sowinski 2013; Sandnes et al 2005). Son estas moléculas las que aparecen involucradas directamente en el establecimiento de las interacciones mutualistas entre las leguminosas y los rizobios.

El caso más estudiado, en cuanto a su composición y rol, son los exudados radiculares producidos durante la simbiosis leguminosas-rizobio (Morel y Castro-Sowinski 2013; Narula et al 2009). Tanto la composición como la cantidad de los exudados radiculares están influenciadas por: 1) factores de la planta, como el genotipo, el estado de crecimiento, 2) las condiciones ambientales, y 3) la comunidad microbiana presente en la rizosfera (Wu et al 2008).

Entre los metabolitos secundarios que los microorganismos pueden secretar se encuentran (Morel y Castro-Sowinski 2013):

- las fitohormonas que afectan la división y diferenciación celular, la arquitectura y aérea radicular, así como el funcionamiento general.
- algunos compuestos orgánicos volátiles (VOC, del inglés *volatile organic compounds*), con funciones que van desde la antibiosis, la inducción de diferentes rutas de señalización dependientes de fitohormonas, a la activación del sistema de defensa de la plantas, entre otros.
- los flavonoides, compuestos fenólicos que en el entorno de la raíz actúan como quimio-atrayentes de los rizobios y son la señal molecular clave para la inducción de los genes *nod* rizobianos que derivan en la producción del factor de nodulación (FN).
- moléculas involucradas en el fenómeno de *quorum sensing* (QS), autoinductores capaces de regular de una forma precisa la expresión de un conjunto de genes con funciones muy diversas y que controlan la densidad celular en la población (Oliva García 2008). Entre las funciones reguladas por QS, se encuentran la transferencia de plásmidos simbióticos, expresión de genes *nod*, producción de polisacáridos extracelulares, motilidad, desarrollo del simbiosoma, la FBN y desarrollo de biofilms sobre las superficies radiculares, entre otras (He y Fuqua 2006; Gonzalez y Marketon 2003). Algunas plantas además son capaces de detectar y responder frente a moléculas de origen microbiano y con funciones de QS, cambiando la secreción de compuestos que mimetizan las señales de QS e interfieren con la función de los mismos (Bauer y Mathesius 2004).
- los polisacáridos y proteínas extracelulares cumplen roles de protección frente a diferentes tipos de estrés ambiental, presentando funciones de adherencia a superficies, invasión a las células vegetales y en el establecimiento de una simbiosis efectiva, sobre todo en aquellas que desarrollan nódulos del tipo indeterminados (Skorupska et al 2006; Fraysee et al 2003). Además, estas moléculas parecen cumplir un rol inhibitorio en la respuesta de defensa en las plantas. Por ejemplo, D'haeze y Holsters (2004), demostraron que el exo-polisacárido (EPS) producido por *Azorhizobium caulinodans* forma una capa protectora que impide la entrada a la célula del H₂O₂ generado por la planta durante la invasión a la misma. En otros rizobios, los EPS se han relacionado con la inducción de respuestas típicas de defensa contra patógenos (Niehaus et al 1996).

Los resultados de la sección anterior muestran el efecto positivo de la co-inoculación con JD2 y U143 en plantas de alfalfa, pero sin dar rastros sobre cuáles son las señales bioquímicas que participan en la comunicación en los microorganismos y la planta. Bajo los

antecedentes anteriores, esta sección plantea la caracterización de los compuestos secretados por la planta y las bacterias, a los que denominamos *exudados rizo-bacterianos* (U143-JD2). Los mismos contendrían los compuestos que participan en la señalización y establecimiento de una asociación eficiente entre *Delftia*-alfalfa-*S. meliloti*, en términos de productividad vegetal. El conocimiento de estas moléculas puede aportar información para iniciar el diseño de un posible modelo de comunicación.

4.3.2. Objetivo planteado

Analizar la composición parcial de los exudados obtenidos en hidroponia, y que contienen los compuestos secretados tanto por las plantas de alfalfa y las bacterias inoculadas.

4.3.3. Resultados

Con el objeto de analizar parcialmente la composición química de los líquidos hidropónicos producidos en condiciones de co-inoculación, se analizaron las moléculas secretadas utilizando diferentes procedimientos cromatográficos, en una escala temporal, tal como se indica en Materiales y Métodos. Flavonoides, AIA, Trp se analizaron mediante HPLC-MS, los metil ester de ácidos grasos y azúcares, mediante GC-FID y los compuestos de bajo peso molecular por GC-MS.

Composición en flavonoides.- Los resultados del análisis de LC/MS se muestran en el Cuadro 4.7. Se observa que la apigenina, crisina y genisteína fueron los principales flavonoides exudados por las raíces de plantas control (sin inocular) de alfalfa. Estos tres flavonoides presentaron valores máximos de concentraciones en exudados acumulados durante los cuatro días post-inoculación. Tres días después sus concentraciones disminuyeron drásticamente, sugiriendo la degradación y/o uso de los flavonoides por la planta o las bacterias.

Cuadro 4.7. Composición química de los exudados: flavonoides (μM), ácido indol-3-acético (AIA; nM) y triptofano (Trp; μM). Para la colecta de exudados, las plantas de alfalfa se inocularon con *Delftia* sp. JD2 o *S. meliloti* U143 o se co-inocularon con ambas, en condiciones de hidroponia. La composición de los líquidos hidropónicos se analizó a los cuatro, siete y 15 días luego de la inoculación de las plantas. ND, “no detectado” en las condiciones de análisis usadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma columna ($P < 0,05$).

Exudados	Días post inoculación	Apigenina	Crisina	Genisteína	Naringenina	Naringina	Luteolina	Morina	AIA	Trp
Radiculares	4	3,464 _a	4,327 _a	3,400 _a	0,087 _a	0,098 _a	0,586 _a	ND	ND	ND
	7	0,007 _b	0,300 _b	0,005 _b	0,162 _a	ND	0,013 _{bc}	ND	ND	ND
	15	0,017 _b	0,576 _c	0,035 _b	0,810 _b	0,041 _a	0,014 _{bc}	ND	ND	0,06 _a
Radiculares-rizobianos	4	6,715 _c	9,903 _d	6,340 _c	11,271 _c	0,105 _a	0,021 _{bc}	ND	4,0 _a	0,20 _a
	7	0,152 _b	0,036 _e	0,117 _b	0,492 _d	0,036 _a	0,004 _{bc}	ND	2,4 _b	ND
	15	1,662 _b	1,688 _f	0,336 _d	2,665 _e	0,039 _a	0,001 _b	ND	ND	0,18 _a
Rizo-bacterianos (JD2)	4	0,276 _b	4,318 _a	0,730 _e	2,253 _f	0,089 _a	0,149 _{bcd}	ND	ND	0,16 _a
	7	0,026 _b	ND	0,030 _b	0,007 _a	ND	ND	ND	3,9 _a	ND
	15	0,140 _b	ND	0,084 _{bd}	0,577 _g	ND	0,035 _{bcd}	ND	ND	0,01 _a
Rizo-bacterianos (U143-JD2)	4	18,030 _d	19,393 _g	17,419 _f	0,060 _a	0,324 _b	3,073 _e	ND	ND	0,15 _a
	7	0,965 _b	8,780 _h	0,956 _a	0,909 _b	0,018 _a	0,260 _d	ND	4,7 _c	ND
	15	0,001 _b	1,178 _i	0,012 _b	0,373 _d	0,040 _a	0,126 _{bc}	ND	ND	0,02 _a

Todos los flavonoides evaluados se detectaron en sus mayores valores de concentraciones en el período más temprano (cuatro días) de interacción. A su vez, en este período, las concentraciones más altas de flavonoides se detectaron en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. En ellos, la concentración de apigenina aumentó tres veces mientras que las de crisina, genisteína y naringina aumentaron dos veces, respectivamente, en relación a los valores detectados en *exudados radiculares-rizobianos*. El contenido en naringenina, sin embargo, disminuyó drásticamente (187 veces su valor) (Cuadro 4.7).

La morina fue el único flavonoide no detectado en las condiciones de análisis. La luteolina se detectó en niveles bajos en relación al resto de los flavonoides, y en todas las condiciones y períodos evaluados. Se observó un aumento en el contenido de esta flavona, de 7 y 146 veces, en los *exudados rizo-bacterianos (JD2)* y *rizo-bacterianos (U143-JD2)*, respectivamente, en relación a los *exudados radiculares-rizobianos* (Cuadro 4.7). Al igual que con los otros flavonoides, a los siete días posteriores a la inoculación, las concentraciones de luteolina disminuyeron significativamente, aunque siempre fueron mayores en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, en comparación a los *exudados radiculares-rizobianos* (Cuadro 4.7).

Composición en AIA y Trp.- El AIA no se detectó en los exudados radiculares de plantas control en ninguno de los tres períodos evaluados. Tampoco se detectó Trp, excepto a los 15 días. Probablemente este Trp podría utilizarse para la síntesis de AIA a tiempos superiores a los 15 días. Sin embargo, si se detectó AIA en los exudados de plantas inoculadas y co-inoculadas, sugiriendo que la secreción de AIA puede estar relacionada con la presencia de los microorganismos en el sistema.

La secreción de AIA y Trp en *exudados radiculares-rizobianos* y *rizo-bacterianos (U143-JD2)* se detectó en forma alternada: en aquellos tratamientos y períodos de colecta donde se detectó AIA, no se detectó Trp y viceversa (Cuadro 4.7). Este patrón podría explicarse porque el Trp es el precursor de la síntesis de AIA, y por lo tanto, su desaparición se asociaría a la producción de la fitohormona. La concentración de AIA fue mayor en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, comparado con los restantes exudados (Cuadro 4.7).

Composición en CBPM.- Los resultados del análisis temporal de la composición de CBPM, por GC/MS, en los exudados se muestran en los Cuadros 4.8, 4.9 y 4.10. Se detectaron muchos metabolitos, principalmente carbohidratos, ácidos orgánicos, amidas y VOCs.

Comparando todos los tratamientos, se encontraron pocas diferencias en el perfil de CBPM secretados durante los cuatro primeros días de interacción (Cuadro 4.9). En los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* se detectaron algunos metabolitos que según la literatura son relevantes en las interacciones planta-microorganismo. Entre ellos, se detectó la producción de limoneno, un terpeno volátil, sintetizado por plantas, con actividad antioxidante, el cual se acumularía en los *exudados radiculares-rizobianos y rizo-bacterianos (U143-JD2)*. Otros metabolitos detectados son los ácidos hidroxibutírico, oleico, nonanoico y benzoico (Cuadro 4.8), los cuales son comúnmente detectados en los exudados radiculares (Bais et al 2006).

Con el tiempo (siete y 15 días post-inoculación), los perfiles de CBPM detectados cambiaron, mostrando una composición más diversa entre tratamientos (Cuadro 4.9 y 4.10). Se notó la aparición de varios ácidos orgánicos, derivados de la oxidación de ácidos grasos y quizás de la degradación de lignina. Estos incluyen ácidos dicarboxílicos, como el succínico, pirúvico, adípico y málico; monocarboxílicos, como los ácidos acético, láctico, butírico e hidroxibutírico; y derivados bencénicos, como los ácidos cinámico y benzoico (Cuadro 4.9 y 4.10).

Cuadro 4.8. Composición de los exudados: compuestos de bajo peso molecular (derivados de trimetil éster). Para la colecta de exudados, las plantas de alfalfa se inocularon con *Delftia* sp. JD2 o *S. meliloti* U143 o se co-inocularon con ambas, en condiciones de hidroponia. La composición de los líquidos hidropónicos se analizó a los cuatro días de la inoculación de las plantas. La columna “todos los exudados” incluye aquellos compuestos detectados en todas las plantas incluyendo el tratamiento control (exudados radiculares). El resto de las columnas detallan exclusivamente los compuestos detectados en cada tipo de exudado indicado.

Familia química	Todos los exudados	Exudados radiculares- rizobianos	Exudados rizo-bacterianos (JD2)	Exudados rizo- bacterianos (U143-JD2)
Acidos grasos	Ácido propanoico (C3:0)		Ácido nonanoico (C9:0)	Ácido nonanoico (C9:0)
	Ácido mirístico (C14:0)			Ácido oleico (C18:1 <i>cis</i> -Δ9)
	Ácido palmítico (C16:0)			
	Ácido esteárico (C18:0)			
Terpenos		Limoneno		Limoneno
VOCs	Butanodiol			
Compuestos fenólicos	Ácido Cinámico			Ácido benzoico
Ácidos orgánicos y derivados	Ácido isopropilmálico		Ácido malónico	Ácido Hidroxibutírico
	Monopalmitin			
	Ácido adípico			
	Ácido láctico			
	Ácido acético			
Amidas, aminas y otros compuestos nitrogenados	Amidas no identificadas	Caproamida		Caproamida
Carbohidratos y poli-oles	Urea			
			Arabinosa	
			Inositol	

Cuadro 4.9. Composición de los *exudados*: CBPM (derivados de trimetil éster). Para la colecta de exudados, las plantas de alfalfa se inocularon con *Delftia* sp. JD2 o *S. meliloti* U143 o se co-inocularon con ambas, en condiciones de hidroponia. La composición de los líquidos hidropónicos se analizó a los siete días de la inoculación de las plantas. La columna “todos los exudados” incluye aquellos compuestos detectados en todas las plantas incluyendo el tratamiento control (exudados radiculares). El resto de las columnas detallan exclusivamente los compuestos detectados en cada tipo de exudado indicado.

Familia química	Todos los exudados	<i>Exudados radiculares-rizobianos</i>	<i>Exudados rizo-bacterianos (JD2)</i>	<i>Exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)</i>
Acidos grasos	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido nonanoico (C9:0)	Ácido nonanoico (C9:0)	Ácido nonanoico (C9:0)
	Ácido esteárico (C18:0)	Acido laurico (C12:0)		Acido cáprico (C10:0)
				Ácido oleico (C18:1 <i>cis</i> - Δ 9)
				Acido laurico (C12:0)
				Acido mirístico (C14:0)
Acidos carboxilicos y derivados	Monopalmitin	Acido succínico	Acido láctico	Acido láctico
			Acido acético	Acido pirúvico
				Acido adípico
Amidas, aminos y otros compuestos nitrogenados	Imida de ácido succínico		Urea	2-Aminoetanol
				Urea
				Serina
				Homoserina
Carbohidratos y polioles	Glicerol	Inositol	Inositol	Galactosa
				Glucosa
				Sacarosa

Cuadro 4.10. Composición de los exudados: CBPM (derivados de trimetil éster). Para la colecta de exudados, las plantas de alfalfa se inocularon con *Delftia* sp. JD2 o *S. meliloti* U143 o se co-inocularon con ambas, en condiciones de hidroponía. La composición de los líquidos hidropónicos se analizó a los siete días de la inoculación de las plantas. La columna “todos los exudados” incluye aquellos compuestos detectados en todas las plantas incluyendo el tratamiento control (exudados radiculares). El resto de las columnas detallan exclusivamente los compuestos detectados en cada tipo de exudado indicado.

Familia química	Todos los exudados	Exudados radiculares- rizobianos	Exudados rizo-bacterianos (JD2)	Exudados rizo- bacterianos (U143-JD2)
Acidos grasos	Ácido nonanoico (C9:0)	Acido mirístico (C14:0)	Acido laurico (C12:0)	Acido butírico (C4:0)
	Ácido palmítico (C16:0)	Acido pentadecanoico (C15:0)	Ácido oleico (C18:1 <i>cis</i> -Δ9)	Acido caproico (C6:0)
	Ácido esteárico (C18:0)			Acido cáprico (C10:0)
				Acido laurico (C12:0)
				Acido mirístico (C14:0)
				Ácido oleico (C18:1 <i>cis</i> -Δ9)
VOCs		Propanediol		Metil benzoato
Acidos carboxilicos y derivados	Monopalmitin	Acido láctico	Acido láctico	Acido glicólico
		Acido adípico	Acido succínico	Acido acético
			Acido adípico	
			Acido azelaico	
			Acido benzoico	
Aminoácidos, aminas y otros compuestos nitrogenados		Carbonil diamida	Urea	
		Serina	Serina	
		Homoserina	Treonina	
			Homoserina	
Carbohidratos y poli-oles	Ribosa	Manosa	Arabinosa	Xilulosa
	Glucosa		Manosa	Lactona de ácido gulónico

Galactosa	Acido ribónico	Glicerol
mio-Inositol	Xilosa	Xilitol
	Fructosa	
	Sucrosa	
	Lactosa	
	Maltosa	
	Eritritol	
	Xilitol	
	Arabitol	
	Glicerol	
Derivados de Piridina	Acido nicotínico	

El análisis de la composición en ácidos grasos de los exudados por GC/FID, confirmó el perfil detectado por GC/MS; con la única excepción del ácido lignocérico, que se detectó en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. En general se observó un amplio espectro de ácidos grasos a los cuatro días.

En los *exudados radicales-rizobianos y rizo-bacterianos (JD2)* se encontró una composición relativa de monosacáridos similar: 25% de ribosa, 25% de celobiosa+galactosa y 50% glucosa. Sin embargo, en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* se detectó un 100% de glucosa.

4.3.4. Discusión

Una ventaja del sistema de cultivo en hidroponia es que permite recolectar las soluciones donde crece la planta, y sobre estas soluciones estudiar las moléculas producto de las secreciones que se acumulan durante su crecimiento. Esto sería prácticamente imposible en plantas cultivadas en sustratos sólidos o semi-sólidos. Los experimentos realizados bajo condiciones hidropónicas permitieron la recolección de los exudados producto del flujo bi-direccional de moléculas (Jones et al 2009), pero sin poder discriminar entre los compuestos exudados por las raíces o las bacterias cuando ambas se encuentran presentes, al menos con las herramientas utilizadas en este trabajo.

La LC/MS/MS y GC/MS son poderosas herramientas que permiten una aproximación múltiple para la detección, identificación y eventual cuantificación de compuestos fenólicos, fitohormonas y aminoácidos, entre otros (De Rijke et al 2006). La LC/MS se utiliza cada vez más para la identificación de isoflavonoides y sus derivados glicosidados (Jasiński et al 2009; Liu et al 2008). Los flavonoides, junto con los FN, son las moléculas mayormente caracterizadas en las simbiosis alfalfa-*Sinorhizobium*, y están estrechamente involucrados en el establecimiento de una nodulación efectiva (Uesugi et al 2001). Varios flavonoides se han identificado en tejidos de diferentes variedades de alfalfa, aunque todas con un perfil similar (Stochmal et al 2001a; 2001b). La mayoría de los flavonoides encontrados en alfalfa son glicósidos de apigenina, luteolina y tricina (Golawska et al 2008; Stochmal et al 2001a; 2001b). En concordancia con estos reportes, se observó por LC/MS que la apigenina, crisina y genisteína fueron los principales flavonoides exudados por las raíces de alfalfa.

El análisis químico de los exudados mostró que la acumulación de flavonoides fue máxima en los cuatro primeros días de interacción. El conjunto de flavonoides evaluados disminuyó a los siete y 15 días, cuando la nodulación estaba ya establecida. Además, las concentraciones más altas de flavonoides se detectaron en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. Además, en estas condiciones se detectó el mayor rendimiento vegetal, según se demostró en el punto anterior de esta tesis. Estos resultados sugieren que la planta reconoce a ambas bacterias (U143 y JD2) como benéficas y en respuesta secretaría sustancias capaces de promover su asociación. El rápido incremento inicial de estos flavonoides podría relacionarse con el proceso de colonización dual. Esta propuesta se apoya en el hecho de que sus concentraciones fueron significativamente más bajas en *exudados radiculares* y *exudados radiculares-rizobianos*, sugiriendo que la tasa de síntesis de flavonoides podría estar íntimamente ligada al proceso de colonización (Lugtenberg y Kamilova 2009).

La luteolina, se acumuló en mayor concentración en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. Sin embargo, sus valores fueron muy bajos respecto a los del resto de flavonoides. La luteolina es el flavonoide responsable de la inducción de los genes *nod* de los sinorizobios, y por lo tanto el más importante en el establecimiento de la simbiosis *Sinorhizobium-alfalfa* (Peters y Long 1988). Además, es una molécula quimio-atrayente (Caetano-Anolles et al 1988). Su baja concentración podría explicarse porque esta flavona se encuentra principalmente en extractos de semilla, pero no tanto en raíces de alfalfa (Zhang et al 2007; Hartwig et al 1990). En nuestra estrategia de trabajo, el tiempo cero de los ensayos de hidroponia se definió cuando las plántulas de cinco días de crecimiento se transplantaron hacia nuevo medio de crecimiento para ser inoculadas. Con este diseño experimental, es probable que la luteolina presente en las semillas se haya acumulado en el medio que se descartó previo a la inoculación. El gran incremento en los niveles de luteolina observado en *rizo-bacterianos (U143-JD2)*, sugiere que las células de JD2 son capaces de modificar el perfil de flavonoides secretados e involucrados en la inducción de los genes *nod* de los sinorizobios.

En los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* colectados a los cuatro días se observó también una disminución en los niveles de la flavanona naringenina, cuando se compara con los *exudados radiculares-rizobianos*. Es probable que la naringenina se haya consumido durante la producción de algunas flavanonas e isoflavonas. Las flavanonas son intermediarios de la síntesis de las otras subclases de flavonoides (Farang et al 2008; Winkel-Shirley 2001). Las isoflavonas se sintetizan a partir de las flavanonas naringenina y liquiritigenina (Shaw et al 2006; Winkel-Shirley 2001). Por ejemplo, la naringenina se convierte a genisteína mediante una reacción catalizada por la enzima isoflavona sintasa (Akashi et al 2005). Particularmente, en los *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, se

detectaron valores de concentración entre dos y tres veces superiores para las flavonas apigenina, genisteína, y crisina, en relación a los niveles detectados en los *exudados radiculares-rizobianos*; mientras que la naringenina se detectó en una concentración 187 veces menor. La activa producción de las flavonas podría explicar la menor acumulación de naringenina en los líquidos de hidroponia. El aumento observado en naringina en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* también explicaría la disminución de naringenina, ya que el primero es una “versión” glicosilada del segundo. Los flavonoides glicosilados sirven además como fuente de carbono de mayor bio-disponibilidad (en relación a los no-glicosilados), para las poblaciones bacterianas que posean la maquinaria enzimática para degradarlos (Hassan y Mathesius 2012).

Se ha reportado que la naringenina posee actividad antagónica sobre la expresión de los genes de nodulación de *Sinorhizobium* (Peters et al 1986) y que impide la quimiotaxis impartida por la luteolina (Caetano-Anolles et al 1988). La reducción en los niveles de naringenina, sumado a los valores aumentados de luteolina (que en parte se explican también por ser la naringenina precursor del eryodictiol que origina flavonas; Winkel-Shirley 2001), podrían en parte explicar la mayor tasa de nodulación durante la co-inoculación de las plantas.

Si bien en los exudados colectados a los siete y 15 días las concentraciones de flavonoides disminuyeron en relación al período más temprano (cuatro días), las relaciones entre los diferentes flavonoides se mantuvieron: a los siete días los niveles de las flavonas fueron mayores en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* comparado con los valores detectados en los *exudados radiculares-rizobianos*; mientras que la naringenina+naringin disminuyó probablemente a expensas de la síntesis de flavonas. Los resultados indicarían que durante la co-inoculación, el balance cualitativo y cuantitativo de los diferentes flavonoides podría estar controlando el proceso de la nodulación.

Los flavonoides inducen la expresión en los rizobios de los genes *nod*, y por lo tanto de la síntesis de los FN, moléculas que median tanto el reconocimiento bacteriano por la planta como la organogénesis del nódulo (Morel y Castro-Sowinski 2013; Peters et al 1986). Las concentraciones incrementadas de determinados flavonoides (en especial de luteolina) en los exudados, sumado a la nodulación temprana, sugieren que la producción y secreción de FN habría también aumentado, tal como lo reportaron Volpin et al (1996) durante la co-inoculación de alfalfa con sinorizobios y azospirilos.

La presencia de AIA en los exudados coincidió en los momentos en los que no se detectó Trp, y cuando la concentración de flavonoides disminuyó drásticamente. De forma contraria, a los cuatro días, cuando las concentraciones de los flavonoides evaluados

fueron altas, no se detectó AIA pero si Trp. Esta correlación inversa entre los niveles de Trp y IAA sugiere que el Trp exudado se utiliza quizás de forma rápida para la síntesis de AIA, impidiendo su detección.

Los resultados sugieren un patrón temporal de eventos moleculares durante la interacción alfalfa-U143-JD2. Durante la etapa más temprana (cuatro días post-inoculación) los flavonoides fueron los generadores de señales de alerta para el inicio de la biosíntesis de FN, y más tarde, a los siete días post-inoculación, la secreción de AIA fue la señal molecular dominante, que llevó a la proliferación radicular. Los efectos en la planta asociados con la proliferación radicular de alfalfa debido a la secreción de AIA de origen bacteriano, durante experimentos de co-inoculación fueron descritos por Morel y Castro-Sowinski (2013).

Mediante GC/MS fue posible detectar muchos ácidos orgánicos, incluyendo ácidos grasos y carbohidratos, en todos los tratamientos. Los ácidos oxálico, málico, fumárico, succínico, acético, láctico, pirúvico, malónico y glutárico son los más comúnmente identificados en exudados radiculares de diferentes especies vegetales (Shukla et al 2011; Neumann 2007; Sandnes et al 2005; Bertin et al 2003; Dakora y Phillips 2002; Jones 1998). Todos ellos pueden ser tomados como fuente directa de nutrientes por plantas y microorganismos, e indirecta, al reducir el pH del entorno, posibilitando la solubilización de cationes (Khorassani et al 2011; Sandnes et al 2005; Bertin et al 2003; Dakora y Phillips 2002). La secreción de grandes cantidades de ácidos orgánicos hacia la rizosfera era un resultado esperable dado que inducen el crecimiento de rizobacterias presentes y actúan como quimio atrayentes de microorganismos hacia las raíces.

Además de los ácidos orgánicos ya mencionados, se detectaron los ácidos nicotínico, adípico, benzoico y cinámico. Todos ellos son derivados de la degradación de la lignina que también se encuentran presentes en exudados radiculares (Shukla et al 2011). En general, se admite que las paredes celulares de la planta incrementan su contenido de lignina como respuesta a patógenos (Jayamohan y Kumudini 2011). Si U143 y JD2 no son reconocidos como patógenos, tal como lo sugieren los resultados y se discuten en la sección 3.1, entonces la secreción de compuestos derivados de la degradación de la lignina en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* podría indicar un incremento en la flexibilidad de la pared vegetal que podría estar colaborando en la colonización bacteriana.

Muchos ácidos grasos se han identificado en exudados de raíces, entre los cuáles los mayores representantes, se detectaron en este estudio: palmítico (16:0), oleico (18:1) y esteárico (18:0) (Dutta et al 2013; Badri et al 2009; Badri y Vivanco 2009). No se distinguieron patrones o perfiles de ácidos grasos entre los diferentes exudados, aunque si

resalta la presencia de ácidos grasos insaturados y de cadena corta en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*. Este tipo de ácidos grasos se han relacionado con la fluidez de membrana y pueden estar indicando la existencia de cambios en la membrana celular, necesarios para la colonización bacteriana, de forma similar a como lo sugirieron Brechenmacher et al (2010), estudiando la colonización de soja por *Bradyrhizobium*.

Por GC/FID se logró identificar, como rasgo distintivo, al lignocérico, ácido graso de cadena larga (C24:0), detectado únicamente en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)*, durante la etapa más temprana evaluada de interacción. Aunque se ha detectado en exudados radiculares, se desconoce el rol que este ácido graso pueda tener en las interacciones planta-microorganismo. Su acumulación en exudados de raíz de soja a las 48 h luego de la inoculación con *B. japonicum* fue reportado por Brechenmacher et al (2010), quienes lo relacionaron con la asociación triple entre maíz, micorrizas arbusculares y varias BPCV (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*). En otro estudio, la aplicación exógena de ácidos grasos de cadena larga, entre ellos el lignocérico, se relacionó directamente con el transporte y distribución de auxinas y el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis* (Roudier et al 2010).

Entre los VOCs, se identificó al butanodiol en todos los tipos de exudados colectados a los cuatro días. El butanediol es una molécula que se ha relacionado con la promoción del crecimiento vegetal, debido a que activaría las rutas dependientes de citokinina o de etileno participantes de la RSI (Ping y Boland 2004). El limoneno, otro VOC mono-terpénico con actividad antioxidante, se acumuló solo en *exudados rizo-bacterianos (U143-JD2)* y radiculares-rizobianos colectados a los cuatro días. El limoneno fue recientemente detectado en semillas de soja inoculada con *Bradyrhizobium* (Silva et al 2013). Entre los roles que se le adjudican, el limoneno es capaz de prevenir la deshidratación, inducir defensa en la planta contra predadores, inhibir el crecimiento de potenciales fitopatógenos (Bennett et al 2012), y puede ser utilizado como fuente de carbono por algunos microorganismos (Duetz et al 2003).

La detección de azúcares y polioles solo fue particularmente relevante en exudados colectados a los 15 días post-inoculación, donde se acumularon varios mono- y di-sacáridos y polioles. Los polioles están relacionados con la tolerancia al estrés salino, a través de la estabilización de las membranas y proteínas en alfalfa y soja (Brechenmacher et al 2010).

En la sección anterior de resultados, se evaluó el efecto de los exudados producidos durante cuatro días sobre el crecimiento vegetal (ver sección 4.2). El agregado de los compuestos mencionados en esta sección, avalaría y explicaría el mayor desarrollo radicular y rendimiento vegetal evidenciado en invernáculo a los 50 días de crecimiento.

Todos los resultados de esta sección aparecen publicados en el manuscrito:

The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. JD2: an interaction that improves plant yield. 2014. Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S. Molecular Plant Microbe Interaction, DOI: 10.1094/MPMI-08-14-0229-R. El mismo se adjunta en el Anexo III.

4.4. Estudios sobre la anotación del genoma de *Delftia* sp. JD2

4.4.1. Introducción

Genómica descriptiva y comparativa en bacterias.- La determinación de secuencias completas de genomas es posible gracias al avance simultáneo de las técnicas de manipulación y secuenciación del ADN, junto al desarrollo de poderosas herramientas bioinformáticas que permiten procesar, almacenar e interpretar la extraordinaria cantidad de secuencias generadas. Este avance tecnológico abre grandes posibilidades para abordar los procesos celulares a nivel genético, desde una perspectiva global (Orellana 2002).

A partir de la secuencia de genomas completos, se han desarrollado métodos de análisis de la expresión global a nivel del ARN mensajero (genómica funcional), a nivel de la naturaleza física de los genomas (genómica estructural), a nivel de proteínas (proteómica), etc. Entre estas y otras derivaciones, ha sido posible identificar los genes responsables de procesos que son comunes a todas las bacterias y, más importante aún, aquellos genes que son exclusivos de una determinada especie o cepa bacteriana.

La secuencia de cada genoma aporta mucha información biológica de interés que permite predecir y catalogar el número total de genes, conocer su estructura y sus regiones reguladoras, predecir la estructura primaria de las proteínas codificadas, definir la organización básica y distribución génica, e inferir aspectos evolutivos del genoma a partir de la conservación o variación de la secuencia y del orden de los genes (Corona 2006), y del conocimiento de los procesos y mecanismos responsables de la aparición de diferencias entre secuencias a lo largo del tiempo (Rodríguez Martínez 2004).

Una de las principales características que se ha revelado mediante el estudio de los genomas bacterianos es su enorme plasticidad. El genoma es una estructura dinámica que está continuamente sujeta a las modificaciones causadas por los mecanismos evolutivos que actúan a lo largo de millones de años.

La genómica comparativa es el estudio simultáneo de la expresión de genes por dos o más microorganismos, y el análisis de la variabilidad genética de bacterias aisladas de diferentes nichos (Wibberg et al 2011). A través de este tipo de enfoque podemos entender una serie de mecanismos que ocurren en los microorganismos y cambian su apariencia génica: variación de fase, duplicación génica, pérdida de funciones rudimentarias, transferencia horizontal (TH), etc. La TH de genes (THG) es un evento común entre

procariotas de la misma o diferentes especies. Este tráfico de ADN entre bacterias juega un papel determinante en la adaptación a nuevos ambientes y es particularmente relevante en nichos extremos, ya que por este medio se transfiere gran parte de las resistencia a tóxicos, antibióticos, temperatura, pH, etc. (Comas et al 2006).

Por ejemplo, en un modelo propuesto por Gogarten et al (2002) se asume que la probabilidad de THG es mayor entre organismos relacionados, reafirmando la hipótesis de que existen restricciones asociadas a la compatibilidad en la arquitectura de los genomas y en la distancia filogenética. Sin embargo, la genómica comparativa indica que también se produce THG entre especies filogenéticamente alejadas, lo cual permite la formación de genomas extraordinariamente heterogéneos y dinámicos (Koonin y Wolf 2008).

A diferencia de los eucariotas, donde los genes están interrumpidos por intrones, en las bacterias todos los codones para una proteína se localizan en forma secuencial, adyacentes uno a otro en el ADN, sin interrupciones. Los genes para varias proteínas pueden estar localizados en forma consecutiva en el ADN y su expresión puede estar controlada por una señal común de inicio y de término de la transcripción, permitiendo la expresión coordinada de los genes. Este concepto de operón es el paradigma de la expresión y regulación génica y de la transducción de señales en procariotas. Generalmente, los genes que forman parte de un operón están relacionados funcionalmente, es decir forman parte del conjunto de proteínas que llevan a cabo un proceso bioquímico determinado. Considerando la arquitectura de los genomas y el fenómeno de la THG, la organización de los genes bacterianos en operones permite la co-transferencia horizontal de todos los genes en un solo evento de transferencia, en lo que se conoce como el concepto del “Operón Egoista” (Koonin y Wolf 2008).

Una parte del material genético de los procariotas corresponde a elementos involucrados en la diseminación de genes en forma horizontal. El conjunto de todos los elementos móviles se denominan moviloma. El moviloma está compuesto de bacteriófagos, plásmidos, elementos transponibles, así como de genes asociados a estos últimos (pasajeros de los elementos móviles).

Genómica descriptiva y comparativa en *Delftia*.- La subdivisión β - del grupo proteobacteria representa un grupo sumamente diverso y heterogéneo de bacterias con una gran variabilidad de características genómicas, fisiológicas y ecológicas. Dentro de esta clase se encuentra el orden Burkholderiales, el cual ha cobrado gran relevancia debido a su versatilidad nutricional e importancia ecológica, ya que degradan una amplia variedad de compuestos. En su gran mayoría son bacterias propias del suelo y del agua que intervienen

en los ciclos del Carbono y del Nitrógeno. Dentro del orden se destaca la familia Comamonadaceae (Willems et al 1991), que incluye géneros como *Comamonas*, *Delftia*, *Acidovorax* y *Variovorax* (Garrity et al 2004).

El reconocimiento de *Delftia* como género se dió en 1999, cuando frente a evidencia filogenética y fenotípica, algunos miembros de *Comamonas acidovorans* se redefinieron, pasando a llamarse *Delftia acidovorans* (Wen et al 1999). Desde entonces y hasta la fecha solo cuatro especies se identificaron dentro del género: *D. acidovorans* (Wen et al 1999), *D. lacustris* (Jørgensen et al 2009), *D. litopenaei* (Chen et al 2012) y *D. tsuruhatensis* (Shigematsu et al 2003).

Las bacterias del género *Delftia* se encuentran en diferentes ambientes (agua de mar, suelo, plantas y lodos activados) y se caracterizan por su capacidad de degradar o transformar tóxicos orgánicos e inorgánicos (Morel et al 2011; Yang et al 2011; De Gusseme et al 2010; Juarez-Jimenez et al 2010; Leibelng et al 2010a; 2010b; Paulin et al 2010; Zhang et al 2010; Vacca et al 2005; entre otros). Se han descrito además algunas *Delftia* spp. como promotoras del crecimiento vegetal (PCV), pues son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, producir fitohormonas y sideróforos, y/o colaborar en la simbiosis rizobio-leguminosa (Morel et al 2012; Han et al 2005).

Estas características posicionan al género como de interés para aplicaciones biotecnológicas, principalmente orientadas a la microbiología ambiental y agrícola. Recientemente se encontraron también algunas *Delftia* spp. en muestras clínicas (Hail et al 2011; Preiswerk et al 2011).

Al día de hoy, de acuerdo a los datos de la NCBI, existen dos genomas del género *Delftia* completamente secuenciados, anotados y públicamente disponibles:

- *D. acidovorans* SPH-1. Este aislamiento se obtuvo de lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales en Alemania. Es capaz de utilizar el 4-(4-sulfophenyl)-hexanoate (4-C6-SPC) como fuente de carbono y energía (Schleheck et al 2004). El 4-C6-SPC es un sub-producto de la degradación del sulfonato de alquilbenceno lineal, surfactante sintético biodegradable utilizado comúnmente en detergentes. Su código de acceso en la NCBI es NC_010002.1 y su tamaño de genoma es de 6.767.514 pb.
- *Delftia* sp. Cs1-4. Esta bacteria se aisló de un suelo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos en Wisconsin, USA (Vacca et al 2005). Es capaz de crecer en fenantreno y producir estructuras extracelulares llamadas nanopodos (Chen y Hickey 2011). Los nanopodos son vesículas de membrana externa, que acarrean material

periplasmático conteniendo proteínas y otras moléculas con actividad biológica, que le ayudan a la célula a establecer interacciones de larga distancia con el ambiente (Shetty et al 2011). El código de acceso de Cs1-4 en la NCBI es NC_015563.1 y el tamaño de su genoma es de 6.685.842 pb.

Además, existe un borrador del genoma (159 contigs separados), de *D. tsuruhatensis* 670 disponible para búsquedas por blast en la base de datos de la NCBI (Referencia a contigs: JNWI01000001 al JNWI01000159), y genomas de bacterias de los géneros cercanos a *Delftia*: *Acidovorax*, *Comamonas*, *Verminephrobacter*, *Variovorax*, *Alicyclophilus*, *Polaromonas* y *Rhodoferax*, completamente secuenciadas.

4.4.2. Objetivo planteado

Relacionar los aspectos funcionales ya descritos para *Delftia* sp. JD2 con la información obtenida de su genoma y analizar en forma primaria los genes de interés.

Con la finalidad de analizar el borrador del genoma de JD2, se comenzó el análisis con las siguientes preguntas:

- 1) ¿Cómo se relacionan los diferentes microorganismos secuenciados del género *Delftia*, en términos de información del genoma y en su biología?
- 2) ¿Qué grupos o vías funcionales (subsistemas) se pueden identificar en el genoma de JD2?
- 3) ¿Cuáles son las posibles vías de producción de AIA, sideróforos y otros metabolitos secundarios, y los genes de resistencia a compuestos de Cr(VI)?

4.4.3. Resultados y Discusión

Propiedades del genoma.- En base a la secuenciación parcial del genoma de *Delftia* sp. JD2, utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000, se obtuvieron 15.287.096 lecturas de aproximadamente 101 nucleótidos, que corresponden a 1.543.996.696 bases secuenciadas, distribuidos en 209 contigs, el menor y mayor de ellos de 83 y 475.298 pb, respectivamente (promedio 32.354 pb).

Luego del ensamblado *de novo* se determinó que JD2 poseería un tamaño de genoma de más de 6.750.000 pb, con un contenido en GC de 66,4%. Tomando como referencia a las *Delftia* ya secuenciadas, se determinó una identidad nucleotídica del 98,07% con *D. acidovorans* SPH-1 y 98,65% con *Delftia* sp. Cs1-4.

El servidor RAST anota genes incluidos en subsistemas jerárquicos de clasificación funcional. Un subsistema representa al conjunto de funciones que un anotador entiende que deben considerarse como relacionadas, por ejemplo resistencia a tóxicos. Para ello, utiliza genomas presentes en las bases de datos, y se enfoca sobre un conjunto restringido de roles funcionales (Aziz et al 2008).

Delftia sp. JD2 presentó un total de 5.966 secuencias codificantes de proteínas (SCPs), 77 genes de ARN y 515 subsistemas (Fig. 4.3). Se encontró una copia simple del gen codificante para la subunidad menor del ARNr.

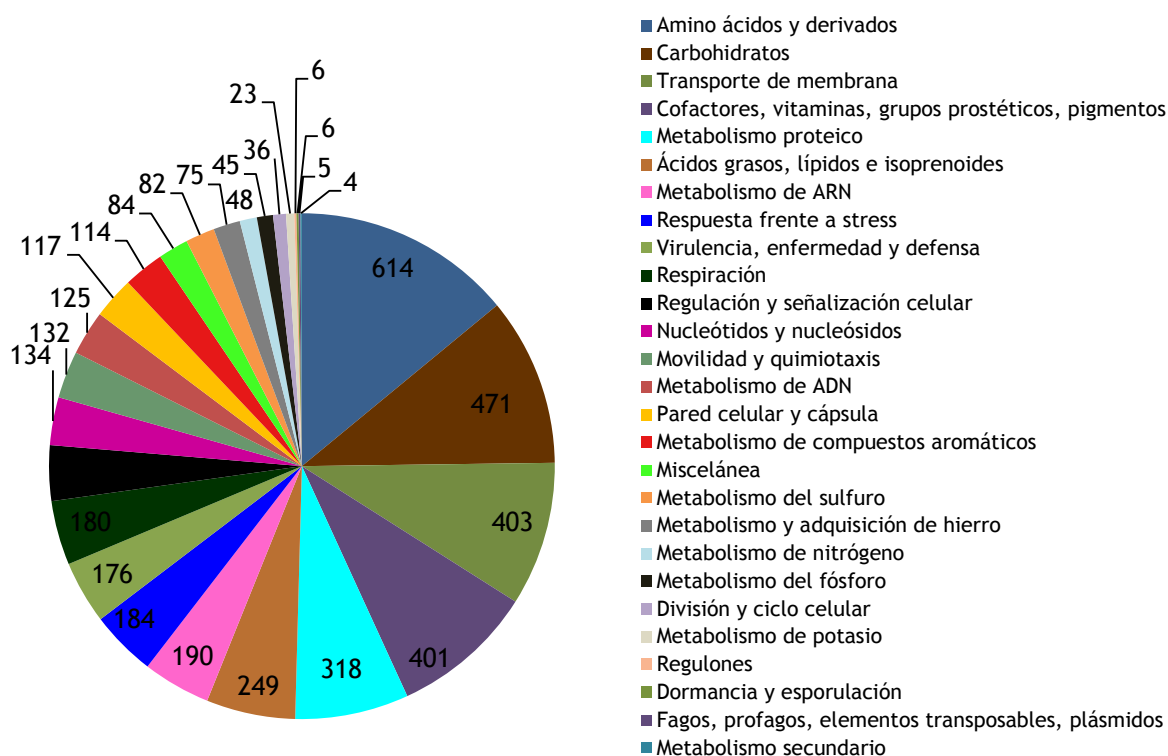


Figura 4.3. Distribución de secuencias codificantes dentro de subsistemas. El gráfico representa la abundancia relativa de cada subsistema y el número de SCPs asignado a cada uno, según el servidor RAST.

Relaciones filogenéticas con organismos cercanos.-Se compararon las SCPs de JD2 con aquellas provenientes de varios genomas anotados y públicos de bacterias dentro y fuera de la familia Comamonadaceae (Cuadro 4.11.). Tomando en cuenta todas las SCPs de JD2, se observó que ésta comparte 4932 SCPs (de acuerdo a RAST) con *D. acidovorans* SPH-1.

Cuadro 4.11. Comparación de secuencias (SCPs) entre *Delftia* sp. JD2 y otros genomas anotados y públicos dentro de la Clase B-proteobacteria, familia Comamonadaceae. Se muestra el número de SCPs compartidas entre JD2 y cada microorganismo, indicándose el porcentaje de similitud. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de SCPs de JD2 compartido entre genomas. Se utilizaron como controles externos de familia y clase a *B. cepacia* R18194 de la familia Burkholderiaceae y *S. meliloti* 1021 de la clase α -proteobacteria, respectivamente.

Microorganismo	Identidad de secuencia aminoacídica (%)		
	80-100	30-79,9	10- 29,9
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	4932 (86,8)	319 (5,7)	58 (1)
<i>Comamonas testosteroni</i> KF-1	1599 (28,2)	2811 (49,5)	265 (4,7)
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	971 (17)	2891 (50,9)	413 (7,2)
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> AAC00-1	820 (14,4)	3025 (53,3)	404 (7,1)
<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2	455 (8)	2934 (51,7)	497 (8,7)
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	421 (7,4)	3258 (57,4)	448 (7,8)
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> DSM 15236	336 (6)	3101 (54,6)	525 (9,2)
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	214 (3,8)	3229 (56,8)	561 (9,8)
<i>Leptothrix cholodni</i> SP-6	199 (3,5)	3174 (55,9)	554 (9,7)
<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	80 (1,4)	3735 (65,6)	408 (7)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	3 (0)	3056 (53,8)	708 (12,5)

Las Figuras 4.4 y 4.5 muestran las filogenias, basadas en los genes del ARN ribosomal 16S y de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*), respectivamente. Se observa que JD2 se agrupa junto a las delftias. Las relaciones inferidas en el árbol de la Fig. 4.3 muestran una clara divergencia entre las Familias Comamonadaceae y Burkholderiaceae, ambas β -proteobacterias. Aunque la topología fue similar, la filogenia realizada con el gen *rpoB* presentó algunas incongruencias (Fig. 4.5).

Utilizando las herramienta de RAST se encontraron mas de 500 SCPs presentes en *Delftia* sp. JD2 pero ausentes en *Delftia* sp. Cs1-4 y *D. acidovorans* SPH-1. Entre ellas resaltan algunas funciones relacionadas a la resistencia a metales pesados, en particular la

tolerancia a compuestos de Cr(VI). A continuación, se describirán algunos genes de interés, principalmente relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, que es el objeto de esta tesis. Finalmente, se describirán los genes implicados en la resistencia a Cr(VI), que está ausente en Cs1-4 y SPH-1 y que explicaría la alta tolerancia a este metal descrita previamente. Por más información sobre las SCPs anotadas por RAST, presentes solo en JD2, remitirse al Anexo IV.

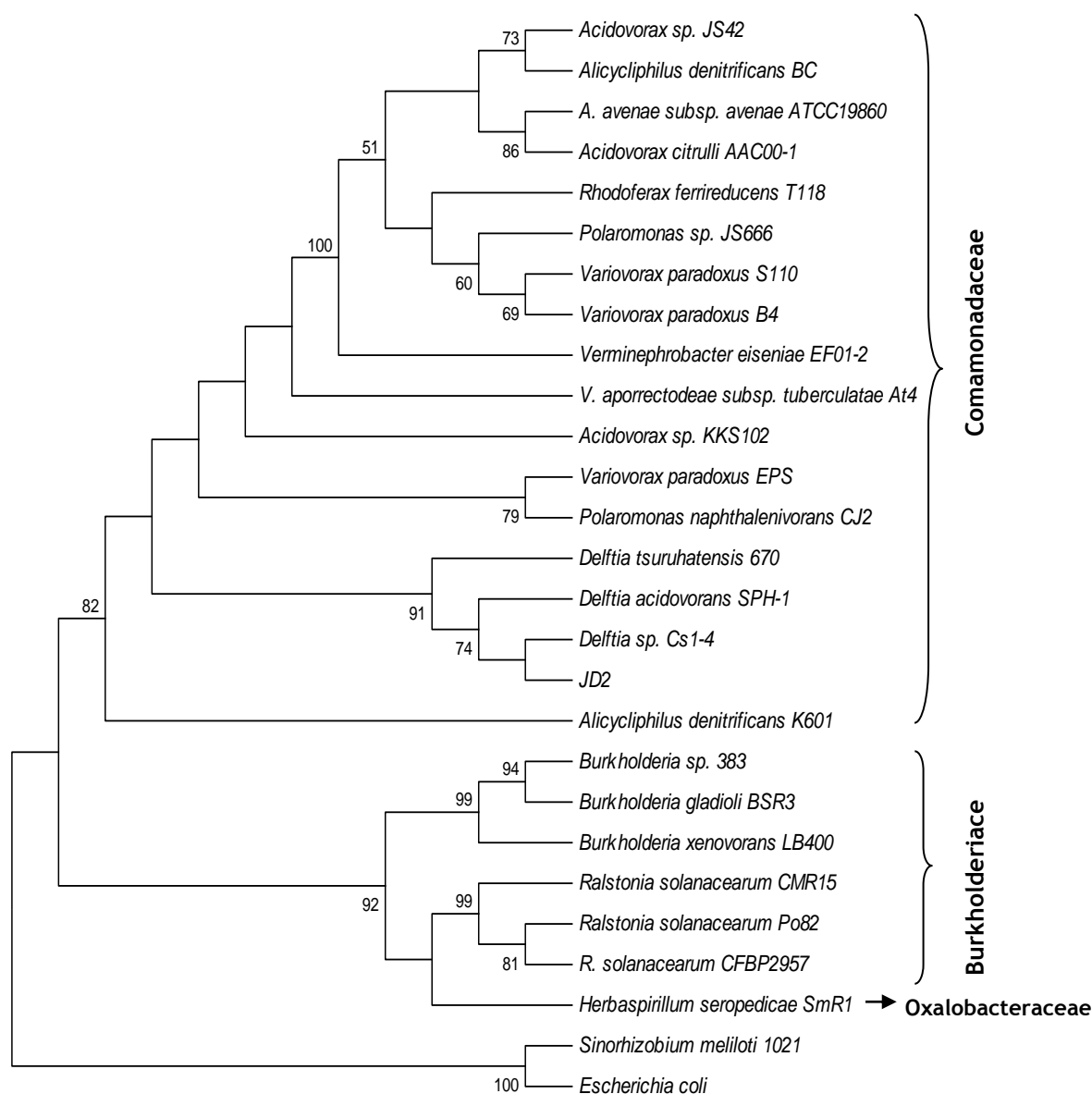


Figura 4.4. Relaciones evolutivas entre *Delftia* sp. JD2 y otros taxa inferida utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ). Los números entre clados representan los valores de bootstrap (1000 réplicas). El análisis incluyó 27 secuencias del gen del ARNr 16S y se realizó en MEGA 6.0. La topología de los árboles utilizando otros métodos fue similar a NJ. Se indican en el árbol las familias representadas. Se utilizaron como raíces externas *S. meliloti* y *E. coli*, α y γ -proteobacteria, respectivamente.

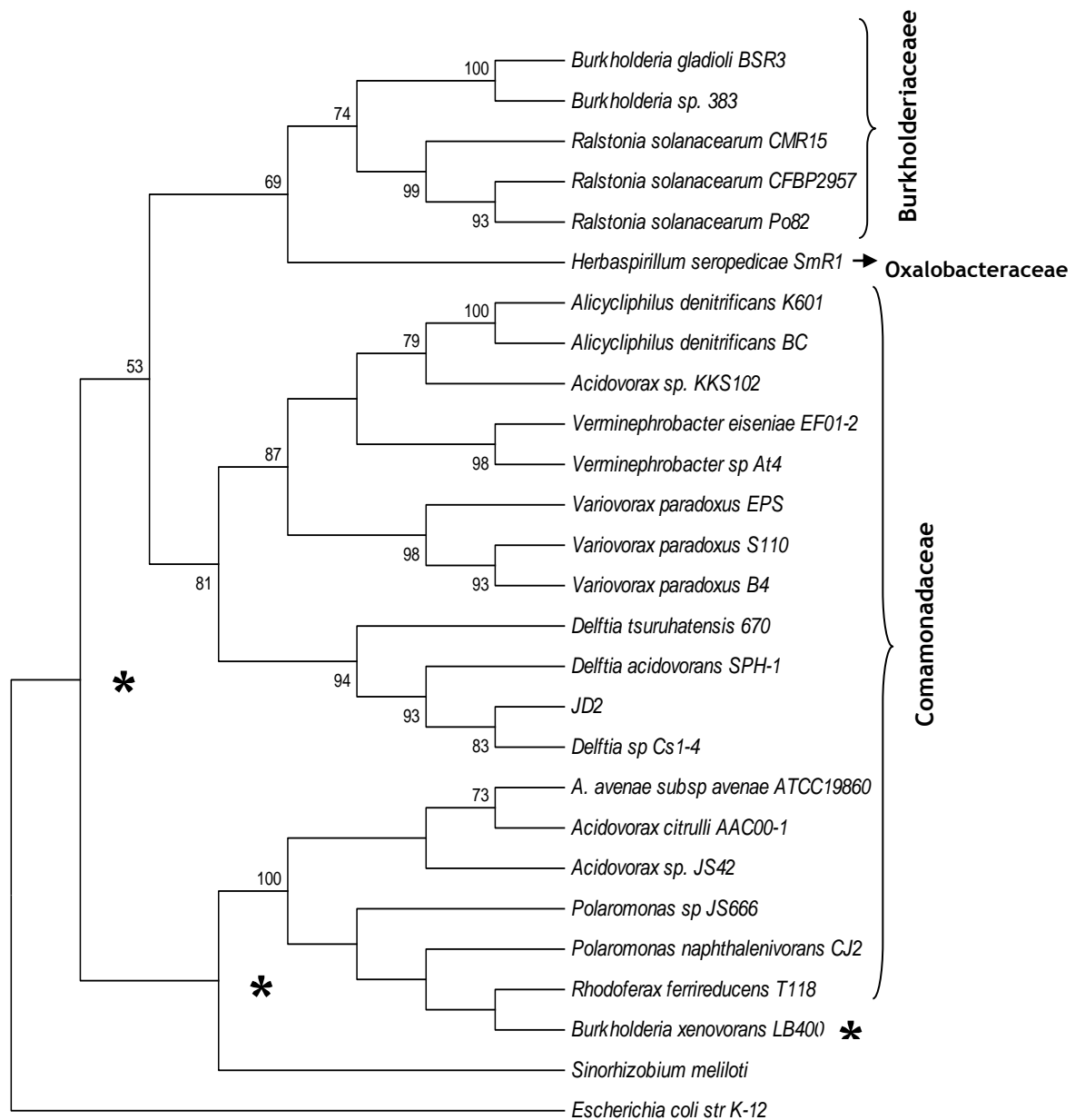


Figura 4.5. Relaciones evolutivas entre *Delftia* sp. JD2 y otros taxa inferida utilizando el método de NJ. Los números entre clados representan los valores de bootstrap (1000 réplicas). El análisis incluyó 30 secuencias del gen *rpoB*, codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa. Los análisis se realizaron en MEGA 6.0. La topología de los árboles utilizando otros métodos (UPGM, Maxima Parsimonia) fue similar a NJ. Se indican en el árbol las familias representadas y con un asterisco las incongruencias filogenéticas detectadas de acuerdo a la clasificación actual. Se utilizaron como raíces externas *S. meliloti* y *E. coli*, α y γ -proteobacteria, respectivamente.

Otros genes de interés.- Según los objetivos de esta tesis, las principales características de *Delftia* sp. JD2 son su capacidad de producir AIA y sideróforos. Otras características de particular interés son su resistencia a antibióticos y a metales pesados (MP) (Ubalde et al 2012, Morel et al 2011). Se buscaron SCPs relacionadas con estas propiedades a través del servidor de RAST y las plataformas uniprotKB (The UniProt Consortium, 2012; www.uniprot.org) y antiSMASH 2.0 (Medema et al 2011, <http://antismash.secondarymetabolites.org/>).

Fijación Biológica de Nitrógeno

Dado que *Delftia* sp. JD2 es capaz de crecer en medio libre de N y de reducir acetileno cuando se le agrega Vanadio (V) al medio de cultivo, se postuló que esta bacteria es capaz de fijar N en vida libre, posiblemente a través de la actividad del complejo catalítico de la nitrogenasa dependiente de V (Morel et al 2011; 2010).

La nitrogenasa es un heterotetrámero, constituido por dos unidades proteicas conocidas como dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, muy conservadas y por tanto muy semejantes entre los microorganismos fijadores de nitrógeno. Los genes *nif* son los encargados de la síntesis de todos los componentes proteicos implicados, e incluyen los estructurales que codifican para la reductasa (*nifH*) y para la dinitrogenasa (*nifD* y *nifK*). Las nitrogenasas alternativas están codificadas por los genes *vnfHDK*, para el sistema con vanadio, y *anfHDK* para el que sólo contiene Fe, y presentan una homología significativa de secuencias con *nifHDK*.

Con la intención de identificar los genes responsables de la síntesis de la nitrogenasa, se realizó un megablast y blastx sobre el genoma secuenciado de JD2, utilizando secuencias parciales de *nifHDK*, *vnfHDK* y *anfHDK* obtenidas de la base de datos de la NCBI, incluyendo la secuencia *nifH* de *D. tsuruhatensis* HP4. Los resultados no mostraron secuencias con similitud significativa, por lo cual no se identificaron SCPs relacionadas al proceso de fijación biológica de nitrógeno. No se excluye que la información genética correspondiente se encuentre en las brechas o *gaps* aun existentes y a ultimar en un futuro, para completar la información correspondiente al genoma de JD2.

Biosíntesis de AIA

Delftia sp. JD2 es capaz de producir AIA tanto cuando se le agrega Trp al medio de crecimiento como cuando no se le agrega. Sin embargo, ocurre una clara inducción (al menos ocho veces) en la producción de AIA por el agregado de Trp 5 mM al medio de cultivo (Morel et al 2011).

En el Cuadro 4.12. se muestran las funciones anotadas en el genoma de JD2 para las SCPs relacionadas al metabolismo de auxinas, y que incluyen a las enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación de Trp. Todas ellas presentaron un grado de cobertura e identidad de secuencia mayor a 96% cuando se las comparó con la anotación de las *Delftia* spp. SPH-1 y Cs1-4. Los dominios funcionales conservados (DFC) en las secuencias aminoacídicas se identificaron utilizando el servicio de búsqueda de dominios conservados de NCBI (CD Search). Estos se muestran en el Cuadro 5.12. Se describen a continuación las vías identificadas en el genoma de JD2.

Biosíntesis de Trp.- Se encontraron posibles secuencias codificantes para las enzimas implicadas en la biosíntesis de Trp (Cuadro 5.12). Esta vía se encuentra únicamente en plantas y bacterias, y utiliza el corismato como precursor, para producir Trp en cinco pasos enzimáticos (Fig. 4.6).

La organización de los genes involucrados en la biosíntesis de Trp es variable. La información se encuentra distribuida como genes dispersos en el genoma, como en *Acinetobacter baumannii* (Merino et al 2008), organizados en un solo operón *trpE/GDCFBA*, como en *E. coli* y *Chlamydia psittaci* (Wood et al 2004) o en varios operones menores, como en *Pseudomonas* spp. y *Methylococcus capsulatus* (Merkl 2007; Olekhovich y Gussin 2001).

En el genoma de JD2 se encontraron genes formando agrupaciones menores, ubicadas en diferentes contigs (Cuadro 4.12). La organización de estos genes es similar a la descrita para *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. syringae*, siguiendo la estructura: *trpBA*, *trpE* y *trpGDC*. En estas *Pseudomonas*, la expresión del primer operón se activa por el producto del gen *trpI*. El regulador transcripcional TrpI pertenece a la familia LysR. En estas tres *Pseudomonas* el gen *trpI* se encuentra cercano a *trpBA* y no forma parte del operón (Gao y Gussin 1991; Chang et al 1989).

Se realizó la búsqueda por megablast (y blastx) utilizando el gen *trpI* de *P. aeruginosa* PAO1 (y su producto, TrpI) en el genoma secuenciado de JD2. Se encontró homología (>56% de identidad de secuencia aminoacídica) con reguladores transcripcionales de la familia

LysR y alejados de *trpBA*, según su ubicación en la secuencia primaria, aunque ninguno de ellos fue anotado como *trpI*.

La enzima Trp sintasa lleva a cabo el último paso de la biosíntesis de Trp. Esta es una enzima bi-funcional tetramérica, con dos subunidades α (TrpA) y dos β (TrpB) (Fig. 4.6). Algunos microorganismos poseen dos isoformas de TrpB debido a que existen dos variantes del gen *trpB*. La secuencia codificante para TrpB-1 siempre se ubica adyacente a *trpA* mientras que *trpB-2*, en aquellas bacterias que poseen ambas, se ubica alejada del gen *trpA* (Merkl 2007; Merino et al 2008). TrpB-1 y TrpA forman un complejo con actividad Trp sintasa, mientras que TrpB-2, actuaría como serina-desaminasa, posiblemente involucrada en los últimos pasos de la biosíntesis de treonina (Merino et al 2008).

En el genoma de JD2 se detectaron dos ORFs anotados para la subunidad beta de la Trp-sintasa, uno de ellos alejado de *trpA* según la secuencia primaria del ADN, con similitud de secuencia aminoacídica con deshidratasa de treonina en *Delftia* spp. Ambas TrpB de JD2 comparten un 72% de similitud de secuencia nucleotídica (cobertura de 46%). Frente a esta evidencia, se sugiere que probablemente se trate de *trpB-1* y *trpB-2*.

Cuadro 4.12. Genes de *Delftia* sp. JD2 posiblemente involucrados en la biosíntesis de Trp y en el metabolismo de AIA.

N° contig (N° SCP*)	Gen	Tamaño (aa)	DFC y N° EC	Función	Descripción	Referencia
Biosíntesis de Trp**						
43(3694)	<i>trpA</i> (<i>trpE</i>)	479	pfam04715 4.1.3.27	Antranilato sintasa (AS), componente I aminasa	Formación de antranilato a partir de amonio y corismato	Palmer et al 2013
42(3643)	<i>trpA</i> (<i>trpG</i>)	195	cd01743 4.1.3.27	AS sintasa componente II amidotransferasa	Hidroliza glutamina y transfiere el amonio originado al componente I	Palmer et al 2013
42(3642)	<i>trpB</i> (<i>trpD</i>)	314	PRK00188 2.4.2.18	Antranilato fosforribosil- transferasa	Formación de antranilato 5-fosforibosil (AFR) a partir de antranilato	Palmer et al 2013
13 (456)	<i>trpC</i> (<i>trpF</i>)	240	PRK01222 5.3.1.24	Antranilato fosforibosil isomerasa	Formación de 1-(o-carboxifenilamino)- 1-deoxiribulosa 5-fosfato (CdRP) a partir de AFR	Setiyaputra et al 2011
42(3641)	<i>trpD</i> (<i>trpC</i>)	245	PRK00278 4.1.4.8	Indol-3-glicerol fosfato sintasa	Cierre del anillo en CdRP para generar indol-3-glicerol fosfato (IGP), con liberación de CO ₂ y H ₂ O	Gerth et al 2012
13 (458)	<i>trpE</i> (<i>trpA</i>)	269	cd04724 4.2.1.20	Subunidad alfa de la sintasa de Trp	Transformación del IGP en dos productos: gliceraldehído 3-fosfato (G3P) e indol	Miles 2013
13(457) 8 (5647)	<i>trpEb-1</i> (<i>trpB</i>)	418 370	cd06446 4.5.1.20	Subunidad beta de la sintasa de Trp	Formación Trp a partir de indol y serina, dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP)	Miles 2013
Degradación de Trp						
36(3195 y 3204)	<i>kynA</i>	286 y 291	TIGR03036 1.13.11.11	Trp 2,3-dioxigenasa	Formacion de L-formilkinurenina a partir de Trp	Zummo et al 2012
36(3200)	<i>kynB</i>	209	TIGR03035 3.5.1.9	Kinurenina formamidasa (o Arilformamidasa)	Hidrólisis de L-formilkinurenina a L-kinurenina y formiato	Zummo et al 2012
36(3201)	<i>kynU</i>	268	COG3844	Kinureninasa	Hidrólisis de L-kinurenina a antranilato y alanina	Phillips

3.7.1.3						2014
Vía del indol 3-acetamida						
32(2915)	<i>iaaH</i>	494	PRK0748	Indolacetamida (IAM)	Conversión de IAM en AIA	Spaepen et al 2007
			3.5.1.-	hidrolasa		

* El N° de *contig* y la ubicación del gen en el mismo se indican a modo orientación y para señalar la co-linealidad de los genes.

**Se indica la nomenclatura actual de los genes y entre paréntesis la previa, según Xie et al 2004.

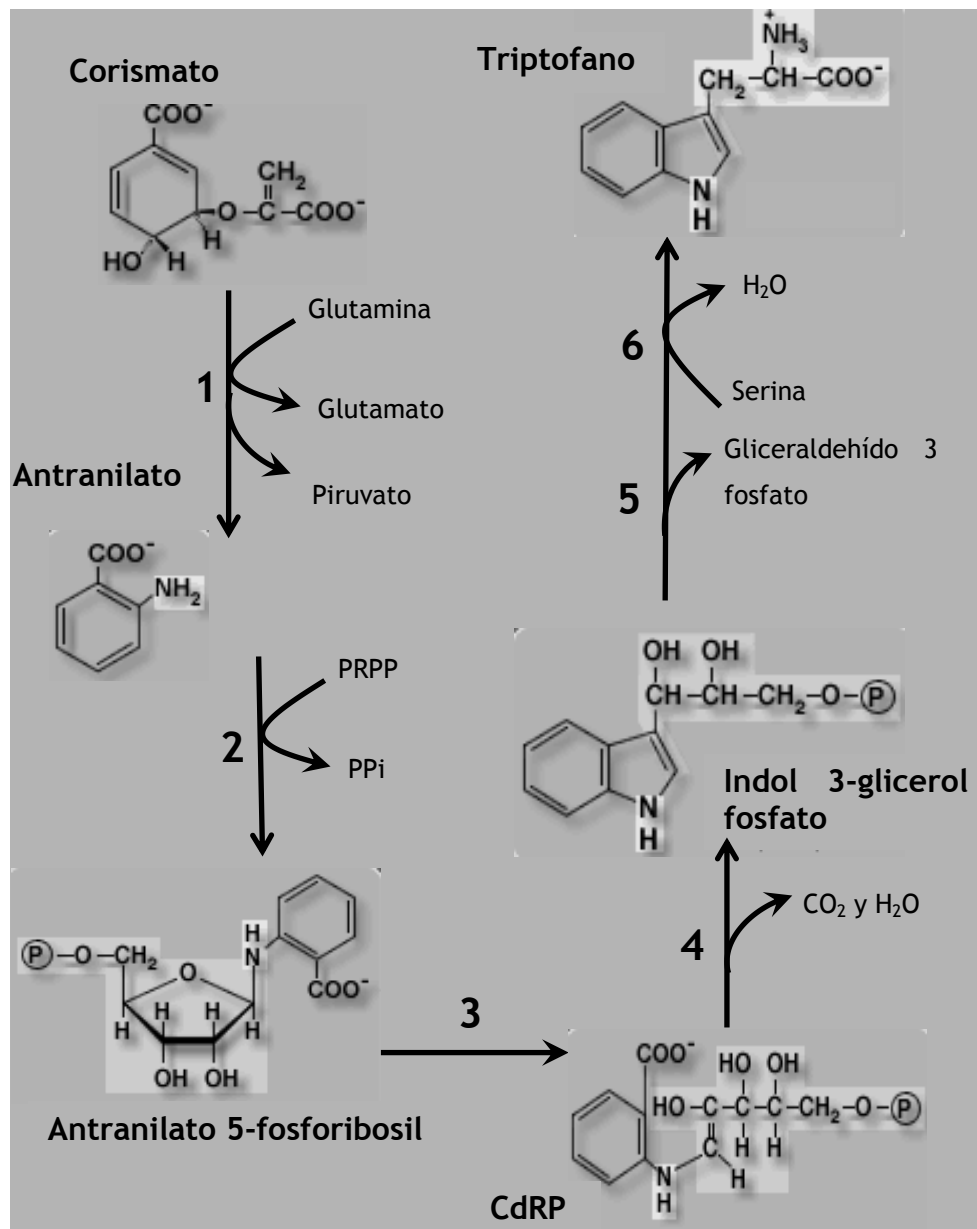


Figura 4.6. Vía de síntesis de Trp en bacterias, utilizando corismato como precursor. 1, Antranilato sintasa; 2, Antranilato fosforribosil-transferasa; 3, Antranilato fosforibosil isomerasa; 4, Indol-3-glicerol fosfato sintasa y 5, Trp sintasa.

Biosíntesis de AIA.- En bacterias, existen reportadas seis vías de síntesis de AIA, cinco de las cuales utilizan Trp como precursor de la biosíntesis (Fig. 4.7) (Spaepen et al 2007; Carreño-Lopez et al 2000). Las tres vías más frecuentes en bacterias son: la vía del indol 3-acetamida (IAM); la vía del ácido indol 3-pirúvico (AIP) y la vía de la triptamina (TAM) (Lambrecht et al 2000).

No se encontraron, por blast, secuencias que codifiquen para enzimas claves de la mayoría de las vías de biosíntesis de AIA en el genoma de JD2, salvo una SCP relacionada a la vía del IAM. Esta vía presenta tan solo dos pasos: el Trp se convierte en IAM por la acción de la enzima Trp-2-mono-oxigenasa y luego se transforma en AIA por una IAM-hidrolasa (Fig. 4.7). En el genoma de JD2 se detectó una secuencia codificante para la enzima IAM hidrolasa (*iaaH*) aunque no se encontró el gen *iaaM*, de la Trp-mono-oxigenasa (Cuadro 4.13). No se descarta la posibilidad de que *iaaH* se encuentre en los *gaps* del genoma o bajo otra anotación. Esta enzima (*iaaH*) se encontró además por blastx en la *Delftia* Cs1-4, no así en SPH-1 y 670. Tampoco se encontró homología de secuencias con los genes codificantes de las enzimas de las otras vías de síntesis de AIA en las *Delftias* secuenciadas.

La evidencia sugiere que *Delftia* sp. JD2 produciría AIA a través de la vía del IAM, aunque no se excluye que también se produzca por una vía independiente de Trp. No hay información clara sobre la vía de producción de AIA independiente de Trp. La vía está reportada en plantas, pero aún existe controversia sobre su existencia en microorganismos (Spaepen et al 2007). Por ejemplo, la evidencia sugiere que una importante parte de la síntesis de AIA en *A. brasilense* se daría a través de una ruta independiente de Trp, utilizando antranilato como precursor (Hernandez-Mendoza et al 2010; Zakharova et al 1999). Sin embargo, se desconocen los pasos enzimáticos, los intermediarios, los genes y proteínas involucradas en esta vía e incluso los precursores del AIA (¿antranilato, indol 3-glicerol fosfato?) (Spaepen y Vanderleyen 2011; Woodward y Bartel 2005).

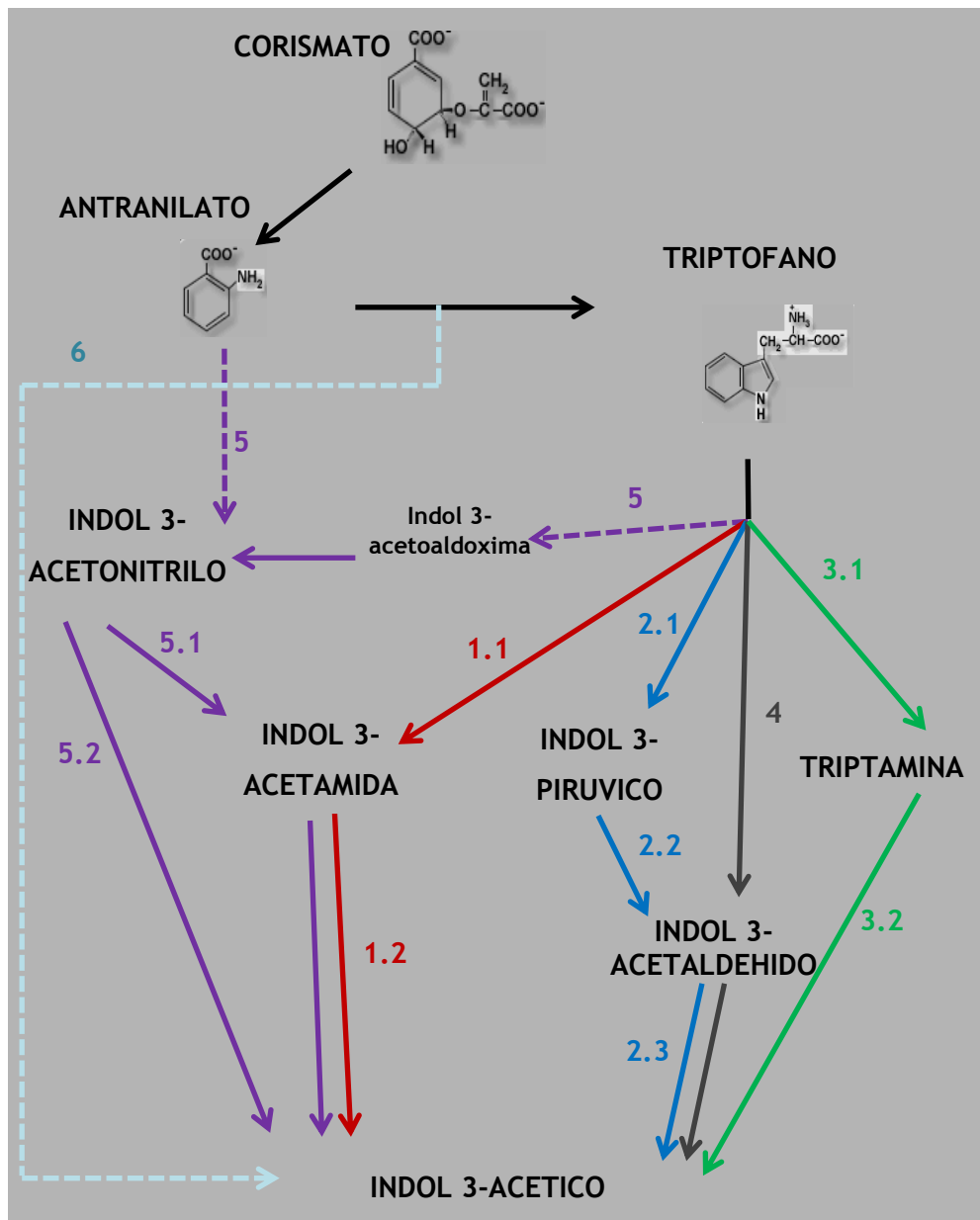


Figura 4.7. Vías de síntesis de ácido indol 3-acético en bacterias. 1) Vía del IAM: 1.1. Trp 2-mono-oxigenasa y 1.2. IAM hidrolasa; 2) vía del indol 3-pirúvico: 2.1. Amino-transferasa, 2.2. Piruvato-decarboxilasa y 2.3. Indol 3-aldehído deshidrogenasa; 3) vía de la triptamina: 3.1. Trp-decarboxilasa y 3.2. Amino-oxidasa; 4) vía de la Trp-oxidasa de cadena lateral: trp 2-dioxigenasa y 2.3. 5) vía del indol 3-acetonitrilo: 5.1. Nitrilo hidratasa y 5.2. Nitrilasa. El indol 3-acetaldoxima ha sido propuesto como precursor de la síntesis de AIA en *Arabidopsis* (Sugawara et al 2009); y 6) vía independiente de Trp: propuesta pero no dilucidada, se produciría a través de un atajo en la síntesis, a partir del indol-3-glicerol fosfato o indol, el cual podría ser el precursor de la síntesis (Woodward y Bartel 2005). Las flechas punteadas indican pasos no dilucidados aún (Spaepen y Vanderleyen 2011; Zhao 2010; Aguilar-Piedras et al 2008; Spaepen et al 2007).

Degradación de Trp.- La degradación de Trp a través de la vía de la kinurenina puede seguir dos rutas: la producción de nicotinamida dinucleótido (NAD⁺) o la producción de antranilato (Fig. 4.7), formando parte así de las rutas de biosíntesis del AIA, la independiente de Trp (Fig. 4.7).

Durante el estudio del genoma de JD2, se encontraron marcos de lectura coincidentes con las enzimas encargadas de los tres pasos del proceso completo de degradación de Trp a antranilato (Cuadro 4.13). Los pasos de esta vía se resumen a continuación:

- 1) El Trp se convierte en L-formilkinurenina por la acción de la enzima Trp 2,3-dioxigenasa.
- 2) La L-formilkinurenina se hidroliza a L-kinurenina mediante una arilformamidasa (o kinurenina formamidasa).
- 3) La L-kinurenina se hidroliza a antranilato y alanina por la catálisis de la kinureninasa.

Los reportes indican que en *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa* y *R. metallidurans* las secuencias codificantes para las enzimas arilformamidasa, kinureninasa y Trp 2,3-dioxigenasa están formando una organización del tipo operón (Farrow y Pesci 2007). Esta disposición se encontró también en el genoma de *Delftia* sp. JD2, donde los tres genes (*kynA*, *kynB* y *kynU*) se organizan en forma co-lineal (Cuadro 4.13). Hay además dos copias de *kynA*.

La vía de la kinurenina, de degradación de Trp, se descubrió en *P. fluorescens* TR-23. Esta bacteria es capaz de utilizar Trp como única fuente de energía y nitrógeno. A partir del surgimiento de genomas bacterianos completamente secuenciados se identificaron genes ortólogos correspondientes a las enzimas de esta vía (Phillips 2014). En la mayoría de los reportes esta ruta se relaciona con vías biosintéticas de metabolitos secundarios, muchos de ellos de señalización molecular en bacterias patógenas (Dubern y Diggle 2008; Farrow y Pesci 2007; Wood et al 2004).

Biosíntesis de sideróforos

Una de las particularidades de *Delftia* sp. JD2 es la capacidad de producir sideróforos en medio con baja disponibilidad de hierro (Fe) (Morel et al 2011). Normalmente el Fe presenta baja disponibilidad cuando se halla en ambientes aeróbicos de pH neutro o

alcalino, por su baja solubilidad. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular de 0,5 a 1,0 kDa, solubles en soluciones acuosas a pH neutro, sintetizadas por bacterias (principalmente Gram negativas), hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos). Actúan como agentes quelantes específicos de Fe^{3+} y son secretadas en condiciones de deficiencia del mismo. La bacterias pueden producir una o varias clase de sideróforos, lo que les permiten colonizar diferentes ambientes (Aguado-Santacruz et al 2012).

La relevancia de la producción de los sideróforos por las bacterias PCV ha sido ampliamente reportada (Aguado-Santacruz et al 2012). Estos sideróforos secuestran el Fe mediante la formación de un complejo Fe^{3+} -sideróforo que es reconocido por la célula gracias a un receptor de membrana externa (vegetal o bacteriana). La formación del complejo provoca que se encuentre menos Fe disponible en el entorno, dificultando la asimilación del mismo por otros microorganismos que no tienen un sistema específico de reconocimiento del complejo. De esta forma, la carencia de Fe disponible suprime el crecimiento de otros microorganismos, por ejemplo de los patógenos. Este es un ejemplo de biocontrol de un patógeno por la presencia de un microorganismo productor de sideróforos. Existiría además evidencia experimental que sugeriría una influencia directa de los sideróforos bacterianos en la nutrición de las plantas. Acorde a la misma, las plantas serían capaces de utilizar los complejos Fe^{3+} -sideróforos bacterianos como fuente de Fe, aumentando sus posibilidades de supervivencia y adaptación a diferentes condiciones de suelo (Aguado-Santacruz et al 2012).

La búsqueda, mediante RAST y antiSMASH 2.0, de genes relacionados con los subsistemas de adquisición de Fe, toma y utilización de grupos hemo y heminas, y transportadores del tipo Ton mostró que el genoma de JD2 presentaría varios de estos subsistemas. Los ORFs relacionados con estos subsistemas se muestran en el Anexo V. En especial, se detectaron los ORFs relacionados con la síntesis del sideróforo pioverdina y con la importación de los sideróforos enterobactina y pioquelina (Cuadro 4.13).

Cuadro 4.13. Genes de adquisición y metabolismo de Fe, específicamente de sideróforos, presentes en JD2.

Sideróforo	Disposición génica y función asignada
Pioverdina	• <i>fvpAR/pvdA/pvdEF</i> : FpvA, receptor de membrana externa
	FpvR, sensor transmembrana antisigma
	PvdA, monooxigenasa de L-ornitina
	PvdE, transporte ABC (componente permeasa y ATPasa)
	PvdF, formiltransferasa de hidroxiornitina
	• <i>pvdQ</i> : PvdQ, hidrolasa acilasa periplasmática de acil-homoserin lactona
• <i>fvpI</i> y <i>pvdS</i> : Fpvl y PvdS, factores sigma	
• <i>pvdD</i> : PvdD, sintetasa	
• <i>pvdG</i> : PvdG, tioesterasa	
Pioquelina	• <i>fptA</i> : FptA, receptor de membrana externa
	• <i>fptX</i> : FptX, permeasa de membrana interna
	• <i>pchR</i> : PchR, regulador transcripcional
Enterobactina	• <i>fepCBDG</i> : FepC, hidrolasa citoplasmática de ATP
	FepB, proteína periplasmática de unión a enterobactina
	FepD y FepG, permeasas de membrana interna

Las enterobactinas son sideróforos de Fe producidos por *E. coli*, relacionados con su patogenicidad. El sistema de biosíntesis, exportación e importación de enterobactina incluye seis genes de transporte o genes *fep* (*A,B,C,D,G,E*), seis genes de biosíntesis o genes *ent* (*A,B,C,D,E,F*), además de *entS*, cuyo producto interviene en la secreción de la enterobactina y *fes*, que codifica para una esterasa citoplasmática que media la liberación del hierro del complejo Fe-enterobactina (Urgell Urpi 2004). En *E. coli* la síntesis de la enterobactina requiere de corismato como precursor e involucra cinco enzimas (EntA, EntB, EntC, EntE y EntF). Las cuatro primeras subunidades génicas (*entABCE*) se disponen formando un operón junto a las tres subunidades (*fepB*, *fepD*, *fepG*) que codifican, junto a *fepC*, para el transportador ABC, utilizado para la importación del complejo enterobactina-Fe (Peregrin-Alvarez et al 2009). FepC es una hidrolasa de ATP, citoplasmática (Urgell Urpi 2004). La adquisición de este conjunto de genes le proveería a cualquier célula de la habilidad para sintetizar, secretar e importar enterobactina, utilizando corismato como precursor para la síntesis del sideróforo (Peregrin-Alvarez et al 2009). El análisis del genoma de JD2 mostró que este microorganismo no presenta los genes relacionados a la biosíntesis de este tipo de sideróforo. Sin embargo, sí se detectaron los genes *fep*, formando un operón siguiendo la disposición *fepCBDG*, que le permitirían la internalización de complejos Fe-enterobactinas exógenas.

Las pioverdinas (PVDs) son el pigmento fluorescente característico de *Pseudomonas* fluorescentes, conocido también como fluoresceína y pseudobactina (Visca et al 2006; Meyer et al 2002). La estructura química de este tipo de sideróforos varía entre especies de bacterias, aunque todos se componen de tres partes, un cromóforo fluorescente de estructura más o menos conservada; una cadena acilo lateral (acídica o dicarboxílica) unida al grupo amino del cromóforo y una cadena peptídica variable, unida a través de un grupo amida al cromóforo (Yeterian et al 2010; Visca et al 2006; Meyer et al 2002). En general, los genes involucrados en la síntesis de PVDs se disponen en dos operones, *pvc* y *pvd*, implicados en la síntesis del cromóforo y de la cadena peptídica, respectivamente (Rédly y Poole 2003). Existen varias isoformas de PVDs, aunque todas involucran en su síntesis a PvdL, PvdI, PvdJ y PvdD, cuatro sintetisas de péptidos no-ribosomales (NRPS, del inglés *non-ribosomal peptide synthetases*) (Visca et al 2006). Junto a ellas se han identificado otras 11 secuencias implicadas en la síntesis de PVDs. Algunas de ellas son la hidroxilasa de ornitina (PvdA), aminotransferasa (PvdH) y la formiltransferasa de hidroxiornitina (PvdF) (Ravel y Cornelis 2003). Las PVDs quelan Fe con alta afinidad, aunque también son capaces de quelar con menores eficiencias otros metales, entre ellos Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Los complejos formados con estos metales se unirán también en la superficie celular a través del mismo receptor del sideróforo: FpvIA (Braud et al 2009a).

Las funciones anotadas para JD2 involucradas en la síntesis, maduración y transporte de PVDs se indican en el Cuadro 4.13. Entre ellos se encuentran: 1) PvdE, un “exportador” del tipo ABC con los componentes permeasa y ATPasa fusionados, y que sería el principal candidato como transportador del precursor del sideróforo, no fluorescente, hacia el periplasma (Yeterian et al 2010); 2) PvdQ, una enzima acilasa periplasmática, involucrada en la maduración del sideróforo (Drake y Gulick 2011); 3) FpvR, un factor anti-sigma asociado a la membrana citoplasmática que posiblemente controla la actividad de los factores sigma PvdS y FpvI; 4) PvdS y FpvI, reguladores de la expresión de los genes de biosíntesis de PVD y de *fpvA*, respectivamente; 5) FpvA, receptor del sideróforo (Rédly y Poole 2015). Según los resultados, JD2 presentaría la información necesaria para la síntesis y transporte de PVDs.

Las pioquelinas (PCHs) son también comunes en muchas *Pseudomonas*, aunque se han reportado además en *Burkholderia* spp. (Aguado-Santacruz et al 2012; Woods y Sokol 2006). En *P. aeruginosa*, los genes encargados de su síntesis se organizan en dos operones (*pchDCBA* y *pchEF*), junto al gen regulador *pchR* (Reimann et al 2001). Su rol principal es quelar Fe en el medio extracelular e internalizarlo a la célula via un transportador específico de membrana externa (FptA) y una permeasa de membrana interna (FptX). Pero

además, este sideróforo es capaz de quelar otros metales con menor afinidad que el Fe, como Ag^+ , Al^3 , Cd^2 , Co^2 , Cr^2 , Cu^2 , Hg^2 , Mn^2 , Ni^2 , Pb^2 y Zn^2 , entre otros. Los complejos formados con estos metales se unen también a FptA (Braud et al 2009b). En el ambiente extracelular la PCH también actúa como molécula señal, induciendo la expresión de los genes de su propia biosíntesis y adquisición, a través del regulador citoplasmático PchR (Michel et al 2005; Heinrichs y Poole 1996). Los genes *fptX* y *fptA* forman parte del operón *fptABCX*, conservado en *Burkholderia* sp. y *Rhodospirillum rubrum*. En ellos, los productos de *fptB* y *fptC* participan en, pero no son indispensables para, la producción y utilización de piquelina como fuente de Fe (Michel et al 2007). Se identificaron en JD2 secuencias codificantes ubicadas en forma dispersa en el genoma (en tres diferentes contigs) de PchR, FptR y FptA. Al igual que con las PVD, la presencia de estos genes le permitiría a la bacteria la adquisición de Fe y/o otros metales a través de la internalización de piquelinas.

En bacterias Gram negativas, el tamaño de las proteínas transportadoras de Fe y los complejos Fe^{3+} -sideróforo exceden al tamaño de las aberturas de las porinas presentes en la membrana externa, y por lo tanto utilizan receptores externos de membrana específicos para su internalización. El sistema de internalización consta de un receptor de membrana externo, una proteína periplásmica que recibe al sideróforo y finalmente un transportador de membrana interno del tipo ABC (del inglés *ATP-binding cassette proteins*). La energía requerida para el transporte se obtiene a través de la fuerza protón-motriz generada a nivel de la membrana citoplásmica (interna), que permite el funcionamiento de los transportadores proteicos dependientes de TonB (TBDT, del inglés *TonB dependent-transporters*). TonB, el cual forma parte del complejo TonB/ExbB/ExbD presente en la membrana interna, provee de la energía requerida para la translocación del complejo a través de la membrana externa (Noinaj et al 2010). El papel más estudiado de los TBDTs es la toma de Fe en bacterias Gram-negativas, pero se han descrito TBDT para Ni, disacáridos, productos de degradación de proteínas, entre otros (Schauer et al 2008).

Durante el proceso de anotación, el servidor RAST unifica en un mismo subsistema los transportadores del tipo Ton y Tol. El subsistema incluye a los complejos TonB/ExbB/ExbD y TolA/TolB/TolR/TolQ, compuestos por proteínas homólogas, pero con funciones diferentes. Mientras que el primero se asocia principalmente al transporte de Fe, el segundo se relaciona al transporte de polímeros. Ambos constituyen una maquinaria especializada en la toma activa de nutrientes esenciales, pero escasos. Para conocer más acerca de los sistemas Ton de transporte en *Delftia* sp. JD2 se buscaron secuencias codificantes anotadas dentro del subsistema de transporte tipo Ton y Tol y se comparó con los genes de TBDTs encontrados en los genomas de varias Comamonadaceae, incluyendo a *D. acidovorans* SPH-1 (Mirus et al 2009) (Cuadro 4.14). En el genoma de JD2 se detectaron

más de 40 SCPs clasificadas dentro del subsistema de transporte tipo Ton y Tol, aunque no se pudo determinar la especificidad de sustrato (Anexo VI).

Cuadro 4.14. Número (N°) de genes anotados dentro del subsistema de transporte tipo Ton y Tol en el genoma de JD2. Se muestran además los TBDTs encontrados en otras Comamonadaceae (Mirus et al 2009).

Microorganismo	N° de genes
<i>Delftia sp. JD2</i>	44
<i>Delftia acidovorans SPH-1</i>	37
<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>	15
<i>Ralstonia metallidurans CH34</i>	16
<i>Burkholderia xenovorans LB400</i>	13
<i>Verminephrobacter eiseniae EF01-2</i>	6
<i>Polaromonas sp. JS666</i>	5
<i>Rhodoferax ferrireducens T118</i>	3
<i>Polaromonas naphthalenivorans CJ2</i>	3

Resistencia a antibióticos y metales pesados

Previamente se reportó que JD2 es un microorganismo capaz de resistir Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) (Morel 2010), así como varios antibióticos de diferentes familias (Ubalde et al 2012).

El análisis del genoma de JD2 sugiere que este presentaría la información necesaria para la degradación y eflujo de varias moléculas tóxicas (Cuadro 4.15.). En general, se detectaron sistemas de detoxificación y eflujo de antibióticos y metales pesados como Cr, Cu, Co, As, Zn y Cd. En particular, se identificó un agrupamiento de genes relacionados con la resistencia a Cr(VI) que, según los porcentajes de similitud de secuencias, no estarían presentes en las dos cepas de *Delftia* cuyos genomas han sido secuenciados.

Cuadro 4.15. Genes relacionados con resistencia a antibióticos y tóxicos, identificados en el genoma de JD2.

Subsistema funcional	Función asignada a genes
Resistencia a antibióticos y bacteriocinas	Tolerancia a y producción de Colicina
	Resistencia a fluoroquinolonas
	Producción de β -lactamasas
Resistencia a MP	Homeostasis y resistencia a Cu
	Resistencia a Co/Zn/Cd
	Resistencia a As
	Resistencia a compuestos de Cr
	Resistencia a Zn
Detoxificación	Absorción de selenito y selenato
Resistencia a múltiples drogas	MRS (Multi drug system)
	Bombas de eflujo

Se identificaron cuatro genes directamente relacionados con la resistencia a cromatos (CrO_4^{2-}) organizados en forma co-lineal en el genoma, probablemente formando un operón: *chrB* de 795 pb, *chrA* de 1197 pb, *chrC* de 909 pb y *chrF* de 459 pb (Fig. 4.8).

La búsqueda de probable homología, por megablast, de las secuencias identificadas de los cuatro genes (*chrB*, *chrA*, *chrC* y *chrF*) contra los genomas completos (SPH-1 y Cs1-4) y borradores de *Delftia* spp. (seis disponibles en NCBI) dió como resultado el alineamiento solo con secuencias de *Delftia tsuruhatensis* 670. Sin acotar la búsqueda de homologías a *Delftia* spp., el mismo algoritmo detectó homologías de secuencia con dos microorganismos: *Alicyclophilus denitrificans* K601 y *Burkholderia xenovorans* LB400 (Cuadro 4.16).

Cuadro 4.16. Búsqueda de homología por megablast utilizando las secuencias codificantes de los genes chr de JD2. Se muestran las cuatro secuencias con mayor impacto (menor *E-value*).

Microorganismo	gen	Cobertura (%)	Identidad (%)
1 <i>Delftia tsuruhatensis</i> 670	chrB	100	100
	chrA	100	99
	chrC	100	100
	chrF	100	99
2 <i>A. denitrificans</i> K601	chrB	100	100
	chrA	100	99
	chrC	100	100
	chrF	100	99
3 <i>B. xenovorans</i> LB400	chrB	100	100
	chrA	100	99
	chrC	100	99
	chrF	100	99
4 <i>Polaromonas</i> sp. JS666	chrC	65	75
5 <i>V. paradoxus</i> S110	chrC	55	72

Dado que las búsquedas nucleótido-nucleótido no son la forma más apropiada de buscar regiones homólogas codificantes de proteínas entre organismos, debido a la degeneración del código genético, se realizaron búsquedas a nivel proteico utilizando las secuencias traducidas. Para ello se buscaron, mediante el servidor ORF Finder de NCBI, los seis marcos abiertos de lectura, se seleccionó el ORF de mayor tamaño, con el cual se realizó la búsqueda de homologías (blastp). El resultado se muestra en el Cuadro 4.17.

Finalmente, con las secuencias homólogas de menor *E-value* se realizaron reconstrucciones filogenéticas. Las representaciones de la Figura 4.8 muestran cómo la información (secuencia aminoacídica) correspondiente a la resistencia a Cr(VI) en JD2, *D. tsuruhatensis* 670, *A. denitrificans* K601 y *B. xenovorans* LB400 se agrupan. Por otro lado, no se identificaron homólogos en los genomas de las dos *Delftias* enteramente secuenciadas (SPH-1 y Cs1-4). Sin embargo, se encontró homología con otros miembros de la familia Comamonadaceae, quienes presentarían también algunos de los genes del agrupamiento *chr* (Cuadro 4.18; Fig. 4.8).

Cuadro 4.17. Identificación de homólogos, por blastp, utilizando como referencia las secuencias codificantes de ChrB, ChrA, ChrC y ChrF de JD2. Se muestran las secuencias de mayor impacto (menor *E-value*). Se indican para cada organismo el N° de acceso a la secuencia aminoacídica en la base de NCBI.

Bacteria y N° de acceso a la proteína	Proteína	Tamaño (aa)	Cobertura (%)	Identidad (%)
1 <i>A. denitrificans</i> K601				
YP_004387837	ChrB	264	100	100
YP_004387836	ChrA	354	100	99
YP_004387835	ChrC	302	100	100
YP_004387834	ChrF	152	100	99
2 <i>B. xenovorans</i> LB400				
YP_556417	ChrB	264	100	100
YP_556416	ChrA	354	100	99
YP_556415	ChrC	302	100	99
YP_556414	ChrF	152	100	99
3 <i>Chryseobacterium taeanense</i>				
WP_017406219	ChrA	398	100	99
WP_017406218	ChrB	264	100	92
4 <i>Delftia tsuruhatensis</i> 670				
KEH10412	ChrB	264	100	100
KEH10411	ChrA	398	100	99
KEH10410	ChrC	280	100	99
KEH10409	ChrF	152	100	99

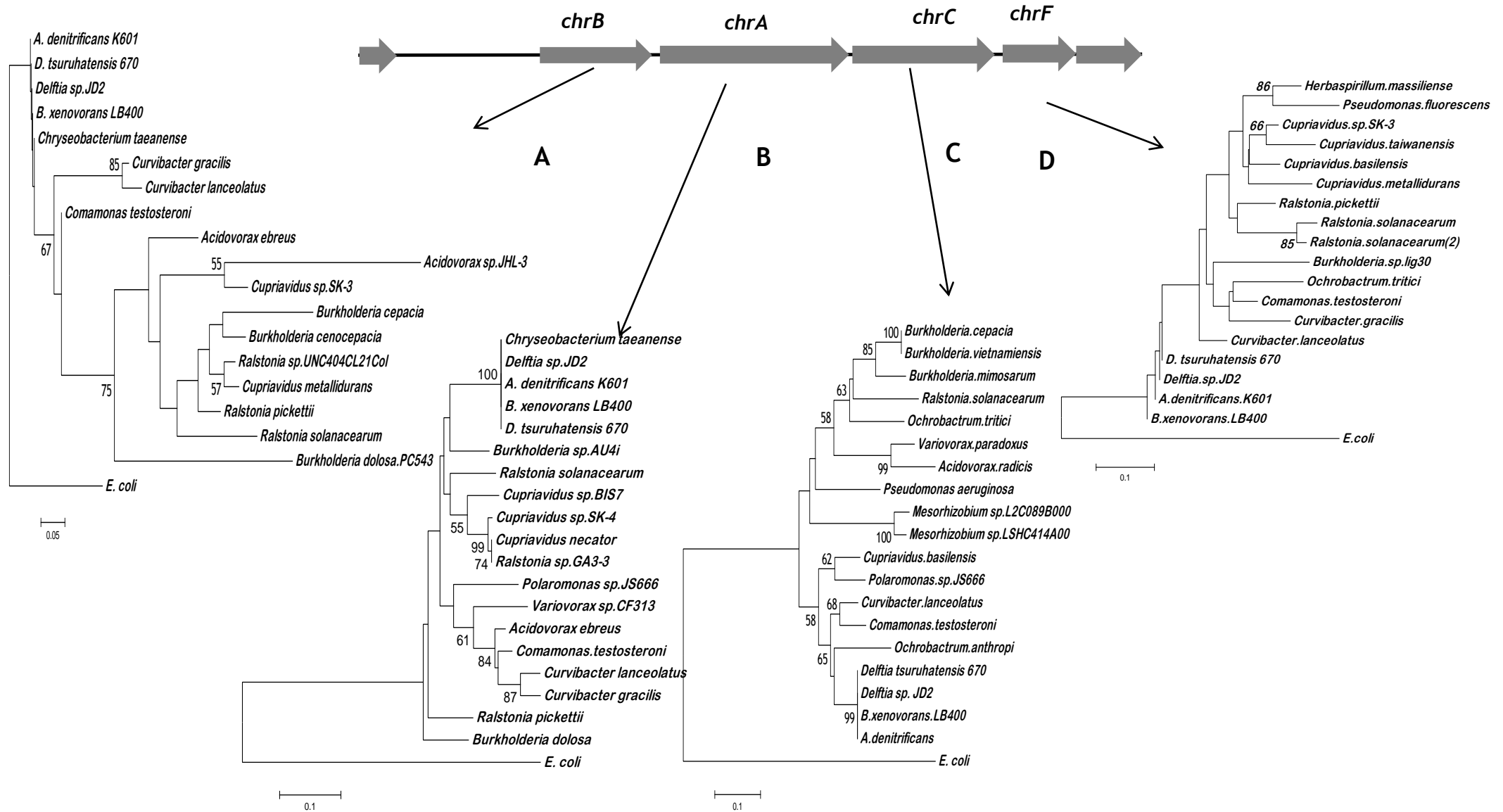


Figura 4.8. Relaciones evolutivas inferidas utilizando secuencias aminoacídicas de ChrB(A); ChrA(B); ChrC(C) y ChrF(D) por NJ. Se muestran los valores de bootstrap entre clados (2000 réplicas). La topología de árboles realizados con MEGA 6.0 usando UPGMA y NJ fue similar. Se utilizó como raíz externa a *E. coli*.

Se observó además que la sintenia del agrupamiento de genes se conserva entre especies (Fig. 4.9), sugiriendo la existencia de un ancestro común, y que la información se mantuvo como una unidad heredable debido a las relaciones funcionales entre esos genes. No se disponen de datos relacionados a la organización de estos genes en *D. tsuruhatensis* 670, por lo que esta no fue incluida en la figura.

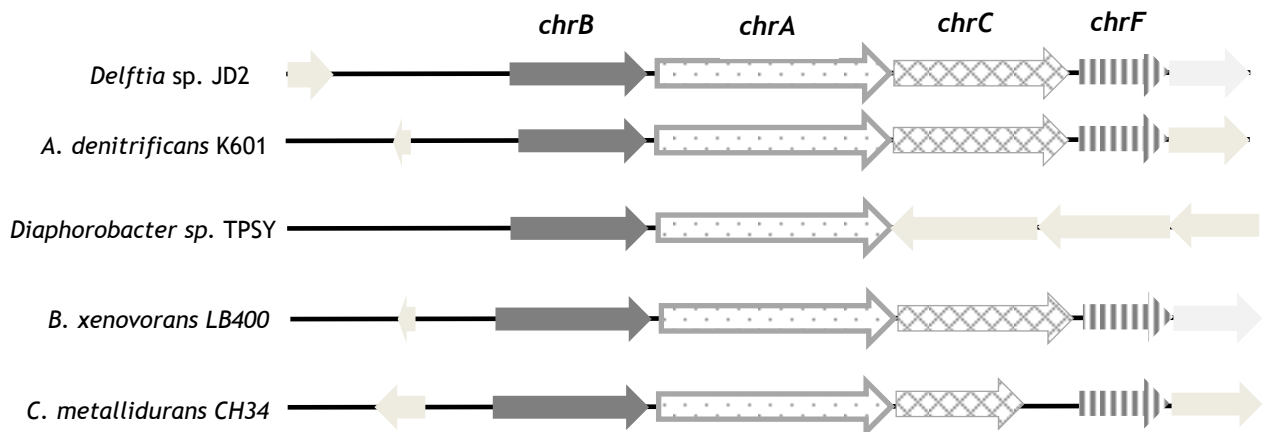


Figura 4.9. Ilustración gráfica del agrupamiento de genes *chr* en diferentes microorganismos de la familia Comamonadaceae y fuera de ella. *B. xenovorans* y *C. metallidurans*, y *A. denitrificans* y *Diaphorobacter* sp. pertenecen a las familias Burkholderiaceae y Comamonadaceae, respectivamente.

Los dominios funcionales conservados en las secuencias aminoacídicas de los genes *chr* se identificaron utilizando el servicio de búsqueda de dominios conservados de NCBI (CD Search) (Cuadro 4.18).

Cuadro 4.18. Dominios funcionales conservados (DFC) y superfamilias identificados para los genes de resistencia a cromatos (CrO_4^{2-}) presentes en JD2.

	DFC		Rol propuesto en la resistencia a Cr(VI)	Referencias
<i>chrB</i>	pfam09828.	Proteína de resistencia a CrO_4^{2-} [Cr(VI)]	Sensor y regulador transcripcional del operón <i>chr</i>	Nies et al 1990
<i>chrA</i>	COG2059.	Proteína hidrofóbica de membrana	Responsable del eflujo de CrO_4^{2-}	Juhnke et al 2002; Nies et al 1990
<i>chrC</i>	COG0605.	Superóxido dismutasa	Detoxificación de radicales libres que se producen cuando el Cr(VI) intracelular se reduce a Cr(III)	Nies et al 1990
	cd01444.	GlpE, sulfuro-transferasa (ST)	Detoxificación por ruptura de los complejos Cr-glutatión	Juhnke et al 2002
<i>chrF</i>	COG4275.	Proteína conservada sin caracterizar	Detoxificación de radicales libres (que se originen cuando el CrO_4^{2-} interactúa con compuestos celulares)	Juhnke et al 2002; Nies et al 1990

Acompañando el agrupamiento de genes *chr* en JD2 se encontraron otras SCPs relacionadas a resistencia a MP y elementos genéticos móviles (Fig 4.10), cuyos dominios conservados se describen en el Cuadro 4.19. Estos elementos móviles no presentaron similitud, a nivel nucleotídico, con secuencias de genomas de ninguna de las *Delftia* depositadas en la base de datos de NCBI. Sin embargo, se identificaron secuencias aminoacídicas con homología (>99% de cobertura e identidad de secuencia) con transposasas (Tnp) e integrasas (Int) de varias especies de *Pseudomonas aeruginosa*. De los cuatro elementos móviles, la integrasa (referencia de 2 en el Cuadro 4.19) presentó 100% de cobertura e identidad de secuencias con Tnp e Int de la familia Comamonadaceae, incluyendo una Int de *D. tsuruhatensis* 670. Además, no se encontró homología con *D. acidovorans* SPH-1 y *Delftia* sp. Cs1-4, ni con otras secuencias aminoacídicas de cualquier *Delftia* presente en la base de datos de NCBI. Las Int y las Tnp son todas recombinasas que podrían estar actuando en eventos de THG.

La información recabada al momento deja abierto un estudio más exhaustivo que valide una de las siguientes hipótesis: “los genes *chr* se adquirieron por THG, habiendo un ancestro común entre las *Delftias* JD2 y 670”, o “las cepas de *Delftia* secuenciadas y disponibles en las bases de datos, perdieron la información”.

Cuadro 4.19. Dominios funcionales conservados (DFC) y superfamilias identificados para los posibles elementos móviles adyacentes a los genes de resistencia a cromatos (CrO_4^{2-}) en JD2. Se muestran el microorganismo y los porcentajes de cobertura de secuencia e identidad de mayor impacto (menor E-value) entre paréntesis.

Referencia (Fig. 4.10)	Tamaño (aa)	Código de DFC y Descripción	Microorganismo (%cobertura, % identidad)
1	364	COG3666. Transposasa (Tnp)	<i>P. aeruginosa</i> (100,100)
2	507	pfam00665. Integrasa (Int)	<i>D. tsuruhatensis</i> (100,100)
3	365	COG3666. Transposasa	<i>P. aeruginosa</i> (99,100)
4	644	cd00801. Integrasa tipo P4	<i>P. aeruginosa</i> (100,99)



Figura 4.10. Ilustración gráfica de elementos móviles co-lineales y ubicados aguas-arriba y aguas-abajo de los genes relacionados a la resistencia a Cr(VI). Los números de los elementos móviles se corresponden con el número de referencia en el Cuadro 4.19. Las Tnp e Int se indican en verde y gris, respectivamente. Entre los genes *chr* y la Int (referencia 2) se hallaron ORFs correspondientes a proteínas hipotéticas, entre ellas, una lipoproteína conservada y dos transportadores del tipo ABC que no se indican en la figura.

Aunque no era de interés particular en esta tesis, durante el procesamiento de los datos obtenidos del genoma, se detectó la presencia de otras SCPs que nos interesaron por su valor, por ejemplo, SCPs relacionadas a la síntesis de polímeros de reserva y quimiotaxis. Los miembros del género *Delftia* descritos hasta la fecha se caracterizan por ser aeróbicos, gram negativos y móviles mediante flagelos polares o bipolares (Chen et al 2012). Se encontraron en el genoma de JD2, muchas SCPs relacionadas con la quimiotaxis mediada por flagelos y organizadas en un gran operón (Anexo VII). Al igual que *D. lacustris* 332, cepa descrita por Jorgensen et al (2009), JD2 presentaría, actividad β N-acetylglucosaminidasa, que forma parte de la hidrólisis de la mureína y reciclado del N-acetyl- β -glucosamina. Por último, al igual que *D. litopenaei* wsw-7 JD2 es un potencial acumulador de poli- β -hidroxibutirato, a juzgar por las múltiples SCPs relacionadas al subsistema “Metabolismo de polihidroxibutirato” (Anexo VIII

**DISCUSION GENERAL Y
CONCLUSIONES**

La alfalfa es uno de los cultivos más utilizados para realizar reservas forrajeras de alta calidad, y puede sembrarse prácticamente durante todo el año. Puede ser utilizada como heno, silo y pastoreo. Se utiliza en el área de producción animal intensiva y destacan sus características alimenticias para el animal: alta calidad proteica, palatabilidad y digestibilidad. Su alta persistencia en el campo y su buen potencial productivo, hacen que los costos por kg de materia seca producida sean bajos, aunque es imprescindible una correcta inoculación de la semilla con sinorizobios para obtener una buena implantación (Rebuffo et al 2000). Ya en el año 1994, García et al, en INIA La Estanzuela, determinaron una eficiencia de FBN en alfalfa de 32 kg N/Ton materia seca y 360 kg N/há.año. En Uruguay, según Racca et al (2007) las principales limitantes para la FBN que presentan los suelos, son el mal drenaje y la acidez.

Como cultivo es capaz de autosustentarse, obteniendo hasta el 90% del N que requiere por el proceso de FBN realizado por sinorizobios de alta eficiencia fijadora. Puede considerarse que en promedio, por cada Ton de materia seca de forraje producida por há, se fijan alrededor de 30 kg de N (Sawchik 2001), y en sistemas de producción que rotan gramíneas y leguminosas, el ingreso de N por FBN supera los 100 kg/ha.año (Ernst 2004). Resulta claro entonces que la entrada de N a los sistemas por la vía de la FBN es muy importante y que aquellas prácticas de manejo que maximicen la producción y persistencia de la alfalfa tendrán un impacto positivo sobre la entrada de N en los sistemas mixtos.

Dado que en el sistema agrícola-ganadero del Uruguay la alfalfa participa en un alto porcentaje del área sembrada del país y que como cultivo es altamente demandante de N, la FBN debe promoverse para que el N obtenido de esta manera sea suficiente para mantener un alto rendimiento de materia forrajera. Esto es posible si el cultivo de alfalfa se inocula correctamente con sinorizobios específicos y se combina con otras prácticas de manejo, que pueden incluir la co-inoculación con otras BPCV. Bajo esta situación, el disponer de una cepa de BPCV, eficiente para la producción de inoculantes, que garantice un mayor retorno tanto económico (en términos de materia seca de forraje que se traducirá finalmente en litros de leche o kg de carne), como nutricional (en términos de N fijado al sistema y contenido proteico del forraje), justifica considerablemente su uso a nivel de campo. Al respecto, el aumento en la productividad vegetal detectado durante esta tesis, por la co-inoculación de las plantas de alfalfa con los sinorizobios y JD2, de 14 y 35% en los PS aéreo y radicular, respectivamente, comparado con la inoculación simple con sinorizobio, supera ampliamente las perspectivas económicas y agronómicas.

Durante este trabajo se presentó evidencia que sugiere que JD2 es capaz de colonizar las raíces de alfalfa, y que no se inducirían signos aparentes de defensa por parte de la planta cuando se la co-inocula con el sinorizobio del inoculante comercial nacional (U143).

Curiosamente, algunos de los parámetros analizados para estudiar la respuesta de la planta (glucanasas y peroxidases) aumentaron cuando las plantas se inocularon con JD2. Sin embargo, para asignarle un valor relevante a estos datos sería necesario contar con un microorganismo capaz de infectar y enfermar a las plantas de alfalfa. En las plantas co-inoculadas, los niveles de actividad se mantuvieron relativamente constantes respecto al control sin inocular, sugiriendo la existencia de algún tipo de control sobre la inducción de defensa en la planta ejercido por el sinorizobio, tal como fue reportado por Zamioudis y Pieterse (2012); Mitra y Long (2004); Kim y An (2002) entre otros.

Las plantas lejos de desarrollar algún síntoma de enfermedad frente a la co-inoculación, se vieron estimuladas en su crecimiento. Muchos factores influyen sobre la competitividad de las BPCV en la rizosfera. Los sideróforos, las enzimas líticas, las moléculas involucradas en el fenómeno de QS y los antibióticos producidos y secretados por BPCV y otros microorganismos en la rizosfera son particularmente relevantes en la colonización radicular (Lugtenberg et al 2001). El genoma de JD2 presentaría genes anotados, asociados a la biosíntesis y/o transporte de sideróforos; más de 60 SCPs relacionadas a la quimiotaxis mediada por flagelos y presentaría actividad β N-acetyl-glucosaminidasa, que forma parte del reciclado del N-acetil- β -glucosamina (residuo final de los quitooligosacáridos). Esta hidrólisis es importante en el ciclo de C y del N en el suelo, porque participa en los procesos por los que la quitina se convierte en aminoazúcares, importante fuente de N mineralizable de los suelos (Acosta-Martinez et al 2003).

Se ha reportado que las bacterias producen y utilizan el AIA para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización, fito-estimulación y prevención de los mecanismos basales de defensa de las plantas (Spaepen et al 2007). Mucho se discutió acerca del AIA como molécula de señalización bacteriana. El AIA puede tener un efecto directo sobre la fisiología bacteriana, además de ejercer sus efectos sobre las plantas actuando como fitohormona (Spaepen et al 2007). Los resultados de esta tesis avalarían que la producción de AIA por JD2 sería uno de los mecanismos que explica, al menos en parte, los efectos de promoción del desarrollo radicular, evidenciado en invernáculo. Sin embargo, muchas otras moléculas pueden también estar involucradas.

Existen seis vías de síntesis de AIA en bacterias, y del análisis de la anotación genómica de JD2 surge que este microorganismo presentaría genes relacionados a la síntesis y degradación de Trp y de biosíntesis de AIA. Las vías que se encontraron representadas por alguna SCP, fueron las de biosíntesis de Trp a través de la vía del corismato, la vía de síntesis de AIA a través del IAM, y la vía de la kinurenina de degradación de Trp a antranilato. Esta evidencia sugiere que JD2 posiblemente sintetice AIA a través de la vía

del IAM, utilizando Trp como precursor, aminoácido que también sería capaz de sintetizar. No se descarta la posible producción de AIA por una vía independiente de Trp, quizás desde el antranilato (producto de la degradación del aminoácido).

Las leguminosas también producen una batería de moléculas que impactan sustancialmente sobre las relaciones mutualistas que desarrollan, destacándose los isoflavonoides. En hidroponía, las moléculas secretadas a la rizosfera se acumulan en el líquido de crecimiento, donde las raíces sumergidas y las bacterias inoculadas crecen. En los ensayos las plántulas se inocularon cuando estas ya contaban con hojas trifoliadas y un sistema radicular ramificado y totalmente sumergido en el medio de crecimiento (Fig. 5.1). En ese momento, las plántulas se transplantaron hacia nuevo líquido de hidroponía, y todos aquellos exudados radiculares que se produjeron durante la germinación y hasta al menos el estado de hoja unifoliada, se descartaron. Durante esta tesis, se detectaron cambios temporales en los perfiles de compuestos exudados hacia la rizosfera. Los compuestos acumulados en los líquidos hidropónicos en condiciones de co-inoculación provienen entonces de los eventos desarrollados luego de que las bacterias y las plantas se encontraron en comunicación.

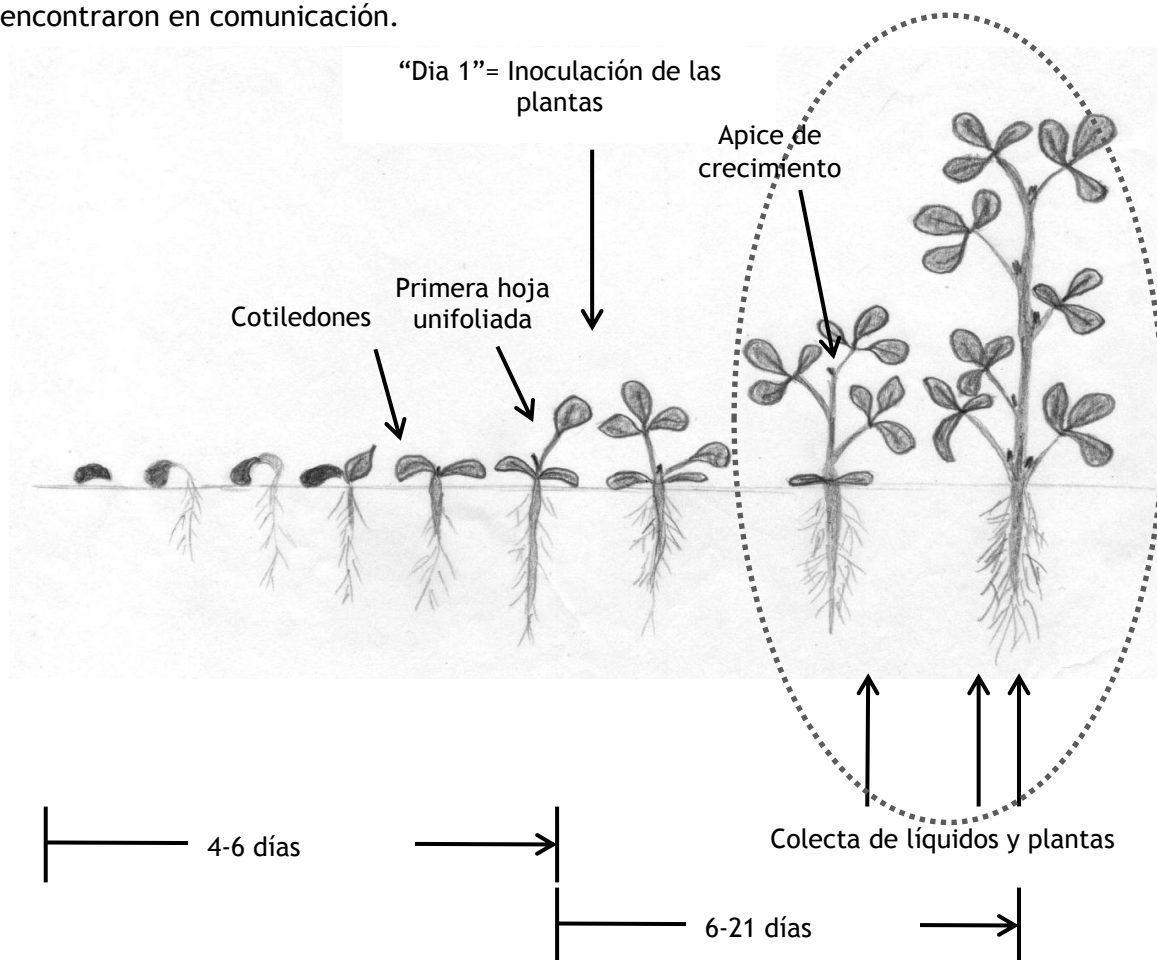


Figura 5.1. Fenología del cultivo de alfalfa en hidroponía. Se indican los principales hitos del cultivo y del ensayo.

Cuatro días después de la inoculación de las plantas en hidroponia, los flavonoides inductores de los genes *nod* fueron la principal señal molecular detectada en los *exudados radiculares-bacterianos (U143-JD2)*. Estos posiblemente estén involucrados en el diálogo químico entre las tres partes (rizobio, alfalfa y JD2). Sin embargo, con el transcurso del tiempo, y acompañando la disminución en los niveles de flavonoides, la producción de AIA aparece en escena, sugiriendo su rol como una importante señal. Sus niveles fueron importantes a los siete días de la inoculación y no se detectó más tarde (Fig. 5.2).

El consumo o degradación de AIA por las bacterias podría ser una explicación a la desaparición de esta fitohormona en los exudados. La mineralización completa de AIA (Zúñiga et al 2013; Leveau y Gerards 2008) y la capacidad de crecer en AIA como única fuente de C, fueron descritas para representantes de los géneros *Pseudomonas* (Leveau y Lindow 2005), *Arthrobacter* (Mino 1970), *Alcaligenes* (Claus y Kutzner 1983), *Bradyrhizobium* (Jarabo-Lorenzo et al 1998) y *Burkholderia* (Zúñiga et al 2013). A pesar de los múltiples reportes, la función ecológica de esta actividad de mineralización del AIA aún se desconoce (Scott et al 2013).

Se detectaron otras señales químicas, entre ellas muchos ácidos orgánicos, exudados hacia el medio de crecimiento de las plantas inoculadas y co-inoculadas. Entre los cambios, destaca el incremento de ácidos grasos insaturados y de cadena corta, así como ácidos orgánicos derivados de la degradación de lignina. La liberación de estas moléculas a la rizosfera posiblemente esté relacionada con un aumento de la fluidez de la pared celular de la planta, que podría preparar el camino para la colonización bacteriana, principalmente facilitando la penetración de los sinorizobios al interior vegetal. La acumulación de ácido lignocérico y de limoneno durante los cuatro primeros días de interacción, detectados en *exudados radiculares-bacterianos* también fue notoria, aunque se desconoce que roles pueden tener estos compuestos en la asociación planta-bacterias. Los azúcares y polioles se detectaron en exudados colectados a los 15 días post-inoculación los que podrían ser utilizados como fuente de C y energía por las microflora rizosférica.

El agregado de los metabolitos secundarios (en la forma de exudados libres de células colectados durante en crecimiento de alfalfa en condiciones de hidroponia) fue suficiente para incrementar el crecimiento de alfalfa, siendo la promoción del desarrollo del sistema radicular el efecto más relevante. Muchas moléculas que se acumularon en los exudados hidropónicos bien podrían explicar el mayor desarrollo del sistema radicular, particularmente el AIA, así como los mayores valores de flavonoides y CBPM detectados durante la co-inoculación de las plantas de alfalfa.



Día 4

Son muy altas las concentraciones de flavonas inductores de las genes *nod* y posiblemente aumenten la producción de los FN.

No se detectan nódulos, ni la producción de AIA, pero si de Trp. La naringenina es muy baja.



Día 7

Disminuye la concentración de flavonoides.

No se detecta Trp, pero si AIA en concentraciones muy elevadas respecto al control inoculado con el rizobio. Es posible que el AIA esté involucrado en el mayor desarrollo del sistema radicular (mayor absorción de agua y nutrientes, mayor área para la nodulación).

Se detectan moléculas posiblemente derivadas de la degradación de lignina (¿se facilita la entrada de los sinorizobios a la planta?)



Día 15

Disminuye aún más la concentración de flavonoides y de AIA.

Se estableció el mayor número de nódulos por planta. Se detectan azúcares, polioles, Trp y otros amino-compuestos, y ácidos carboxílicos (¿podrían ser fuente de C y N para la microflora?)

Día 50



Figura 5.2. Representación temporal de los cambios detectados en relación a los compuestos secretados hacia la rizosfera durante la interacción alfalfa- U143 y JD2 y que explicarían el mayor rendimiento y nodulación de las plantas.

El principal logro obtenido durante este estudio fue la contribución a entender como la alfalfa y el consorcio *Sinorhizobium-Delftia* intercambia señales durante una interacción efectiva y que supera las expectativas agronómicas, comparada con la inoculación rizobiana. Tanto la co-inoculación de las semillas con *Delftia* sp. JD2 y *S. meliloti* U143, como el agregado de exudados rizo-bacterianos al sustrato de crecimiento de las plantas, podría ser una estrategia útil para mejorar la productividad vegetal. Sin embargo, queda aún por determinar la factibilidad de producir a nivel industrial este tipo de formulación y su eficiencia en campo.

La anotación genómica y el análisis comparativo del genoma de JD2, reveló características funcionales asociadas a otras propiedades de interés biotecnológico. En particular, resalta el sistema de resistencia a cromatos (*chr*), junto con otros sistemas de resistencia y bombas de eflujo de MP. Estos estarían acompañados de elementos móviles (tranposasas e integrasas) en posiciones adyacentes, La organización de estos elementos génicos dejan abierta la posibilidad de analizar si el sistema de resistencia a cromatos fue adquirido por transferencia horizontal de genes. Estas características funcionales convierten a JD2 en un interesante candidato para el desarrollo de programas de biorremediación de MP, en especial Cr(VI). JD2 podría ser potencialmente utilizada como BPCV en plantas hiperacumuladoras de metales pesados para la detoxificación *in situ* de suelos contaminados con Cr, así como agente reductor de Cr(VI) para la detoxificación *ex situ* de efluentes industriales.

Perspectivas

Los resultados nos permiten concluir que la co-inoculación tiene un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de alfalfa y que JD2 estaría actuando como agente fito-estimulador de las plantas. Además, parecería que la producción de metabolitos secundarios exudados a la rizosfera (por parte de la planta y de las bacterias) juegan un papel directo en la promoción del crecimiento vegetal. En general, los resultados estimulan a continuar evaluando la capacidad PCV de *Delftia* sp. JD2, y en especial su potencial uso en la producción de formulaciones agrícolas.

Sin embargo, se debería hacer un estudio más profundo en el que se incluyan:

- el análisis más profundo de la colonización y sus efectos, mediante otras técnicas de microscopía, y determinar la respuesta de defensa en la planta frente a la

invasión de algún fitopatógeno luego de la pre-colonización por JD2, con fines comparativos;

- reforzar la hipótesis de que la co-inoculación tiene un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta debido a determinadas moléculas claves. Analizar el efecto de aplicar AIA, flavonoides (en especial luteolina), u otros metabolitos encontrados en este trabajo, sobre el crecimiento vegetal; la aplicación directa de metabolitos bacterianos producidos en medio líquido de crecimiento, sobre el sustrato de crecimiento vegetal, para descartar el efecto de la raíz en los exudados; e incluso la pre-incubación de JD2 en luteolina, previo a su inoculación en las plantas. Además, se deberían construir mutantes incapaces de producir AIA para verificar la relevancia del AIA producido en por JD2 en la interacción microorganismo-planta.
- evaluar la contribución de JD2 al *pool* de N de la planta por FBN, mediante ensayos de reducción de acetileno, para determinar la actividad nitrogenada en plantas bajo diferentes condiciones de inoculación.
- completar el estudio sobre el estado fisiológico de la planta frente a la co-inoculación, haciendo determinaciones de Chl en plantas crecidas en invernáculo, así como la evaluación de las enzimas relacionadas con el metabolismo de N, como por ejemplo la glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa y glutamato sintasa.
- completar la secuenciación del genoma de JD2 a través de PCRs que permitan completar los *gaps* de la secuencia actual. Asimismo, futuros análisis genómicos permitirán determinar las funciones precisas de genes anotados y descifrar funciones de nuevos genes de proteínas hipotéticas que conferirían propiedades únicas. La comparación de genomas completos, tanto con organismos relacionados como alejados, permitirán además descifrar relaciones evolutivas.

ANEXOS

ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

i) Medio TY

Triptona ----- 5 g

YE ----- 3 g

CaCl₂ 2,5%-----7 mL

H₂O c.s.p -----1000 mL

Agar-----20 g

ii) Medio LB

Triptona ----- 10 g

YE ----- 5 g

NaCl-----10 g

H₂O c.s.p -----1000 mL

Agar-----20 g

iii) Medio Jensen (Vincent 1970)

CaHPO₄ ----- 1 g

K₂HPO₄ (anh. 5%)-----4 mL

MgSO₄ (anh. 5%)-----2 mL

NaCl (anh. 1%)-----20 mL

FeCl₃ (6 H₂O 3,4%)-----5 mL

H₂O dest-----1000 mL

Solución de Micronutrientes-----1mL/L

pH 7

Agar-----0,8%

iv) Medio Murashige y Skoog

(Murashige y Skoog 1962, modificado)

KCl-----65 mg/L

KH₂PO₄-----12,5 mg/L

CaSO₄-----144 mg/L

MgSO₄.7H₂O----- 72 mg/L

NaFe-EDTA-----25 mg/L

H₃BO₃ -----1,6 mg/L

MnSO₄.4H₂O -----6,5 mg/L

ZnSO₄.7H₂O -----2,7 mg/L

KI-----0,75 mg/L

v) Solución de Micronutrientes

H₃BO₃ ----- 0,2 g

MnSO₄.H₂O ----- 0,15 g

ZnSO₄.7H₂O ----- 0,02 g

MoO₄.H₂O ----- 0,008 g

CuSO₄.5H₂O ----- 0,008 g

c.s.p-----100 mL

vi) Medio Howieson (Howieson 1993)

K₂SO₄-----c.f. 1mM

KH₂PO₄-----c.f. 0,2 mM

CaSO₄-----c.f. 1 mM

MgSO₄.7H₂O-----c.f. 0,2 mM

FeSO₄-----c.f. 0,02 mM

Solución de Micronutrientes-----1mL/L

vii) Medio Hoagland (Johnson et al 1957)

KCl-----3,8 mg/L

KH₂PO₄-----115 mg/L

CaSO₄-----236 mg/L

MgSO₄.7H₂O----- 72 mg/L

NaFe-EDTA-----7 mg/L

H₃BO₃ -----1,5 mg/L

MnSO₄.4H₂O -----0,4 mg/L

ZnSO₄.7H₂O -----0,6 mg/L

CuSO₄.5H₂O-----0,125 mg/L

MoO₄.H₂O-----0,081 mg/L

viii) Reactivo de DNS al 1%

- 1) Se disuelven 16 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 300 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en aproximadamente 600ml de agua destilada.
- 2) Se adiciona 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) poco a poco hasta lograr su completa disolución. Es conveniente realizarlo en baño de agua termostaticado a 50°C.
- 3) Se afora a 1 litro de agua destilada luego de que la disolución se enfría a temperatura ambiente. Si es necesario puede filtrarse.

La solución debe guardarse en frasco ámbar y alejado de la luz, a temperatura ambiente durando un máximo de dos meses, antes de mostrar precipitación o vestigios de descomposición.

ANEXO II: Morel M, Ubalde M, Braña V y Castro-Sowinski S. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI) reducing agent with plant growth promoting activity. Arch. Microbiol.193:63-68.

ANEXO III: Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S. 2014. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. JD2: an interaction that improves plant yield. 2014. DOI: 10.1094/MPMI-08-14-0229-R.

Delftia sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity

María A. Morel · Martha C. Ubalde · Victoria Braña · Susana Castro-Sowinski

Received: 11 June 2010 / Revised: 2 August 2010 / Accepted: 4 September 2010 / Published online: 21 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract A chromium (Cr)-resistant bacterium isolated from soil containing 6,000 mg/kg of Cr was identified based on 16S rRNA gene sequence analysis as *Delftia*, and designated as JD2. Growth of JD2 was accompanied with reduction of Cr(VI) to Cr(III) in liquid medium initially containing 100 mg/L Cr(VI), the maximum concentration allowing growth. JD2 showed NADH/NADPH-dependent reductase activity associated with the soluble fraction of cells. The results suggest that JD2 might be a good candidate for the treatment of highly Cr(VI)-contaminated water and/or industrial effluents. The isolate produced indole-3-acetic acid in the presence and absence of Cr(VI) and showed free-living nitrogen-fixing activity possibly attributable to a V-nitrogenase. JD2 did not counteract the harmful effect of Cr(VI) during leguminous plant growth and nodulation by rhizobial strains but functioned as a “helper” bacterium to enhance the performance of rhizobial inoculant strains during inoculation of alfalfa and clover (used as model plants to study plant growth-promoting activity) in the absence of Cr(VI).

Keywords *Delftia* · Plant-growth-promotion · Bioremediation · Chromium

Introduction

Contamination of water and soil by chromium (Cr) is a worldwide problem that is increasing in parallel with industrialization. Usually, Cr is found in the less toxic and slightly water-soluble trivalent oxidation state, Cr(III). However, due to human activity, the water-soluble hexavalent chromium, Cr(VI), is commonly released to the environment, where it is easily mobilized between soil and water. Cr(VI) is highly toxic and can penetrate cells, where it is chemically and/or biologically reduced to Cr(III), causing oxidative damage (Cheung and Gu 2007; Ramirez-Diaz et al. 2008).

Conventional physical/chemical methods to remediate contaminated areas are expensive and generally not specific to the contaminant. However, bioremediation strategies have emerged as an eco-friendly and low-cost clean-up approach to remove, destroy, or sequester hazardous substances from the environment. Bioremediation technologies use microorganisms, plants (phytoremediation), or enzymes to restore a contaminated environment to its original condition (Glick 2003).

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) have a positive effect on plant development (Castro-Sowinski et al. 2007). Nowadays, promising new approaches to contaminant removal are using PGPB to promote the growth of hyperaccumulating plants, overcoming the limitations imposed by their small size. Examples of bioremediation of heavy metals by PGPB and plants have been summarized by Zhuang et al. (2007).

PGPB promote plant growth either by helping to provide nutrients to the host plant, or by helping it to resist infection

Communicated by Erko Stackebrandt.

M. A. Morel · M. C. Ubalde · V. Braña · S. Castro-Sowinski (✉)
Unidad de Microbiología Molecular,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE),
Avda Italia 3318, 11600 Montevideo, PC, Uruguay
e-mail: scs@iibce.edu.uy

S. Castro-Sowinski
Sección Bioquímica y Biología Molecular,
Instituto de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República, Iguá 4225,
Montevideo, Uruguay

The Pattern of Secreted Molecules During the Co-Inoculation of Alfalfa Plants With *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* Sp. Strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield

M. A. Morel,¹ C. Cagide,¹ M. A. Minteguiaga,¹ M. S. Dardanelli,² and S. Castro-Sowinski^{1,3}

¹Molecular Microbiology, Clemente Estable Institute of Biological Research, Montevideo, Uruguay; ²Department of Molecular Biology, FCEFQYN, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina; ³Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, University of the Republic, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

Submitted 4 August 2014. Accepted 15 October 2014.

Delftia sp. strain JD2 is a plant-growth-promoting bacterium that enhances legume nodulation and growth, acting as nodule-assisting bacterium during the co-inoculation of plants with rhizobial strains. In this work, we evaluate how the co-inoculation of alfalfa with *Sinorhizobium meliloti* U143 and JD2 increases plant yield under greenhouse conditions and we analyze the pattern of secreted bioactive compounds which may be involved in the microbe–plant communication. The chemical composition of extracellular cultures (EC) produced in hydroponic conditions (collected 4, 7, and 14 days after bacterial treatment) were characterized using different chromatographic and elucidation techniques. In addition, we assessed the effect that plant irrigation with cell-free EC, produced during co-inoculation experiments, would have on plant yield. Results showed increased alfalfa shoot and root matter, suggesting that U143-JD2 co-inoculation might be a beneficial agricultural practice. The pattern of secreted secondary metabolites among treatments showed important differences. Qualitative and quantitative changes in phenolic compounds (including flavonoids), organic acids, and volatile compounds were detected during the early microbe–plant interaction, suggesting that the production of some molecules positively affects the microbe–plant association. Finally, the irrigation of co-inoculated plants with cell-free EC under greenhouse conditions increased plant yield over agronomic expectations. This effect might be attributed to the bioactive secondary metabolites incorporated during the irrigation.

Leguminous plants are economic important crops. They are source of proteins (high protein content of some grains) and other nutrients, and are used as pastures. Pastures such as alfalfa and clover play an important role in dairy and meat production, being sources of protein, fiber, and energy (Phan Tran and Nguyen 2009). Thus, the ability of many legumes to form associations with plant-growth-promoting bacteria (PGPB) that increase plant yield is of high ecological and

economic interest. The comparison between chemical and biological fertilization supports the idea that the uses of PGPB in commercial formulations represent an economic, sustainable, and environmentally friendly alternative to maintain nutritional needs of an agroecosystem (Morel et al. 2012).

The biological nitrogen (N) fixation process in leguminous plants plays a very important role in terms of plant production in agriculture. Rhizobia are bacteria that fix atmospheric N when associate with leguminous plants. The N fixation is preceded by root morphological changes that include the root-nodule formation (where rhizobia are transformed into bacteroids and fix N as the result of the nitrogenase activity) (Morel and Castro-Sowinski 2013). Thus, rhizobia promote growth by increasing the N supply to the legume host plant. In addition, the enhanced nodulation by the combined inoculation with rhizobia and other PGPB has been reported for several legumes. This phenomenon may be mainly due to changes in root-exuded molecules such as flavonoids that increase the transcription of rhizobial nodulation genes (Dardanelli et al. 2008, 2012; Morel and Castro-Sowinski 2013; Narula et al. 2009; Volpin et al. 1996). However, other molecular factors in addition to flavonoids—for example, phytohormones, volatile organic compounds (VOC), quorum-sensing signaling molecules, extracellular polysaccharides, and proteins—have been involved in the establishment of the mutualistic interaction between legume and rhizobia (Morel and Castro-Sowinski 2013).

Microbial secreted hormones (auxins and cytokinins) influence plant cell division and differentiation, affecting root and shoot architecture and functioning. VOC may have antibiotic functions, induce different phytohormonal signaling networks, and activate immune systemic resistance and cytokinin-dependent pathways for plant growth promotion. The best-known roles attributed to plant flavonoids are in chemoattraction of rhizobia to the legume root and as a primary molecular signal for rhizobial *nod*-gene induction, followed by nodulation factor production. Extracellular polysaccharides have roles as protection against stress, attachment to surfaces, plant invasion, and inhibition of plant defense in plant–microbe interactions. For better information on molecular signaling in microbe–plant interaction, see Morel and Castro-Sowinski (2013).

Corresponding author: S. Castro-Sowinski; Telephone: +(598) 25252095; E-mail: s.castro.sow@gmail.com; scs@fcien.edu.uy

ANEXO IV: Funciones anotadas presentes en *Delftia* sp. JD2 pero ausentes en *Delftia* sp. Cs1-4 y *D. acidovorans* SPH-1

Se muestran solo las funciones asignadas por RAST a las SCPs (como *no hipotéticas*) de JD2 que no aparecen en los genomas de SPH-1 y Cs1-4. La mayoría de las SCPs únicas a JD2 se relacionó a *proteínas hipotéticas*. Se muestran en recuadro aquellas funciones relacionadas con la resistencia a metales pesados.

Funciones anotadas presentes en JD2 y ausentes en SPH-1 y Cs1-4

2,4-diketo-3-deoxy-L-fuconate hydrolase
2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase
2-keto-3-deoxy-L-fuconate dehydrogenase
2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases
3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (EC 1.1.1.100)
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII (EC 2.3.1.179)
3-oxoadipate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.6);
Glutaconate CoA-transferase subunit A (EC 2.8.3.12)
3-oxoadipate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.6);
Glutaconate CoA-transferase subunit B (EC 2.8.3.12)
AAA family ATPase, possible cell division control protein cdc48
ABC transporter amino acid-binding protein
ABC-type amino acid transport system, permease component
ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component
ABC1 family protein
ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA
ATPase involved in DNA repair
Acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.36)
Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)
Aldo-keto reductase
Aliphatic amidase AmiE (EC 3.5.1.4)
Alpha/beta hydrolase
Asl7591 protein
Bacteriophage protein gp37
Beta-propeller domains of methanol dehydrogenase type
Bll7991 protein
C-5 cytosine-specific DNA methylase
CAIB/BAIF family protein (50 families)
Catechol 2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.2)
Cell division transporter, ATP-binding protein FtsE (TC 3.A.5.1.1)
Chaperone protein DnaK
Chromate resistance protein ChrB
Chromate transport protein ChrA
Chromosome segregation ATPase
Cobalt-zinc-cadmium resistance protein Czcd
Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter membrane fusion protein, Czcb
Conjugative transfer protein TraA
Copper chaperone

Cu(I)-responsive transcriptional regulator
 Cytochrome c-type biogenesis protein DsbD, protein-disulfide reductase (EC 1.8.1.8)
 D-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28)
 DNA polymerase III alpha subunit (EC 2.7.7.7)
 DNA polymerase-like protein PA0670
 DNA-binding heavy metal response regulator
 Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase
 Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)
 Excisionase domain protein
 FIG023873: Plasmid related protein
 FIG131328: Predicted ATP-dependent endonuclease of the OLD family
 FOG: Ankyrin repeat
 Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
 Glycosaminoglycan attachment site
 Glycosyl transferase, group 2 family protein
 Glycosyltransferase
Heavy metal RND efflux outer membrane protein, CzcC family
 HipA protein
 Hydrolase (HAD superfamily)
 IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraB
 IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraC
 IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraH
 IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraK
 IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraU
 IncF plasmid conjugative transfer protein TraD
 IncF plasmid conjugative transfer protein TraN
 Integrases
 Invasion protein
 Ku domain protein
 L-fuconate dehydratase (EC 4.2.1.68)
 L-fuconolactone hydrolase
 L-fucose mutarotase, type 2
**Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5)
 Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)**
 Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)
 LysR family transcriptional regulator YnfL
 Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP) (EC 2.7.7.22)
 Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)
Mercuric resistance operon regulatory protein
 Metallo-beta-lactamase family protein, RNA-specific
 Methyltransferase
 Microcystin dependent protein
 Mobile element protein
Multidrug-efflux transporter
 NAD(P)-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase archaeal (EC 1.2.1.59)
 Nucleotide sugar transaminase
 Outer membrane porin protein 32 precursor
 putative 3-hydroxyphenylpropionic acid porine
 Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family

PROBABLE CONSERVED LIPOPROTEIN LPQO
ParD protein (antitoxin to ParE)
Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
Phage T7 exclusion protein
Phage tail fiber protein
Plasmid conjugative transfer DNA helicase TrhI
Plasmid conjugative transfer endonuclease
Possible carboxymuconolactone decarboxylase family protein (EC 4.1.1.44)
Possible monoamine oxidase
Possible regulatory protein similar to urea ABC transporter, substrate binding protein
Probable Co/Zn/Cd efflux system membrane fusion protein
Multidrug efflux membrane fusion protein MexE
Protein of unknown function DUF1446
Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1)
Putative oxidoreductase
RND efflux system, outer membrane lipoprotein CmeC
RND multidrug efflux transporter; Acriflavin resistance protein
Ribose ABC transport system, ATP-binding protein RbsA (TC 3.A.1.2.1)
Ribose ABC transport system, permease protein RbsC (TC 3.A.1.2.1)
Ribose ABC transporter, periplasmic ribose-binding protein RbsB (TC 3.A.1.2.1)
Ribose-phosphate pyrophosphokinase (EC 2.7.6.1)
SAM-dependent methyltransferase
Superoxide dismutase SodM-like protein ChrF
Superoxide dismutase [Mn] (EC 1.15.1.1)
Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)
Superoxide dismutase ChrC
Teichoic acid export ATP-binding protein TagH (EC 3.6.3.40)
Teichoic acid export ATP-binding protein TagH (EC 3.6.3.40)
Teichoic acid export ATP-binding protein TagH (EC 3.6.3.40)
Thioredoxin
Thymidine phosphorylase (EC 2.4.2.4)
TonB-dependent siderophore receptor
Transcriptional regulator
Transcriptional regulator, IclR family
Transcriptional regulator, LysR family
Transcriptional regulator, MerR family
Transporter
Transposase
Type IV fimbrial biogenesis protein PilW
UDP-galactose-lipid carrier transferase (EC 2.-.-.-)
Urea ABC transporter, permease protein UrtB
Urea ABC transporter, permease protein UrtC
Urea ABC transporter, substrate binding protein UrtA
Xenobiotic-transporting ATPase
Xylulose-5-phosphate phosphoketolase (EC 4.1.2.9)
Fructose-6-phosphate phosphoketolase (EC 4.1.2.22)
aminoglycoside phosphotransferase
conserved hypothetical protein
conserved phage protein

dehydrogenase clustered with L-fuconate utilization genes

diguanylate cyclase/phosphodiesterase (GGDEF & EAL domains) with PAS/PAC sensor(s)

phage-related hypothetical protein

putative exported protein

putative protein Ymh

putative recombinase

putative transcription regulator protein

putative transposase

transcriptional regulator, LysR family

transport system permease protein

ANEXO V: SCPs relacionadas con la Adquisición y metabolismo del Fe en *Delftia* sp. JD2, mediante RAST.

Subsistema	Rol	Numero de SCPs
Siderophore Pioverdine	Acyl-homoserine lactone acylase PvdQ (EC 3.5.1.-), quorum-quenching	1
	Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules	1
	Thioesterase PvdG involved in non-ribosomal peptide biosynthesis	1
	L-ornithine 5-monooxygenase (EC 1.13.12.-), PvdA of pyoverdine biosynthesis	1
	PvdE, pyoverdine ABC export system, fused ATPase and permease components	1
	Pyoverdine synthetase PvdF, N5-hydroxyornithine formyltransferase	1
	Sigma-70 factor FpV (ECF subfamily), controlling pyoverdine biosynthesis	1
	Non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine	1
	Pyoverdine sidechain non-ribosomal peptide synthetase PvdD	1
Siderophore pyochelin	Outer membrane receptor for ferric-pyochelin FptA	1
	Inner-membrane permease FptX, ferripyochelin	1
	Transcriptional regulator PchR	1
Siderophore Enterobactin	Ferric enterobactin transport system permease protein FepG (TC 3.A.1.14.2)	1
	Ferric enterobactin-binding periplasmic protein FepB (TC 3.A.1.14.2)	1
	Ferric enterobactin transport system permease protein FepD (TC 3.A.1.14.2)	1
	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC (TC 3.A.1.14.2)	1
Iron siderophore sensor & receptor system	FIG006045: Sigma factor, ECF subfamily	4
	Iron siderophore sensor protein	3
Iron acquisition in Streptococcus	Ferric iron ABC transporter, ATP-binding protein	4
	Iron compound ABC uptake transporter substrate-binding protein	1
	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein	3
	Ferric iron ABC transporter, permease protein	3
Heme, hemin uptake and utilization	Iron compound ABC uptake transporter substrate-binding protein	1

systems in GramPositives	FIG039061: hypothetical protein related to heme utilization	1
	Iron compound ABC uptake transporter permease protein PiuC	2
	Hemin transport protein HmuS	1
ABC transporter [Fe.B12.siderophore.hemin]	ABC transporter (iron.B12.siderophore.hemin) , permease component	1
	Outer membrane (iron.B12.siderophore.hemin) receptor	1
	ABC transporter (iron.B12.siderophore.hemin) , ATP-binding component	1
	ABC transporter (iron.B12.siderophore.hemin) , periplasmic substrate-binding component	1
Heme, hemin uptake and utilization	Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	2
systems in GramNegatives	Ferric siderophore transport system, biopolymer transport protein ExbB	1
	heme uptake regulator	3
	Putative heme iron utilization protein	1
	Electron transfer flavoprotein, beta subunit	1
	Hemin uptake protein	1
	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport	1
	Hemin ABC transporter, permease protein	2
	Hemin transport protein HmuS	1
	TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor	2
	Ferrichrome transport ATP-binding protein FhuC (TC 3.A.1.14.3)	2
Hemin transport system	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport	1
	Hemin uptake protein	1
	Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	2
	Hemin ABC transporter, permease protein	2
	Hemin transport protein HmuS	1
	heme uptake regulator	3
	TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor	2

ANEXO VI: SCPs relacionadas con el transporte de membrana y categorizadas en los subsistemas de transporte Ton y Tol, en *Delftia* sp. JD2, mediante RAST.

Rol	Numero de SCPs
Putative OMR family iron-siderophore receptor precursor	1
Ferric siderophore transport system, biopolymer transport protein ExbB	1
TonB-dependent receptor	5
Outer membrane lipoprotein omp16 precursor	1
TPR repeat containing exported protein	1
Biopolymer transport protein ExbD/TolR	3
TolA protein	6
MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	3
Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	2
Tol biopolymer transport system, TolR protein	1
Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor	2
tolB protein precursor, periplasmic protein involved in the tonb-independent uptake of group A colicins	1
4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase family active site	2
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase (EC 2.1.1.77)	3
Colicin I receptor precursor	1
Type I secretion outer membrane protein, TolC precursor	1
TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor	2
TonB-dependent siderophore receptor	17

ANEXO VII: SCPs relacionadas con la movilidad y quimiotaxis, y categorizadas en los subsistemas “Flagelos y movilidad flagelar”, mediante RAST.

Muchas de las funciones que se indican presentaron más de una SCPs. Se muestran en recuadro aquellas funciones cuyas SCPs no aparecen formando el gran operón que si forman las restantes.

Rol
Cell division protein FtsI [Peptidoglycan synthetase] (EC 2.4.1.129)
RNA polymerase sigma factor RpoD
Flagellar biosynthesis protein FliL
Flagellar hook-associated protein FliD
Flagellar hook-associated protein FlgK
Flagellar assembly protein FliH
Flagellar biosynthesis protein FliR
Flagellar biosynthesis protein FliP
Flagellar hook protein FlgE
Flagellar M-ring protein FliF
Flagellar basal-body rod modification protein FlgD
Flagellar P-ring protein FlgI
Flagellar basal-body rod protein FlgC
Negative regulator of flagellin synthesis
Flagellar biosynthesis protein FlhB
Flagellar hook-basal body complex protein FliE
Flagellar basal-body rod protein FlgB
Flagellar biosynthesis protein FliS
Flagellar basal-body rod protein FlgF
Flagellar L-ring protein FlgH
Flagellin protein FlaA
Flagellar transcriptional activator FlhD
Flagellar protein FlgJ [peptidoglycan hydrolase] (EC 3.2.1.-)
Flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA
Flagellar motor switch protein FliN
Flagellar basal-body rod protein FlgG
RNA polymerase sigma-54 factor RpoN
Flagellar motor rotation protein MotB
Flagellar protein FliJ
Flagellar hook-associated protein FlgL
Flagellum-specific ATP synthase FliI
Flagellar biosynthesis protein FlhA

Flagellar biosynthesis protein FliQ
Flagellar hook-length control protein FliK
Flagellar transcriptional activator FlhC
Flagellar motor switch protein FliM
Flagellar motor rotation protein MotA
Flagellar motor switch protein FliG
RNA polymerase sigma factor for flagellar operon
Flagellar biosynthesis protein FliT
Flagellar synthesis regulator FleN
Flagellar L-ring protein FlgH
Chemotaxis protein CheV (EC 2.7.3.-)
Flagellar motor rotation protein MotB
Flagellum-specific ATP synthase FliI
Flagellar basal-body rod modification protein FlgD
Predicted signal transduction protein
Flagellar biosynthesis protein FlhB
Signal transduction histidine kinase CheA (EC 2.7.3.-)
Flagellar biosynthesis protein FlhF
Flagellar motor rotation protein MotA
RNA polymerase sigma factor for flagellar operon
Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY

ANEXO VIII: SCPs relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, lípidos e isoprenoides y categorizadas en el subsistema “Metabolismo de Polihidroxicanoatos”, mediante RAST.

Muchas de las funciones que se indican presentaron más de una SCPs. La organización de las SCPs fue variable, presentándose desde aisladas en el genoma, hasta formando pequeñas agrupaciones de pocos genes.

Rol
3-hydroxybutyryl-CoA epimerase (EC 5.1.2.3)
3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (EC 4.2.1.55)
D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase (EC 3.1.1.22)
Polyhydroxyalkanoic acid synthase
Intracellular PHB depolymerase (EC 3.1.1.-)
Acetyl-CoA acetyltransferase (EC 2.3.1.9)
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.30)
Acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.36)
D-beta-hydroxybutyrate permease
Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)
Acetoacetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.16)
3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16)
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.35)
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.157)

REFERENCIAS

- Abeles LFB y Forrence LE. 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 45:395-400.
- Acosta-Martinez V, Zobeck TM, Gill TE y Kennedy AC. 2003. Enzyme activities and microbial community structure in semiarid agricultural soils. *Biol.Fert. Soils.*38:216-227.
- Acosta-Martinez V, Zobeck TM, Gill TE, y Kennedy AC. 2003. Enzyme activities and microbial community structure in semiarid agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:216-227.
- Adesemoye AO, Torbert HA y Kloepper JW. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Ecol.* 58:921-929.
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 35:9-21.
- Aguilar-Piedras JJ, Xiqui-Vásquez ML, García-García S y Baca BE. 2008. Producción del ácido indol 3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50:29-37.
- Akashi T, Aoki T y Ayabe S. 2005. Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol.* 137:882-891.
- Arbona V, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente, RM y Gómez-Cadenas A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plantarum* 132:452-466.
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Ash GJ. 2010. The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control* 52:230-240.
- Assefa S, Keane TM, Otto TD Newbold C y Berriman M. 2009. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics.* 25:1968-1969.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, and Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
- Badri D, Weir T, Van der Lelie D y Vivanco J. 2009. Rhizosphere chemicals dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Op. Biotechnol.* 20:642-650.

- Badri DV y Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant. Cell Environ.* 32:666-681.
- Bailey KL, Boyetchko SM y Längle T. 2010. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biol. Control* 52: 221-229.
- Bailey-Serres J y Mittler R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology Special Issue on Reactive Oxygen Species. Plant Physiol.* 141:311-311.
- 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. *Ann Rev Plant Biol* 57:233-266.
- Bajsa N, Morel MA y Castro-Sowinski S. 2013. The effect of agricultural practices on resident soil microbial communities: Focus on biocontrol and biofertilization. En: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. De Bruijn (ed.). 687-700p.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin MA, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA y Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19:455-477.
- Barea, J. M., E. Navarro, and E. Montoya. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 40: 129-134.
- Baudoin E, Nazaret S, Mougél C, Ranjard L y Moëgne-Loccoz Y. 2009. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biol. Biochem.* 41:409-413.
- Bauer WD y Mathesius U. 2004. Plant responses to bacterial quorum sensins signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:429-433.
- Benizri E, Baudoin E y Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* 11:557-574.
- Bennett JW, Hung R, Lee S y Padhi S. 2012. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview. En: *The mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research and their role as ecological signaling agents*. Esser K y Hock B (eds). Springer-Verlag Berlin. 373-394p
- 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 y Weston LA. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil.* 256:67-83.
- Bligh Eg y Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

- Bloemberg G, Wijffjes A, Lamers G, Stuurman N y Lugtenberg B. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *MPMI* 13:1170-1176.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD y Valéro JR. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem.* 41:323-342.
- Braud A, Hannauer M, Mislin GL y Schalk IJ. 2009b. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J. Bacteriol.* 191:3517-3525.
- Braud A, Hoegy F, Jezequel K, Lebeau T y Schalk IJ. 2009a. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* 11:1079-1091.
- Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky MJ, Sumner LW y Stacey G. 2010. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* 153:1808-1822.
- Burdman S, Kigel J y Okon Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Soil Biol. Biochem.* 29:923-929.
- Caetano-Anolles G, Crist-Estes DK y Bauer WD. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170:3164-3169.
- Carreño-Lopez R, Campos-Reales N, Elmerich C y Baca BE. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 264:521-530.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna y Luna V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45:28-35.
- Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G y Okon Y. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:119-125.
- Chakravarty G y Kalita MC. 2013. Comparative evaluation of organic formulations of *Pseudomonas fluorescens* based biopesticides and their application in the management of bacterial wilt of brinjal (*Solanum melongena* L.). *African J. Biotech.* 10:7174-7182.
- Chandler D, Davidson G, Grant WP, Greaves J y Tatchell GM. 2008. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Sci. Technol.* 19:275-283.
- Chang M, Hadero A y Crawford IP. 1989. Sequence of the *Pseudomonas aeruginosa trpI* activator gene and relatedness of *trpI* to other prokaryotic regulatory genes. *J. Bacteriol.* 171:172-183.

- Chen J. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. En: International Workshop on Sustained Management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use. pp20.
- Chen S y Hickey WJ. 2011. Development of tools for genetic analysis of phenanthrene degradation and nanopod production by *Delftia* sp. Cs1-4. *Frontiers Microbiol.* 2:A187.
- Chen W, Lin Y, Sheu D y Sheu S. 2012. *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:2315-2321.
- Claus G y Kutzner HJ. 1983. Degradation of indole by *Alcaligenes* spec. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 169-180.
- Clevers JG y Kooistra L. 2012. Using hyperspectral remote sensing data for retrieving canopy chlorophyll and nitrogen content. *IEEE J-STARS* 5:574-583.
- Cohen-Kupiec R y Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:270-277.
- Comas I, Moya A, Azad RK, Lawrence JG y Gonzalez-Candelas F. 2006. The evolutionary origin of Xanthomonadales genomes and the nature of the horizontal gene transfer process. *Mol. Biol. Evol.* 23:2049-2057.
- Compant S, Clément C y Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42:669-678.
- Corona DY. 2006. De la secuencia de un genoma bacteriano a la identificación de candidatos vacunales. *VacchiMonitor [online]* 15:23-29.
- D'haeze W y Holsters M. 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol.* 12:555-561.
- Dakora FD y Phillips DA. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil.* 245:35-47.
- Dardanelli MS, Fernández de Córdoba FJ, Espuny MR, Rodríguez Carvajal MA, Soria Díaz ME, Gil Serrano MR, Okon Y y Megías M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol. Biochem.* 40:2713-2721.
- Das K, Dang R, Shivan TN y Sekeroglu N. 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. grown in Indian subtropics. *J. Medicinal Plants Res.* 1:005-008.
- Davies PJ. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. En: *Plant hormones*. Springer Netherlands. 1-12p.

- De Gusseme B, Vanhaecke L, Verstraete W y Boon N. 2010. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Res.* 45:1829-1837.
- De Rijke E, Out P, Niessen W, Ariese F, Gooijer C y Brinkman UAT. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatography A.* 1112:31-63.
- Del Rio D, Stewart AJ y Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15:316-328.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV y Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212:153-162.
- Dordas CA y Sioulas C. 2008. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. *Industrial Crops and Products* 27:75-85.
- Drake Ej y Gulick AM. 2011. Structural characterization and high throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis. *ACS Chem. Biol.* 18:1277-1286.
- Dubern JF y Diggle SP. 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol. BioSyst.* 4:882-888.
- Duetz WA, Bouwmeester H, van Beilen JB y Witholt B. 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:269-525 277.
- Dutta S, Rani TS y Podile AR. 2013. Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PloS one* 8:e78369.
- Egamberdieva D, Berg G, Lindstrom K y Rasanen LA. 2010. Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance off odder galega (*Galega orientalis* Lam.) *Europ. J. Soil Biol.* 46:269-272.
- El Zemrany H, Cortet J, Peter Lutz M, Chabert A, Baudoin E, Haurat J, Maughan N, Félix D, Défago G, Bally R y Moënné-Loccoz Y. 2006. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol. Biochem.* 38:1712-1726.
- Ernst O. 2004. Leguminosas como cultivo de cobertura. *Informaciones agronómicas del cono sur* 21: 1-10.
- Etesami HH, Alikhani A y 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.

- Farag MA, Huhman DV, Dixon RA y Sumner LW. 2008. Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* 146:387-402.
- Farag MA, Huhman DV, Lei Z y Sumner LW. 2007. Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochem.* 68:342-354.
- Farrow JM y Pesci EC. 2007. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J. Bacteriol.* 189:3425-3433.
- Fernández-Herrera E. 2011. Tesis Doctoral. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 resistete a *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. Colegio de posgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, México. pp84.
- Ferri L, Gori A, Biondi EG, Mengoni A y Bazzicalupo M. 2010. Plasmid electroporation of *Sinorhizobium* strains: The role of the restriction gen *hsdR* in type strain Rm1021. *Plasmid.* 63:128-135.
- Fox SL, O'Hara G y Brau L. 2011. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant Soil* 48:245-254.
- Frandsberg E y Schnurer J. 1994. Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K1. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 361-367.
- Fraysee N, Couderc F y Poinot V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.
- Frettinger P, Herrmann S, Lapeyrie F, Oelmüller R y Buscot F. 2006. Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*. *Mycorrhiza* 16:219-223.
- Fuentes-Silva D y Rodriguez-Romero A. 2006. Endo- β -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 15:35-42.
- Gamalero E, Lingua G, Berta G y Lemanceau P. 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement.* 23:407-418.
- Gao J y Gussin G. 1991. Activation of the *trpBA* promoter of *Pseudomonas aeruginosa* by TrpI protein in vitro. *J. Bacteriol.* 173:3763-3769.
- García J, Labandera C, Pastorini D y Curbelo, S. 1994. Fijación de nitrógeno por leguminosas en La Estanzuela. En: Nitrógeno en Pasturas. INIA Serie Técnica 51. 13-18p.
- Garrity GM, Bell JA y Lilburn TG. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Springer, New York, Berlin, Heidelberg. pp379.

- Gerth ML, Nigon LV y Patrick WM. 2012. Characterization of the indole-3-glycerol phosphate synthase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Protein J.* 31:359-365.
- Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L y Stewart, A. 2012. Have biopesticides come of age?. *Trends Biotech.* 30:250-258.
- Gogarten JP, Doolittle WF y Lawrence JG. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19:2226-2238.
- Goławska S, Łukasik I y Leszczyński B. 2008. Effect of alfalfa saponins and flavonoids on pea aphid. *Entomologia experimentalis et applicata*, 128:147-153.
- Goławska S, Łukasik I y Leszczyński B. 2008. Effect of alfalfa saponins and flavonoids on pea aphid. *Entomologia Experim. Et applicate.* 128:147-153.
- Gomez-Vasquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR y Cooper RM. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany* 94:87-97.
- Gonçalves M C, Vega J, Oliveira JG y Gomes M. 2005. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitopatologia brasileira* 30:10-16.
- Gonzalez JE y Marketon MM. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 67:574-592.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P and James M. Tiedje. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int.J. Syst.Evol. Microbiol.* 57:81-91.
- Hail D, Lauziere I, Dowd SE y Bextine B. 2011. Culture independent survey of the microbiota of the glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca vitripennis*) using 454 pyrosequencing. *Environ. Entomol.* 40:23-29.
- Hammer Ø, Harper DAT y Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:9pp.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y 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.
- Hartwig UA, Maxwell CA, Joseph CM y Phillips DA. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 92:116-122.
- Hassan S y Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J. Experim. Bot.* 63:3429-3444.
- He XS y Fuqua C. 2006. Rhizosphere communication: quorum sensing by the rhizobia. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1661-1677.

- Heath R y Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125:189-198.
- Heim KE, Tagliaferro AR y Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 13:572-584.
- Heinrichs DE y Poole K. 1996. PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fptA) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. J. Bacteriol. 178:2586-2592.
- Hernández-Mendoza JL, Moreno-Medina VR, Quiroz-Velásquez JD, García-Olivares JG y Mayek-Pérez N. 2010. Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. Rev. Colomb. Biotecnol. XII:57-63.
- Hinsinger P, Plassard C y Jaillard B. 2006. Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. J. Geochem. Explor. 88:210-213.
- Houles V, Guerif M y Mary B. 2007. Elaboration of a nitrogen nutrition indicator for winter wheat based on leaf area index and chlorophyll content for making nitrogen recommendations. Eur. J. Agron. 27:1-11.
- 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 medics. Soil Biol. Biochem. 25:567-573.
- Huang C, Wang T, Chung S y Chen C. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. J. Biochem. Molec. Biol. 38:82-88.
- Hussain A y Hasnain S. 2011. Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. J. Ind. Microbiol. Biotech. 38:85-92.
- Islam MA, Sturrock RN, Williams HL y Ekramoddoullah AKM. 2010. Identification, characterization, and expression analyses of class II and IV chitinase genes from Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphurascens*. Phytopathol. 100:356-366.
- Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Vega-Hernandez M, Trujillo J y Leon-Barrios M. 1998. Indole-3-acetic acid catabolism by bacteria belonging to the Bradyrhizobium genus. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century (Elmerich C, Kondorosi A & Newton WE, eds), p. 484. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Jasiński M, Kachlicki P, Rodziewicz P, Figlerowicz M y Stobiecki M. 2009. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. Plant Physiol. Biochem. 47:847-853.
- Jayamohan NS y Kumudini BS. 2011. Host pathogen interaction at the plant cell wall. Int. Res. J. Pharm. Pharmacol. 1:242-249.
- Johnson CM, Stout PR, Broyer TC y Carlton AB. 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. Plant and Soil 8:337-353.

- Jones DL, Nguyen C y Finlay RD. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* 321: 5-33.
- Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant Soil*. 205:25-44.
- Jorgensen N, Brandt K, Nybroe O y Hansen M. 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from freshwater and emended description of *D. tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2195.
- Juarez-Jimenez B, Manzanera M, Rodelas B, Martínez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J, Crognale S, Pesciaroli C y Fenice M. 2010. Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation* 21:475-489.
- Juge C, Prevosta D, Bertrand A, Bipfubusaa M y Chalifour FP. 2012. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Appl. Soil Ecol.* 61:147-559 157.
- Juhnke S, Peitzsch N, Hubener N, Grobe C y Nies DH. 2002. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179:15-25.
- Khorassani R, Hettwer U, Ratzinger A, Steingrobe B, Karlovsky P y Claassen N. 2011. Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus. *BMC Plant Bio.* 11: 121.
- Kim HB y An CS. 2002. Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. *MPMI* 15:209-215.
- Kirizii DA, Vorobei NA y Kots SY. 2007. Relationships between nitrogen fixation and photosynthesis as the main components of the productivity in alfalfa. *Russian J. Plant Physiol.* 54:589-594.
- Kloepper J y Schroth M. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: *Proceeding of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteriology 2, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France.* p879-882.
- Koonin EV y Wolf YI. 2008. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucl. Acids Res.* 36:6688-6719.
- Kumar KV, Singh N, Behl H M y Srivastava S. 2008. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere* 72:678-683.
- Kumar KV, Srivastava S, Singh N y Behl HM. 2009. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J. Hazard. Mat.* 170:51-57.
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV y Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8:298-300.

- Leibeling S, Schmidt F, Jehmlich N, von Bergen M, Muller RH y Harms H. 2010a. Declining capacity of starving *Delftia acidovorans* MC1 to degrade phenoxypropionate herbicides correlates with oxidative modification of the initial enzyme. *Environ. Sci. Technol.* 44:3793-3799.
- Leibeling S, Taubert M, Seifert J, Von Bergen M, Harms H y Muller RH. 2010b. Adaptation of the herbicide-degrading strain *Delftia acidovorans* MC1 through carbonylation of RdpA as key enzyme. *J. Biotechnol.* 150:S262-S26310.
- Leveau JHJ y Gerards S. 2008. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65: 238-250.
- Leveau JHJ y Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl Environ Microbiol* 71: 2365-2371.
- Lindström K, Murwira M, Willems A y Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 161:453-463.
- Liu EH, Qi LW, Cao J, Li P, Li CY y Peng YB. 2008. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules.* 13:2521-2544.
- Lugtenberg B y Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Lugtenberg BJ, Dekkers L y Bloemberg GV. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:461-490.
- Mahfouz SA y Sharaf-Eldin MA. 2007. Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield, and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Int. Agrophysics* 21:361-366.
- Malik D y Sindhu S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17:25-32.
- Marks BB, Megías M, Nogueira MA y 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
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Res* 424:83-95.
- Medema NH, Blin K, Cimermanic P, de Jager PV, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Breitling R y Takano E. 2011. AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucl. Acids Res.* 39:W339-46.
- Merino E, Jensen RA y Yanofsky C. 2008. Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:78-86.
- Merkl R. 2007. Modelling the evolution of the archaeal tryptophan synthase. *BMC Evol. Biol.* 7:59.
- Meyer JM, Geoffroy VA, Baysse, C, Cornelis, P, Barelmann, I, Taraz K y Budzikiewicz H. 2002. Siderophore-mediated iron uptake in fluorescent *Pseudomonas*: characterization of the

- pyoverdine-receptor binding site of three cross-reacting pyoverdines. Arch. Biochem. Biophys. 397:179-183.
- Michel L, Bachelard A y Reimann C. 2007. Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153:1508-1518.
- Michel L, González N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T y Reimann C. 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. Mol. Microbiol. 58:495-509.
- Miles EW. 2013. The Tryptophan Synthase $\alpha 2\beta 2$ Complex: A model for substrate channeling, allosteric communication, and pyridoxal phosphate catalysis. J. Biol. Chem. 288:10084-10091.
- Mino Y. 1970. Studies on destruction of indole-3-acetic acid by a species of *Arthrobacter*. IV. Decomposition products. Plant Cell Physiol. 11:129.
- Mitra RM y Long SR. 2004. Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. Plant Physiol. 134:595-604.
- Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M y Puteh AB. 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. Soil Biol. Biochem. 33:457-463.
- Moller IM, Jensen PE y Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 58:459-481.
- Molloy DP, Mayer DA, Gaylo MJ, Morse JT, Presti KT, Sawyko PM, Karatayev AY, Burlakova LE, Laruelle F, Nishikawa KC y Griffin BH. 2013. *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A- A biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (*Bivalvia: Dreissenidae*). J. Invert. Pathol. 113:104-114.
- Montoliu Vidal A. 2010. Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Tesis Doctoral. Universitat Jaume I, Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals, Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. pp213.
- Morel M, Braña V y Castro-Sowinski S. 2012. Legume Crops, importance and use of bacterial inoculation to increase the production. En: Goyal (Ed.), Crop Plant. A. Editorial INTECH. 217-240p.
- Morel M, Ubalde M, Braña V y Castro-Sowinski S. 2011. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI) reducing agent with plant growth promoting activity. Arch. Microbiol. 193:63-68.
- Morel M. 2010. Mecanismos implicados en la tolerancia a cromo en bacterias: potenciales aplicaciones biotecnológicas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Opción Microbiología. PEDECIBA - Universidad de la República. pp157.

- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.
- Narula N, Kothe E y Behl RK. 2009. Role of root exudates in plant-microbe interactions. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 82:122-130.
- Nelson DL y Cox MM. 2000. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, New York, NY, USA. 190-237p.
- Neumann G. 2007. Root exudates and nutrient cycling. En: *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*. Marshner P y Rengel Z (eds). Springer Berlin Heidelberg. 123-157p.
- Niehaus K, Baier R, Becker A y Pühler A. 1996. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* defense system -the key- of *Rhizobium meliloti* to enter the host plant? En: *Biology of Plant-Microbe Interactions*. Stacey G, Mullin B y Gresshoff P. (eds). ISMPI, St. Paul. 349-352p.
- Nies A, Nies D y Silver S. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ y Buchanan SK. 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 13:43-60.
- Okon Y y Labandera-Gonzalez CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- Okon Y y Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63: 366-370.
- Oliva García JJ. 2008. *Mutualismo y patogénesis: Importancia de genes implicados en virulencia para el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas simbióticos, Estación experimental del Zaidin, Universidad de Granada.
- Orellana O. 2002. *Perspectivas de la secuenciación de genomas bacterianos: nuevas estrategias en el desarrollo de terapias antimicrobianas*. *Rev. Chil. Infectol.* 19:S46-S49.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F y Stevens R. 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucl. Acids Res.* 42:D206-D214.
- Pagano E y Maddonni G A. 2007. Intra-specific competition in maize: Early established hierarchies differ in plant growth and biomass partitioning to the ear around silking. *Field Crops Res.* 101:306-320.
- Palmer GC, Jorth PA y Whiteley M. 2013. The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. *Microbiol.* 159:959-969.
- Pandey V, Dixit V y Shyam R. 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* 61:40-47.

- Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24:255-265.
- Paulin MM, Nicolaisen MH y Sørensen J. 2010. Abundance and expression of enantioselective *rdpa* and *sdpa* dioxygenase genes during degradation of the racemic herbicide (r,s)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propionate in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2873-2883.
- Pavone FD. 2012. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn por *Trichoderma* spp. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. pp199.
- Peregrín-Alvarez JM, Xiong X, Su C y Parkinson J. 2009. The modular organization of protein interactions in *Escherichia coli*. *PLoS Comput. Biol.* 5:e1000523.
- Perotti EBR y Pidello A. 1999. II Reunión Científico Técnica de Biología del suelo, fijación biológica del nitrógeno. FCA-UN de Catamarca. 181-184p.
- Peters NK y Long SR. 1988. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88:396-40.
- Peters NK, Frost JW y Long SR. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233:977-980.
- Phillips RS. 2014. Structure and mechanism of kynureninase. *Arch. Biochem. Bioph.* 544:69-74.
- Ping L y Boland W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9:263-266.
- Pinkard EA, Patel V y Mohammed C. 2006. Chlorophyll and nitrogen determination for plantation-grown *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* using a non-destructive meter. *Forest Ecol. Manag.* 223:211-217.
- Pliego C, Kamilova F y Lugtenberg B. 2011. Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. En: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop ecosystems*. Maheshwari DK (ed). Springer-Verlag. 295-343p.
- 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. Facultad de Ciencias Agrarias. 013.
- Preiswerk B, Ullrich S, Speich R, Bloemberg GV y Hombach M. 2011. Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *J. Med. Microbiol.* 60:246-248.
- Racca R, Campillo R y Labandera C. 2007. Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina, Chile y Uruguay. Informe Técnico Final de Proyecto FTG-13/2001, Convenio FTG/RF-01-03-RG. pp42. Disponible online: http://procisur.org.uy/proyectos/pdfs/14_ALFALFA_Informe_Tecnico_Final.pdf.
- Rao DR, Kodandaramaiah J, Reddy Mp, Katiyar RS y Rahmathulla VK. 2007. Effect of VAM fungi and bacterial biofertilizers on mulberry leaf quality and silkworm cocoon characters under semiarid conditions. *Caspian J. Env. Sci* 5:111-117.

- Ravel J y Cornelis P. 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *TRENDS in Microbiol.* 11:195-2000.
- Rebuffo M, Risso DF y Restaino E. 2000. Tecnología en Alfalfa. Boletín de divulgación N° 69, INIA.
- Rédly JA y Poole K. 2005. FpvIR control of fpvA ferric pyoverdine receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of an interaction between Fpvl and FpvR and identification of mutations in each compromising this interaction. *J. Bacteriol.* 187:5648-57.
- Reimann C, Patel HM, Serino L, Barone M, Walsh CT y Haas D. 2001. Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183:813-820.
- Richardson AD, Duigan SP y Berlyn GP. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153:185-194.
- Rodrigues Coelho MR, De Vos M, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E y Seldin L. 2008. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 15-22.
- Rodriguez-Martinez JM. 2004. Secuenciación de genomas. Arbor: Ciencia, Pensamiento y Cultura 698: 285-310.
- Rose JKC, Ham KS, Darvill AG y Albersheim P. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor Proteins: coevolution of a counter defense mechanism by plant pathogens. *The Plant Cell* 14:1329-1345.
- Roudier F, Gissot L, Beaudoin F, Haslam R, Michaelson L, Marion, J, Molino D, Lima A, Bach L, Morin H, Tellier F, Palauqui JC, Bellec Y, Renne C, Miquel M, DaCosta M, Vignard J, Rochat C, Markham JE, Moreau P, Napier J y Faure JD. 2010. Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22:364-375.
- Sambrook J, Maniatis T y Fritsch EF. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandnes A, Eldhuset TD y Wollebæk G. 2005. Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch. *Soil Biol. Biochem.* 37:259-269.
- Sawchik J. 2001. Dinámica del nitrógeno en la rotación cultivo pastura bajo laboreo convencional y siembra directa. En: Siembra Directa en el Cono Sur. Díaz-Rosello R. (ed) PROCISU: 323-345. Disponible online: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219230807115519.pdf>.
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38:995-1014.
- Schauer K, Rodionov DA y de Reuse H. 2008. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'?. *Trends Biochem. Sci.* 33:330-338.

- Schleheck D, Knepper TP, Fischer K y Cook AM. 2004. Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4053-4063.
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A y Langebartels C. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29:909-918.
- Scott, Jeness C., Isaac V. Greenhut, and Johan HJ Leveau. 2013. Functional characterization of the bacterial iac genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. *J. Chem. Ecol.* 39:942-951.
- Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B y De Bolle, MF. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46:941-950.
- Serandour J, Reynaud S, Willison J, Patouraux J, Gaude T, Ravanel P, Lemperiere G y Raveton M. 2008. Ubiquitous water-soluble molecules in aquatic plant exudates determine specific insect attraction. *PLoS ONE.* 3: e3350.
- Setiyaputra S, Mackay JP y Patrick WM. 2011. The Structure of a truncated phosphoribosylanthranilate isomerase suggests a unified model for evolution of the ($\beta\alpha$)₈ barrel fold. *J. Mol. Biol.* 408:291-303.
- Shannon LM, Kay E y Lew JY. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241:2166-2172.
- Shaw LJ, Morris P y Hooker JE. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8:1867-1880.
- Shetty A, Chen S, Tocheva EI, Jensen GK, Hickey WJ. 2011. Nanopods: a new bacterial structure and mechanism for deployment of outer membrane vesicles. *PLOS ONE* 6:e20725.
- Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Numaguchi M, Morimura S y Kida K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1479-1483.
- Shukla KP, Sharma S, Singh NK, Tiwari K y Singh S. 2011. Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *African J. Biotech.* 10:9717-9724.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G y Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* 132:199-208.
- Silva LR, Pereira MJ, Azevedo J, Mulas R, Velazquez E, Gonzalez-Andres F, Valentao P y Andrade PB. 2013. Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* enhances the organic and fatty acids content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds. *Food Chem.* 141:3636-3648.
- Silvar C, Merino F y Díaz J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165:1120-1124.

- Silveira APD. 1992. Micorrizas. En: Microbiología do Solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Cienciao do Solo. Brasil. 257-282p.
- Sinha S y Mukherjee SK. 2008. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Curr. Microbiol.* 56:55-60.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A y Krol J. 2006. Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6:2897-2903.
- Spaepen S y Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a001438.
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A y Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil.* 312:15-23.
- Spaepen S, Vanderleyden J y Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 4:425-448.
- Star L, Matan O, Dardanelli MS, Kapulnik Y, Burdman S y Okon Y. 2012. The *Vicia sativa* spp. *nigra-Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. *Plant and soil* 356:165-174.
- Stochmal A, Piacente S, Pizza C, De Riccardis F, Leitz R y Oleszek W. 2001a. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 49:753-758.
- Stochmal A, Simonet AM, Macias FA y Oleszek W. 2001b. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 49:5310-5314.
- Sugawara S, Hishiyamac S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiha T, Zhao Y, Kamiya Y y Kasahara H. 2009. Biochemical analyses of índole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *PNAS* 106:S430-S435.
- Tadeo F y Gómez-Cadenas A. 2008. Fisiología de las plantas y el estrés. En: Fundamentos de fisiología vegetal. (eds. Azcón-Bieto JA y Talón Cubillo) M.McGraw-Hill Interamericana de España.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Tan KH. 1994. Organic constituents. En: Environmental soil science. (ed. Marcel Dekker). Inc., New York. 51-95p.
- The UniProt Consortium. 2011. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res.* 39:D214-D219.

- Theocharis A, Bordiec S, Fernandez O, Paquis S, Dhondt-Cordelier S, Baillieul F, Clément C y Ait Barka E. 2012. *Burkholderia phytofirmans* PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures. *MPMI* 25:241-249.
- Thompson A y Taylor B. 2008. Guide for the use of the International system of units (SI). NIST Special publication 811. Gaithersburg. 85pp.
- 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. *Cur. Microbiol.* 64:597-603.
- Uesugi T, Toda T, Tsuji K y Ishida H. 2001. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol. Pharm. Bull.* 24:368-372.
- Urgell Urpi C. 2004. Análisis genómico y proetómico de los mecanismos de captación de hierro en *Aeromonas* mesófilas. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Departament de Microbiologi. pp215.
- Vacca DJ, Bleam WF y Hickey WJ. 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3797-3805.
- Van Loon LC y Bakker PAHM. 2006a. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. En: PGPR: Biocontrol and biofertilization. Siddiqui ZA. (ed.). Springer Netherlands. 39-66p.
- Van Loon LC, Bakker PAHM y Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-83.
- Van Loon LC, Rep M y Pieterse CMJ. 2006b. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Van Loon LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243-254.
- Verginer M, Siegmund B, Cardinale M, Müller H, Choi Y, Míguez CB, Leitner E y Berg G. 2010. Monitoring the plant epiphyte *Methylobacterium extorquens* DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74:136-145.
- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Visca P, Imperi F y Lamont IL. 2006. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *TRENDS Microbiol.* 15:22-30.
- Volpin H, Burdman S, Castro-Sowinski S, Kapulnik Y y Okon Y. 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *MPMI* 9:388-394.
- Walker TS Bais HP, Grotewold E y Vivanco JM. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.

- Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakrabort S. y Sly L. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:567-576.
- Wibberg D, Blom J, Jaenicke S, Kollin F, Rupp O, Scharf B, Schneiker-Bekel S, Sczcepanowski R, Goesmann A, Setubal JC, Schmitt R, Pühler A y Schlüter A. 2011. Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupini* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. *J. Biotech.* 155:50-62.
- Willems A., De Ley J, Gillis M y Kersters K. 1991. Comamonadaceae, a new family encompassing the *Acidovorans* rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov. for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:445-450.
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126:485-493.
- Wood H, Roshick C y McClarty G. 2004. Tryptophan recycling is responsible for the interferon- γ resistance of *Chlamydia psittaci* GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells. *Mol. Microbiol.* 52:903-916.
- Woods DE y Sokol PA. 2006. The genus *Burkholderia*. *Prokaryotes* 5:848-860.
- Woodward AW y Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95:707-735.
- Wu FZ, Wang S, Yang Y. 2008. Effects of rotation and intercropping on bacterial communities in rhizosphere soil of cucumber. *Chin. J. Appl. Ecol.* 19:2717-2722.
- Xie G, Bonner CA, Song J, Keyhani NO y Jensen RA. 2004. Inter-genomic displacement via lateral gene transfer of bacterial *trp* operons in an overall context of vertical genealogy. *BMC Biology* 2:15.
- Xie G, Forst C, Bonner CA y Jensen RA. 2001. Significance of two distinct types of tryptophan synthase beta chain in Bacteria, Archaea and higher plants. *Genome Biology* 3:1-14.
- Xie G, Keyhani NO, Bonner CA y Jensen RA. 2003. Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:303-342.
- Xiong J, He Z, Liu D, Mahmood Q y Yang X. 2008. The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium. *Chemosphere* 70:489-494.
- Xiong ZT, Liu C y Geng B. 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:273-280.
- Yang Z, Ni Y, Lu Z, Liao X, Zheng Y, Sun Z. 2011. Industrial production of S-2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide with a novel recombinant R-amidase from *Delftia tsuruhatensis*. *Process Biochem.* 46:182-187.

- Yeterian E, Martin LW, Guillon L, Journet L, Lamont IL y Schalk IJ. 2010. Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* 38:1447-1459.
- Younesi O, Moradi A y Chaichi MR. 2013. Effects of different rhizobacteria on nodulation and nitrogen fixation in alfalfa (*Medicago sativa*) at suboptimal root zone temperatures. *Intl. J. Agri Crop Sci.* 5:1500-1507.
- Zakharova E, Shcherbakov AA, Brudnik VV, Skripko NG, Bulkhim NS y Ignatov VV. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. *Eur. J. Biochem.* 259:572-576.
- Zamioudis C y Pieterse C. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *MPMI* 25:139-150.
- Zehfuss GH. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Revista Ciencia* 59:72-78.
- Zhang J, Subramanian S, Zhang Y y Yu O. 2007. Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. *Plant Physiol.* 144:741-751.
- Zhang LL, He D, Chen JM y Liu Y. 2010. Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* H1. *J. Hazard Mater.* 179:875-82.
- Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D y Chory J. 2001. A Role for Flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309.
- Zummo FP, Marineo S, Pace A, Civiletti F, Giardina A y Puglia AM. 2012. Tryptophan catabolism via kynurenine production in *Streptomyces coelicolor*: identification of three genes coding for the enzymes of tryptophan to anthranilate pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:719-728.
- Zúñiga, A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA y González B. 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by Burkholderia phytofirmans PsJN. *MPMI* 26:546-553.