

T.416

62178

MARTY, C.
Aislamiento de Bacte

2006

62178

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

TESIS DE DOCTORADO

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) TOLERANTES A
SALINIDAD**

Autora: Lic. Carolina Marty

Directora: Dra. Gladys Mori

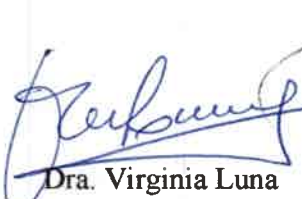
2006

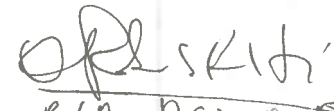


El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales, Orientación Biología General, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Directora: Dra. Gladys Mori

Comisión Asesora y Tribunal de Tesis


Dra. Virginia Luna · Dr. Rubén Bottini


PIA Dr. A. Feb 22
Dr. Antonio Lagares

62178

MFN:
Clasif:

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento a esta querida universidad que me brindó todo lo necesario para mi formación de grado y post grado.

Al CONICET, por las becas concedidas ya que sin las mismas la realización de esta tesis hubiera sido imposible.

A la, Dra. Virginia Luna; Dr. Rubén Bottini y Dr. Antonio Lagares, por formar parte de la comisión asesora y el jurado de esta tesis a pesar de tener una infinidad de obligaciones.

A mi directora, Dra. Gladys Mori, ejemplo de la fortaleza y la lucha constante por los ideales, por abrirme las puertas su grupo de investigación y por todo el apoyo y entendimiento brindado en estos años.

A mis amigas de siempre, Ana, Tania y Laura por los años hermosos que hemos compartido desde que éramos estudiantes, por el apoyo, la tolerancia y la comprensión que siempre han mostrado. Y sobre todo por la AMISTAD. Gracias desde el alma!!!

A mis compañeros de Lab. Sonia, Edgardo, Analia, Flori, Sole, Marina, Luci, porque me han aguantado como duques las locuras (que eran muchas!!!) y por toda la amistad compartida.

A los integrantes del Lab. 22; Adriana, Stella Jorge, Carito, Fernando, Vanina, Luciano, por la ayuda de siempre, por la amistad, por la tolerancia y por todo lo compartido.

A Mariela Woelke y Roxana Garnica por la predisposición a ayudarme siempre.

A las integrantes de CA II de Olimpiadas de Biología, Analia, Susana, Sonia, Analia y Ana y a también a Noelia, por los lindos momentos compartidos entre risas y preguntas difíciles.

A Anto, por haberme dado tanto, por su compañía, por su bondad y por su apoyo incondicional.

A mis tíos Estela y Hugo por su confianza y su apoyo infinito en estos años.

A mi familia por el apoyo de siempre

RESÚMEN

En el presente trabajo se llevo a cabo el aislamiento de una colección de cepas tolerantes a 1M de NaCl a partir de suelos salinos de la provincia de Córdoba utilizando agropiro alargado como huésped trampa. Luego de la caracterización y determinación de las principales características asociadas a la promoción del crecimiento vegetal (producción de sideróforos, solubilización de fosfato, crecimiento en medios libres de nitrógeno e inhibición de hongos fitopatógenos in vitro), fueron seleccionados 5 aislamientos para los estudios de interacción in vivo con agropiro, trigo y soja, en condiciones controles y salinas. Uno de estos aislamientos que mostró tener un efecto protector en plántulas de trigo y soja en condiciones de salinidad fue identificado mediante el secuenciamiento del gen 16S DNAr como *Microbacterium sp.*

Estudios de tolerancia frente a diferentes condiciones de estrés revelaron que el microorganismo presentaba una elevada tolerancia a estrés térmico y oxidativo además de ser altamente tolerante al estrés salino. Por otra parte se determinó mediante cromatografía gaseosa la presencia de trehalosa en el interior de células del microorganismo cultivado en condiciones de estrés salino. Por otra parte se determinó mediante análisis del contenido intracelular de iones Na^+ y K^+ que el microorganismo incorpora Na^+ en condiciones de elevada salinidad mostrando un comportamiento halofílico.

En estudios de interacción con plántulas de trigo cultivadas en condiciones controles y salinas, se determinó un cambio cualitativo en la composición de azúcares solubles y presentes en los exudados así como también en la composición de iones Na^+ y K^+ en las plántulas en condiciones controles y estresadas. Las plántulas cultivadas en condiciones salinas que habían sido inoculadas con *Microbacterium sp.* mostraron un contenido de azúcares similar, al encontrado en plántulas cultivadas en condiciones controles que no fueron sometidas a estrés, y diferente al de las plántulas cultivadas en condiciones de estrés que no habían sido inoculadas.

SUMMARY

In this work we describe the isolation and characterization of a collection of native salt tolerant strains from Cordoba saline soils with agropiro alargado as a trap host. Main traits associated with plant growth promotion were assayed (siderophore production, solubilization of inorganic phosphate, nitrogen fixation and biocontrol). Five strains were selected to perform growth promotion greenhouse experiments with agropiro, wheat and soybean under control and saline conditions. One strain identified as *Microbacterium sp.* by 16 S rDNA gene sequencing, demonstrated protection and growth promotion effects on wheat plantlets under saline conditions.

Stress tolerance towards other stresses other than saline, ie. oxidative, thermic and osmotic, reveals that *Microbacterium sp.* is highly tolerant to different adverse conditions. Chromatography analysis (TLC and GC) of the sugars cell content indicate that under saline conditions the microorganism is able to accumulate trehalose. Furthermore ionic cell content demonstrate that the microorganism is able to accumulate Na^+ when is cultured under saline stress conditions showing a clearly halophylic behavior. .

In in vitro experiments of interaction between wheat (*Triticum aestivum*) and *Microbacterium sp.* qualitative changes in sugar content were observed between plantlets subjected to different treatments specially inside the plant. Trehalose was found inside treated plantlets (T) but was not present on inoculated treated plantlets (Ti) at least on the conditions assayed.

Changes in the ionic (Na^+ and K^+) composition inside the shoots and roots were also observed.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1-La salinidad en los suelos.	1
2-La salinidad en los vegetales.	3
a-Regulación en la acumulación selectiva o exclusión de iones y compartimentalización de los mismos.	5
b-Síntesis de solutos compatibles.	6
c-Cambios en los patrones fotosintéticos.	7
d-Alteraciones en la estructura de las membranas.	7
e-Inducción de enzimas de la respuesta antioxidante.	8
3-La salinidad en las bacterias	10
4-La salinidad en la interacción Planta-Bacteria	15
a-Resistencia sistémica	15
b-Interacción planta-bacteria en condiciones de salinidad	17
5-¿Cómo recuperar tierras no productivas afectadas por salinidad?	19
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Medios de cultivo y reactivos	25
Medio Hoagland	25
Medio mínimo glucosa (MMG)	25
Medio Nfb para la fijación de nitrógeno	26
Medio para la solubilización de fosfato	27
Medio CAS para producción de sideróforos	27
Medio agar papa glucosado	28
Medio para la detección de actividad ACC deaminasa	29
Reactivo de antrona	29
Desinfección y pregerminación de semillas	29
Establecimiento de las condiciones salinas estresantes para las distintas especies	30

vegetales	
Aislamiento de cepas nativas tolerantes a salinidad	30
Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos seleccionados	31
Estudios de inhibición in vitro por competencia directa o por producción de sustancias antimicrobianas	32
Identificación taxonómica del aislamiento seleccionado	33
Evaluación de la tolerancia del aislamiento seleccionado a distintos tipos de estrés	33
Determinación de la acumulación intracelular y excreción in vitro de azúcares del aislamiento seleccionado	34
Determinación del contenido intracelular de iones Na ⁺ y K ⁺	35
Estudios de interacción	35
Determinación de los efectos de promoción de crecimiento del aislamiento seleccionado sobre plántulas de trigo, soja y agropiro en invernadero.	35
Determinación de la localización en tallo o en raíz del aislamiento seleccionado en trigo, soja y agropiro.	36
Determinación de los posibles mecanismos a través de los cuales el aislamiento seleccionado disminuye los efectos del estrés salino.	37
Determinación del contenido de azúcares en la interacción Bacteria-Trigo	37
Determinación de la producción de ácido salicílico por el aislamiento seleccionado	42
Determinación de la actividad ACC (1-aminociclopropano1-carboxilato) deaminasa por parte del aislamiento seleccionado	42
Determinación de la actividad catalasa en plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado	43
Determinación del contenido de iones Na ⁺ y K ⁺ en el interior de plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.	43
Análisis estadístico	44
RESULTADOS Y DISCUSION	45
Establecimiento de las condiciones salinas estresantes para las distintas especies vegetales	45

Aislamiento de cepas nativas tolerantes a salinidad	46
Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos	46
Estudios fisiológicos y bioquímicos de los aislamientos seleccionados	52
Determinaciones bioquímicas y morfofisiológicas de los aislamientos seleccionados	52
Crecimiento de los aislamientos seleccionados en condiciones controles y salinas	53
Estudios de inhibición in vitro por competencia directa o por producción de sustancias antimicrobianas	58
Identificación taxonómica del aislamiento seleccionado	60
Evaluación de la tolerancia del aislamiento seleccionado a distintos tipos de estrés	61
Determinación del contenido intracelular de iones Na^+ y K^+	66
Determinación de la acumulación intracelular y excreción in vitro de azúcares del aislamiento seleccionado	71
Estudios de interacción	77
Determinación de la localización en tallo o en raíz del aislamiento seleccionado en trigo, soja y agropiro.	77
Determinación de los efectos de promoción de crecimiento del aislamiento seleccionado sobre plántulas de trigo, soja y agropiro en invernadero.	81
Determinación de los posibles mecanismos a través de los cuales el aislamiento seleccionado disminuye los efectos del estrés salino.	90
Determinación del contenido de azúcares en la interacción Bacteria-Trigo	90
Determinación de la producción de ácido salicílico por el aislamiento seleccionado	99
Determinación de la actividad ACC (1-aminociclopropano 1-carboxilato) deaminasa por parte del aislamiento seleccionado	99
Determinación de la actividad catalasa en plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado	99
Determinación del contenido de iones Na^+ y K^+ en el interior de plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.	101

CONCLUSIONES

108

BIBLIOGRAFIA

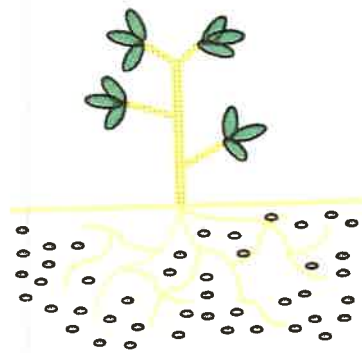
114

Abreviaturas empleadas

ABA:	Ácido absísico
AIA:	Ácido indol acético
Aislam:	Aislamiento
ANOVA:	Análisis de la varianza
AS:	Ácido salicílico
BSA:	Albúmina de suero bovino
c.s.p:	Cantidad suficiente para
Cat:	Catalasa
CE:	Conductividad eléctrica
CPS:	Polisacárido de cápsula
DO:	Densidad óptica
dS/m:	Decisiemens por metro
Fosf:	Capacidad para solubilizar fosfato
GB:	Glicina Betaína
has:	Hectáreas
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
Mic:	Microcolonias
MML:	Medio mínimo lactato
Mpa:	Megapascal
Nfb:	Medio malato sin nitrógeno
NfbN:	Medio malato con nitrógeno
NMR:	Resonancia magnética nuclear
Ox:	Oxidasa
pb:	Pares de bases nucleotídicas
PBS:	Buffer fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polietilenglicol
PGPR:	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
rpm:	Revoluciones por minuto

SidG:	Producción de sideróforos con glucosa como fuente de carbono
SidM:	Producción de sideróforos con malato como fuente de carbono.
S. scle:	Capacidad para inhibir a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
TLC:	Cromatografía en capa delgada
ufc:	Unidades formadoras de colonia
Vss:	Velo subsuperficial

INTRODUCCION



INTRODUCCIÓN

1-La salinidad en los suelos

La salinidad en el suelo o en el agua es uno de los mayores problemas agrícolas en las regiones áridas y semiáridas del globo, en las que puede limitar severamente el rendimiento de los cultivos, pero en ciertas condiciones, también pueden ser afectadas las regiones subhúmedas y húmedas. Estudios recientes indican que cerca de la tercera parte de todos los terrenos bajo riego del mundo (es decir aproximadamente 70 millones de ha) presenta problemas de salinidad.

La salinidad puede producirse por causas naturales como por ej. la composición de roca madre del suelo, un drenaje insuficiente, la superficialidad de las capas de agua subterráneas, o como resultado de la actividad humana como el riego con agua de alto contenido salino, el excesivo uso de fertilizantes, o la explotación de zonas petroleras (Bohn *et al.*, 1993). Todo esto ocasiona no solamente una disminución en el rendimiento de los cultivos sino que también conduce a cambios muy marcados en los patrones de crecimiento de los vegetales.

Los valores de salinidad de un suelo pueden definirse como débiles o moderados cuando la conductividad eléctrica (CE) tiene valores de entre 2-6 dS/m (aprox. 20-60 mM de cationes); severos entre 6-10 dS/m (aprox. 60-100 mM de cationes) y muy severos entre 10 /15 dS/m (100- 150 mM de cationes) (Bohn *et al.*, 1993).

En la República Argentina se estima que existen 20.000.000 de has. con problemas de salinidad, de las cuales aproximadamente la mitad corresponden a la Pcia. de Bs. As.; 2.699.401 has. a la Pcia. de Córdoba y 5.124.515 a la Provincia de Santa Fe.

Las zonas afectadas en la Pcia. de Córdoba son fundamentalmente aquellas que corresponden a los ambientes geomorfológicos de la pampa arenosa, pampa arenosa anegable (ambas situadas en la zona sur oeste de la provincia), depresión fluvio-lacustre del mar de Ansenúza (laguna de Mar Chiquita) y depresión del arroyo Tortugas situadas en la zona nor-oeste) (Jarsún *et al.*, 2003).

En el siguiente mapa de la Pcia. de Córdoba, extraído de Jarsún *et al.* (2003) se pueden observar (encerradas en un círculo rojo) las principales áreas con problemas de salinidad.



Figura I: Principales áreas afectadas por los efectos de la salinidad en la provincia de Córdoba.

Estas zonas tienen en común una capa freática cercana a la superficie, lo que genera condiciones de hidromorfismo y halomorfismo. Y además, como en el caso de la zona que rodea a la depresión del arroyo Tortugas y al Mar de Ansenúza (laguna de Mar Chiquita), poseen drenaje insuficiente por lo que son anegadas con facilidad. La mayor parte de las zonas bajas son cuerpos de agua permanentes o semipermanentes, lo que conlleva a una salinización y alcalinización de los suelos (Jarsún *et al.*, 2003).

Los suelos salinos pueden clasificarse en: suelos sódicos, suelos salinos y suelos Salinos-Sódicos. Los “suelos sódicos”, tienen una gran cantidad de sodio

intercambiable, el pH de los mismos puede llegar a 9,5 y la permeabilidad al agua es tan baja que los atraviesa muy lentamente, lo que constituye un problema principal en estos tipos de suelos; además, muchos nutrientes, entre ellos el manganeso, hierro, cobre y zinc (fundamentales para el crecimiento de las plantas), no se encuentran disponibles para ser utilizados. Los “suelos salinos” poseen generalmente gran cantidad de sales solubles, pero el porcentaje de sodio intercambiable es bajo; el pH de estos suelos es menor a 8,5 por lo que la salinidad de los mismos puede corregirse al menos parcialmente, lixiviando el exceso de sales de la zona radicular. Por último, los suelos “sódico-salinos” poseen una elevada concentración de sales solubles y un elevado porcentaje de sodio intercambiable, lo que hace que el pH de estos suelos sea inferior a 8,5 debido a que las sales solubles impiden las reacciones de hidrólisis. En este caso, el daño principal se presenta cuando se lixivian las sales solubles de la superficie, porque el sodio intercambiable no es eliminado a la misma velocidad que las sales y se transforma así en suelo-sódico (Bohn *et al.*, 1993)

Muchos cultivos no crecen bajo condiciones de pH elevados; además, la salinidad degrada la estructura de los suelos, causando anegamiento en la superficie y perjudicando al intercambio gaseoso. Todo esto conduce a una disminución drástica en la biodiversidad del suelo y los efectos sobre el rendimiento de los cultivos pueden llegar a ser irreversible.

Por todas las consideraciones realizadas anteriormente, se deduce claramente la complejidad que ofrece el problema de la recuperación y el uso sostenible de los suelos con mayores o menores problemas de salinidad. En este sentido, es necesario hay que disponer de la información y la tecnología adecuadas para realizar un correcto tratamiento en cada uno de los casos y evitar así el avance de estas condiciones adversas de los suelos.

2-La salinidad en los vegetales

La tolerancia a la sal en los vegetales es un fenómeno complejo que abarca cambios morfológicos y de desarrollo, así como también procesos fisiológicos y bioquímicos (Zahran, 1999) y generalmente varía a lo largo del ciclo de vida de la planta. Especies altamente tolerantes durante la madurez, pueden ser sensibles durante

la germinación y viceversa, o ser tolerantes a lo largo de todo el ciclo de vida (Bohn *et al.*, 1993).

La complejidad de las respuestas de las plantas frente a este tipo de estrés puede ser explicada parcialmente por el hecho de que la salinidad ejerce un efecto iónico y osmótico a la vez. En los primeros segundos o minutos de exposición a la sal, las células pierden agua y se deshidratan; luego de horas, la célula recupera su turgencia pero la tasa de elongación se reduce, lo que disminuye el crecimiento de raíces y hojas. Al cabo de días de estrés, la baja tasa de división y elongación celular el crecimiento conducen a un menor crecimiento en los diferentes órganos de la planta, mientras que las hojas viejas comienzan a manifestar síntomas de intoxicación y daño. Si el estrés continúa, un mayor número de hojas muere y finalmente se produce la muerte de la planta (Muns, 2002).

De los cultivos extensivos, los más tolerantes a sal son la cebada (*Hordeum vulgare* L.) y la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), donde la conductividad eléctrica (CE) determinada en dS m^{-1} necesaria para disminuir un 25% el rendimiento es de 16 y 13 respectivamente (160 y 130 mM de sales). El trigo (*Triticum aestivum*) es menos tolerante ya que la CE necesaria para disminuir el rendimiento en un 25% es de 10 (100mM de sales), mientras que la soja (*Glycine max*) y el maíz (*Zea mays*) son más sensibles: A CE de 7 (70 mM de sales) ven afectado su crecimiento en un 25% y a valores de CE de 9 (90 mM de sales) la disminución el crecimiento alcanza un 50% (Bohn *et al.*,1993).

Según datos proporcionados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación, solo en la provincia de Córdoba se sembraron en la campaña 2004/2005, 4.172.940 has. de soja; 1.155.250 has. de trigo; lo que representa casi 30 % y 14% de la producción nacional de soja y trigo respectivamente (SAGPyA, 2005). Estos valores se incrementan de un modo vertiginoso mediante la utilización de tierras marginales que hasta el momento no habían sido utilizadas para el cultivo de estas especies, ya sea dentro de los límites de la provincia o en provincias como Chaco y Formosa. El uso de estas tierras muchas veces no aptas para cultivo intensivo, trae aparejado una sobreexplotación y salinización de los suelos como resultado de implementación de sistemas de riego con agua de baja calidad.

Las plantas desarrollan una gran variedad de mecanismos bioquímicos y moleculares para enfrentar el estrés salino. Parida y Das (2004) mencionan las siguientes respuestas:

- a) Regulación en la acumulación selectiva o exclusión de iones y compartimentalización de los mismos.
- b) Síntesis de solutos compatibles.
- c) Cambios en los patrones fotosintéticos.
- d) Alteración en la estructura de las membranas.
- e) Inducción de enzimas de la respuesta antioxidante.

La elección de uno u otro mecanismo o de un conjunto de ellos, va a depender de las especies, de las variedades o incluso de los diferentes compartimientos de las plantas (Shannon, 1998).

2 a) Regulación en la acumulación selectiva o exclusión de iones y compartimentalización de los mismos.

Tanto las glicófitas como las halófitas, no pueden tolerar concentraciones elevadas de sal en el citoplasma, por lo que deben restringir el exceso de sales a las vacuolas o compartimentalizar los iones en diferentes tejidos para llevar a cabo las funciones metabólicas. En el caso de las glicófitas, la acumulación se produce en los tejidos viejos que son sacrificados (Cheeseman, 1988).

El restablecimiento de la homeostasis iónica, no es un problema de fácil solución para las plantas, ya que a diferencia de las células animales, ellas carecen de transportadores de sodio, tales como las Na^+ -ATPasas o las Na^+/K^+ -ATPasas, por lo que deben recurrir a las H^+ -ATPasas o H^+ -pirofosfatasas para generar un gradiente electroquímico de protones que permitan el intercambio de H^+ por Na^+ y también de otros iones y metabolitos.

Cuando las plantas están en estrés salino, deben mantener elevada la concentración de K^+ y baja la de Na^+ dentro del citoplasma para poder llevar a cabo correctamente las funciones metabólicas. Esto es posible mediante la regulación y la expresión de los transportadores de estos iones y de las bombas de protones. Estudios recientes en trigo de Saqib *et al.* (2005) demostraron que los diferentes genotipos de *Triticum aestivum* varían en la expresión de antiportadores vacuolares Na^+/K^+ en raíces y tallos. Y que el genotipo con una mayor expresión de este antiportador en raíz y tallo

retiene mayor cantidad de Na^+ (por acumulación dentro de las vacuolas) en raíz, lo que hace que las hojas estén protegidas de los efectos tóxicos de este ión y por lo tanto sea más resistente a salinidad en términos de crecimiento absoluto y relativo del tallo.

Otro modo de regulación es la exclusión o secreción de las sales. La secreción se da mediante estructuras celulares llamadas glándulas de la sal que secretan sal de las hojas y mantienen las concentraciones iónicas internas más bajas (Hogarth, 1999), mientras que la exclusión se da a través de las raíces principalmente en las halófilas, lo que permite disminuir la cantidad de sales presentes en las hojas (Levitt, 1980).

2 b) Síntesis de solutos compatibles

Los solutos compatibles son compuestos que pueden acumularse en niveles altos sin perjudicar la bioquímica celular, tienen la capacidad de preservar la actividad de enzimas, no afectan el pH del citoplasma o compartimiento de las organelas (Bohnert y Jensen, 1996).

Los principales osmolitos compatibles que se encuentran en las plantas superiores son azúcares de bajo peso molecular; proteínas solubles, ácidos orgánicos, polialcoholes, aminoácidos, amidas y compuestos de amonio cuaternario (Ashraf y Harris, 2004).

- Azúcares de bajo peso molecular. Hay una gran variación en la acumulación de azúcares en relación a la salinidad. Se ha informado la acumulación de azúcares reductores (glucosa y fructosa), sacarosa y fructanos en numerosas plantas (Khatkar y Kuhad, 2000; Singh *et al.*, 2000). También se ha informado que la acumulación de trehalosa en algunas especies favorece la tolerancia a la sal. Garg *et al.* (2002), obtuvieron líneas de arroz tolerantes a sal mediante la incorporación y expresión de genes de la biosíntesis de trehalosa de *Escherichia coli*.
- Polialcoholes. Los polialcoholes identificados más comúnmente en plantas son manitol, glicerol, sorbitol y pinitol. Generalmente se sabe que se acumulan en algunas halófitas para sobrellevar la alta concentración de iones inorgánicos compartimentalizados en las vacuolas. Además actúan como secuestrantes de

radicales libres de oxígeno protegiendo a las proteínas del daño oxidativo (Ashraf y Harris, 2004).

- Aminoácidos y amidas: Las plantas puede acumular aminoácidos como alanina, arginina, glicina, serina, leucina, en conjunto con prolina y los aminoácidos no proteicos como la citrulina y ornitina. (Rabe, 1990 ; Mansour, 2000).
- Aminas Cuaternarias. Se ha determinado la acumulación de Glicina Betaina en muchos vegetales como espinaca, tomate, papa, arroz, zanahoria y sorgo (Weimberg *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 2003). Este compuesto se localiza principalmente en cloroplastos y tiene un rol esencial en la protección de la membrana tilacoidea, lo que posibilita mantener la eficiencia fotosintética (Robinson *et al.*, 1986; Genard *et al.*, 1991).

2-c) Cambios en los patrones fotosintéticos

El estrés salino afecta la fotosíntesis debido la reducción en el potencial osmótico entre otros efectos, por lo que las plantas deben aumentar la eficiencia en el uso del agua a través de la regulación del cierre estomático. Es decir, la planta entrecierra sus estomas para preservarse de la deshidratación, pero esto influye negativamente sobre la difusión del CO₂ hacia la cámara subestomática. Con este fin, algunas halófilas facultativas cambian su metabolismo y pasan de un modo C₃ a un metabolismo CAM, lo que permite a la planta reducir su pérdida de agua abriendo los estomas durante la noche. (Cushman *et al.*, 1989; Zhu y Memzer, 1999).

2-d) Alteración en la estructura de las membranas

Los lípidos, además de su función estructural y de almacenamiento de energía, cumplen un rol fisiológico vital en la tolerancia a diversos tipos de estrés en una amplia gama de organismos. La bicapa lipídica, en condiciones de estrés puede encontrarse estabilizada por azúcares, especialmente trehalosa. La insaturación de los ácidos grasos también contrarresta los efectos del estrés hídrico o salino ya que los puentes hidrógeno de los ácidos grasos son el blanco de las especies reactivas del oxígeno. Los lípidos son el blanco de las reacciones oxidativas, y se ha visto que el contenido de fosfolípidos así como el de esteroides disminuye con el aumento en la salinidad en maní y en pastos tolerantes a salinidad (Wu *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2002) aunque no se altera la proporción esteroide/fosfolípido; paralelamente se ha visto que se incrementan los glicolípidos a medida que la salinidad se incrementa.

2-e) Inducción de enzimas de la respuesta antioxidante.

Está ampliamente aceptado que las especies activas del oxígeno (EAO) como el O_2^- , H_2O_2 y 1O_2 , tienen un papel importante en la inhibición de la fotosíntesis (Borsani *et al.*, 2001), así como también en el daño a ADN y proteínas y en la peroxidación de lípidos celulares.

Es importante tener en cuenta que la producción de EAO es una consecuencia inevitable de la vida aeróbica. Normalmente, los mecanismos protectores de las células pueden eliminar estos compuestos sin mayores dificultades. Cuando los sistemas de defensa fallan o cuando aumenta anormalmente la producción de EAO, el balance entre oxidantes y antioxidantes favorece a los primeros y se produce el estrés oxidativo. En las plantas, las situaciones ambientales adversas afectan este balance y pueden desencadenar el estrés oxidativo.

Se sabe también que la generación de EAO y más específicamente el H_2O_2 , se ve incrementada en respuesta a una serie de estreses ambientales bióticos o abióticos, como el exceso de luz, frío, sequía, UV, infecciones por patógenos, etc. (Bartosz, 1997; Dat *et al.*, 2000). Dado que se produce en respuesta a una gran variedad de estímulos, se postula como una molécula atractiva para desencadenar las respuestas de tolerancia cruzada, en la que la exposición de la planta a un tipo de estrés, por ejemplo, la exposición a dosis subletales de ozono o UV, confiere a la planta tolerancia frente a la infección por un patógeno virulento (Bowler y Fluhr, 2000; Neill *et al.*, 2002).

Puesto que la mayor parte de las EAO son generadas en los cloroplastos durante el transporte fotosintético de electrones, es natural que los componentes plastídicos se conviertan en el sitio celular más dañado. Los efectos negativos sobre las mitocondrias son también muy importantes y bajo ciertas condiciones de estrés, pueden ser incluso mayores a los sufridos por los cloroplastos (Bártoli *et al.*, 2004).

El sistema de defensa antioxidante está integrado por las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR), entre otras (Sairam *et al.*, 2002). Numerosos trabajos con diferentes especies vegetales coinciden en que la actividad de estas enzimas se incrementa en condiciones de estrés y que hay una correlación entre la tolerancia al estrés y una mayor actividad enzimática (Lee *et al.*, 2001; Sairam *et al.*, 2002; Mittova *et al.*, 2002, 2003).

Como primer respuesta frente a la salinidad, se produce una modificación en el balance hormonal de la planta, principalmente se produce un aumento en los niveles de ácido absísico (ABA). El ABA induce genes involucrados en la respuesta frente al estrés salino y se ha visto que alivia los efectos inhibitorios del NaCl sobre la fotosíntesis, el crecimiento y la translocación de asimilados, además promueve el cambio de metabolismo de tipo C₃ a CAM (de Bruxelles *et al.*,1996).También hay numerosos trabajos que vinculan al ABA con la tolerancia a distintos tipos de estrés como el salino, sequía y bajas temperaturas a través del incremento de la actividad de enzimas de la respuesta antioxidante como catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa (Giraudat *et al.*, 1994; Jiang y Zhang 2001, 2002); de la reducción de la liberación de etileno y de la abscisión foliar en cítricos, probablemente disminuyendo la acumulación de Cl⁻ en las hojas (Gómez Cadenas *et al.*, 2002)

Por otra parte se ha visto que el estrés salino causa un aumento en el ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) y consecuentemente, en el contenido de etileno ya que el ACC es un precursor directo en la vía de biosíntesis de esta hormona (Gómez Cadenas *et al.*, 1998).

Otro grupo de hormonas vegetales que participan cuando la planta se ve afectada por salinidad, son los jasmonatos. Estos median señales como las involucradas en respuestas de defensa, pero se ha demostrado que también participan en la tolerancia a la sal. Cultivares de tomate tolerantes a la sal, tienen mayores niveles de jasmonatos que los cultivares sensibles (Pedranzani *et al.*, 2003).

Muchos estudios demuestran la participación del ácido salicílico (AS) en la regulación de las respuestas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés abiótico, en la regulación del daño oxidativo que conduce a la muerte celular en la respuesta hipersensible y actúa como señal para el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (Shiratsu *et al.*,1997; Persello Cartieaux *et al.*,2003). Rao *et al.*, (1997) y Janda *et al.*, (1999) informaron en trabajos con maíz que el AS causaba un incremento en la actividad de enzimas de la respuesta antioxidante (Ganesan *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2005).

3-La salinidad en las bacterias

La capacidad para sobrevivir en condiciones estresantes depende de la habilidad para sentir los cambios que se producen en el ambiente y responder a los mismos mediante reacciones altamente integradas. En los microorganismos operan dos tipos de respuestas frente al estrés. Respuestas generales que frecuentemente están controladas por uno o varios reguladores y proveen una protección cruzada frente a varios tipos de estrés independientemente del estímulo inicial, y respuestas específicas que involucran redes altamente integradas de mecanismos de adaptación fisiológicos y genéticos.

La presión de turgencia es la presión que ejerce la membrana celular contra la pared celular. En los Gram negativos, se han encontrado valores de 3 a 5 bares (0,3-0,5 MPa), mientras que para los Gram positivos, esta presión asciende a los 20 bares (2 MPa) aproximadamente. Este mayor valor de los Gram positivos se debería al gran volumen de solvente citoplasmático necesario para la expansión del peptidoglicano complejo que poseen (Bremer y Kramer, 2000).

Para sobrevivir en condiciones hiperosmóticas y mantener la presión de turgencia adecuada, los microorganismos han desarrollado dos estrategias denominadas "salt in" y "salt out". La primera se encuentra principalmente en los microorganismos cuya fisiología está adaptada a una vida permanente en condiciones de hiperosmolaridad. Estos acumulan en su interior gran cantidad de iones, fundamentalmente potasio y cloruro. Dado que la gran acumulación de iones interfiere con las macromoléculas celulares, estos microorganismos presentan cambios evolutivos en casi todas sus proteínas (Dennis y Schimmin, 1997), entre ellos, una mayor cantidad de aminoácidos ácidos, menor cantidad de básicos y menor proporción de hidrofílicos (Lanyi, 1974).

La otra estrategia, el "salt out", es empleada por aquellas bacterias que viven en ambientes con salinidad moderada o en nichos ecológicos que periódicamente están sujetos a condiciones de baja actividad acuosa y elevada salinidad. Estos microorganismos acumulan grandes cantidades de osmolitos orgánicos específicos que son compatibles con las funciones celulares. Dado que este mecanismo no requiere grandes cambios evolutivos en las macromoléculas y procesos celulares, es la respuesta

frente al estrés osmótico más ampliamente distribuida en la naturaleza y puede observarse en bacterias, hongos, plantas y animales (Bremer y Kramer, 2000).

La estrategia “salt out” comprende dos fases. La fase inicial, que es una respuesta rápida que se desencadena en los primeros momentos del shock osmótico, se da en Gram + y en Gram – y consiste en la acumulación de K^+ (Epstein, 1986; Whatmore *et al.*, 1990). Luego de esta acumulación de K^+ , generalmente se produce un incremento en el contraión glutamato especialmente en Gram negativos como *Rhizobium*, *A. brasilense* o *E. coli* (Miller y Wood, 1996) mientras que en Gram positivos hay acumulación de otros solutos osmoprotectores como glicina betaína u otros aminoácidos (Sleator y Hill, 2001)

El espectro de solutos compatibles empleados comprende un limitado número de compuestos, divididos en dos grupos mayores: i) azúcares y polioles y ii) α y β aminoácidos y sus derivados incluyendo a las metilaminas. Este limitado número de compuestos refleja la dificultad de acumular compuestos que sean compatibles con las funciones moleculares y celulares (Le Rudulier *et al.*, 1986). La estructura química de los solutos compatibles que se encuentran más ampliamente distribuidos en bacterias se observa en la figura II.

- Glicina betaina: es el soluto compatible más común en plantas, mamíferos, arqueobacterias y bacterias. A pesar de que la mayoría de los organismos no pueden sintetizarla de novo, hay descriptos varios sistemas de transporte para incorporarla desde el medio ambiente. Al respecto, Boncompagni *et al.*, (1999) demostraron que el agregado exógeno de glicina betaína y colina favorecían el crecimiento de *Rhizobium tropici*, *Sinorhizobium loti*, *Sinorhizobium fredii*, *Agrobacterium tumefaciens*, entre otros mientras que no eran eficientes para las cepas más sensibles a la sal. Por ello concluyen que el rol fisiológico principal de la glicina betaína en la familia *Rhizobiaceae* parecería ser el de fuente de energía mientras que la propiedad de osmoprotección estaría restringida a algunas cepas.

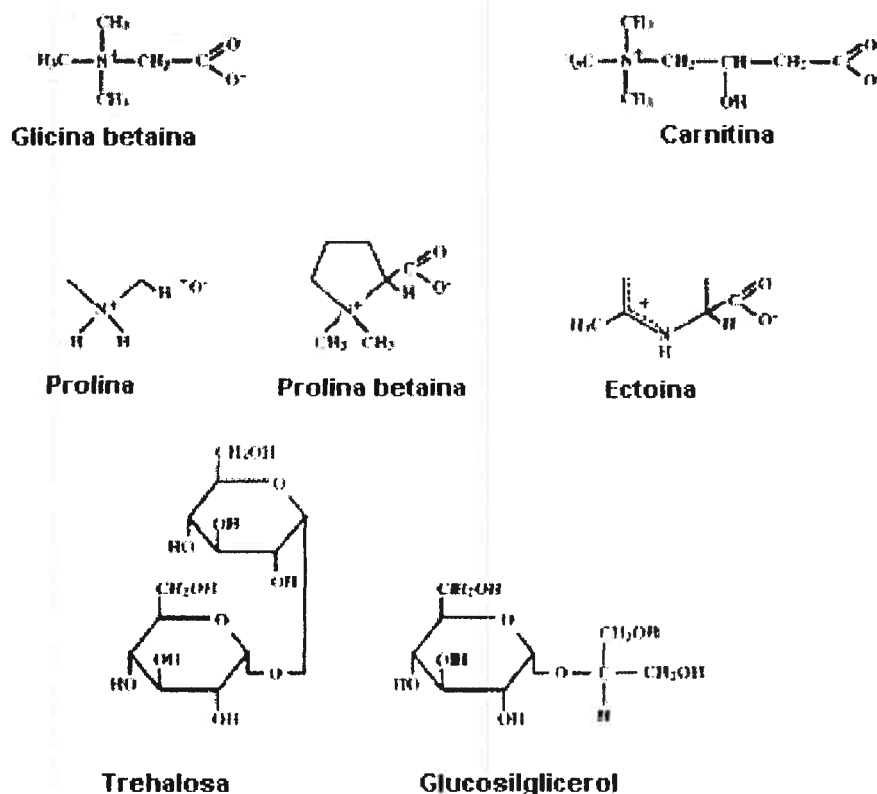


Figura II: Estructura química de los principales solutos compatibles descriptos para bacterias (modificado de Kempf y Bremer ,1998)

- Prolina: La acumulación de prolina ha sido observada en *Azospirillum brasilense* especialmente por síntesis de novo y en especies de *Bacillus* y *Staphylococcus*, especialmente en aquellas presentes en ambientes salinos (Galinski, 1993; Miller y Wood, 1996) y en *Corynebacterium glutamicum*, una bacteria de suelo Gram positiva, cuando es sometida a un shock osmótico (Roeßler y Müller, 2001). No se ha encontrado en *Pseudomonas* ni en rizobios de vida libre (Miller y Wood, 1996)
- Ectoína: La acumulación de este soluto ha sido informada en especies como *R.meliloti*; *Bradyrhizobium japonicum*, *R.leguminosarum* y *E coli* en medios con elevada osmolaridad. (Talibart *et al.* 1990; Galinski y Truper, 1994).
- Trehalosa: Este disacárido ha sido identificado como soluto compatible en numerosas especies pertenecientes a géneros muy diversos, tanto en Gram positivos como en Gram negativos, ej *Salmonella enterica* (Canovas *et al.*,

2001); *E. coli* (Welsh *et al.*, 1999); *Rhizobium* ATCC10317 y TAL1000 (Dardanelli, 2001) entre otras, y también en arqueobacterias del género *Pyrobaculum* (Martins *et al.*, 1997).

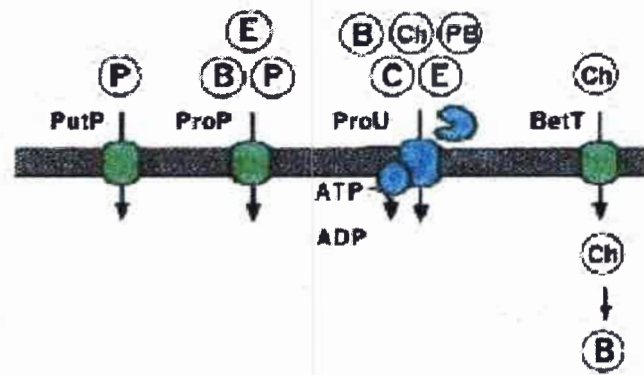
- Glucosilglicerol: Pocard *et al.*, (1994) han demostrado la acumulación de este osmolito en *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y Goude *et al.*, (2004) determinaron la presencia de glucosilglicerol en la bacteria de suelo patógena para numerosas especies vegetales, *Erwinia chrysanthemi*.
- Glutamato: Hua *et al.* (1982), informaron la acumulación de glutamato en la cepa de *Rhizobium sp.* tolerante a sal WR 1001 cuando las células eran cultivadas en osmolaridades elevadas. También se ha demostrado la acumulación en *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Measures, 1975). Por su parte Rivarola *et al.*, (1998) determinaron que en *Azospirillum brasilense* Cd, el glutamato se acumula como osmolito en la fase exponencial de crecimiento del microorganismo.
- Carnitina: En la mayoría de las bacterias, la carnitina es incorporada desde el medio. Kets *et al.*, (1994), por medio de NMR identificaron a este soluto como osmoprotector en *Lactobacillus plantarum* cuando era cultivado en medios con elevada concentración de NaCl. También fue identificada en *Listeria monocytogenes* por Beumer *et al.*, (1994).

➤

La acumulación de solutos compatibles en respuesta a la hiperosmolaridad en el ambiente es una característica muy conservada evolutivamente por lo que las bacterias y arqueobacterias presentan el mismo comportamiento. Sin embargo, cuando se comparan los solutos en estos dos grupos surgen algunas diferencias. La mayoría de los solutos acumulados por las arqueobacterias se asemejan a aquellos de las bacterias pero portan una carga negativa dada por la presencia de grupos carboxílicos, fosfatos o sulfatos (Roeßler y Müller, 2001).

En la figura III se sintetizan los mecanismos de transporte identificados para *E. coli* y *B. subtilis* como modelos de Gram negativos y Gram positivos respectivamente.

A



B

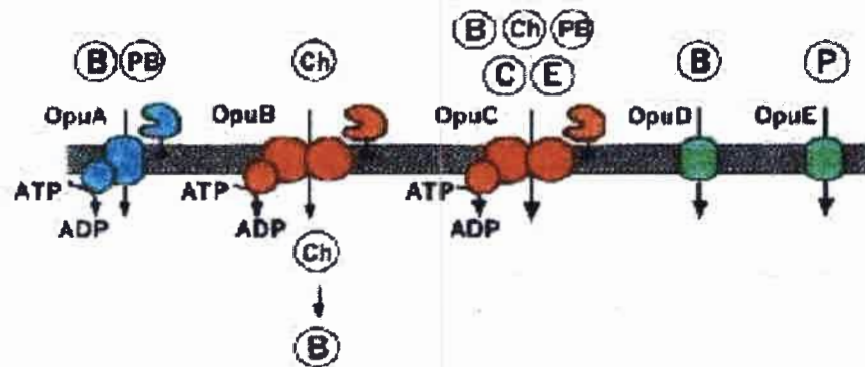


Figura III: Principales sistemas de transporte de solutos compatibles en A) *E. coli* y B) *B. subtilis*; modelos de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas respectivamente. B= glicina betaína, C= carnitina; Ch= colina; E= ectoína; P= prolina ;PB= prolina betaína (modificado de Sleator y Hill, 2001).

En el caso de *E. coli*, la incorporación de solutos se da principalmente por medio de dos principales transportadores con diferencias en estructura y afinidad para GB; ProU (de la familia de los ABC transportadores) que tiene una elevada afinidad por GB y ProP (proteína integral de membrana) que tiene una menor afinidad por GB. Además han sido identificados dos transportadores específicos, PutP específico para el transporte de prolina y BetT específico para colina (Pichereau *et al.*, 2000)

Para *B. subtilis* la situación es más compleja. Se han identificado cinco sistemas de transportadores de osmoprotectores, tres de ellos OpuA a OpuC son transportadores dependientes de proteínas de unión ABC. Una diferencia con los transportadores de *E. coli* es que los sistemas son más específicos, donde OpuA y Opu D parecen tener mayor especificidad por glicina betaína, Opu B para colina y Opu E para prolina (Pichereau *et al.*, 2000).



4-Interacción Planta-Bacteria

Los exudados de la raíz ejercen una influencia selectiva sobre el crecimiento de los microorganismos que colonizan la rizósfera, alterando la química del suelo en la vecindad de las raíces y sirviendo como sustratos de crecimiento para las comunidades microbianas rizosféricas (Hong-Yang y Crowley 2000). Por otra parte, las raíces disminuyen los nutrientes esenciales de la rizósfera, como por ej. potasio, fosfatos, hierro y compuestos nitrogenados, y además pueden liberar solutos no esenciales o tóxicos como el ClNa o sales de aluminio. Aquellos componentes de los exudados que no se unen a las partículas del suelo o a la superficie celular elevarán la osmolaridad de la rizósfera (Miller y Wood,1996), por lo tanto los microorganismos presentes en la misma deberán ser capaces de crecer en estas condiciones. A su vez, estos microorganismos ejercen influencia en la composición y cantidad de los exudados por medio de sus efectos sobre el metabolismo celular (Hong –Yang y Crowley, 2000) y sobre la nutrición y crecimiento de la planta actuando como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), mediante la secreción de compuestos hormonales como auxinas, giberelinas, citocininas (Bottini *et al.*,1989; Fulchieri *et al.*, 1993; Döbbelaere *et al.*, 2003); sideróforos como pseudobactrina, ácido salicílico, etc. (Kloepper *et al.*, 1991), por su capacidad de solubilizar los fosfatos del suelo o fijar nitrógeno (Tarrand *et al.*,1978) o producir compuestos volátiles como 2-3 butanediol y acetoina (Ryu *et al.*, 2003; Ping and Boland 2004) y como agentes de biocontrol ya sea por la producción de antibióticos (Milner *et al.*,1996; Raaijmakers *et al.*,1997) o por la inducción de resistencia sistémica adquirida (Whipps, 2001).

4-a Resistencia sistémica

Kloepper, et al., 1992 definen el término resistencia inducida como el proceso de resistencia activa dependiente de las barreras físicas o químicas de la planta activados por agentes inductores bióticos o abióticos. Esta definición vemos que tiene en cuenta los dos tipos de inductores. Si bien los efectos fenotípicos de la inoculación con bacterias pueden ser similares a los observados por tratamientos con agentes abióticos o microorganismos que causen daño localizado, los cambios bioquímicos son sutilmente diferentes. Esto originó el término resistencia sistémica inducida (ISR) para definir a

aquella resistencia inducida por bacterias y resistencia sistémica adquirida (SAR) a aquella que se origina por otros inductores (Pieterse *et al.*, 1996). La diferencia bioquímica más observable en estos casos es que en la SAR se produce la activación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) como quitinasas; glucanasas, etc. cosa que no se observa con frecuencia en la resistencia inducida por bacterias (ISR) (Hoffland *et al.*, 1995) y además la SAR es inducida por ácido salicílico, que no siempre se encuentra presente en la ISR, aunque esto depende de la cepa bacteriana involucrada y de la planta (Pieterse *et al.*, 1996).

Los cambios que se han observado en las raíces de las plantas que presentan ISR son:

- a) Fortalecimiento de las paredes celulares corticales con deposición de barreras adicionales como lignina, callosa o compuestos fenólicos (Jetiyanon *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997).
- b) Incremento en el nivel de enzimas como quitinasas, peroxidasas, polifenol oxidasas, etc. (Chen *et al.*, 2000).
- c) Aumento en la producción de fitoalexinas (Ongena *et al.*, 1999).
- d) Aumento en la expresión de genes relacionados al estrés (Timmusk y Wagner, 1999)

Estos cambios bioquímicos no son universales ya que no se producen en todas las combinaciones planta-bacteria. Cada una de las respuestas va a depender de la planta y de la cepa en cuestión, incluso de la capacidad que tenga la cepa por colonizar los tejidos de la raíz. No hay una clara delimitación entre ISR y SAR desde el momento en que algunos mecanismos, como por ejemplo la inducción de PR, si bien son típicos de la SAR, también se producen como respuesta al contacto con una bacteria, esto se observa claramente en la bibliografía y es notable la falta de vinculación que tienen algunos aspectos, como por ejemplo la capacidad de muchas bacterias de producir ácido salicílico como sideróforo, con la inducción de tolerancia al estrés abiótico que podría ejercer este ácido salicílico de origen bacteriano en la planta. Este planteo también se ve reflejado aunque de un modo muy indirecto y sutil en el trabajo de Timmusk y Wagner (1999), quienes encontraron que la inoculación con *Paenibacillus polymixa* puede proteger a *Arabidopsis thaliana* en la infección contra patógenos y frente a condiciones de estrés por sequía en un sistema gnotobiótico. La inoculación con el microorganismo causa un incremento en la expresión de genes asociados no solamente al estrés biótico

(RR-1; HEL y ATVSP) sino que también hay un incremento en la expresión de genes relacionados al estrés abiótico (ERD 15 y RAB 18) y concluyen que la inoculación con la bacteria puede desencadenar las vías de defensa de ambos tipos de estrés o que estas vías están solapadas.

4-b Interacción planta bacteria en condiciones de salinidad

Si bien son conocidos los mecanismos de tolerancia y adaptación al medioambiente salino en las plantas y en las bacterias, es poco lo que se conoce hasta el momento acerca del modo en que se ve afectada la interacción planta-microorganismo en estas condiciones en aquellas PGPR con cultivos de interés agronómico como lo son el trigo, soja, maíz, sorgo o pastos forrajeros.

La interacción más estudiada en condiciones de estrés salino es la de *Rhizobium*-leguminosas. Soussi *et al.*, (1998), demostraron que las concentraciones de 75 y 100 mM de NaCl afectan significativamente la nodulación y la actividad nitrogenasa en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) inoculadas con *Mesorhizobium ciceri ch-191*. Por otra parte, Tu (1981) demostró que los pelos radiculares de soja se deformaban o curvaban poco cuando eran inoculados con *Bradyrhizobium japonicum* en presencia de NaCl 170 mM y que la nodulación fue completamente suprimida en presencia de NaCl 210 mM.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la interacción de *Azospirillum* con maíz y trigo en condiciones de elevada salinidad y se demostró que si bien *Azospirillum brasilense* es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de 300 mM, en estas condiciones, por tener afectadas moléculas que intervienen en la adsorción y el anclaje, no coloniza adecuadamente las raíces de maíz y trigo (Jofre *et al.*, 1998 ; Fischer *et al.*, 2000).

Cuando se quieren determinar los mecanismos mediante los cuales puede ser exitosa la interacción planta-bacteria en condiciones de estrés abiótico, ya sea salinidad, sequía, metales pesados, etc, es notable el vacío de información que hay al respecto.

En este sentido uno de los mecanismos descritos, es aquel estudiado por Burd *et al.*, (1995) y Mayak *et al.*, (2004) que demostraron que la inoculación con una cepa productora de ácido amino ciclo propano carboxílico (ACC) deaminasa confiere resistencia al estrés hídrico en plántulas de tomate y pimiento. El modelo que explica

este mecanismo se ve representado en la figura IV extraída de van Loon y Bakker , 2003

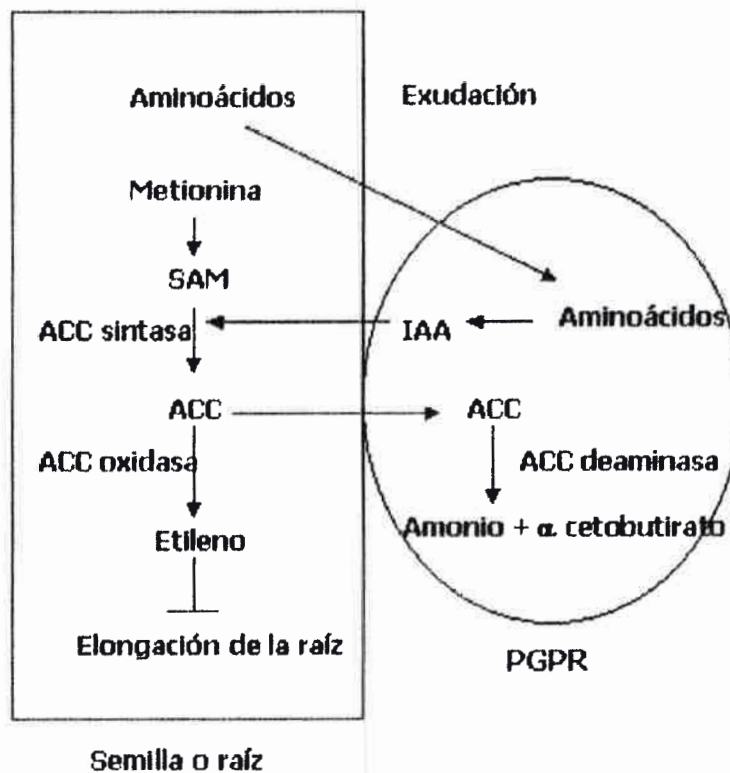


Figura IV: Mecanismo de protección frente a estrés mediante la producción de ACC deaminasa, desencadenado por la inoculación con una PGPR. (Modificado de van Loon y Bakker, 2003)

La cepa bacteriana promueve la elongación de la raíz uniéndose a la semilla o a la raíces en crecimiento e hidrolizando el ACC liberado por la planta dando como producto amoniaco y α -cetobutirato. De esta manera disminuye la cantidad de ACC que se convierte en etileno disminuyendo los niveles del mismo y por consiguiente, favoreciendo el crecimiento de la planta.

Este mecanismo ha sido identificado en lechuga, canola, tomate y trigo, mientras que no se produce en cebada y avena (Hall *et al.*, 1996) por lo que se concluye que la promoción de crecimiento vía hidrólisis de ACC estaría restringida a algunas especies.

5- ¿Cómo recuperar tierras no productivas afectadas por salinidad?

En la actualidad, los esfuerzos por recuperar tierras afectadas por la elevada salinidad han consistido fundamentalmente en desarrollar cultivos resistentes a este tipo de estrés por métodos de cruzamiento convencionales. Sin embargo una serie de experimentos genéticos y fisiológicos han dejado claro que la tolerancia intrínseca de las plantas al estrés ambiental es determinada por factores multigénicos de incidencia cuantitativa que son muy difíciles de manejar por métodos de mejoramiento clásicos (Dvorák *et al.*, 1988; Parida y Das, 2004). Un ejemplo de esto ha sido el intento de obtener híbridos entre especies económicamente importantes como el trigo (*Triticum aestivum*) con especies tolerantes a la sal como el agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) también llamado *Elytrigia elongata* (Host) Nevski o *Lophopyrum elongatum* (Host).

Los géneros *Triticum* y *Agropyron* están estrechamente relacionados y aparentemente divergen de un linaje común en la tribu triticeae. Solo una pequeña cantidad de especies de esta tribu ocupa ambientes salinos. Asumiendo que el ambiente salino es un nicho ecológico especializado parecería que el halofilismo facultativo de agropiro es un carácter derivado a partir del hábitat no halofílico que prevalece en la tribu. La tolerancia a la sal de *Agropyron elongatum* depende de muchas interacciones génicas aditivas menores. La adaptación de esta especie se desarrolló probablemente por acumulación de muchos alelos en numerosos loci, cada uno con un efecto relativamente pequeño sobre la tolerancia a la sal (Dvorák *et al.*, 1988).

Se han realizado intentos por obtener híbridos entre estas dos especies pero dado que los alelos de agropiro responsables de la tolerancia a la salinidad no presentan una dominancia absoluta sobre los de trigo, no se han logrado híbridos que muestren ser tolerantes a la salinidad.

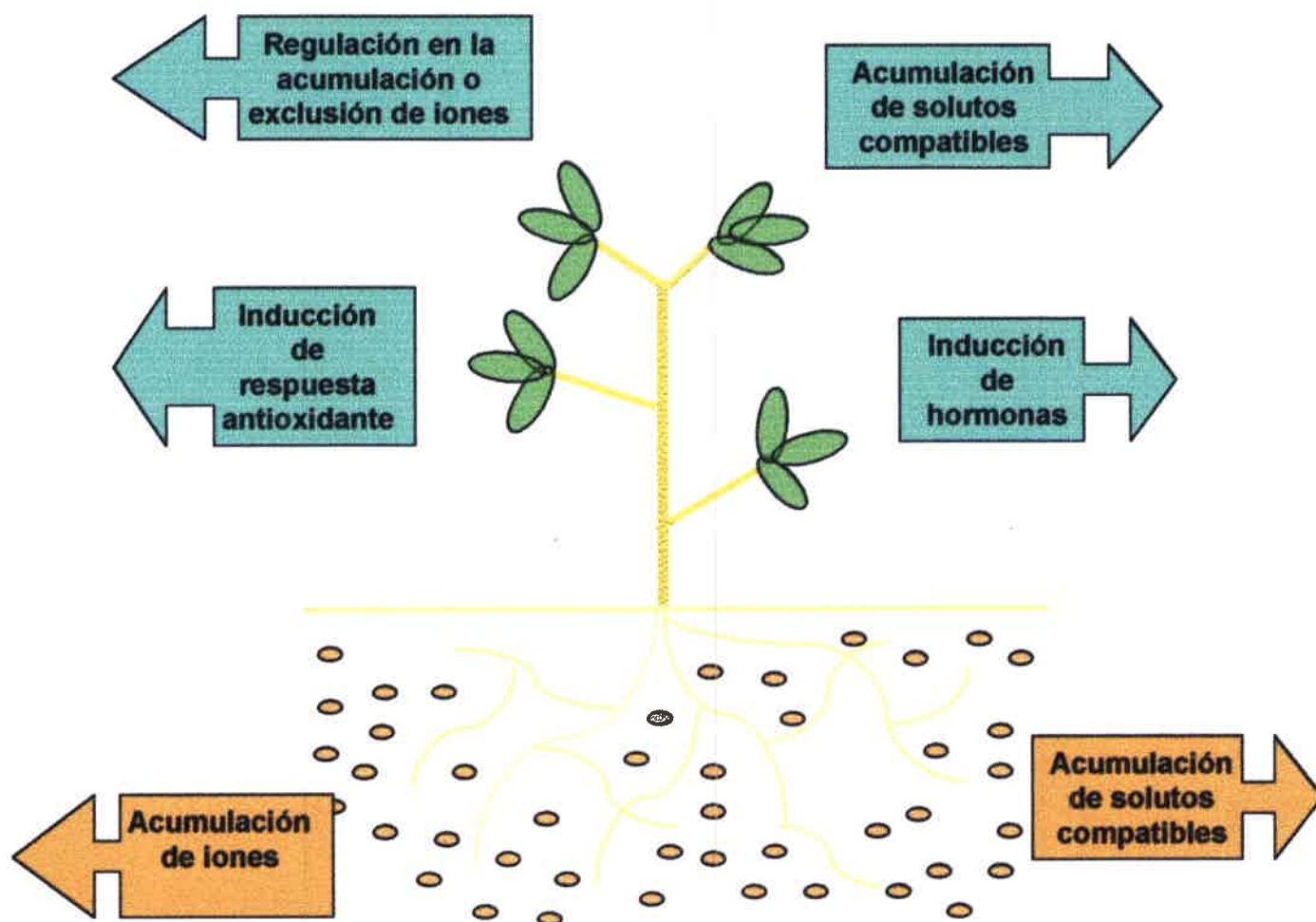
Agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) ha sido ampliamente recomendado para la recuperación de suelos anegados y afectados por los altos niveles de sales, pudiendo llegar a crecer en suelos cuyas conductividades eléctricas (CE) alcanzan valores de 15 dS/m (aproximadamente 150 mM de NaCl). Además tolera condiciones de alcalinidad y humedad, es de alto nivel nutritivo cuando está verde e inmaduro y es

una especie fuertemente competitiva pudiendo volverse un monocultivo si las condiciones lo permiten (www.ussl.ars.usda.gov).

Una solución alternativa o complementaria a los intentos por obtener híbridos que toleren condiciones salinas y que no vean afectado su rendimiento en dichas condiciones, sería diseñar un sistema que incluya una interacción planta - microorganismo eficiente para sobrevivir en un medio con alta concentración de sales y de esta manera proporcionar una alternativa ecológica para la recuperación de estas tierras poco productivas.

En este sentido y con el propósito de encontrar una asociación planta-bacteria adecuada para la recuperación de suelos salinos poco productivos, y mediante el uso de una especie tolerante a la sal como agropiro alargado como huésped trampa, nuestros estudios se centraron en el aislamiento de bacterias nativas de suelos salinos de la región, adaptadas a estas condiciones y capaces de asociarse a agropiro y a otros cultivos de importancia agronómica y promover el crecimiento de los mismos.

Mecanismos de respuesta frente a salinidad identificados en plantas, bacterias y en la interacción planta-bacteria



Disminución de los niveles de etileno de estrés a través de la producción de ACC deaminasa por parte de la bacteria (Mayak et al., 2004).

Producción bacteriana de Acido Salicílico en la rizósfera o en el interior de la planta??

Excreción de azúcares osmoprotectores por parte de la bacteria en la rizósfera o en el interior de la planta??

Modificación en el contenido de iones Na^+ o K^+ en la rizósfera o en el interior de la planta?

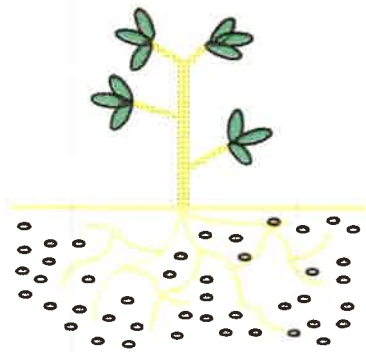
Establecimiento de una asociación Planta-Bacteria eficiente para permitir el crecimiento de especies vegetales sensibles en suelos con elevada salinidad

HIPÓTESIS

A partir de suelos salinos de la provincia de Córdoba es factible el aislamiento de bacterias ya adaptadas con capacidad de establecer una asociación planta-bacteria que le permita a la planta sobreponerse a los efectos de la salinidad.

El o los mecanismos involucrados en esta asociación beneficiosa son aquellos relacionados a una mayor tolerancia a la sal por parte de la planta como lo son la acumulación de azúcares con función de osmoprotección, la regulación en el contenido y compartimentalización de los iones Na^+ y K^+ , la producción de hormonas relacionadas al estrés o una combinación de los mismos.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

1- Aislar y caracterizar cepas nativas PGPR tolerantes a estrés salino:

*Determinar las características morfofisiológicas y bioquímicas, el potencial PGPR y la tolerancia a la sal de los aislamientos.

*Evaluar la capacidad de producir sustancias inhibitoras (tipo bacteriocinas) in vitro de los aislamientos seleccionados.

2- Realizar estudios fisiológicos de las bacterias seleccionadas:

*Determinar mediante curvas de crecimiento, la viabilidad de los aislamientos tolerantes a NaCl 1M seleccionados.

*Identificar taxonómicamente el / los aislamientos de interés

*Determinar la tolerancia a otros tipos de estrés.

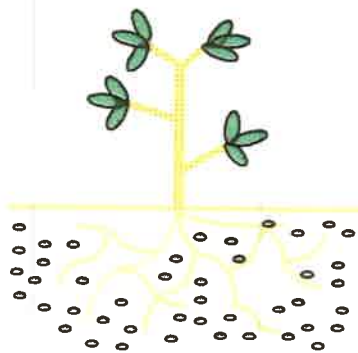
*Evaluar posibles mecanismos de tolerancia, por parte de los aislamientos seleccionados.

3- Evaluar el efecto de la inoculación de los aislamientos seleccionados sobre los parámetros de crecimiento de plántulas de agropiro, trigo y soja en condiciones controles y de estrés.

4-Determinar, en el caso de observar mejoras en el crecimiento de las plantas, los posibles mecanismos por los cuales la/ s cepa/s seleccionada/s disminuye/n los efectos del estrés salino en las mismas, estudiando para ello:

- a) Producción de azúcares con función de osmoprotección en el interior de las plantas y en los exudados.
- b) Producción de enzimas de la defensa antioxidante como catalasa y/ u otras.
- c) Producción de ácido salicílico por la/s cepa/s
- d) Determinación de la actividad ACC deaminasa por parte de la/s cepa/s
- e) Determinación del contenido de iones Na^+ y K^+ en el interior de las plántulas.

MATERIALES Y METODOS



MATERIALES Y METODOS**1) Medios de cultivo y reactivos.****1 a) Medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950)**

CaCl ₂ 1 M	10 ml
KCl 1 M	10 ml
MgSO ₄ 1 M	4 ml
KH ₂ PO ₄ 1 M	2 ml
FeCl ₃ (5 mg/ml)	2 ml
Solución de micronutrientes	2 ml
H ₂ O destilada (c.s.p)	1000 ml
Solución de micronutrientes:	
H ₃ BO ₃	2,83 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,81 g
ZnCl ₂	0,11 g
CuSO ₄	0,05 g
MoO ₄ Na	0,025 g
H ₂ O destilada (c.s.p)	1000 ml

1 b) Medio mínimo Glucosa (MMGlucosa)

Glucosa	4 g
K ₂ HPO ₄	1,67 g
KH ₂ PO ₄	0,87 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
Ca Cl ₂	0,04 g
FeCl ₃	0,004 g
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,005 g
Peptona	0,4g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O destilada (c.s.p)	1000 ml

1 c) Medio para la fijación de nitrógeno: Nfb

Acido málico	5 g
K_2PO_4H 10%	5 ml
$MgSO_4 \cdot H_2O$ 10%	2 ml
NaCl 10%	1 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%	2 ml
Solución de micronutrientes	2 ml
Fe-EDTA 1,64%	4 ml
KOH	4,5 g
Solución de vitaminas	1 ml
Agar	1,75 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Para el medio con nitrógeno se adicionó:	
NH_4Cl	2,5 g/l
Se llevó a pH 6,5-6,8.	
Solución de vitaminas	
Biotina	10 mg
Piridoxal-HCl	20 mg
Agua destilada c.s.p.	100 ml
Solución de micronutrientes	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,2 g
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0,235 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,024 g
H_3BO_3	0,28 g
Agua destilada c.s.p.	200 ml

1 d) Medio para la solubilización de fosfato

Extracto de levadura	2g
Glucosa (o fructosa)	20 g
Ca ₅ O ₁₃ HP ₃	2 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 7,0	

1 e) Medio (CAS) para la producción de sideróforos.**Soluciones stock**

1) CAS (Chromo Azurol S) stock 10x

Solución a-A 60,5 g de CAS disueltos en 50 mL de agua desionizada se le agregan 10 ml de FeCl₃•6H₂O 1mM disueltos en HCl 10 mM.

Solución b- 72,9 mg de HDTMA (bromuro de hexadecil trimetilamonio, FLUKA) disueltos en 40 ml de agua desionizada.

Mezclar las soluciones a y b. Autoclavar a vapor fluente por 20 minutos. Almacenar a 4°C y en oscuridad.

2-MM9 stock 10x

KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Autoclavar y guardar a 4°C.	

Solución stock de vitaminas (10 ml)

Riboflavina	20 mg
Acido paraminobenzoico	20 mg
Acido nicotínico	20 mg
D-biotina	20 mg

D-pantotenato de calcio	20 mg
Piridoxal-HCl	20 mg
Tiamina-HCl	20 mg
Agua destilada c.s.p	100 ml

Filtrar y conservar a 4°C.

Para preparar 200ml de Agar CAS:

Pipes (Buffer free acid pH 6,8)	6,1g
Bacto agar	3 g
Solución stock de triptófano al 1%	0,6 ml
Triptona	0,032 g
Agua destilada c.s.p	160 ml

Este medio se autoclava. Posteriormente se le agregan las siguientes soluciones estériles:

MM9 10x	20 ml
CAS 10 x	20 ml
Glucosa o ácido málico 20%	2 ml
MgSO ₄	0,1 ml
CaCl ₂ 50 mM	0,2 ml
Solución stock de vitaminas	0,1 ml

Se lleva a pH 6,8

1 f) Medio Agar Papa Glucosado (APG)

Papas frescas peladas	200 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p	1 l

Las papas son peladas y cortadas. Luego de hervirlas en agua destilada, se filtra el puré a través de gasa.

1 g) Medio para la detección de actividad ACC deaminasa (Glick *et al.*, 1995).

K ₂ PO ₄ H	1g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O ₂	0,2g
SO ₄ Fe. 7H ₂ O ₂	0,1g
CaCO ₃	1g
NaCl	0,2
Na MoO ₄ .2H ₂ O ₂	5 mg
Glucosa	10 g
ACC	0,3g
Agar	0,3g
Agua destilada c.s.p	1l

1 h) Reactivo de Antrona (Morris D, 1948).

Solución (250 ml H ₂ SO ₄ + 100 ml H ₂ O destilada)	100 ml
Antrona	200 mg

2-Esterilización y pregerminación de semillas.

Para el aislamiento de las cepas nativas se utilizaron semillas de *Thynopiron ponticum* (Agropiro alargado) variedad El Vizcachero con un porcentaje de germinación de 80%.

Las semillas fueron desinfectadas durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio 1% y luego de repetidos lavados fueron colocadas entre papeles de filtro en placas de germinación estériles de 20 cm de diámetro y humedecidas con 4,5 ml de agua. Las placas fueron mantenidas en oscuridad durante 5 días.

Para el trigo y la soja la metodología de esterilización y las condiciones de pregerminación fueron las mismas. Trigo (*Triticum aestivum*) var. "Charrua" y soja (*Glicine max*) var DM4800. La desinfección consistió en los siguientes pasos: Sumergirlas durante 5 minutos en etanol comercial 95%, luego se realizaron sucesivos

lavados con agua destilada estéril y posteriormente fueron sumergidas en una solución de lavandina comercial al 25 %. Al cabo de 15 minutos fueron enjuagadas abundantemente con agua destilada y se las dejó en remojo en agua estéril durante una hora para permitir la imbibición. Luego fueron sumergidas nuevamente en solución de hipoclorito de sodio durante 5 minutos y finalmente fueron lavadas con abundante agua estéril y colocadas en placas de germinación húmedas en oscuridad durante dos días para trigo y cinco días para soja.

3-Establecimiento de las condiciones salinas estresantes para las distintas especies vegetales .

La determinación de los límites de tolerancia al estrés salino de agropiro alargado se realizó en medio líquido, en tubos que contenían 25 ml de medio Hoagland : control (C); 250 mM NaCl y 300 mM de NaCl. Para ello, semillas estériles y pregerminadas de agropiro fueron transferidas a los tubos y luego de 15 días se evaluaron los efectos sobre la apariencia y estado de las plántulas sometidas a las distintas concentraciones.

En trigo y soja, las concentraciones estresantes empleadas en experimentos en tubos, fueron 100 mM (CE aprox. 10 dS/m) y 80 mM NaCl (8 dS/m) respectivamente, valores que afectan el rendimiento de estos cultivos en un 25% (Bohn *et al.*, 1993).

En el caso de experimentos en macetas, la concentración fue elevada a 120 mM y 100 mM NaCl para trigo y soja respectivamente, dado que en experimentos preliminares se determinó que las concentraciones utilizadas para los tubos no eran estresantes en macetas, posiblemente debido a que el sustrato (arena: perlita) posibilita una mejor aereación de las raíces permitiendo un mejor crecimiento.

4-Aislamiento de cepas nativas tolerantes a salinidad.

Se tomaron muestras de tres suelos salinos pertenecientes a la provincia de Córdoba. Dos de ellas de la zona de Laboulaye (suelo 1 y 2) y la restante de Huanchilla (suelo 3)

Las características de los distintos suelos fueron: Suelo 1, CE= 49,5 mS/cm y pH=7,67; Suelo 2 con CE= 25,3 mS/cm y pH=6,21 y Suelo 3; CE= 36,1mS/cm y pH=8

Semillas de agropiro estériles y pregerminadas fueron transferidas asépticamente a vasos que contenían las distintas muestras de suelo. Se colocaron tres semillas por

vaso. Al cabo de 21 días se procedió al aislamiento de las bacterias presentes tanto en la rizósfera como en la endorizósfera de las plántulas.

Para el aislamiento de la rizósfera, se cosecharon tres plántulas; las raíces fueron sumergidas en 5 ml de solución fisiológica estéril de manera de desprender la tierra adherida a ellas. Se realizaron diluciones, las que fueron posteriormente sembradas en placas de agar nutritivo. Luego de 24-48 hs se repicaron las colonias presentes en las diluciones.

Para la endorizósfera, las raíces fueron desinfectadas externamente con una solución de HgCl_2 0,01% durante 15 segundos. Luego fueron maceradas con 1ml de solución fisiológica en morteros estériles. Se realizaron diluciones y se sembraron en placas de agar nutritivo a partir de las que se seleccionaron las distintas colonias.

En el caso del suelo 1, la metodología fue distinta debido a que ninguna semilla fue capaz de establecerse en los vasos. Por ello se realizó una dilución del suelo que fue sembrada en medio Nfb semi sólido con nitrógeno y sin nitrógeno. El velo de crecimiento fue extraído y sembrado en medio LB. Luego de 24 hs de crecimiento a 28 °C, se tomó 1 ml de este cultivo con el que se inocularon plántulas de agropiro sembradas en vasos que contenían una mezcla de arena perlita estéril. A partir de esas plántulas se realizó el posterior aislamiento de las bacterias presentes en la rizósfera y en la endorizósfera.

Finalmente fueron seleccionados aquellos aislamientos capaces de crecer en agar nutritivo 1M de NaCl.

Por otro lado, se observó crecimiento microbiano en uno de los tubos con plántulas de agropiro que habían sido cultivadas en el medio suplementado con 300 mM NaCl (ver apartado 3 de Mat. y Met.). Se tomó una alícuota del medio de cultivo y se sembró en agar nutritivo 700 mM NaCl, que luego de 24 hs. de incubación en estufa, mostró crecimiento de una colonia bacteriana amarilla. Este aislamiento fue denominado E y se determinó que era tolerante a NaCl 1M.

5- Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos seleccionados

5a) Determinaciones bioquímicas y morfofisiológicas de los aislamientos seleccionados.

1) La caracterización se realizó a través de tinción de Gram, prueba de la oxidasa, catalasa, fenil alanina, ureasa, citrato y crecimiento a 4°C.

II) Pruebas para determinar el carácter PGPR en las cepas aisladas:

-Formación de velo en medios semisólidos sin fuente de nitrógeno (Nfb) (fijación de nitrógeno) (Tarrand *et al.*, 1978; Döbereiner, 1989)

- Producción de ácido indol acético y/o análogos por medio del método de Salkowski (Brito Alvarez *et al.*, 1995; Glickmann, y Dessaux, 1995) que permite de manera rápida realizar un screening entre muchos aislamientos. Para considerar un aislamiento como positivo se tomó como cepa patrón a *Azospirillum brasilense* Cd que es ampliamente reconocido como productor de AIA. (Balota, *et al.*, 1997; Dobbelaere *et al.*, 1999; Bashan *et al.*, 1997)

-Producción de sideróforos según la técnica del agar cromo azurol (CAS). Por medio de esta técnica, aquellos microorganismos capaces de excretar sideróforos producen un halo naranja alrededor de las colonias presentes en la placa y son fácilmente identificados (Schwyn, *et al.*, 1986).

-Solubilización de fosfatos (Frioni, 1990).

-Ensayos de inhibición del crecimiento del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno de plantas de maní. Para esto, el hongo fue sembrado en placas de agar papa glucosado (APS) y se sembraron cuatro aislamientos por placa. Se incubó a 28 °C y se determinó si había o no inhibición del crecimiento fúngico, así como también la inhibición de la formación de esclerosios.

5b) Estudios fisiológicos de los aislamientos seleccionados

La dinámica de crecimiento frente a condiciones de estrés salino se determinó por medio de curvas de crecimiento de las bacterias en caldo nutritivo (Britania). Las curvas de crecimiento se realizaron en un agitador rotatorio a 120 rpm y a 30 °C. El crecimiento se siguió por lectura en espectrofotómetro a 600 nm y la viabilidad con respecto al control se determinó mediante el recuento de células viables en una DO = 0,6 en agar nutritivo.

6-Estudios de inhibición in vitro por competencia directa o por producción de sustancias antimicrobianas, entre los aislamientos seleccionados

a) Por producción de sustancias antimicrobianas. Técnica de Difusión de Agar en pocillos (WDA)

Esta técnica se utilizó para determinar la actividad antibacteriana en los sobrenadantes de cultivos de fase estacionaria de los 5 aislamientos. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación de los cultivos. A continuación fueron esterilizados por filtración, y colocados en freezer hasta su utilización.

La técnica de WDA, consiste en colocar 20 ml de agar nutritivo 0,2 % en placas de petri de 10 cm de diámetro. Una vez solidificado, se derramaron 3 ml de caldo nutritivo semisólido (1% de agar) inoculado previamente con un determinado aislamiento. Luego se realizaron pocillos de 4 mm de diámetro y se colocaron 50 µl de cada sobrenadante y de los concentrados de estos sobrenadantes. Las placas fueron mantenidas a 4 °C durante 4 hs. para permitir la difusión y luego fueron incubadas a 30 °C durante 48 hs. Se evaluó la presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

b) Por competencia directa por los nutrientes

La metodología fue similar al caso de la técnica anterior sólo que en este caso no se realizaron pocillos sino que se colocaron 10 µl de un cultivo en fase estacionaria directamente sobre el agar 0,1 % inoculado con la cepa indicadora.

7-Identificación taxonómica del aislamiento seleccionado.

Se utilizaron los cebadores universales

rD1 (5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')

y rD1 (5'CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC3') los que permiten la amplificación del gen completo (1500 pb) del 16S ADNr (Weisburg *et al.*, 1991).

El ciclo de amplificación fue: 1 ciclo de 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C 1min, 55 °C 1min y 72°C 2 min y finalmente un ciclo de 72 °C 3 minutos.

Los fragmentos amplificados fueron controlados en geles de agarosa 2% y enviados a para su posterior purificación y secuenciación a la Universidad de Bielefeld (Alemania).

8-Evaluación de la tolerancia del aislamiento seleccionado a distintos tipos de estrés en medio MMGlucosa

Se determinó la resistencia a estrés térmico (42 y 37 °C) y oxidativo (10 y 15 mM H₂ O₂), a estrés dado por osmolitos iónico (0,4 M NaCl) y no iónicos (0,6 M manitol, 0,6 M glicerol, 0,020 M PEG). Las concentraciones de los diferentes osmolitos

se fijaron de acuerdo al potencial osmótico. Se estableció como potencial osmótico al dado por 0,4 M NaCl, que fue de $-1,93$ Mpa.

9-Determinación de la posible acumulación intracelular y excreción in vitro de azúcares del aislamiento seleccionado

9 a) Tratamientos.

Se realizaron cultivos por triplicado en MMGlucosa sometidos a los siguientes tipos de estrés:

MMglucosa a 30 °C (como control)

Mmglucosa a 37 °C

MMglucosa + 400 mM NaCl

MMglucosa + 15 mM H₂O₂

9 b) Obtención de la muestra.

Para la determinación de acumulación intracelular de azúcares, se procedió según Canovas *et al.*, (2001); 20 ml de cultivo en fase exponencial se centrifugaron 15 minutos a 10.000 g a 4 °C. Para reducir la presencia de la fuente de carbono del medio se resuspendió el precipitado celular en medio fresco sin fuente de carbono y se centrifugó nuevamente, dos veces. A continuación, las células fueron resuspendidas en 1ml de etanol 80 % (vol/vol) y calentadas a 65 °C durante 15 minutos. Los restos celulares se removieron por centrifugación. El extracto etanólico fue secado a 37 °C al vacío y resuspendido en 0,75 ml de agua.

Los sobrenadantes de estos cultivos también fueron concentrados para determinar la posible excreción al medio de azúcares osmoprotectores.

9 c) Cromatografía en capa delgada.

El contenido de azúcares fue analizado mediante cromatografía en capa fina (TLC) en la que se sembraron 7 µl de cada muestra. Como controles se sembraron 9 µl de testigos (1 mg / ml) de trehalosa y glucosa.

Para el desarrollo de las placas se utilizó una mezcla de butanol: etanol: agua en una proporción (5:3:2). Para el revelado de las placas se pulverizó con una solución de ácido sulfúrico 10% en metanol. Luego se llevó a estufa a 120 °C hasta la aparición de las bandas.

9 d) Cromatografía gaseosa

Las muestras correspondientes a los extractos celulares de cultivos controles y salinas así como también los sobrenadantes de dichos cultivos, fueron analizados por cromatografía gaseosa para confirmar la identidad de los azúcares presentes en las muestras.

Para ello se utilizó una columna capilar de 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm ID y 0,25 μm de film. Se utilizó Nitrógeno como gas portador 2 ml/min. Temperatura inicial 150 °C con programación de temperatura a razón de 4 °C/min hasta 200 °C por 4 minutos, Temperatura del inyector 250 °C. Detector de ionización de llama (FID) a 300 °C. Volumen inyectado: 2 μl .

La identificación se realizó mediante comparación de los tiempos de retención de los siguientes patrones: L (+) Arabinosa, Sacarosa, Manitol, Glucosa y Trehalosa.

10- Determinación del contenido de Na^+ y K^+ intracelular

Para la cuantificación de iones se procedió según Bernard et al (1993). Para ello, se utilizaron células en fase estacionaria (48 hs de cultivo) en medio MMGlucosa control, suplementado con 400 mM de NaCl (estrés iónico) y 0,6 M Manitol (estrés osmótico). Las células se cosecharon por centrifugación (10.000g x 10 minutos), luego fueron lavadas tres veces con solución fisiológica para remover los iones de la pared celular. El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en HCl 0,1 M.

Luego de 24 hs a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente, y en el sobrenadante se determinó el contenido de Na^+ y K^+ en un analizador de iones Na^+/K^+ TecnoLab. El pellet celular fue secado y pesado de modo de expresar los resultados en nm de Na^+ o K^+ por gramo de peso seco.

11-Estudios de interacción

11a) Determinación de los efectos de promoción de crecimiento del aislamiento seleccionado sobre plántulas de trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glicine max*) y agropiro alargado (*Thynopiron ponticum*) en invernadero.

Para los estudios de interacción en invernadero se utilizaron macetas que contenían un soporte hidropónico formado por una mezcla de arena y perlita en una

proporción 1:1. El inóculo empleado fue de 10^7 ufc / por planta. Las macetas fueron mantenidas en cámaras de crecimiento durante 45 días bajo condiciones controladas.

El diseño experimental fue el mismo para todos los casos en donde se establecieron los siguientes tratamientos:

*C = Control: Regado cada tres días con agua estéril o Hoagland alternativamente.

*Ci= Control Inoculado: Regado cada tres días con agua estéril o Hoagland alternativamente e inoculado con 10^7 ufc del aislamiento seleccionado por planta.

*T =Tratado. Regado con medio Hoagland salinizado una sola vez al principio del experimento y luego con agua estéril o Hoagland alternativamente cada tres días.

*T = Tratado Inoculado: Regado con medio Hoagland salinizado una sola vez al principio del experimento y luego con agua estéril o Hoagland alternativamente cada tres días e inoculado con 10^7 ufc del aislamiento seleccionado por planta.

La concentraciones de sal empleadas para el medio Hoagland fueron: Para agropiro 100 mM y 140 mM NaCl; para trigo 120 mM y para soja 100 mM de NaCl .

11b) Determinación de la localización, en tallo o en raíz, del aislamiento seleccionado en plántulas de trigo, soja y agropiro .

Semillas estériles y pregerminadas de agropiro, trigo y soja, fueron transferidas a tubos que contenían diferentes volúmenes de medio Hoagland en condiciones control y salinas (con 140 mM NaCl para agropiro, 100 mM NaCl para trigo y 80 mM para soja) para el caso de soja y trigo se emplearon tubos que contenían 25 ml de medio, mientras que para el caso de agropiro se emplearon tubos de 5 ml de medio debido a que la raíz es pequeña. Los tubos fueron inoculados con 10^7 ufc/ml de un cultivo del aislamiento seleccionado. A los 15 días post inoculación se procedió a realizar el recuento.

Se evaluó la localización tanto en tallos como en raíces. Para ello se esterilizaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 3 minutos. A continuación se lavaron con abundante agua destilada estéril y se procedió al macerado con solución fisiológica en morteros estériles para luego realizar diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de Petri con agar nutritivo suplementado con 400mM de NaCl y 10 μ g/ml de estreptomina. Esto se realizó para evitar el crecimiento en las placas de los endófitos propios en cada una de las especies.

12) Determinación de los posibles mecanismos a través de los cuales, el aislamiento seleccionado disminuye los efectos del estrés salino

12 a) Determinación del contenido de azúcares en la interacción Bacteria-Trigo

La posible participación de azúcares osmoprotectores en el incremento en la tolerancia al estrés salino del trigo por la inoculación del aislamiento seleccionado se evaluó en tres niveles:

- I) Análisis de los azúcares presentes cuando se cultiva el aislamiento seleccionado en medio Hoagland con exudados de trigo como única fuente de carbono.
- II) Análisis de los azúcares presentes en los exudados provenientes de plántulas de trigo inoculados con el aislamiento seleccionado.
- III) Análisis de los azúcares en tránsito en el interior de las plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.

I) Análisis de los azúcares presentes cuando se cultiva el aislamiento seleccionado en medio Hoagland con exudados de trigo como única fuente de carbono. En la figura V se resume esta metodología.

Los exudados de trigo en condiciones salinas fueron obtenidos mediante cultivo de plántulas en tubos que contenían medio Hoagland suplementado con 100 mM de NaCl. A los 20 días de crecimiento se recolectó el medio y se concentró en un evaporador rotatorio.

Este concentrado se utilizó como única fuente de carbono para nuevo medio Hoagland suplementado con 100 mM de NaCl, donde fueron cultivadas las bacterias durante una semana. Posteriormente los cultivos fueron cosechados y el sobrenadante fue colectado, concentrado en evaporador rotatorio y resuspendido en 200 μ l de agua bidestilada (Ti). Como control se utilizó medio Hoagland con el agregado de exudados sin inocular (T).

Los concentrados de T y Ti fueron purificados en una columna de exclusión molecular Biogel P-4. Se colectaron fracciones a las que se les determinó el contenido de azúcares totales por medio de la técnica de antrona (Morris, 1948). Las fracciones positivas para antrona fueron reunidas y analizadas por HPLC con una columna de

intercambio aniónico PA-10 con detector amperométrico. El solvente de elusión fue OHNa 50 mM para el caso de disacáridos y 20 mM para monosacáridos.

II) Análisis de los azúcares presentes en los exudados provenientes de plántulas de trigo inoculados con el aislamiento seleccionado.

Semillas de trigo estériles y pregerminadas fueron transferidas a tubos que contenían medio Hoagland control o 100 mM NaCl. Inmediatamente la mitad de los tubos fueron inoculados con el aislamiento seleccionado en una concentración final de 10^7 ufc/ml., quedando establecidos los siguientes tratamientos:

Plántulas en medio control sin inocular (C)

Plántulas en medio control e inoculadas (Ci)

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl sin inocular (T) y

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl inoculadas (Ti).

Luego de 20 días, las plantas fueron extraídas y el medio que contenía los exudados fue esterilizado por filtración y concentrado a vacío en un agitador rotatorio.

Una vez concentrados, fueron resuspendidos en 200 μ l de agua bidestilada y analizados por HPLC utilizando una columna SUPERCO GEL con agua ultra pura como solvente; flujo de 0,6 ml/ min, a una T° de 85 °C y se utilizó un detector de Índice de refracción Konik con control de temperatura.

III) Análisis de los azúcares en tránsito en el interior de las plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.

Semillas de trigo estériles y pregerminadas fueron transferidas a tubos que contenían medio Hoagland control o adicionado con 100 mM NaCl. Inmediatamente, la mitad de los tubos fueron inoculados con el aislamiento seleccionado en una concentración final de 10^7 ufc/ml, quedando establecidos los siguientes tratamientos:

Plántulas en medio control sin inocular (C)

Plántulas en medio control e inoculadas (Ci)

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl sin inocular (T) y

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl inoculadas (Ti)

A los 20 días se tomaron tres plántulas por tratamiento y se maceraron con 3 ml de alcohol 80 %, de modo de extraer el contenido intracelular. Luego se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante, se evaporó hasta obtener 1 ml y a continuación se pasó la muestra por una columna de exclusión molecular Biogel P-4 de 10 cm de largo. Cada una de las fracciones eluidas fue evaluada por antrona para determinar la presencia de azúcares reductores. Las fracciones positivas para antrona fueron nuevamente evaporadas al vacío, resuspendidas en 30 μ l de agua bidestilada y reunidas en una sola muestra. Se determinó la cantidad total de azúcares nuevamente por el método de antrona y se evaluó en los tratamientos el contenido de azúcares mediante el sistema HPAEC-PAD utilizando una columna de intercambio aniónico PA-10 con detector amperométrico. El solvente de elución fue OHNa 50 mM para el caso de disacáridos y 20 mM para monosacáridos.

La figura VI resume la metodología empleada para determinar los azúcares presentes en los exudados de trigo, así como también la metodología para determinar azúcares en tránsito en plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.

Figura V: Metodología empleada para el análisis de los azúcares presentes cuando se cultiva el aislamiento seleccionado en medio Hoagland con exudados de trigo como única fuente de carbono.

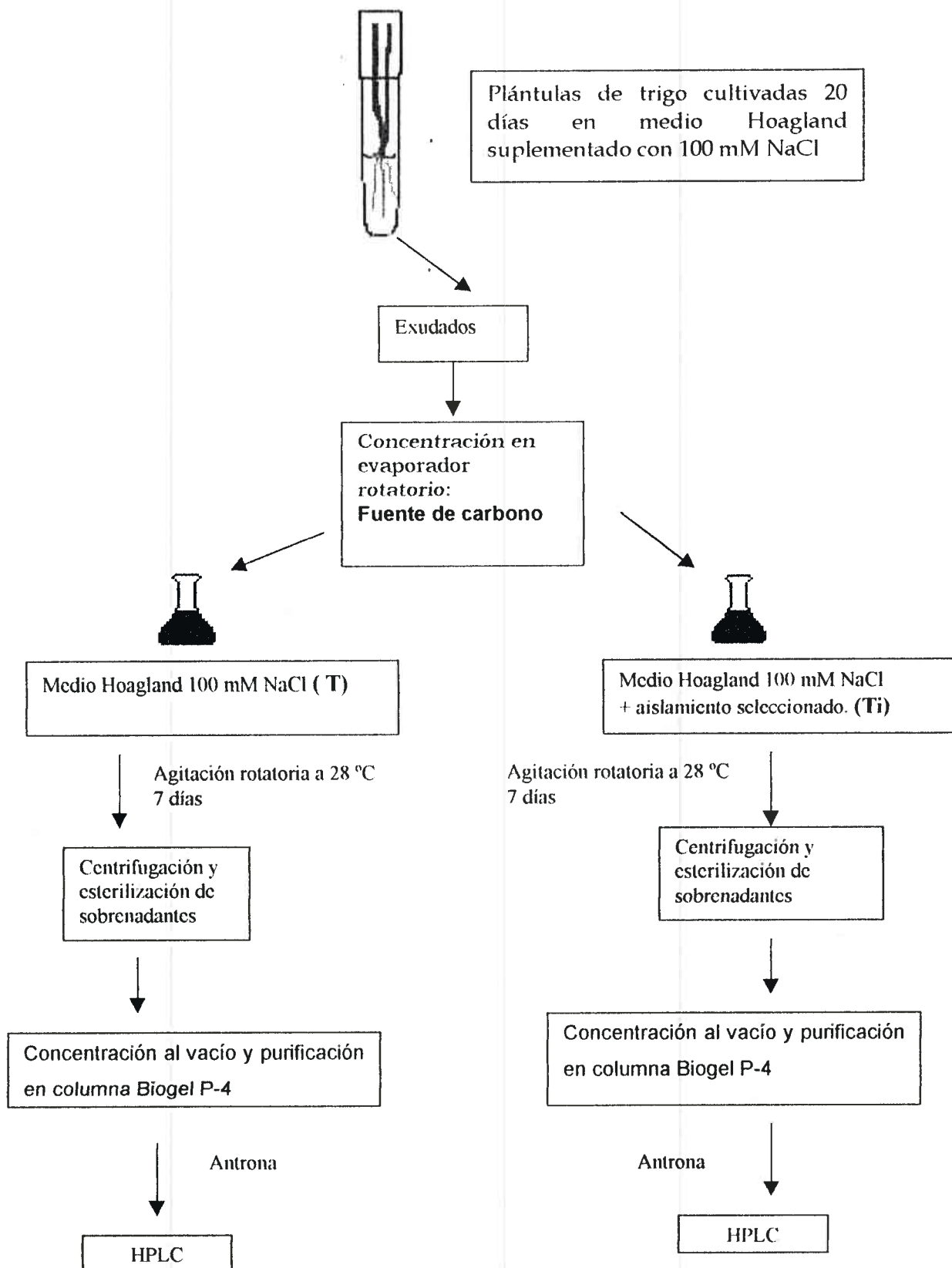
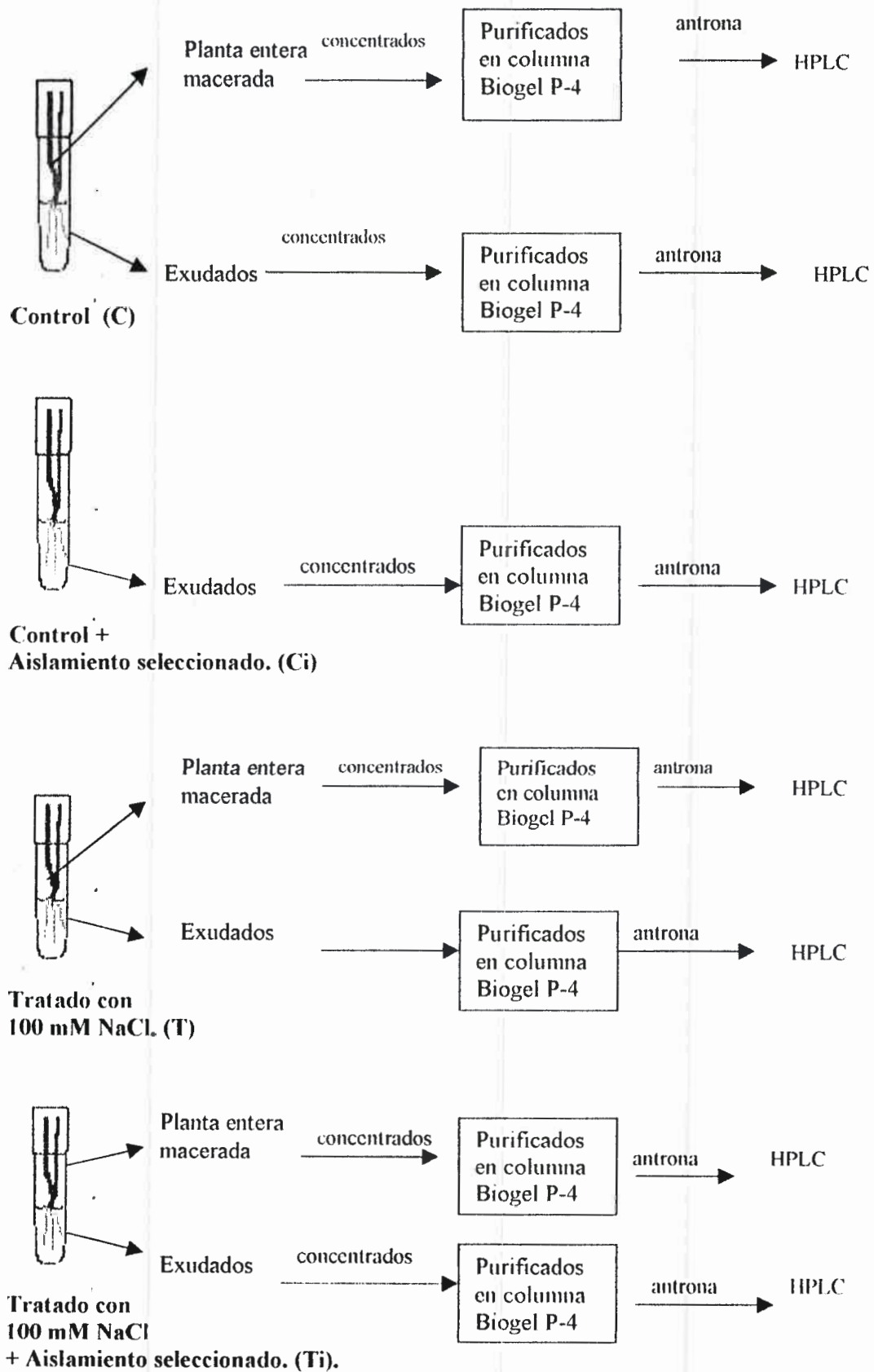


Figura VI: Metodología empleada para el análisis de los azúcares presentes en los exudados y en el interior de plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.



12b) Determinación de la producción de ácido salicílico por el aislamiento seleccionado.

Para establecer la capacidad del/ los microorganismos seleccionados de producir y excretar ácido salicílico al medio, se procedió según Meyer *et al.*, (1992). Cultivos del aislamiento seleccionado en MMGlucosa suplementado con 400 mM NaCl y cultivos controles (MMGlucosa sin NaCl) fueron mantenidos en agitador rotatorio a 130 rpm. y 30 °C durante tres días. A continuación las células fueron removidas por centrifugación 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante fue acidificado a pH= 2 con 1N ClH, filtrado con membrana de nylon de 0,22 µm de poro y particionado dos veces con 2 ml de cloroformo. La fracción clorofórmica fue extraída y concentrada al vacío para luego ser analizada por cromatografía gaseosa. Para ello se utilizó una columna 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, 30m x 0,25 mm ID y 0,25 µm de film. Se utilizó nitrógeno como gas portador 1,5 ml/min., temperatura inicial 100 °C con programación de temperatura a razón de 25 °C/min hasta 300 °C por 4 minutos, temperatura del inyector 250 °C, volumen inyectado 2µl. Detector FID. La identificación se realizó mediante comparación del tiempo de retención con un standard de Acido Salicílico.

12c) Determinación de la actividad ACC (1-aminociclopropano 1-carboxilato) deaminasa por parte del aislamiento seleccionado.

Para la detección de la capacidad de utilizar ACC como única fuente nitrogenada se procedió según la técnica descrita por Glick *et al.*, (1995). Para ello se utilizó el medio para la detección de bacterias degradadoras de ACC (ver apartado 1g de materiales y métodos).

Las bacterias se siembran en el medio que contiene ACC como única fuente de nitrógeno y paralelamente en el mismo medio sin el agregado de ACC. De esta manera se pueden diferenciar aquellas que crecen porque poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (crecen en el medio sin ACC) de aquellas que utilizan ACC como fuente de Nitrógeno (crecen en el medio que contiene ACC y no crecen en el medio sin ACC).

12d) Determinación de la actividad catalasa en plántulas de trigo inoculadas con el aislamiento seleccionado.

Semillas de trigo estéril y pregerminadas fueron transferidas a tubos que contenían medio Hoagland control y salino (suplementado con 100 mM NaCl). La mitad fueron inoculadas con 10^7 ufc/ ml del aislamiento seleccionado. De tal manera quedaron establecidos los siguientes tratamientos:

Plántulas en medio control sin inocular (C)

Plántulas en medio control e inoculadas (Ci)

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl sin inocular (T) y

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl inoculadas (Ti)

Al cabo de 20 días se procedió según Sairam *et al.*, (2002) para la extracción enzimática, donde 0,5 g de tejido fueron homogeneizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,5 y 0,5 mM EDTA en morteros bien fríos. A continuación, el homogenato fue centrifugado a 4 °C 15 min. a 15.000 g y el sobrenadante recuperado y almacenado en frío hasta su utilización.

La determinación de catalasa se realizó por el método espectrofotométrico continuo de Sigma en el que se determina el tiempo transcurrido para la disminución de absorbancia a 240 nm de 0,45 a 0,40 en 3ml de mezcla de reacción que contiene 50 mM Buffer fosfato pH=7; peróxido de hidrógeno 0,035 % y mezcla enzimática (100 mg de proteínas). El contenido de proteínas fue determinado por el método de Bradford (1976).

12 e) Determinación del contenido de iones Na^+/K^+ en el interior de plántulas de trigo.

Semillas de trigo estéril y pregerminadas fueron transferidas a tubos que contenían medio Hoagland control y salino (suplementado con 100 mM NaCl). La mitad fueron inoculadas con 10^7 ufc/ ml del aislamiento seleccionado. De tal manera quedaron establecidos los siguientes tratamientos:

Plántulas en medio control sin inocular (C)

Plántulas en medio control e inoculadas (Ci)

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl sin inocular (T) y

Plántulas en medio salino 100 mM NaCl inoculadas (Ti)

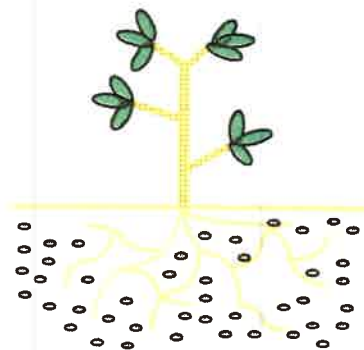
Al cabo de 20 días, se separaron tallos de raíces y se llevaron a estufa de secado a 80 °C durante cuatro días hasta peso constante. Se determinó el peso seco y se procedió a macerar en morteros con 1 ml de HCl 0,1M. Este macerado se dejó 24 hs. a temperatura ambiente. A continuación se removieron los restos vegetales por centrifugación y se filtraron los sobrenadantes. Se determinó el contenido de iones mediante un analizador de iones TecnoLab. Se analizaron 16 plantas en total agrupadas de a tres. Los resultados fueron expresados en nmoles / g de peso seco de tejido.

13-Análisis estadístico

Para la determinación de las diferencias significativas entre los tratamientos de los diferentes experimentos se realizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías (con dos factores: Sal y Cepa en dos niveles cada uno. Control y Tratado para el caso de la sal y sin inocular e inoculado para el caso de la cepa) para el caso de experimentos de interacción entre planta y aislamiento seleccionado. Y de una vía para los experimentos restantes

Las diferencias entre las medias fueron establecidas en todos los casos mediante el test a posteriori de LSD con $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1-Determinación de la concentración de NaCl inhibidora del crecimiento de agropiro alargado.

A partir de las determinaciones de crecimiento realizadas en tubos (apartado 3 de Materiales y Métodos), se estableció 100 mM como concentración de NaCl para los experimentos de estrés, dado que representa una concentración intermedia entre el control y 250 mM NaCl, concentración en la cual se pudo observar una fuerte disminución del crecimiento y signos de un importante estrés.

En la figura 1 se observa el efecto de la salinidad sobre plántulas de agropiro cultivado en tubos con medio Hoagland en condiciones controles; 250 mM NaCl y 300mM NaCl

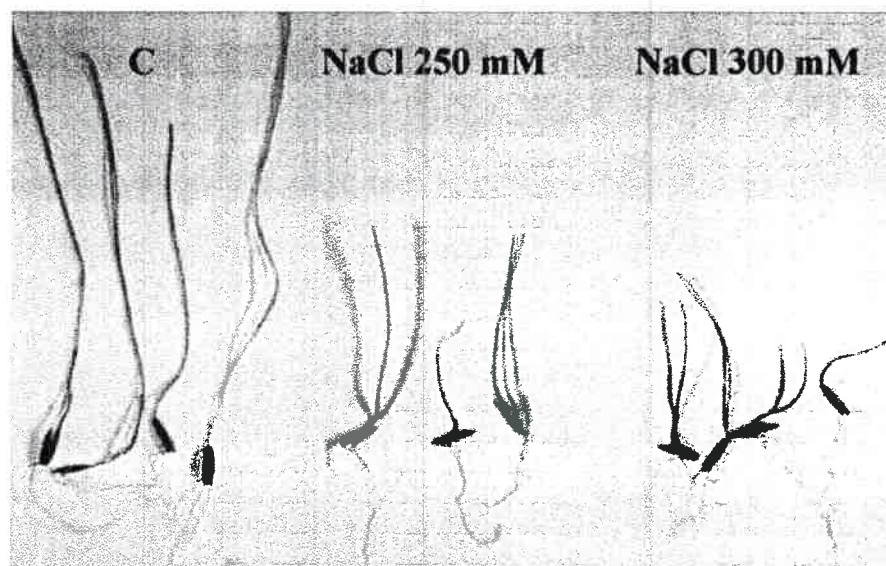


Figura 1: Crecimiento de plántulas de agropiro alargado cultivado en tubos con medio Hoagland en condiciones controles; 250 mM NaCl y 300 mM NaCl.

2-Aislamiento de cepas nativas tolerantes a condiciones estresantes

En la tabla 1 se resume la ubicación con respecto a la planta y el suelo del cual provienen los aislamientos que fueron capaces de crecer en sucesivos repiques en agar nutritivo suplementado con 1M NaCl y por lo tanto fueron considerados tolerantes a dicha concentración de sal.

Tabla 1: Número de colonias aisladas tolerantes a 1M de NaCl según las muestras de suelo y la ubicación con respecto a la raíz.

Muestra de Suelo	Rizósfera	Endorizósfera
Suelo 1; CE= 49,5 dS/m; pH=7,67	9	10
Suelo 2; CE= 25,3 dS/m; pH=6,21	22	20
Suelo 3; CE=36.1 dS/m; pH =8	9	9

De los tres suelos empleados para el aislamiento en el suelos 2 se encontró la mayor diversidad de microorganismos que se observó por una variedad de tipos y colores coloniales y por la tinción de Gram. Blancas, cremosas de bordes lisos; blancas, cremosas de borde rugoso, amarillas, cremosas de bordes lisos, rojas, cremosas de borde liso etc. Esto podría deberse a que este suelo presenta condiciones más favorables para el crecimiento de vegetales y por lo tanto favorece a la población rizosférica y a que los valores de conductividad y pH eran menos extremos que en el caso del suelo 1 donde la conductividad era mucho más elevada. Sin embargo es importante destacar que la conductividad eléctrica determinada es elevada en los tres casos ya, que es superior a 15 mS/m, valor en el cual se considera a la salinidad como muy severa y muy pocos cultivos pueden sobrevivir en esas condiciones.

3-Estudios fisiológicos y bioquímicos de los aislamientos

Los estudios fisiológicos y bioquímicos de los distintos aislamientos obtenidos fueron agrupados según si provenían de rizósfera o de endorizósfera y según los suelos de

donde fueron obtenidos para observar si había diferencias entre los distintos suelos. Las tablas 2 a 9 resumen las características de los aislamientos. Las referencias utilizadas en dichas tablas son las siguientes: Aislam: aislamiento; Ox: Oxidasa; Cat: Catalasa; SidG: producción de sideróforos en medio con glucosa como fuente de carbono; SidM: Producción de sideróforos en medio con malato como fuente de carbono; Fosf: Solubilización de fosfato; AIA: Producción de ácido indol acético y/o análogos; NfbN: Crecimiento en medio Nfb con agregado de nitrógeno; Nfb: Crecimiento en medio Nfb sin nitrógeno; S.scle: Capacidad para inhibir el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* ;+++ : A la semana; ++: A los 15 días; SC: Poco crecimiento en el medio; - Buen crecimiento pero negativo; Vs: Velo superficial; Vss: Velo subsuperficial; Micr.: Microcolonias

Las tablas 2 y 3 muestran las características de los aislamientos obtenidos a partir del suelo 2, de rizósfera y endorizósfera respectivamente.

Tabla 2: Aislamientos obtenidos a partir de la rizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo 2

Aislam.	Ox	Cat.	Gram.	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN	Nfb	S.scle.
123=93	-	+	BG-	SC	++	++	-	-	-	-
115	-	+	BG-	+	-	-	-	Vss	Vss	-
112	-	+	BG+	SC	+++	-	-	Vss	Vss	+
104=107	-	+	BG-	++	-	SC	-	Vss	Vss	-
113	-	+	BG-	-	++	-	-	-	-	+
120=99	+/-	+	BG-	SC	-	-	-	Vss	Vss	-
121	-	+	BG-	-	+++	-	-	Micr.	Micr	+
106	-	+	BG-	++	-	+	-	Vss	Vss	-
92=103	-	+	BG-	+++	+++	-	Si	Vss	Vss	+
97	-	+	BG-	+++	+++	+	-	Vss	Vss	+
96	-	+	BG-	++	+	++	-	SC	SC	+
101	-	+	BG+	+	+	-	-	SC	SC	-
102	-	+	BG-	++	+	-	-	Vss	Vss	+
104	-	+	BG-	+	+++	-	-	Vss	Vss	-
105	-	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
109	+	+	BG-	-	-	-	-	-	-	-
108=111	-	+	BG-	-	+++	++	si	Micr	Micr	+
110	-	+	BG+	-	+++	-	-	Vss	-	+
193=139	-	+	BG-	SC	+++	-	-	Vss	-	-
200	+	+	BG-	SC	++	-	-	Vss	Vss	-
201	-	+	BG-	++	++	++	-	Vss	-	-
202	+	+	BG-	+	+	-	-	Vss	Vss	+

Tabla 3: Aislamientos obtenidos a partir de la endorizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo 2

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb	S.scle.
135	-	+	BG-	SC	++	SC	-	-	-	+
124	-	+	BG-	+	++	-	-	-	-	-
126	-	+	BG-	+	++	-	-	-	-	-
122	-	+	BG-	-	+	-	-	Micr	Micr	+
128	-	+	BG+	+	+	-	-	-	-	+
117	-	+	BG-	+	++	-	-	Vss	Vss	+
118	-	+	BG-	++	+	-	--	-	-	-
140	-	+	BG-	++	++	+	si	Vss	Vss	-
141	+	+	BG+	++	++	-	-	Vss	VsVs	+
47	-	+	BG-	-	+	-	-	-	-	-
28	-	+	BG+	+	+	-	+/-	Vss	Vss	+
29/94/95	-	+	BG-	+	+	SC	-	-	-	-
32	+	+	BG-	-	-	-	-	Vss	-	-
198	-	+	BG-	SC	SC	SC	-	-	-	+
136	-	+	BG-	-	++	-	-	Vss	-	+
137	-	+	BG-	+	+	-	-	Vss	-	-
142	-	+	BG+	SC	+	-	+/-	Vss	-	-
143	-	+	BG-	-	-	++	-	-	-	-
31	-	+	BG-	+	+	-	-	Vss	-	-

En aquellos aislamientos rizosféricos es notable la cantidad de los que son capaces de crecer en Nfb sin nitrógeno y por lo tanto posibles fijadores de nitrógeno. Numerosos aislamientos muestran producción de sideróforos, solubilización de fosfato y notablemente muchos muestran inhibición del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta diversidad de metabolismos y formas encontradas en este suelo podría deberse a que las características de pH y conductividad menos extremas favorecen la diversidad.

Las tablas 4 y 5 describen las características de los aislamientos procedentes del suelo 3, de rizósfera y endorizósfera respectivamente. En ellas se observa una menor cantidad de aislamientos capaces de crecer en el medio Nfb, y solo uno fue positivo para la solubilización de fosfato. Esto se debería a que este suelo presentaba un pH alcalino (pH=8) donde la solubilidad del fosfato es mayor que en aquellos pH inferiores a 7. También se observó que la mayoría de los aislamientos eran capaces de solubilizar fosfato con ambas fuentes de carbono.

Tabla 4: Aislamientos obtenidos a partir de la rizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo

3

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scle.
88	+	+	BG+	-	-	-	-	-	-	-
89	+	+	BG-	-	-	-	-	-	-	-
90	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
49	+	+	BG+	+	+	-	-	Vss	Vss	-
52	+	+	BG-	++	+	-	-	-	-	-
34	-	+	BG	+++	-	-	si	Micr	-	-
192	-	+	BG-	-	+++	-	-	-	-	-
91(1)	+	+	BG-	++	+++	-	-	Vss.	-	-
91(2)	-	-	BG-	+	+++	-	-	Vss	-	-

Tabla 5: Aislamientos obtenidos a partir de la endorizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el

suelo 3

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram.	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scle.
94	-	+	BG-	+	+	SC	-	Vss	Vss	-
95	-	+	BG-	+	+	SC	-	Vss	Vss	-
86=84	-	+	BG-	++	+++	-	si	Vs	-	l.esc.
87=85	-	+	BG-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	BG+	+	+	SC	-	Vss	Vss	+
54	-	+	BG-	SC	SC	SC	-	Vs	-	-
55	-	+	BG-	+++	-	-	-	-	-	-
43=41	-	+	BG+	-	-	-	-	Vss	Vss	-
36	-	+	BG+	+	+++	+	si	Vs	Vss	+

Las tablas 6, 7, 8 y 9 resumen las características de los aislamientos provenientes del suelo 1. La metodología de aislamiento en este caso fue diferente a la de los dos suelos anteriores debido a que la conductividad eléctrica de este suelo era tan elevada que ninguna plántula de agropiro fue capaz de sobrevivir en el mismo. En el apartado 4 de materiales y métodos se describe con detalle la metodología empleada.

Las condiciones extremas de salinidad se correlacionaron con una menor diversidad de formas, colores y tipos coloniales, ya que probablemente estas condiciones han favorecido el crecimiento de microorganismos altamente adaptados y por lo tanto menos diversos.

Tabla 6: Aislamientos obtenidos a partir de la rizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo I, previo enriquecimiento en medio sin nitrógeno.

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scle.
56	-	+	BG-	-	+++	-	-	-	-	-
57	-	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	-	-
66	-	+	BG-	+++	++	-	SI	Vs	-	+
67	-	+	BG-	+++	-	-	-	Vs	-	+
50	-	+	BG-	+	++	-	-	Vs	-	-
14	+	+	BG-	+++	++	-	SI	Vs	-	+
191	-	+	BG+	+	+	-	-	Vss	-	-
190	-	+	BG+	+	-	-	-	-	-	+
170	+	+	BG-	-	-	+	si	Vss	Vss	-

Tabla 7: Aislamientos obtenidos a partir de la endorizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo I, previo enriquecimiento en medio sin nitrógeno.

Aislam.	Ox.	Cat	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scle.
69	+	+	BG-	SC	-	-	-	-	-	+
68	-	+	BG-	SC	-	-	-	Vs	-	-
62	-	+	BG+	SC	-	-	-	Vss	Vss	-
63	-	+	CBG-	++	-	-	si	Vs	-	+
58	-	+	BG+	-	+++	-	-	Vss	-	-
71	-	+	CBG-	++	-	-	-	-	-	-
48	-	+	BG-	-	+++	+	-	Vss	Vss	+

Tabla 8: Aislamientos obtenidos a partir de la rizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo I, previo enriquecimiento en medio con nitrógeno.

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scler.
80	-	+	BG-	++	-	-	-	Vs	-	-
78	-	+	BG-	-	+++	-	-	Vs	-	-
24	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
23	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
25	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
27	-	+	BG-	-	+++	-	-	Vs	-	-
21	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-
22	+	+	BG-	-	+++	-	-	Vss	Vss	-

Tabla 9: Aislamientos obtenidos a partir de la endorizósfera de plántulas de agropiro cultivadas en el suelo 1, previo enriquecimiento en medio con nitrógeno.

Aislam.	Ox.	Cat.	Gram	SidG.	SidM.	Fosf.	AIA	NfbN.	Nfb.	S.scler.
129	-	+	BG-	-	-	SC	-	-	--	-
70	+	+	BG-	+++	++	SC	-	Vs	Vss	+
9	-	+	BG-	SC	++	SC	-	Vss	-	-
11	-	+	BG-	SC	++	SC	-	Vss	-	-
10	+	+	BG-	+	+	SC	-	Vss	-	-
8	-	+	BG-	+	+++	SC	-	Vss	-	+
3	-	+	BG+E	-	+++	SC	-	-	-	-
4	-	+	BG-	+	+	SC	-	-	-	-
1	+	+	BG-	-	-	SC	-	-	-	-

La microflora aislada a partir de suelos salinos e hipersalinos consiste principalmente en bacterias moderadamente halófilas y halotolerantes. Estas han sido asignadas a un amplio rango de géneros tanto de Gram positivas como de Gram negativas, siendo los más numerosos los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (Varnam y Evans, 2000).

En los tres suelos empleados, se pudo observar que la capacidad de producir sideróforos es la característica más difundida entre los aislamientos, tanto en rizósfera como en endorizósfera. Esto probablemente se deba al hecho de que el hierro empieza a disminuir su solubilidad a medida que el pH de los suelos se alcaliniza a partir de 6,5, por lo que en los tres casos los microorganismos se verían beneficiados por la posibilidad de excretar sideróforos al medio.

En el caso de la capacidad para solubilizar fosfato se observa una mayor cantidad de aislamientos en el suelo 2, mientras que en los suelos 1 y 3 son pocos los aislamientos positivos para esta determinación.

Para el caso de determinación de AIA y/o análogos, se tomó como referencia a la cepa *A. brasilense* y se observó que pocos aislamientos fueron capaces de producir estos compuestos en los niveles de *Azospirillum*.

4-Estudios fisiológicos y bioquímicos de los aislamientos seleccionados

Basados en las determinaciones de capacidad PGPR y en la tolerancia a NaCl 1M, se seleccionaron 5 aislamientos (66, 36, 86, 96 y E). El aislamiento E, se obtuvo a partir de plántulas de agropiro sembradas en tubos que contenían medio Hoagland adicionado con 300 mM NaCl habiéndose determinado previamente la tolerancia de agropiro a condiciones salinas. En uno de estos tubos se visualizó crecimiento microbiano y luego de siembra en agar nutritivo, se identificó una sola colonia que fue aislada y denominada E por su origen endofítico.

a) Determinaciones bioquímicas y morfofisiológicas de los aislamientos seleccionados

A continuación, en la tabla 10, se describen las principales características PGPR por las que fueron seleccionados los aislamientos, así como también las principales pruebas bioquímicas para lograr una caracterización más amplia.

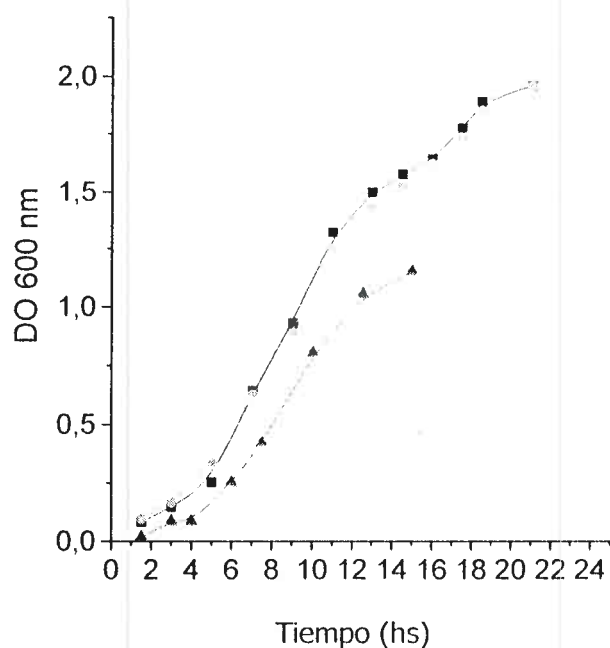
Tabla 10: Determinación de las principales características morfofisiológicas y pruebas metabólicas de los aislamientos seleccionados

	E	66	36	96	86
Tinción de Gram	Bacilos Gram +	Bacilos Gram -	Bacilos Gram +	Bacilo Gram +	Bacilos Gram -
Morfología de la colonia	Amarilla mucosa	Amarilla mucosa	Blanca seca	Blanca seca	Amarilla mucosa
Oxidasa	-	-	+	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Producción de sideróforos	+	+	+	-	+
Solubilización de Fosfato	+	+	+	+	-
Crecimiento en Nfb	-	-	-	+	+
Producción de AIA y/o análogos	-	+	+	-	+
Fenil Alanina	-	-	-	+	-
SIM (sulfuro/indol/movilidad)	- / - / móvil	- / + / móvil	- / - / no móvil	- / - / móvil	- / - / no móvil
Ureasa	-	+	-	-	-
Citrato de Simmons	-	+	-	-	-

b) Crecimiento de los aislamientos seleccionados en condiciones controles y salinas.

La capacidad de los aislamientos para crecer en distintas concentraciones de NaCl fue determinada en medio MMGlucosa, y la viabilidad de los mismos se determinó en $DO=0,6$ de modo que todos los cultivos estuvieran en fase exponencial. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

La figura 2 refleja el patrón de crecimiento del aislamiento 36, un bacilo G+ cuyo crecimiento en 250 mM NaCl es similar al del control, con valores de viabilidad de un orden



Viabilidad:

Control: $1,3 \times 10^{10}$ ufc/ml

250 mM ClNa: $1,3 \times 10^9$ ufc/ml

1M ClNa: 3×10^7 ufc/ml

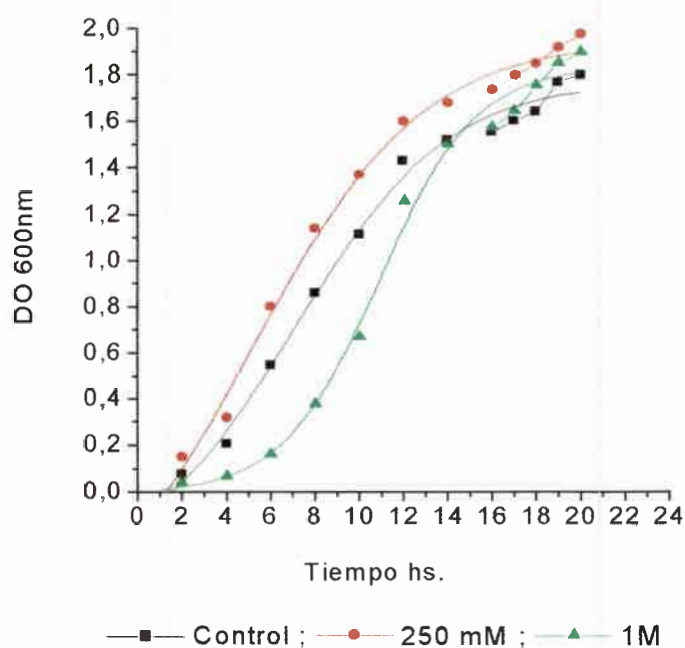
○ Control; ■ 250 mM NaCl; ▲ 1 M NaCl

Figura 2: Crecimiento del aislamiento 36 en MMGlucosa suplementado con diferentes concentraciones de NaCl.

de magnitud inferior que los controles. El cultivo presenta una disminución en el crecimiento y un menor valor de DO máxima cuando está en valores de salinidad de 1M, donde además muestra una viabilidad muy inferior a la del control. Por otro lado, en DO cercana a 1,2 se

produce una marcada floculación del cultivo por lo que no es posible continuar con las determinaciones de crecimiento.

La figura 3, muestra el patrón de crecimiento del aislamiento E, un cocobacilo Gram positivo, en diferentes concentraciones de NaCl.



Viabilidad:

Control: 9×10^{10} ufc/ml

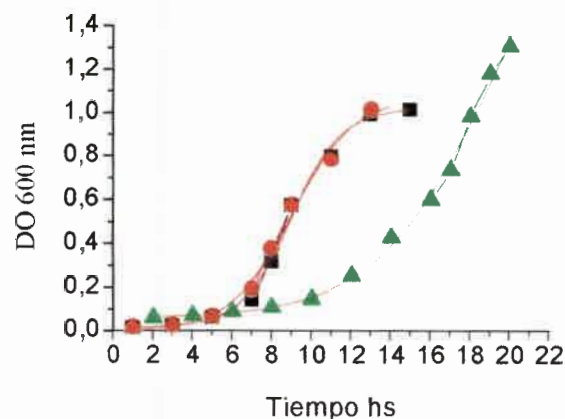
250 mM ClNa: 3×10^9 ufc/ml

1M ClNa: $9,7 \times 10^9$ ufc/ml

Figura 3: Crecimiento del aislamiento E en MMGlucosa suplementado con diferentes concentraciones de NaCl

El aislamiento E presenta marcadas diferencias con los otros aislamientos, ya que el microorganismo crece más rápidamente cuando el medio contiene 250 mM de NaCl, alcanzando también una mayor viabilidad en estas condiciones; en 1M si bien posee, al igual que los otros aislamientos, una mayor fase de latencia, el crecimiento se recupera alcanzando los valores del cultivo control. La viabilidad determinada para 250 mM y 1M NaCl son solamente de un orden de magnitud inferior a la encontrada para el control por lo que no es indicadora la disminución en el crecimiento que se determina para estos casos.

El crecimiento del aislamiento 86 se muestra en la figura 4 donde se pone de manifiesto que en condiciones de salinidad de 250 mM no se ve afectado el crecimiento así como tampoco se ve afectada la viabilidad de los cultivos. Cuando la salinidad se incrementa a 1M se observa una fase de latencia mayor que se prolonga hasta las 10 horas de cultivo; a partir de allí el crecimiento se recupera y alcanza los valores del control.



Viabilidad:

Control: 3×10^8 ufc/ml

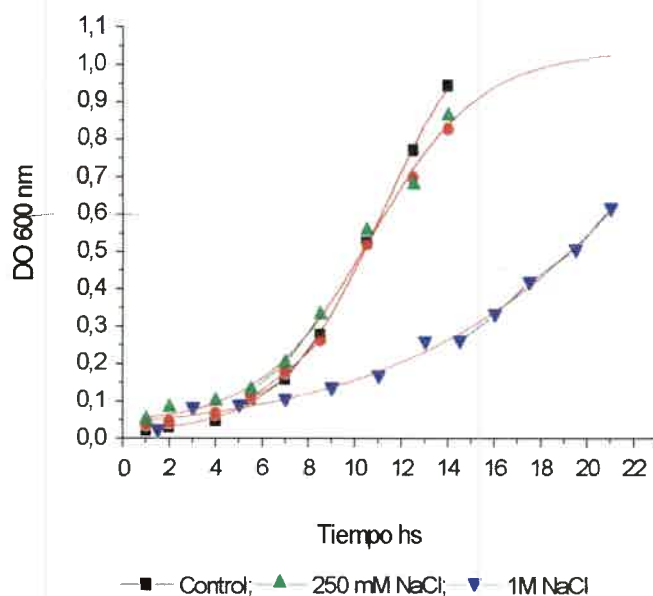
250 mM ClNa: $2,3 \times 10^8$ ufc/ml

1M ClNa: 4×10^7 ufc/ml

—■— Control ; —●— 250 mM NaCl; —▲— 1 M NaCl

Figura 4: Crecimiento del aislamiento 86 en MMGlucosa suplementado con diferentes concentraciones de NaCl

El crecimiento del aislamiento 96 representado en la figura 5, presenta un crecimiento similar en cultivos controles y estresados con 250 mM NaCl. En condiciones de salinidad de 1M, la fase de latencia se alarga considerablemente, recuperándose lentamente luego de las 16 horas de cultivo



Viabilidad:

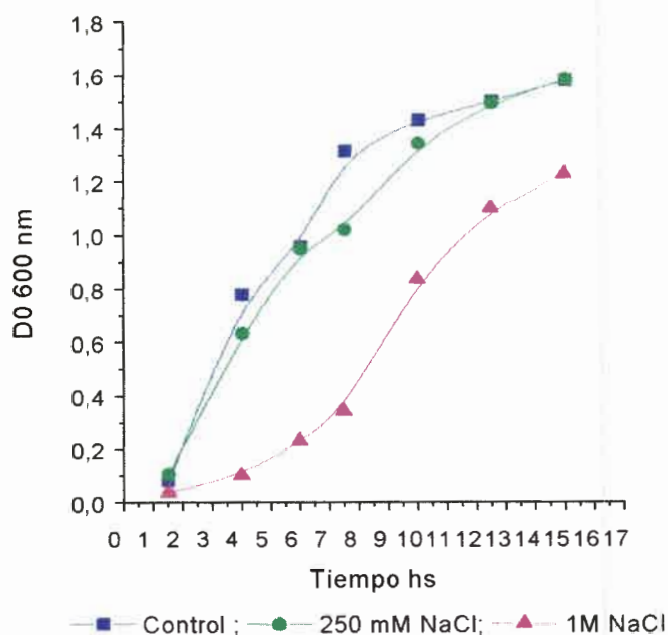
Control: $2,1 \times 10^8$ ufc/ml

250 mM ClNa: $2,2 \times 10^8$ ufc/ml

1M ClNa: $1,8 \times 10^7$ ufc/ml

Figura 5: Crecimiento del aislamiento 96 en MMGlucosa suplementado con diferentes concentraciones de NaCl

En la figura 6 se observa el patrón de crecimiento del aislamiento 66 en condiciones controles y de estrés. En 250 mM NaCl no se observan grandes cambios en el crecimiento aunque si se observa disminución de la viabilidad. Para el caso del crecimiento en 1M NaCl se evidencia una mayor fase de latencia y disminución en la DO máxima alcanzada por el cultivo en fase estacionaria, así como también una marcada disminución de la viabilidad.



Viabilidad:

Control: $1,3 \times 10^{10}$ ufc/ml

250 mM ClNa: 3×10^9 ufc/ml

1M ClNa: 2×10^7 ufc/ml

Figura 6: Crecimiento del aislamiento 66 en MMGlucosa suplementado con diferentes concentraciones de NaCl

Si bien los autores difieren en la definición del límite entre halotolerancia y halofilismo, la mayoría coincide en que microorganismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en concentraciones de NaCl relativamente altas, pero su crecimiento óptimo se da en concentraciones fisiológicas de NaCl. Los microorganismos halófilos son aquellos cuyo requerimiento mínimo de NaCl para crecer es superior a las concentraciones fisiológicas, o sea entre 2,5 a 4 % NaCl (0,4 M a 0,7 M) y la concentración para un crecimiento óptimo generalmente está entre 8 y 10 % NaCl (1,4 M a 1,7 M) (Kushner, 1978; Varnam y Evans, 2000).

Muchos de los aislamientos halófilos crecen en un amplio rango de concentraciones de NaCl, lo que sugiere que una variación espacial y temporal del contenido de esta sal en el suelo favorece a aquellos halófilos menos especializados (Varnam y Evans, 2000)

Si bien los cinco aislamientos seleccionados son capaces de crecer en 1 M NaCl, el aislamiento E presenta un comportamiento diferente, ya que su crecimiento es superior al

del control cuando el medio está suplementado con 250 mM de NaCl y en 1M NaCl, aunque con una fase de latencia mayor, describe una curva similar a la del control. Esto demuestra que este aislamiento no sólo tolera elevadas concentraciones de NaCl, sino que además lo necesita para un mejor crecimiento, por lo que puede ser considerado moderadamente halófilo. Los aislamientos 86, 96, 66 y 36 se pueden considerar dentro de la categoría de halotolerantes, ya que crecen en cultivos suplementados con 1 M de NaCl, pero ninguno aparenta necesitar sal para su crecimiento.

5-Determinación de la inhibición de crecimiento in vitro entre los aislamientos seleccionados por producción de sustancias antimicrobianas o competencia directa .

5a) Por producción de sustancias antimicrobianas. Técnica de Difusión de Agar en pocillos (WDA)

Para determinar la excreción de algún compuesto antimicrobiano, se sembraron en la placa cada uno de los aislamientos y en los pocillos los sobrenadantes estériles de cultivos que crecieron durante la noche de los otros aislamientos.

No se observaron halos de inhibición en ninguno de los casos. La figura 7 muestra uno de los resultados representativos de esta determinación.

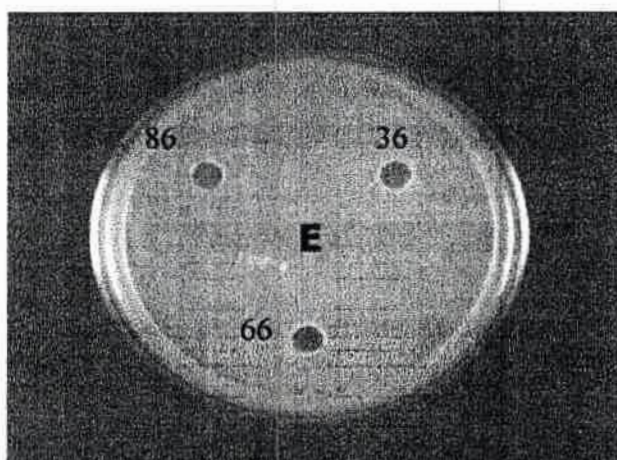


Figura 7: Crecimiento del aislamiento E en presencia de los sobrenadantes de los aislamientos 86, 36 y 66 mediante la técnica de difusión de agar en pocillos (WDA).

5b) Por competencia directa por los nutrientes

La inhibición *in vitro* de los distintos aislamientos, podría indicar lo que ocurre en la rizósfera en donde los aislamientos interactúan y compiten entre sí. En este caso en que se enfrentan los microorganismos de un modo directo, se ponen en juego mecanismos de defensa o de secreción de compuestos inhibidores que no habían sido producidos cuando cada microorganismo crecía por separado. Esto se observa en la figura 8 donde el aislamiento 36 produce alguna sustancia tipo bacteriocina cuando está en contacto con el aislamiento E (sembrado en el césped), que lo inhibe en cierto modo. En ninguno de los otros casos se observa inhibición. Ejemplo significativo de esto se muestran en la figura 8, en la placa de la izquierda en donde se sembró el aislamiento 86 en el césped y se enfrentó con los otros aislamientos, y en la figura 9 donde se sembró en el césped el aislamiento 66.

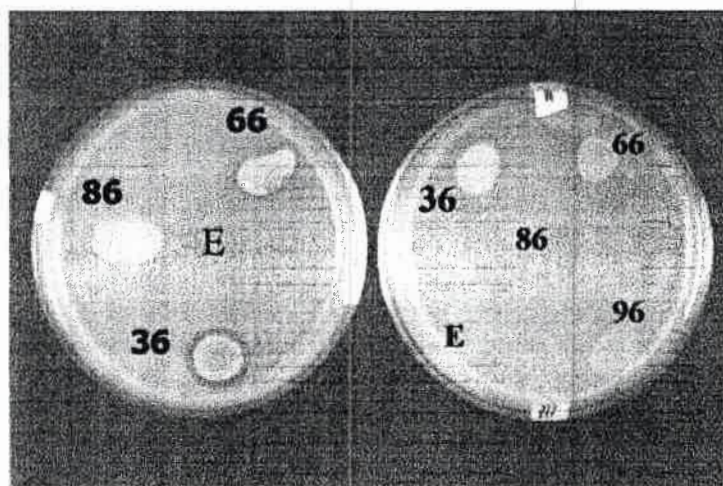


Figura 8: Determinación de la inhibición en agar sembrando adicionado con 400 mM NaCl, por competencia directa de los aislamientos E (izquierda) y 86 (derecha) por los otros aislamientos seleccionados.

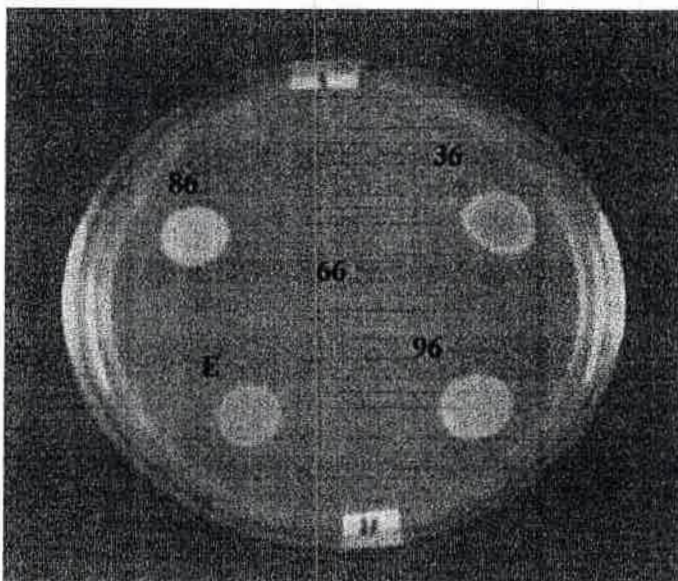


Figura 9: Determinación de la inhibición en agar semiblando adicionado con 400 mM NaCl por competencia directa del aislamiento 66 por los otros aislamientos seleccionados.

6) Identificación Taxonómica del aislamiento E

La homología obtenida a partir del ingreso de la secuencia del gen 16S ADNr al banco de genes fue de 99% con el género *Microbacterium*, no pudiéndose establecer con precisión la especie. Esto se debe a que este género es de muy reciente descripción y se encuentra en constante revisión.

El mayor porcentaje de homología (99,7), fue con *Microbacterium sp.* AS - 44 (Fajon *et al.*, trabajo no publicado).

Las principales características descriptas para dicho género son:

Pequeños bacilos en cultivos jóvenes y luego cocos. Gram positivos o Gram variables no esporulados. No móviles o móviles por uno o tres flagelos. Aeróbicos, aunque pueden crecer en anaerobiosis. Colonias con pigmentación amarillenta. Requerimientos nutricionales complejos. Catalasa +. T° óptima de crecimiento 30 °C.

Las cepas del Género *Microbacterium* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser aisladas de diferentes fuentes. La tinción de Gram por los

procedimientos convencionales, da resultados inciertos dado que las células se decoloran fácilmente y reaccionan como Gram negativas. Otra característica distintiva es que su peptidoglucano es de tipo beta, ya que poseen L homoserina- D-Glu-Gli-D-Ornitina y residuos Glicol en sus paredes (Behrendt *et al.*, 2001).

Si bien el género *Microbacterium* no ha sido identificado como PGPR ni se conoce con detalles las características bioquímicas que lo definen, se ha informado el aislamiento de cepas de *Microbacterium* a partir de tallos de papa (Reiter 2002), del interior de plántulas de sorgo, de pasturas nativas (Zinniel *et al.*, 2002), de zanahoria (Surette *et al.*, 2003) y de la rizósfera de plántulas de trigo (Landa *et al.*, 2003)

Cepas del género *Microbacterium* han sido utilizadas con éxito en experimentos de reducción de cromo presente en suelos o en aguas residuales (Pattanapitpaisal *et al.*, 2001).

7-Determinación de la respuesta de *Microbacterium sp.* frente a otros tipos de estrés en medio MMGlucosa.

En la naturaleza y especialmente en la rizósfera, los microorganismos no se encuentran aislados y constantemente están sometidos a diferentes situaciones de estrés. La tolerancia a un tipo de estrés puede traer aparejada la tolerancia a otros tipos de estrés como consecuencia de tolerancia cruzada (Bremer y Kramer, 2000). Con el objetivo de conocer la respuesta fisiológica del microorganismo frente a otros tipos de estrés, se evaluó el comportamiento de *Microbacterium sp.* en estrés oxidativo, térmico y osmótico (no iónico).

En la figura 10 se observa el crecimiento de *Microbacterium sp.* en condiciones de estrés oxidativo y térmico. En el caso del estrés oxidativo no hay diferencias en el patrón de crecimiento con respecto al control; además es interesante notar que durante el crecimiento se observó una gran cantidad de burbujas en los frascos de cultivo, lo que evidencia una potente actividad catalasa. El aumento de temperatura favorecería la velocidad de crecimiento debido a que la misma, en la fase exponencial, es mayor a la del control y a que la fase estacionaria se alcanza más rápidamente aunque a una DO máxima menor que los controles.

De todos modos, a partir de las curvas de crecimiento y de las determinaciones de viabilidad realizadas (tabla 11) se evidencia que el microorganismo es tolerante a los dos tipos de estrés en juego ya que las viabilidades no se ven afectadas por esas condiciones.

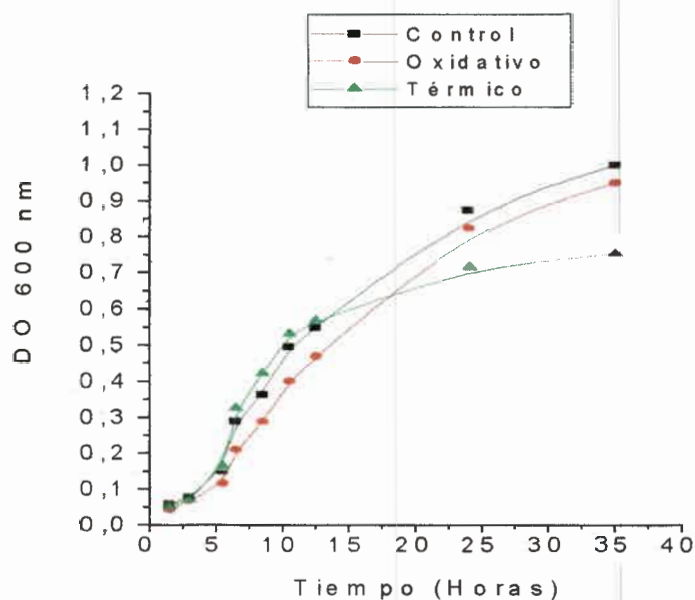


Figura 10: Crecimiento de *Microbacterium sp.* en medio MMGlucosa en condiciones de estrés oxidativo dado por el agregado de 10 mM H₂O₂ y térmico (37 °C). Cada punto de la curva representa la media de tres determinaciones.

Tabla 11: Determinación de la viabilidad en cultivos de *Microbacterium sp.* a diferentes DO en condiciones de controles, estrés oxidativo y estrés térmico. Los valores representan la media de tres determinaciones

	Viabilidad DO= 0,3	Viabilidad DO= 0,6	Viabilidad DO= 1
Control	2 x 10 ⁹ ufc/ml	2,8 x 10 ⁹ ufc/ml	9 x 10 ⁹ ufc/ml
H ₂ O ₂ 10mM	9,3 x 10 ⁸ ufc/ml	2 x 10 ⁹ ufc/ml	5 x 10 ⁹ ufc/ml
37 °C	9 x 10 ⁸ ufc/ml	1,1x 10 ⁹ ufc/ml	-

En la figura 11 se observa los resultados del crecimiento de *Microbacterium sp.* en condiciones de estrés osmótico. Para ello se utilizó manitol 0,6 M (-1,95 MPa); glicerol 0,6 M (-1,87 MPa) y PEG 0,020 M (-1,9 MPa), concentraciones que presentaban una presión osmótica equivalente a la determinada para NaCl 400 mM (-1,9 Mpa).

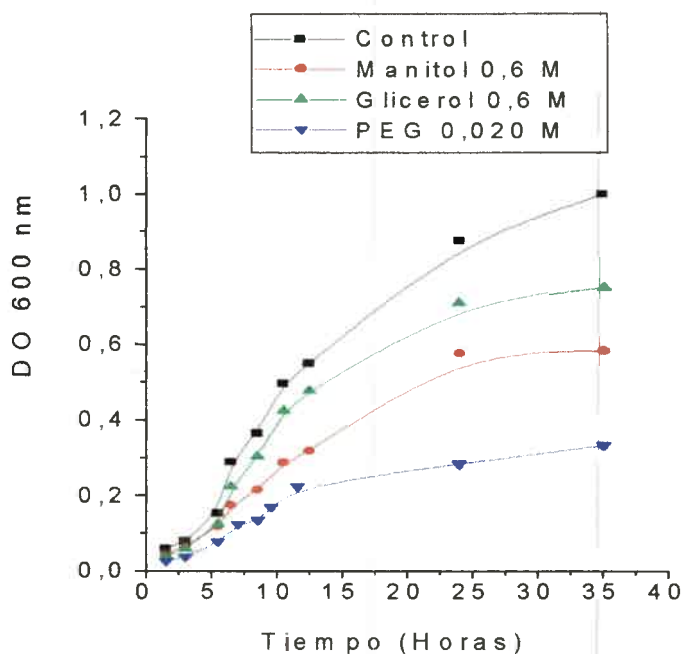


Figura 11: Crecimiento de *Microbacterium sp.* en medio MMGlucosa en presencia de osmolitos no iónicos. Manitol, glicerol y PEG 8000. Cada punto de la curva representa la media de tres determinaciones.

Tabla 12: Determinación de la viabilidad en cultivos de *Microbacterium sp.* a diferentes DO en condiciones de control, estrés por manitol, estrés por glicerol y estrés por PEG 8000. Los valores representan la media de tres determinaciones.

	Viabilidad DO= 0,3	Viabilidad DO= 0,6	Viabilidad DO= 1
Control	2×10^9 ufc/ml	$2,8 \times 10^9$ ufc/ml	9×10^{10} ufc/ml
Manitol 0,6 M	1×10^9 ufc/ml	-	-
Glicerol 0,6M	8×10^8 ufc/ml	1×10^9 ufc/ml	-
PEG 0,020 mM	$1,3 \times 10^9$ ufc/ml	-	-

En la figura 11 se observa claramente que el efecto más estresante es el producido por la presencia de PEG 8000 en el medio de cultivo, en donde la DO máxima no llega a ser superior a 0,4 y el crecimiento se ve severamente afectado. El efecto provocado por manitol y glicerol es similar aunque menos drástico, ya que el microorganismo alcanza niveles importantes de crecimiento (y la viabilidad se mantiene en los niveles del control, especialmente en el caso de glicerol) pero los valores máximos de crecimiento son inferiores al alcanzado por el control.

Resulta claro el hecho de que el microorganismo no es capaz de sobreponerse al estrés generado por este tipo de osmolitos no iónicos. Además, en coincidencia con lo observado en *Microbacterium* cultivado en presencia de PEG 8000, las cepas de *Rhizobium* TAL 1000 y ATCC10317), se vieron severamente afectadas por este osmolito (Dardanelli ,2001).

El efecto inhibitorio del PEG podría deberse a que su agregado al medio de cultivo aumenta considerablemente la viscosidad del mismo, a la vez que disminuye la difusión del oxígeno, creando una situación de doble estrés para los microorganismos. Las moléculas de PEG pueden ejercer efectos diferentes según sea su peso molecular. De esta manera, las moléculas de PEG 200 son fácilmente excluidas de la célula (efecto que sería análogo al causado por el glicerol) y su presencia causaría un daño menor en las células. Por otra parte, las moléculas de PEG de mayor tamaño no pueden difundir y por lo tanto afectan drásticamente el crecimiento de las células (Kets *et al.*, 1996).

Los efectos causados por el agregado de 400 mM NaCl al medio de cultivo se muestran en la figura 12. No se observan diferencias en el patrón de crecimiento entre cultivos controles y estresados. Ambos cultivos alcanzan la misma DO máxima prácticamente al mismo tiempo además la viabilidad de los cultivos estresados no se ve drásticamente disminuida con respecto al control (tabla 13) en las DO determinadas.

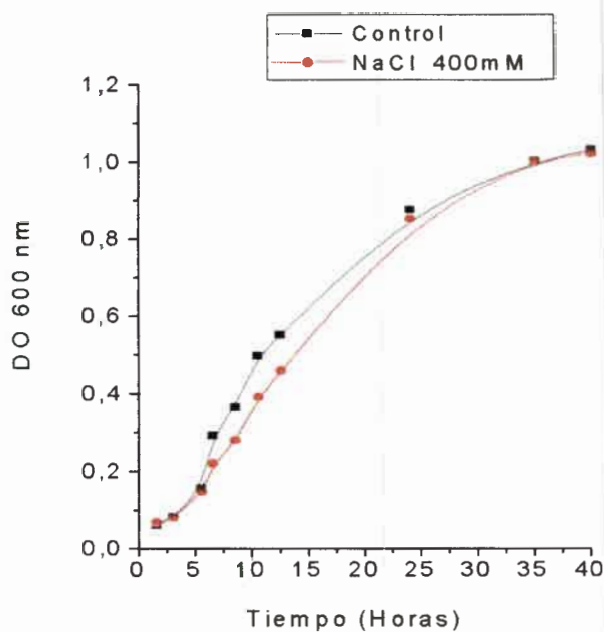


Figura 12: Crecimiento de *Microbacterium sp.* en medio MMGlucosa en condiciones de estrés iónico y osmótico dado por el agregado de NaCl 400mM. Cada punto de la curva representa la media de tres determinaciones.

Tabla 13: Determinación de la viabilidad en cultivos de *Microbacterium sp.* a diferentes DO en condiciones de control y estrés por NaCl. Los valores representan la media de tres determinaciones.

	Viabilidad DO= 0,3	Viabilidad DO= 0,6	Viabilidad DO= 1
Control	2×10^9 ufc/ml	$2,8 \times 10^9$ ufc/ml	9×10^{10} ufc/ml
NaCl 0,4 M	$1,1 \times 10^9$ ufc/ml	$1,9 \times 10^9$ ufc/ml	7×10^{10} ufc/ml

Estudios realizados en *Azospirillum brasilense* Cd, han demostrado que este microorganismo puede crecer hasta concentraciones de 300 mM de NaCl, concentración en la que presenta una disminución del 66% en el crecimiento con respecto al control y en

concentraciones de 400 mM de NaCl, el crecimiento prácticamente es nulo (Rivarola *et al*, 1998).

Para el caso de especies de *Rhizobium*, Dardanelli (2001) observó que la cepa TAL 1000, muestra una disminución tanto en la velocidad de crecimiento como en la DO final alcanzada cuando es cultivada en concentraciones de 800 mM de NaCl, mientras que el crecimiento no se ve afectado por sacarosa, glicerol o manitol 350 mM. Es importante hacer una salvedad y es que el potencial osmótico dado por 800 mM es $-2,8$ MPa y en esas condiciones se presenta un fuerte efecto iónico además del osmótico, mientras que el dado por la sacarosa, glicerol y manitol 350 mM es de $-0,9$ MPa aproximadamente, por lo que la falta de inhibición en el crecimiento que se observa cuando se utiliza sacarosa, manitol o glicerol en esas concentraciones podría deberse a que el potencial osmótico es mayor.

8-Determinación del contenido de iones Na^+ y K^+ en el interior de células de *Microbacterium sp.* en condiciones de estrés

Generalmente las bacterias, especialmente aquellas que son halotolerantes y algunas halófilas, están adaptadas a acumular más K^+ que Na^+ en su interior. Por el contrario, en un gran número de halófilas, la estrategia consiste en acumular Na^+ , hasta concentraciones que pueden llegar a 3 M (Oren, 1999).

Para establecer si el microorganismo acumula alguno de estos iones se determinó el contenido intracelular de los mismos en cultivos controles y estresados con un osmolito iónico (NaCl) y uno no iónico (manitol). El medio de cultivo empleado fue MMglucosa adicionado con 400 mM NaCl y 600 mM manitol. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

En las figuras 13 y 14 se muestra el contenido de iones Na^+ y K^+ respectivamente, mientras que en la figura 15 se muestra la relación Na^+ / K^+ intracelular en los diferentes tratamientos

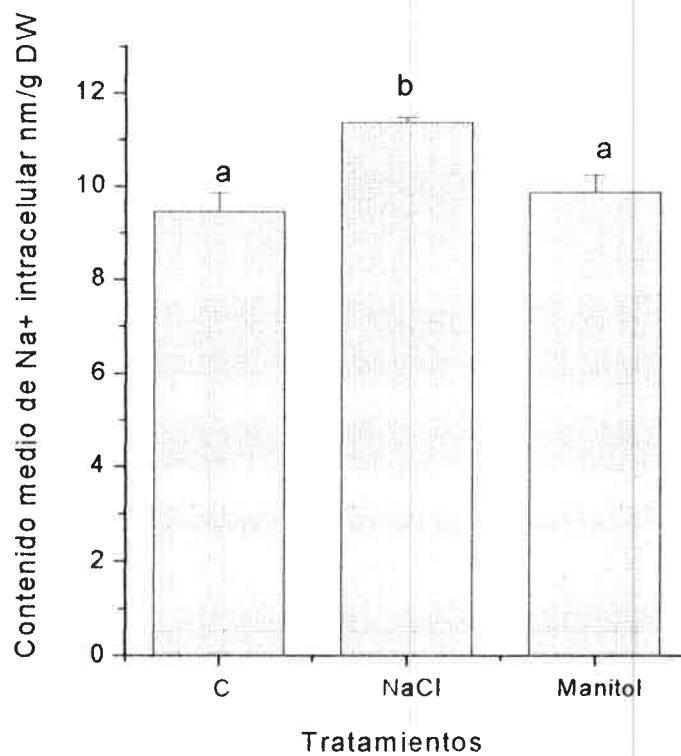


Figura 13: Contenido intracelular de Na⁺ en *Microbacterium sp.* cultivado en MMglucosa en condiciones de estrés iónico y osmótico. Resultados expresados en nmoles de Na⁺/g peso seco de pellet. Los datos representan la media \pm ES de tres determinaciones. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA, test de LSD, ($p < 0,05$)

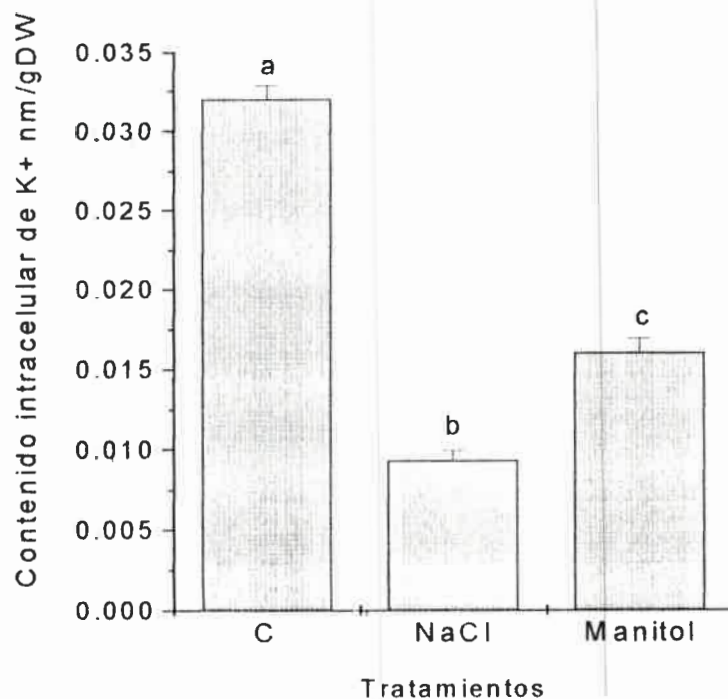


Figura 14: Contenido intracelular de K^+ en *Microbacterium sp.* cultivado en MMglucosa en condiciones de estrés iónico y osmótico.

Resultados expresados en nmoles de K^+ /g peso seco de pellet. Los datos representan la media \pm ES de tres determinaciones. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA, test de LSD, ($p < 0,05$)

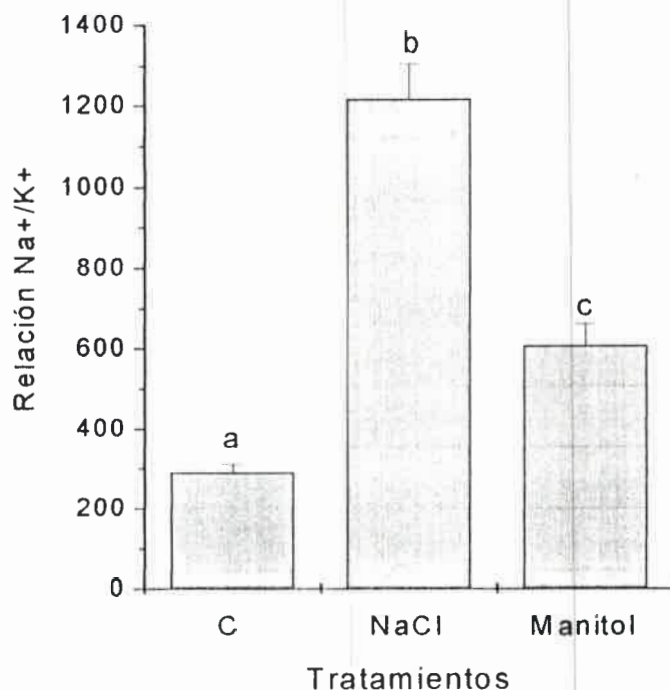


Figura 15: Relación Na^+ / K^+ intracelular en *Microbacterium sp.* cultivado en MMglucosa en condiciones de estrés iónico y osmótico. Los datos representan la media \pm ES de tres determinaciones. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA, test de LSD, ($p < 0,05$)

De las determinaciones de contenido de iones intracelular en *Microbacterium sp.* se observa claramente que el microorganismo se comporta como halófilico al igual que lo observado en las curvas de crecimiento en condiciones salinas. El contenido de Na^+ intracelular es mayor cuando las células están en condiciones de estrés salino dado por NaCl que el control y que el cultivo bajo estrés osmótico dado por manitol (figura 13). De modo inverso, el contenido de K^+ encontrado en *Microbacterium sp.* en estrés salino es significativamente menor que en los otros dos casos (figura 14). Cuando se analiza que ocurre con la relación Na^+ / K^+ (figura 15), vemos que esta relación es aproximadamente cinco veces mayor en aquellas células sometidas a estrés por NaCl, mientras que es menor cuando las células se encuentran en situación control. Aquí se observa claramente la

preferencia de la acumulación de Na^+ sobre K^+ . Para el caso de estrés por manitol, la relación que se observa es el doble de la encontrada para los controles, pero menor que la de las células en estrés salino.

La concentración de iones Na^+ que cada microorganismo puede mantener en su interior va a depender de múltiples factores, como por ejemplo, la calidad y el tipo de osmoprotectores que acompañen a la incorporación de iones, la funcionalidad y modificación de las estructuras celulares y enzimas necesarias para llevar a cabo correctamente las funciones celulares, e incluso factores externos como el pH del medio de cultivo. Se ha comprobado que la mayor toxicidad del Na^+ a pH elevados se produce a causa de la disminución del gradiente de protones lo que dificulta la exclusión de Na^+ . Además el Na^+ compite con los H^+ por algunos blancos lo que compromete las funciones celulares cuando el pH es elevado y la concentración de H^+ es baja (Gonzalez-Hernández y Peña, 2002)

Estudios en microorganismos no halofílicos como *Azospirillum* revelaron que, frente a un estrés salino de 300mM de NaCl, *A. brasilense* Cd es capaz de acumular casi 5 veces más K^+ en sus células que los controles no salinizados en fase estacionaria (Rivarola *et al*, 1998). Esta respuesta, que también ha sido descrita para *E. coli* (Miller and Wood, 1996), algunas especies de *Rhizobium* (Dardanelli 2001), etc., es propia de aquellos microorganismos con una limitada osmoadaptación, mientras que en microorganismos halófilos no siempre se informa un aumento en la acumulación de este ión.

Gonzalez-Hernández y Peña, (2002), determinaron en trabajos de osmoadaptación de la levadura *Debaryomyces hansenii* que, en medios con baja concentración de K^+ , el Na^+ era capaz de sustituirlo, restaurando la relación del crecimiento específico y la biomasa final. La concentración interna de Na^+ alcanzaba valores de hasta 800 mM, sugiriendo que el metabolismo de *D. hansenii* no se afecta a esta concentración elevada de NaCl. Se ha propuesto que el metabolismo de *D. hansenii* es menos sensible al Na^+ intracelular, en comparación con *S. cerevisiae*, donde el Na^+ sustituye al K^+ cuando este es escaso y que el transporte de K^+ se favorece en presencia de Na^+ . En medios donde la concentración de K^+ es baja, *D. hansenii* se comporta como una levadura halófila.

El estrés puede ser definido como cambios en el ambiente que causan una disminución en la tasa de crecimiento o supervivencia a través de cambios en el genoma o proteoma. Las respuestas de los microorganismos frente al estrés son de particular importancia, dado que viven en ambientes sujetos a cambios constantes, ya sea de temperatura, presión osmótica, pH, etc. (Vorobjeva, 2003).

Para el caso de bacterias ácido-lácticas se han identificado más de 17 proteínas de estrés. No es sorprendente, por lo tanto, que la pre-adaptación a un tipo de estrés cause resistencia a otros tipos de estrés (resistencia cruzada) (Vorobjeva, 2003).

En *Bacillus subtilis*, la respuesta general frente a estrés está controlada por el factor de transcripción σ^B que se activa frente a diversos tipos de estrés y dirige la síntesis de más de 100 proteínas de estrés generales. La pérdida de la función de este factor de transcripción conduce a la sensibilidad frente a múltiples estreses como el ácido, térmico, osmótico y oxidativo (Chester et al, 2000).

Las funciones conocidas de los genes regulados por σ^B se relacionan con la protección del DNA, proteínas y lípidos frente al estrés y específicamente frente a las especies activas del oxígeno generadas por un metabolismo desbalanceado (Chester, 2000).

Elbein *et al.*, (2003), informaron que bajo condiciones de estrés térmico, oxidativo, osmótico y otros, se produce trehalosa. Este disacárido no reductor se encuentra presente en bacterias, hongos, insectos y plantas, se acumula en el citoplasma de las células y protege a las proteínas y a las membranas de la desnaturalización causada por los distintos tipos de estrés. Además, la trehalosa actuaría como una molécula señal o reguladora en algunas células, ligando el metabolismo de la trehalosa con el transporte de glucosa y la glucólisis.

9-Determinación de la posible acumulación intracelular y excreción in vitro de azúcares osmoprotectores por parte de *Microbacterium sp.*

Gouffi *et al.*, (1999) describieron la acumulación de disacáridos como trehalosa, maltosa, celobiosa, gentobiosa, turanosa y palatinosa, como osmoprotectores en

Sinorhizobium meliloti y *Rhizobium leguminosarum*. Por el contrario *B. subtilis* y *P. aeruginosa* no poseen la capacidad de acumular estos azúcares como osmoprotectores.

Esto es de suma importancia dado que los polisacáridos presentes en los exudados vegetales son una excelente fuente de disacáridos fácilmente liberados por las enzimas de hongos y bacterias degradadoras. Además daría una ventaja selectiva a los rhizobios frente a otras bacterias del suelo cuando se encuentran en suelos con condiciones de elevada salinidad.

En 1997 la empresa del rubro alimentario Ajinomoto Co, patentó un método de producción de trehalosa (para ser utilizada como aditivo en alimentos), por microorganismos pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* y *Arthrobacter* (Enzyme and Microbial Technology 20: 317-319; 1997).

En virtud de estos antecedentes, y de la elevada tolerancia frente al estrés que presenta el aislamiento, se planteó la hipótesis de que si efectivamente el microorganismo produce este disacárido, se podría explicar la resistencia del mismo frente al estrés.

Con el fin de evaluar la hipótesis anterior se determinó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) el contenido de mono y disacáridos presentes en el interior de las células, así como también la excreción de los mismos al medio de cultivo en distintas condiciones: Control, estrés salino, oxidativo y térmico. Previamente se determinó el contenido de azúcares totales, de modo de sembrar en cada calle la misma cantidad aproximadamente de azúcares totales.

A partir de los resultados obtenidos en extractos intracelulares de bacterias cultivadas en MMGlucosa (figura 16), se puede observar en todos los tratamientos (calles 3 a 6) un compuesto cuyo patrón de migración (casi con el frente del solvente), no se corresponde con ninguno de los patrones de monosacáridos o disacáridos utilizados (figura 17). Por lo tanto podría tratarse de un metabolito secundario o de alguna molécula con sustituyente glucídico. La diferencia más notable que se observa es que en el tratamiento con 400 mM NaCl (figura 16, calle 4) desaparece una banda que correspondería a la glucosa, que se encuentra presente en las otras condiciones.

Además se pueden visualizar bandas que podrían corresponder al disacárido trehalosa ya que la migración de las mismas es similar al patrón de este disacárido.

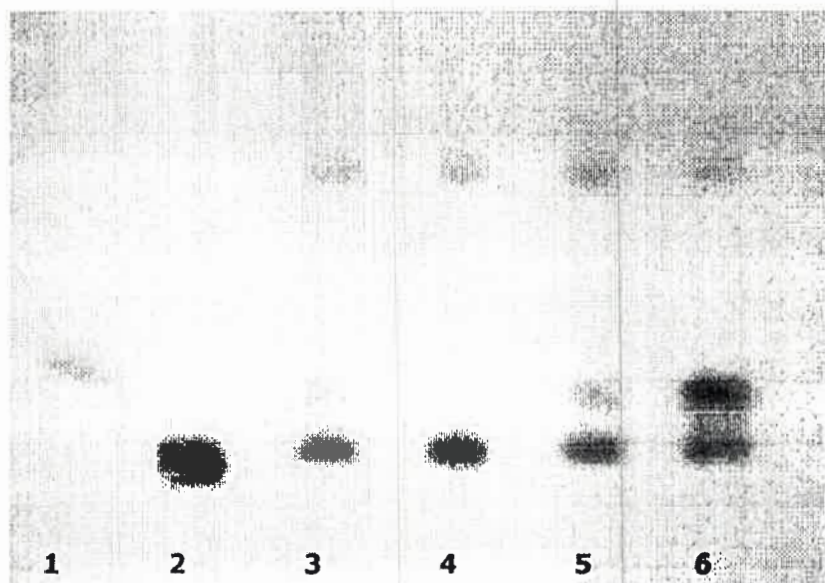


Figura 16: Determinación del perfil de azúcares presentes en el interior de células de *Microbacterium sp.* cultivado en MMGlucosa en distintas condiciones de estrés. Referencias: 1- glucosa; 2-trehalosa; 3-contenido de azúcares en bacterias crecidas en MM glucosa control 4-contenido de azúcares en bacterias crecidas en MM glucosa 400 mM NaCl; 5-contenido de azúcares en bacterias crecidas en MM glucosa 37 °C; 6-contenido de azúcares en bacterias crecidas en MM glucosa 10 mM H₂O₂.

La figura 17 refleja los perfiles de migración en el solvente de corrida butanol:etanol:agua (50:30:20) de los azúcares más ampliamente identificados en microorganismos.

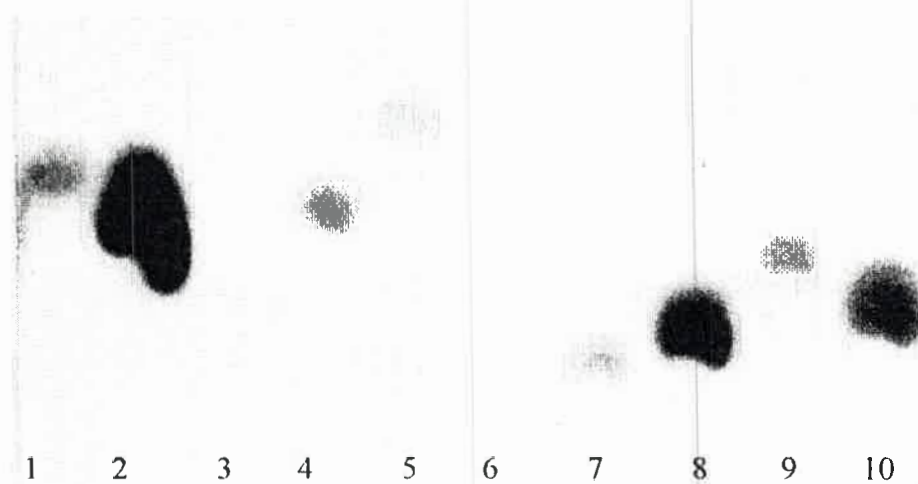


Figura 17: Patrones de migración de los azúcares más comunes identificados en bacterias. Referencias: 1- Glucosa; 2- Fructosa; 3-Manitol; 4- Xylosa; 5-Rhamnosa; 6-Fucosa; 7- Trehalosa; 8- Sacarosa; 9-Arabinosa; 10-Galctosa
Es importante notar que tanto manitol (calle 3) como fucosa (calle 6) no son positivos para el revelado empleado en esta técnica (Sulfúrico- Metanol 10%).

Para el caso de la determinación de la excreción de azúcares al medio de cultivo, por parte de la bacteria sometida a distintos tipos de estrés, (figura 18), el bandeo que se observa en los distintos tratamientos (calles 4 a 6) es similar al del medio de cultivo solo (calle 3). Los resultados permiten suponer que los componentes orgánicos del medio interaccionan con el revelado. Por lo tanto no es posible determinar mediante esta técnica si existe o no excreción de trehalosa por parte del microorganismo.

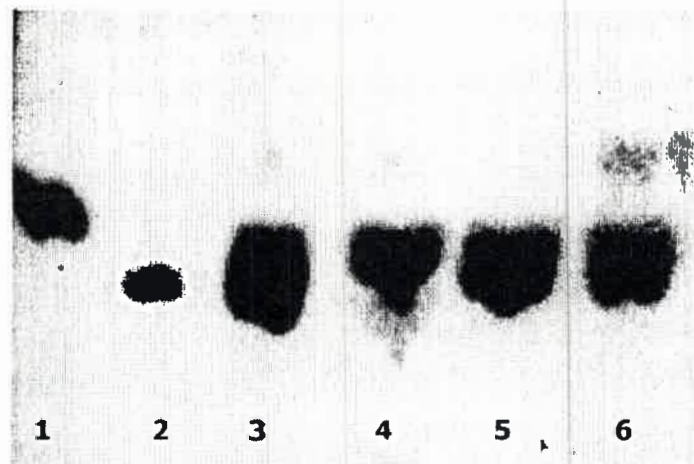


Figura 18: Determinación del perfil de azúcares presentes los sobrenadantes de cultivos de *Microbacterium sp.* en MMGlucosa en distintas condiciones de estrés. Referencias: 1- glucosa; 2-trehalosa; 3- Medio solo 4 -sobrenadante de cultivos crecidos en MM glucosa control 5- sobrenadante de cultivos crecidos en MM glucosa 37 °C; 6-sobrenadante de cultivos crecidos en MM glucosa 10 mM H₂ O₂. Los sobrenadantes de cultivos crecidos en 400 mM NaCl no pudieron ser revelados dada la elevada concentración de sales que poseían.

Por estudios de cromatografía gaseosa, (ver punto 9 de materiales y métodos) se pudo establecer que los extractos celulares de cultivos controles (Figura 19) presentan tres picos de azúcares, uno de los cuales fue identificado como manitol (13,06 min.) , otro glucosa (13,87 min.) y el tercero no pudo ser identificado (14,95 min.).

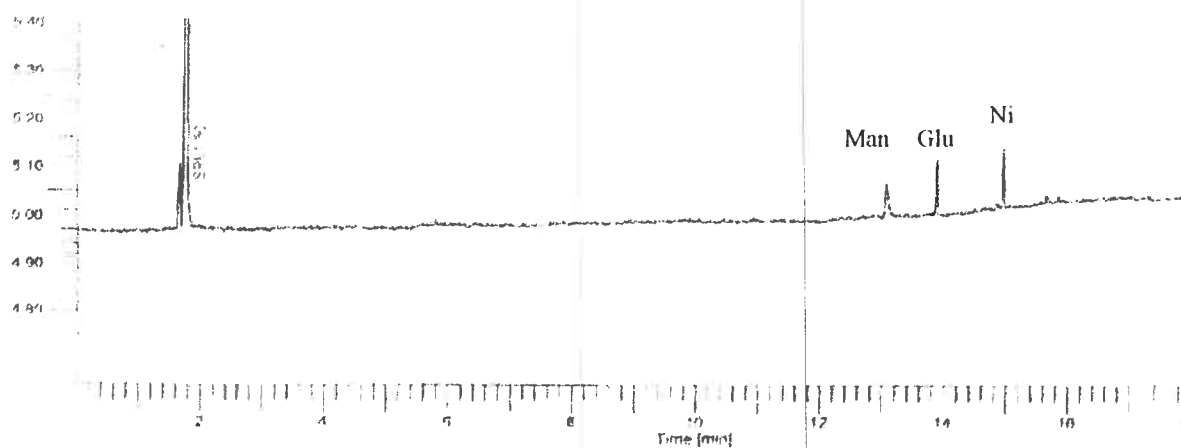


Figura 19: Determinación del contenido de azúcares en el interior de células de *Microbacterium sp.* cultivadas en MMGlucosa en condiciones controles. Glu = Glucosa; Man = Manitol; Ni = No identificado.

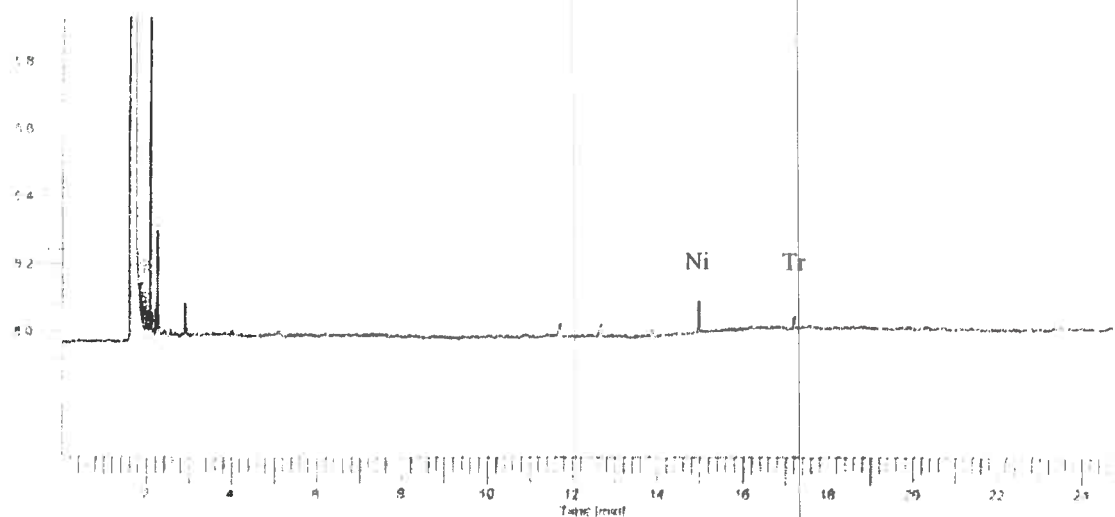


Figura 20: Determinación del contenido de azúcares en el interior de células de *Microbacterium sp.* cultivadas en MMGlucosa suplementado con 400 mM NaCl. Ni= No identificado; Tr = Trehalosa.

Para el caso de los extractos celulares de cultivos estresados con 400 mM NaCl (figura 20), se observó la presencia de dos picos, uno de ellos identificado como trehalosa (17,2 min), y el otro (con igual tiempo de retención al encontrado en el caso anterior, 14,95) no pudo ser identificado con los estándares aplicados. Lo que demuestra que el

microorganismo en condiciones no estresantes posee manitol y glucosa dentro de sus células, mientras que cuando se encuentra en condiciones de estrés salino estos dos compuestos son reemplazados por la trehalosa.

En los sobrenadantes de los cultivos controles y estresados con 400 mM NaCl, no se encontró trehalosa o manitol por lo que no se produciría la excreción de estos dos compuestos al medio, al menos en las condiciones ensayadas.

Dardanelli (2001), determinó la presencia del disacárido trehalosa en dos cepas de rizobium. En la cepa Tal 1000 no solo se encontró trehalosa en las células sometidas a estrés (0,4 M NaCl) sino que también en las células controles que no habían sufrido estrés. Por su parte, la cepa ATCC 10317 solo acumulaba trehalosa en condiciones de estrés (0,4 M NaCl).

Canovas *et al.*, (2001) en estudios realizados con *Salmonella entérica* en presencia de estrés osmótico y térmico, determinaron que un aumento en la osmolaridad del medio de cultivo (0,2 M NaCl) desencadena una tolerancia al calor mayor y que esto se debía a un incremento en la producción de trehalosa en esas condiciones. Mutantes de *S. entérica* que poseían bloqueada la producción de trehalosa no eran capaces de crecer en medios con elevada osmolaridad y elevada temperatura y concluyen que este disacárido es fundamental para el crecimiento a elevadas temperaturas, ya sea por su papel en el mantenimiento de la turgencia celular o en la estabilización de proteínas.

En base a estos antecedentes, proponemos que la acumulación de éste disacárido con funciones de protección sería la responsable de la tolerancia al estrés que presenta *Microbacterium sp.*

10- Estudios de interacción *Microbacterium*-planta

10 a) Determinación de la localización de *Microbacterium sp.* en plántulas de agropiro, trigo y soja

Debido a la aparición de endófitos propios de cada una de las especies vegetales, los recuentos se realizaron en placas de agar nutritivo 400 mM de NaCl con estreptomycin 10 µg / ml. Para esto previamente se aislaron los endófitos que aparecían en las tres especies y se determinó su tolerancia a distintos antibióticos. Se pudo observar que *Microbacterium*

posee resistencia natural a estreptomicina, mientras que las colonias endófitas eran sensibles a la misma. En todos los casos el inóculo aplicado fue de 10^7 ufc/ml de cultivo.

Los recuentos se realizaron teniendo en cuenta los controles sin inocular en ambas condiciones de cultivo [Controles (Hoagland sin NaCl) y Tratados (Hoagland + NaCl)] para asegurar que realmente los recuentos eran de *Microbacterium sp* y no de un contaminante endófito.

En la tabla 14 se muestran los recuentos de *Microbacterium sp*. obtenidos en el interior de plántulas de agropiro. En el caso de raíz, el número de microorganismos recuperados prácticamente se duplica cuando la plántula es sometida a estrés, mientras que en el caso del tallo se cuadruplica en esas condiciones.

Tabla 14: Recuento del aislamiento de *Microbacterium sp*. en *Agropyron elongatum* los resultados corresponden a la media de tres determinaciones con dos plantas cada una. Para el caso del estrés (Tratados) se utilizó Hoagland adicionado con 100 mM NaCl.

Tratamientos	Recuentos
Control Raíz	Sin crecimiento
Control Tallo	Sin crecimiento
Tratado Raíz	Sin crecimiento
Tratado Tallo	Sin crecimiento
Control inoculado Raíz	50000 ufc/ml
Control inoculado Tallo	201910 ufc/ml
Tratado inoculado Raíz	90900 ufc/ml
Tratado inoculado Tallo	862060 ufc/ml

Como se observa en la tabla 15, en el caso de la soja el número de microorganismos recuperados fue bastante menor que en las otras especies vegetales, incluso no se recuperaron microorganismos de la raíz, por lo que se destaca que la ubicación es preferentemente de tallo o que los recuentos a partir de raíz se encuentran fuera de los límites de detección de la técnica.

Tabla 15: Recuento del aislamiento de *Microbacterium sp.* en *Glicine max.* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones con dos plantas cada una. Para el caso del estrés (Tratados) se utilizó Hoagland adicionado con 80 mM NaCl.

Tratamientos	Recuentos
Control Raíz	Sin crecimiento
Control Tallo	Sin crecimiento
Tratado Raíz	Sin crecimiento
Tratado Tallo	Sin crecimiento
Control inoculado Raíz	Sin crecimiento
Control inoculado Tallo	6000 ufc/ml
Tratado inoculado Raíz	Sin crecimiento
Tratado inoculado Tallo	76500 ufc/ml

Los recuentos obtenidos para el caso de trigo se muestran en la tabla 16. Aquí al igual que en el caso de agropiro es posible recuperar el microorganismo a partir de tallo y de raíz aunque el número es mucho mayor en el caso del trigo. En raíces no se observa una gran diferencia cuantitativa cuando las plántulas son cultivadas en estrés, en cambio en el caso de la parte aérea, se produce un incremento en los recuentos de más de diez veces en situaciones de estrés. Este aumento observado también en agropiro (tabla 14) estaría poniendo en evidencia una asociación influenciada por las condiciones de estrés en donde la planta estresada permite una mayor colonización de sus tejidos por parte del microorganismo.

Tabla 16: Recuento del aislamiento de *Microbacterium sp.* en *Triticum aestivum*. Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones con dos plantas cada una. Para el caso del estrés (Tratados) se utilizó Hoagland adicionado con 100 mM NaCl

Tratamientos	Recuentos *
Control Raíz	Sin crecimiento
Control Tallo	Sin crecimiento
Tratado Raíz	Sin crecimiento
Tratado Tallo	Sin crecimiento
Control inoculado Raíz	115×10^5 ufc / ml
Control inoculado Tallo	$3,39 \times 10^5$ ufc / ml
Tratado inoculado Raíz	105×10^5 ufc / ml
Tratado inoculado Tallo	52×10^5 ufc / ml

Una bacteria endófitas por definición es aquella que reside en el interior de los tejidos vegetales y no perjudica a la planta. Esta definición incluye a aquellos colonizadores interiores que tienen un comportamiento neutro, así como también a los simbioses (Hallmann *et al.*, 1997).

Las bacterias endofíticas han sido asociadas con la promoción de crecimiento en muchos cultivos. Según Sturz (1995) cerca del 10 % de bacterias recuperadas del interior de tubérculos de papa fueron promotoras del crecimiento. Entre los géneros estudiados de endófitos, podemos mencionar a *Pseudomona*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* etc. (Hallmann *et al.*, 1997).

Los cambios en la fisiología de la planta pueden conducir al desarrollo de poblaciones de endófitos diferentes, lo que plantea la pregunta de si la planta por si misma favorece la colonización por parte de algunas especies y excluye a otras. Desde el punto de vista de la bacteria, el paso de ser rizosférico a ser endofítico, esta asociado a cambios fisiológicos. Van Peer *et al.*, (1990) encontraron diferentes características bioquímicas

entre especies de *Pseudomonas* internas y externas. Los autores además argumentan que el ingreso de las bacterias no es aleatorio si no que hay alguna forma de selección previa.

El tejido de la planta provee un medio ambiente de protección para los endófitos, sin embargo muchos factores como la temperatura, la radiación UV, los factores edáficos, etc., que afectan la colonización de las bacterias en la rizósfera, también afectarán la colonización y supervivencia de los endófitos dado que estos factores afectan a la planta huésped.

Las bacterias endofíticas colonizan un nicho similar al de los patógenos especialmente aquellos que invaden los tejidos vasculares, por lo que los endofitos son buenos candidatos para diseñar estrategias de biocontrol y hay evidencias de que también actúan sobre el control de nematodos parásitos (Hallmann *et al.*, 1995) e insectos (Dimock *et al.*, 1988).

Trabajos con *Pseudomonas sp.* cepa PsJN han revelado que la población de endofitos de plántulas de papa, se mantiene prácticamente en los mismos órdenes luego de 28 días de inoculadas con aprox. 1×10^5 UFC/ cm de tejido de raíz (Frommel *et al.*, 1991), mientras que experimentos con *Pseudomonas corrugata* indican que la concentración de bacterias en el interior de las plántulas de algodón disminuyen y se mantienen en 1×10^3 UFC/ g independientemente de cual haya sido el inóculo inicial (Chen *et al.*, 1995). Estos resultados indican una capacidad de supervivencia en el tejido de la planta que fluctúa, según las condiciones, edad de la planta y los factores ambientales.

10 b) Determinación de los efectos de promoción de crecimiento del aislamiento seleccionado sobre plántulas de trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*) y agropyro alargado (*Agropyron elongatum*) en invernadero.

En las figuras 21, 22 y 23 se muestran los resultados de la inoculación de *Microbacterium sp.* (10^7 ufc por planta) sobre el peso fresco y seco de raíz y tallo en plántulas de agropyro a los treinta días (figuras 21 y 22) y a los cuatro meses (figura 23).

Es importante destacar la enorme variabilidad intraespecífica que se observó para este cultivo, lo que lo hace una especie de difícil manejo experimental especialmente en invernadero.

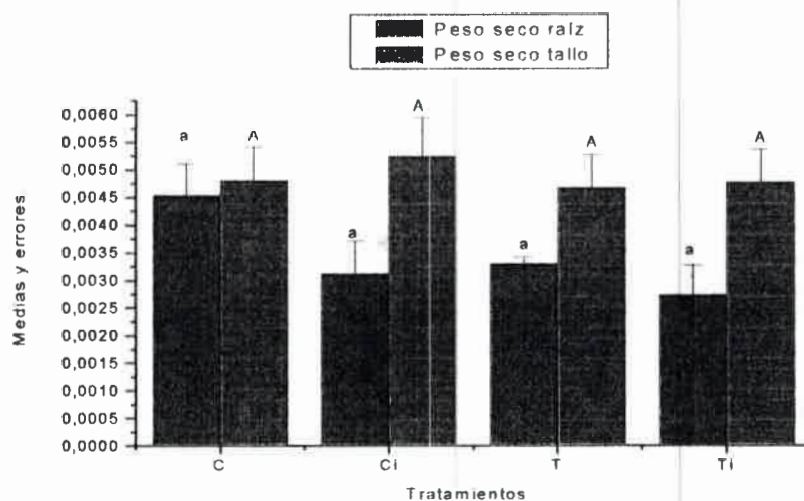


Figura 21: Resultados de los efectos de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre el peso seco de plántulas de agropiro cultivadas en condiciones controles y salinas (100 mM NaCl) durante 30 días. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

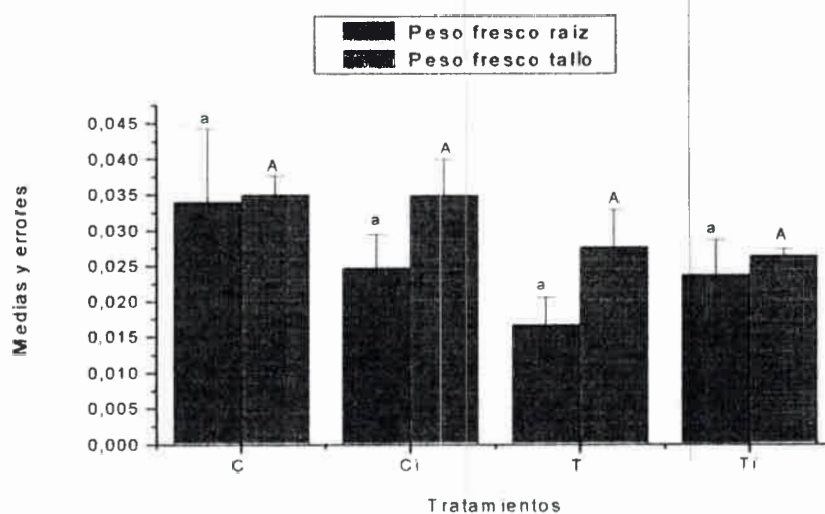


Figura 22: Resultados de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre el peso fresco de plántulas de agropiro cultivadas en condiciones controles y salinas (100 mM NaCl) durante 30 días. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

Dado que no se observaron efectos de estrés en los parámetros de crecimiento determinados para agropiro (figuras 21 y 22), se realizó un experimento de mayor duración (cuatro meses) con un estrés superior dado por 140 mM NaCl, cuyos resultados se muestran a continuación.

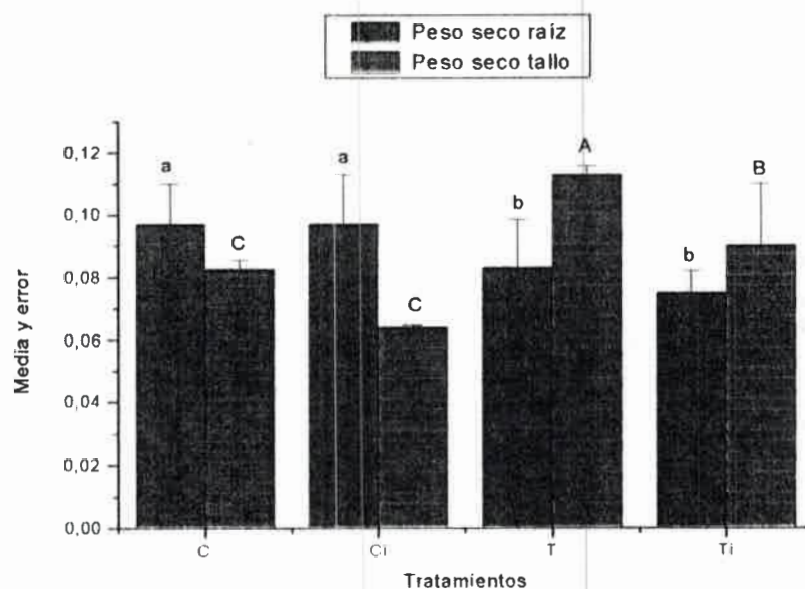


Figura 23: Resultados de los efectos de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre plántulas de agropiro cultivadas en condiciones controles y salinas (140 mM NaCl) durante cuatro meses. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

El resultado de tratamiento a largo plazo (4 meses) indicaría que la inoculación de agropiro con *Microbacterium sp.* no tiene un efecto positivo ni para la raíz ni para el tallo (figura 23). Incluso se observa por las medias de los tallos sometidos a estrés sin inocular (T) que no se verían afectados por la presencia de la sal. Esto también se ve en el experimento anterior (figuras 21 y 22) donde la salinidad era más baja y el tiempo de duración del experimento era menor (1 mes). Estos resultados indicarían que los efectos de la salinidad disminuyen durante el tiempo y el cultivo puede sobreponerse a las

condiciones salinas, mostrando incluso un beneficio en el crecimiento del tallo cuando el cultivo se encuentra en esas condiciones.

Los resultados de la inoculación de trigo con *Microbacterium* sp. observados en las figuras 24 y 25, ponen en evidencia que en condiciones de estrés salino, el microorganismo es capaz de revertir los efectos de la salinidad tanto en el peso fresco como en el seco, ya que las medias de los tratados inoculados (Ti) no presentan diferencias significativas con las medias de los controles (C, Ci) mientras que sí presentan diferencias significativas con los controles salinos que no han sido inoculados (T) sobre todo en aquellas variables relacionadas al tallo.

Por otro lado, en lo que se refiere a peso seco de la raíz, en la figura 25 se observa que, las plántulas que han sido sometidas a estrés y han sido inoculadas (Ti) presentan diferencias significativas con aquellas han sido sometidas al estrés pero no han sido inoculadas (T).

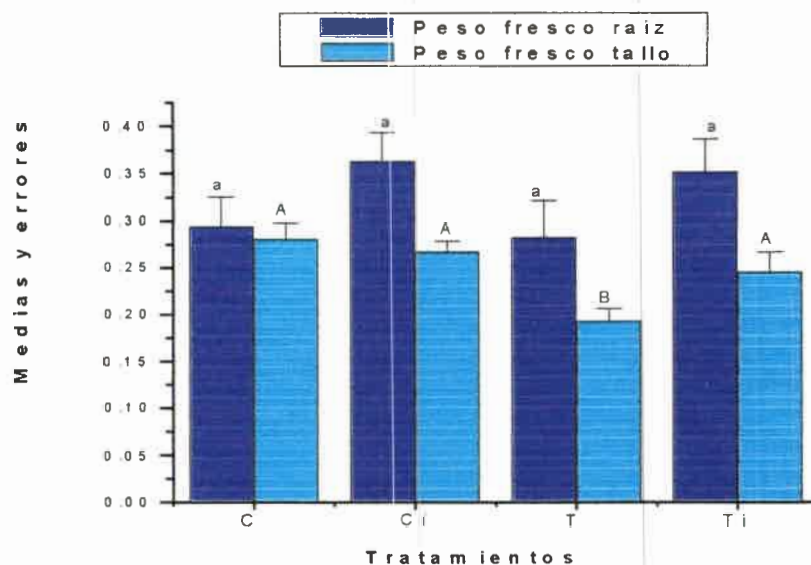


Figura 24: Resultados de los efectos de la inoculación de *Microbacterium* sp. sobre el peso fresco de plántulas de trigo cultivadas en condiciones controles y salinas (120 mM NaCl) durante 30 días. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

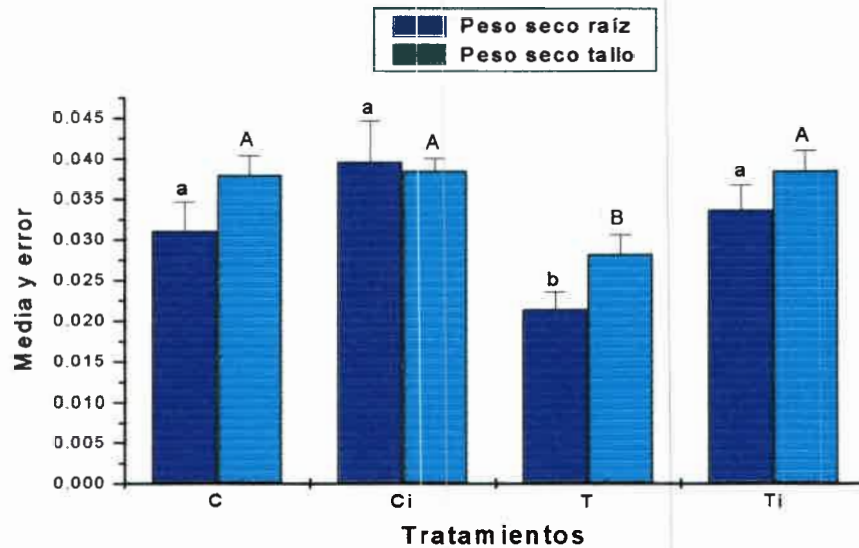


Figura 25: Resultados de los efectos de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre el peso seco de plántulas de trigo cultivadas en condiciones controles y salinas (120 mM NaCl) durante 30 días. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

En las figuras de trigo 26 y 27, se observa claramente la diferencia en el estado de las plántulas. En la figura 26 se comparan las plántulas controles sin inocular (C) y las controles inoculadas con *Microbacterium sp.* (Ci). No se observan diferencias en el aspecto de las plántulas ni en la parte aérea ni en la raíz. En ambos tratamientos las plántulas están saludables y no hay signos de clorosis ni de manchas necróticas. Las raíces son similares en los dos casos.

En la figura 27 se observa la respuesta de las plántulas que se encuentran en condiciones de estrés sin inocular (T) e inoculadas (Ti). Aquí si se observan notables diferencias entre los dos tratamientos no solo en el tamaño de las plántulas si no que fundamentalmente en el estado fisiológico de las mismas. Las plántulas estresadas (T) evidencian una marcada clorosis y un reducido desarrollo foliar que se limita a una sola hoja, mientras que aquellas tratadas e inoculadas (Ti) no presentan clorosis y poseen mayor cantidad de hojas.

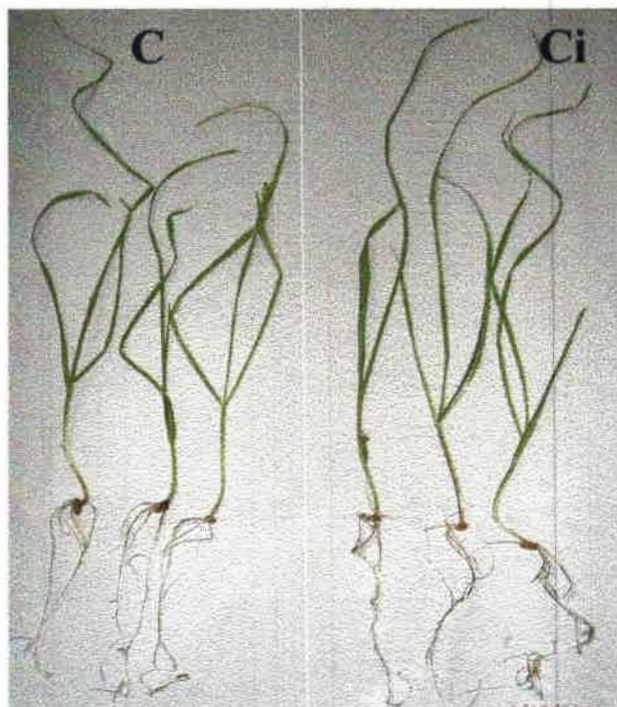


Figura 26: Plántulas de trigo cultivados en tubos con medio Hoagland sin agregado de NaCl: C= Sin inocular; Ci = Inoculado con 10^7 ufc /ml de *Microbacterium sp.*



Figura 27: Plántulas de trigo cultivados en tubos con medio Hoagland suplementado con 100 mM de NaCl; T= Sin inocular; Ti = Inoculado con 10^7 ufc /ml de *Microbacterium sp.*

En la figura 28 se muestra el efecto de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre plántulas de soja

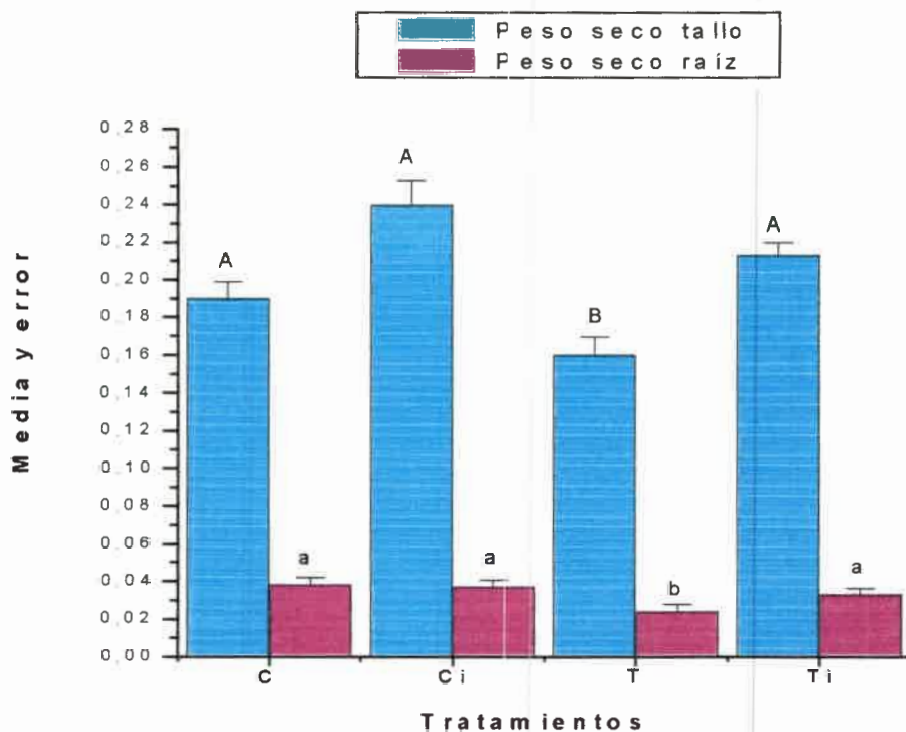


Figura 28: Resultados de los efectos de la inoculación de *Microbacterium sp.* sobre peso seco de plántulas de soja cultivadas en condiciones controles y salinas (100 mM NaCl) durante 30 días. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias. Letras minúsculas para parámetros de raíz y mayúsculas para tallo. [ANOVA test LSD ($p < 0,05$)].

De la inoculación de soja podemos afirmar que las plantas sometidas a estrés que han sido inoculadas revierten la condición de estrés y no presentan diferencias significativas con respecto a aquellas plántulas controles. También se evidencia en la figura 28, en el caso de peso seco del tallo, una tendencia de aquellas plántulas en medio control inoculadas (Ci) con *Microbacterium sp.* a superar el valor promedio de las plántulas controles (C).

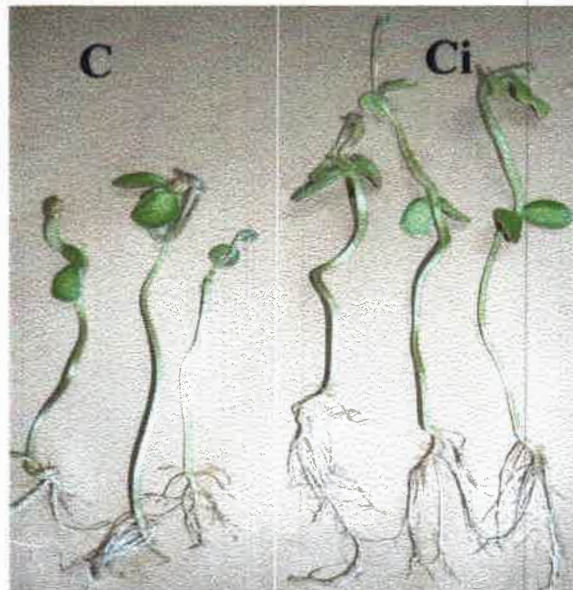
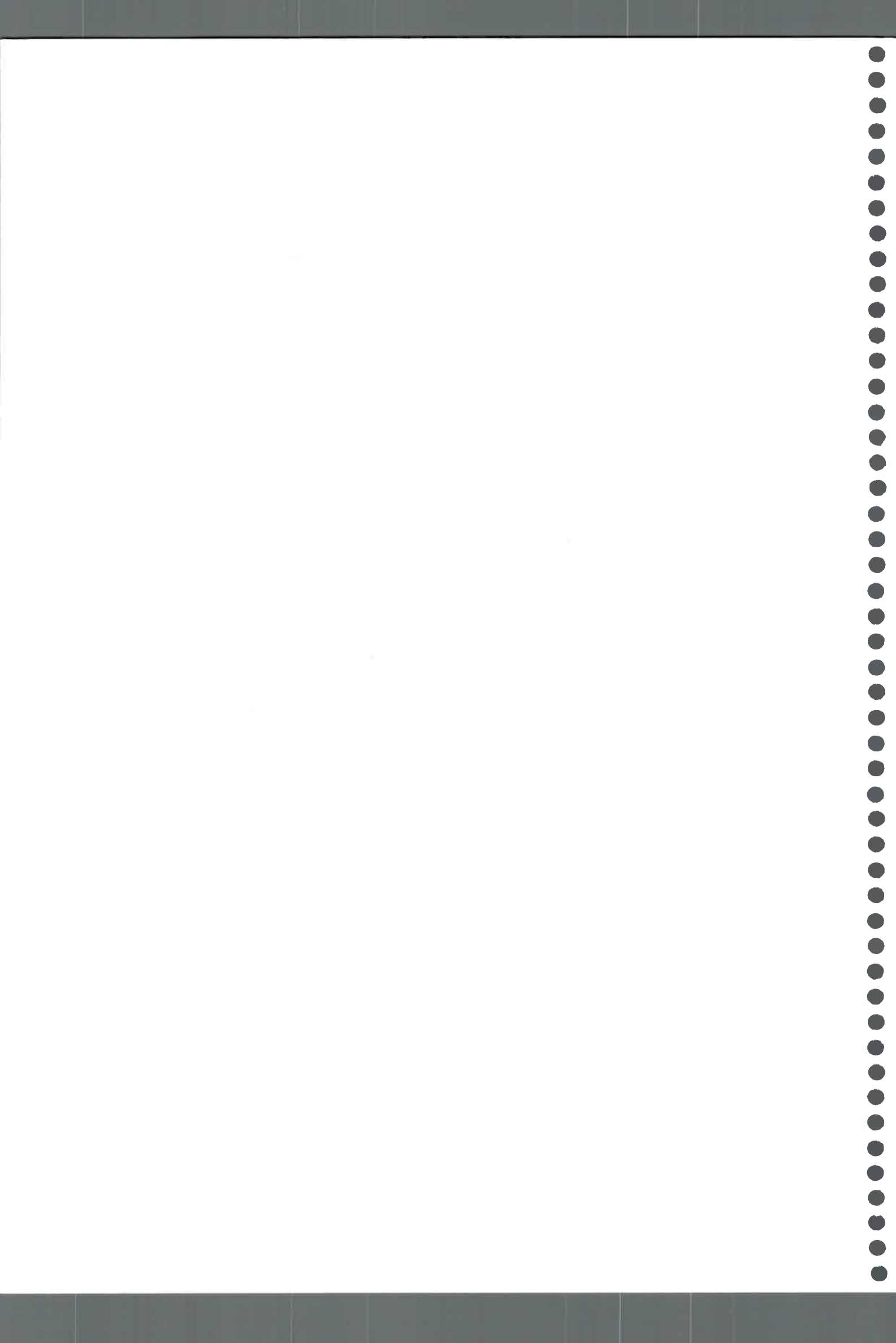


Figura 29: Plántulas de soja cultivadas en tubos con medio Hoagland sin agregado de NaCl: C= Sin inocular ; Ci = inoculado con 10^7 ufc / ml de *Microbacterium sp.*



Figura 30: Plántulas de soja cultivadas en tubos con medio Hoagland suplementado con 80mM de NaCl: T= sin inocular; Ti = inoculado con 10^7 ufc / ml de *Microbacterium sp.*

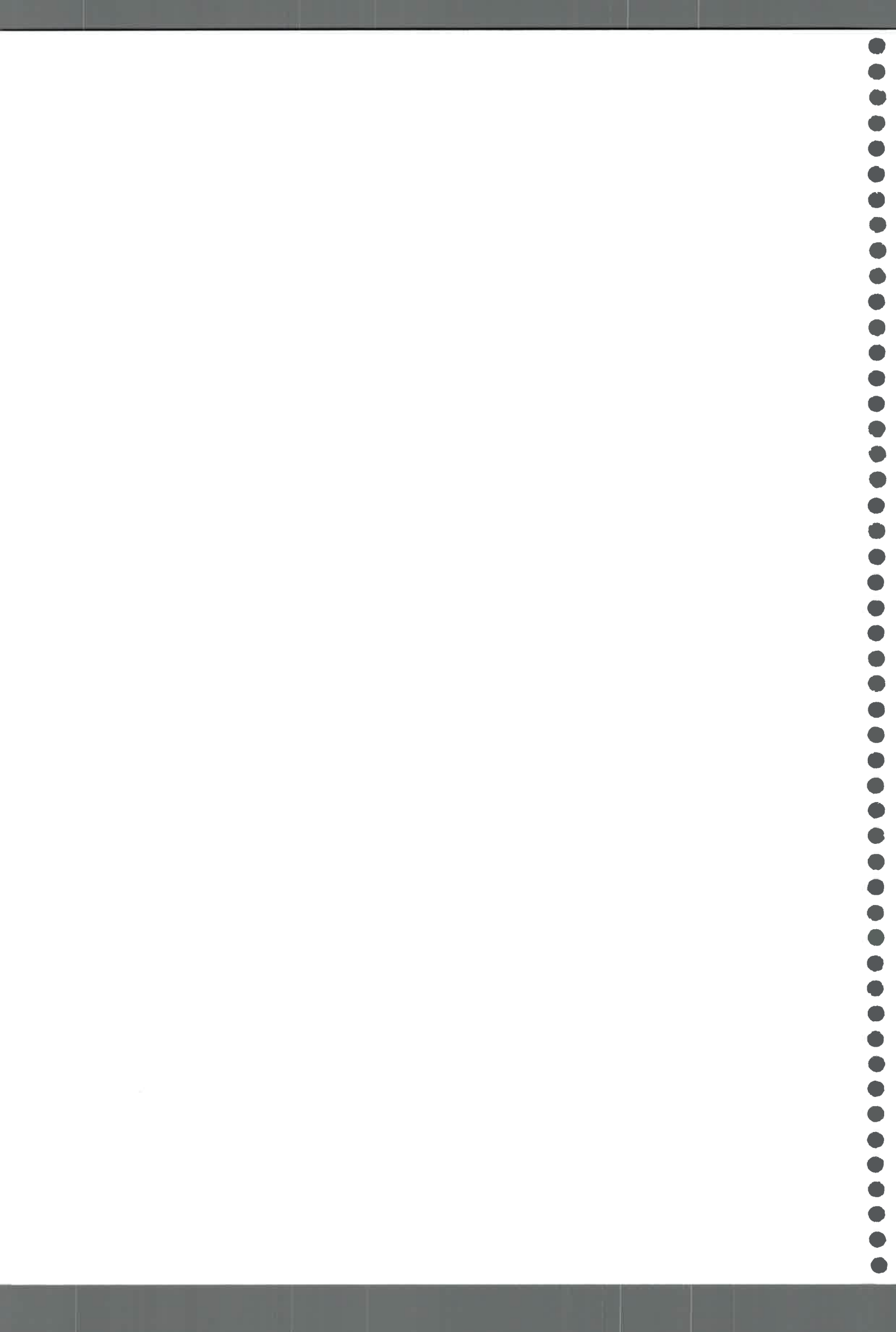


Nuevamente en el caso de la soja se repite el patrón de respuesta encontrado en trigo, lo que refuerza aún más el efecto beneficioso que ejerce la bacteria en el interior de estas plantas, y más aún teniendo en cuenta que una es Monocotiledónea y la otra es Dicotiledónea.

Es interesante observar las diferencias en el comportamiento que presenta cada cultivo frente a la salinidad en una misma etapa del desarrollo.

De los tres cultivos empleados, la soja es el que presenta la mayor sensibilidad frente al estrés salino, ya que el crecimiento de la misma prácticamente se ve abortado cuando las semillas son sometidas a estrés en el momento de la germinación. El trigo muestra una tolerancia sensiblemente mayor, ya que si bien las plántulas se ven afectadas en los primeros días, al cabo de un tiempo pueden recuperarse, y sobrevivir. Los resultados encontrados, son de particular importancia ya que benefician a las plántulas justamente en los primeros días luego de la germinación de la semilla, lo que posibilitaría que estos cultivos sobrevivan en condiciones adversas.

El caso de agropiro es diferente, ya que este cultivo es particularmente tolerante a la sal especialmente en los primeros momentos de la germinación, por lo que constituye un colonizador recomendable en suelos que no pueden ser sembrados con trigo o soja.



11-Determinación de los posibles mecanismos a través de los cuales *Microbacterium sp.* disminuye los efectos del estrés salino

11 a) Determinación del contenido de azúcares en la interacción *Microbacterium-Trigo*

1) Análisis de los azúcares presentes cuando *Microbacterium sp.* se cultiva en medio Hoagland suplementado con exudados radicales de trigo como única fuente de carbono.

De esta manera se procesaron dos muestras; muestra T= medio Hoagland suplementado con exudados radicales (provenientes de trigo cultivado 20 días en medio Hoagland 100 mM concentrado) y muestra Ti = medio Hoagland suplementado con exudados radicales concentrados (provenientes de trigo cultivado 20 días en medio Hoagland 100 mM), inoculado con *Microbacterium sp.* y cultivado en agitación rotatoria durante una semana.

Mediante HPLC se pudo establecer en la figura 31 los azúcares identificados para la muestra T, y en la figura 32 los identificados para la muestra Ti

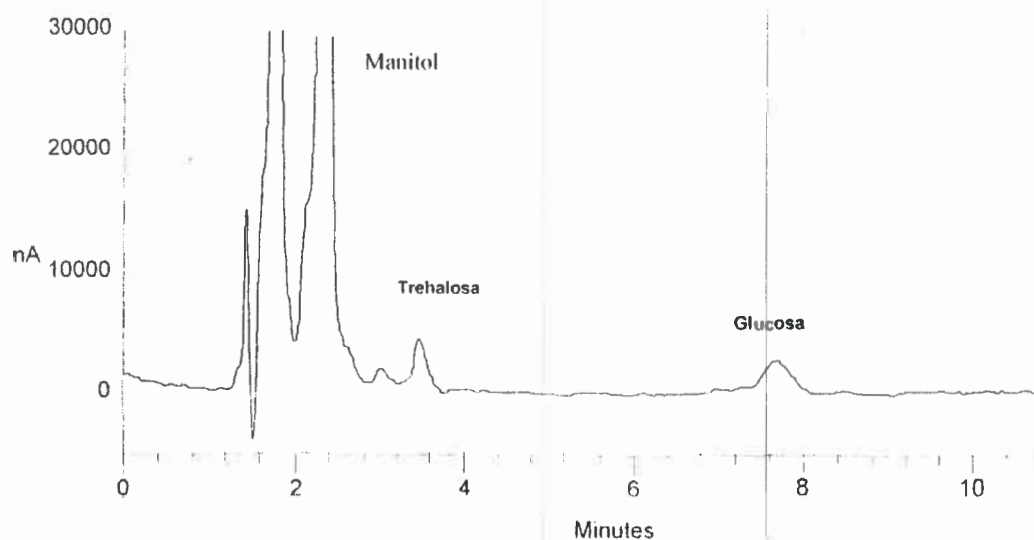


Figura 31: Perfil de azúcares identificados provenientes de medio Hoagland suplementado con exudados radicales de trigo (muestra T)

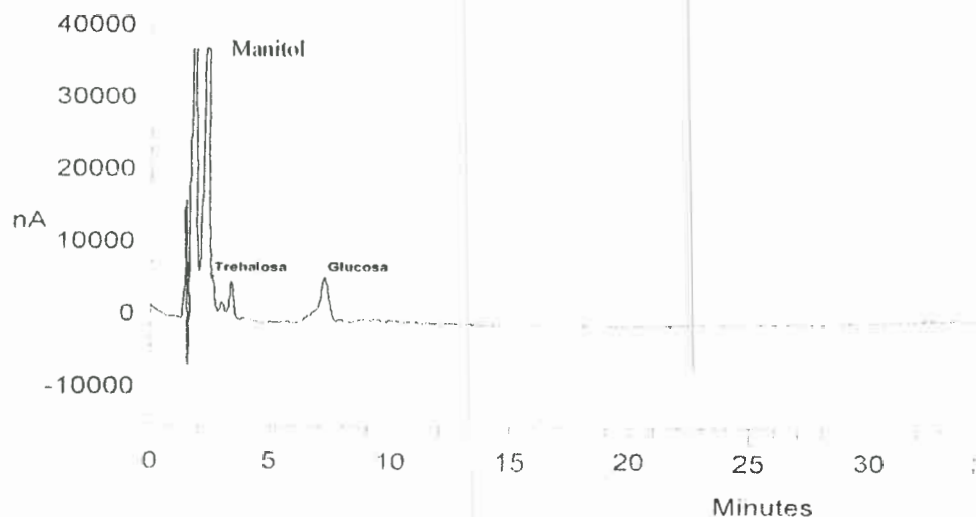


Figura 32: Perfil de azúcares identificados provenientes de medio Hoagland suplementado con exudados radicales concentrados, inoculado con *Microbacterium sp.* y cultivado en agitación rotatoria durante una semana.

La presencia de trehalosa en las muestras concuerda con lo encontrado por Fan *et al.*, (2001), que informan la presencia de este disacárido en exudados de trigo mediante la técnica resonancia magnética nuclear (NMR) de alta resolución. Por otra parte, Roberts *et al.*, (1999) detectaron trehalosa en exudados de semillas de pepino, rabanito y soja.

Cuando *Microbacterium sp.* es cultivado en medio Hoagland adicionado con exudados concentrados provenientes de plántulas de trigo de 20 días, sometidas a estrés salino (figura 32), la composición de azúcares en el medio no presenta diferencias con respecto al medio sin inocular (figura 31), y consiste fundamentalmente en manitol y pequeñas cantidades de glucosa y trehalosa.

II) Análisis de los azúcares presentes en los exudados provenientes de plántulas de trigo inoculadas con *Microbacterium sp.*

Las muestras analizadas fueron:

Control =(C): Exudados de plántulas de trigo cultivados durante 20 días en tubos conteniendo medio Hoagland control. La concentración de azúcares totales por la técnica de antrona fue de 0,185 mg/ ml (Figura 33)

Control inoculado=(Ci): Exudados de plántulas de trigo cultivados durante 20 días en tubos conteniendo medio Hoagland control e inoculadas con *Microbacterium sp.* La concentración de azúcares totales por la técnica de antrona fue de 0,170 mg/ ml (Figura 34)

Tratado = (T): Exudados de plántulas de trigo cultivados durante 20 días en tubos conteniendo medio Hoagland salinizado con 100 mM NaCl. La concentración de azúcares totales por la técnica de antrona fue de 0,194 mg/ ml (Figura 35).

Tratado inoculado = (Ti): Exudados de plántulas de trigo cultivados durante 20 días en tubos conteniendo medio Hoagland salinizado con 100 mM NaCl e inoculadas con *Microbacterium sp.* La concentración de azúcares totales por la técnica de antrona fue de 0,184 mg/ ml (Figura 36).

En todos los casos el volumen de muestra sembrado fue de 50 μ l.

Las raíces exudan una variedad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular; éstos consisten en aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y mayormente azúcares como polisacáridos o disacáridos y monosacáridos como arabinosa, glucosa, sacarosa, (Bertin *et al.*, 2003) y trehalosa (Fan *et al.*, 2001) y compuestos fenólicos. En los estadios de plántulas, los exudados radicales pueden representar entre un 30 y 40 % de los fotosintatos mientras que en plantas jóvenes, alcanzan un 30% de la producción total de materia seca (Whipps, 1990). Está ampliamente documentado en numerosas especies como sorgo y trigo que la exudación disminuye con la edad de la planta y se incrementa en condiciones de estrés ambiental como compactación del suelo, sequía y salinidad (Miller and Wood, 1996).

En la interacción *Microbacterium*-trigo, cuando se analiza la composición de azúcares de los exudados provenientes de plántulas de 20 días de edad, se puede observar

que, en condiciones de estrés (T) (figura 35), existen diferencias en el patrón de los azúcares que se exudan, ya que aparecen glucosa y sacarosa ausentes en el exudado proveniente de las plántulas controles (figura 33), que contienen fundamentalmente manitol y una pequeñísima cantidad de fructosa. Esto coincide con lo expresado anteriormente por Miller y Wood (1996), ya que la exudación de las plántulas sometidas a estrés es mayor y cualitativamente diferente a la de las plántulas controles.

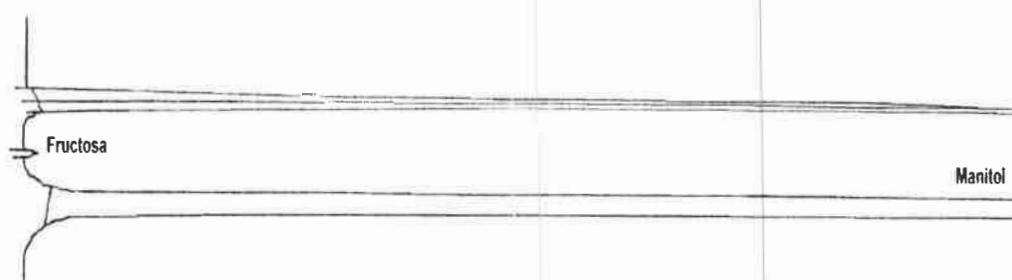


Figura 33: Perfil de azúcares encontrados en los exudados de plántulas de trigo cultivadas en tubos con medio Hoagland (C).

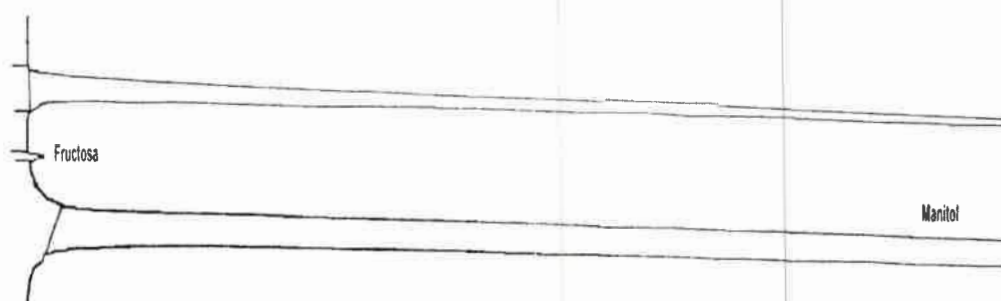


Figura 34: Perfil de azúcares encontrados en los exudados de plántulas de trigo cultivadas tubos con medio Hoagland e inoculadas con 10^7 ufc/ml de *Microbacterium sp.* (Ci)

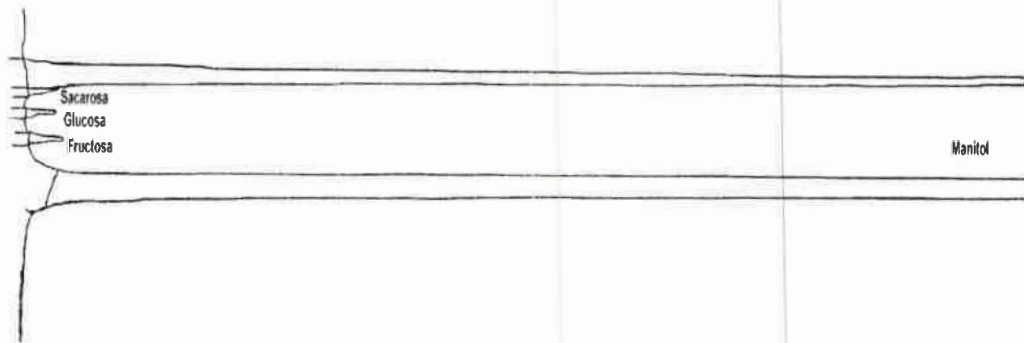


Figura 35: Perfil de azúcares encontrados en los exudados de plántulas de trigo cultivadas en tubos con medio Hoagland adicionado con 100 mM NaCl (T)

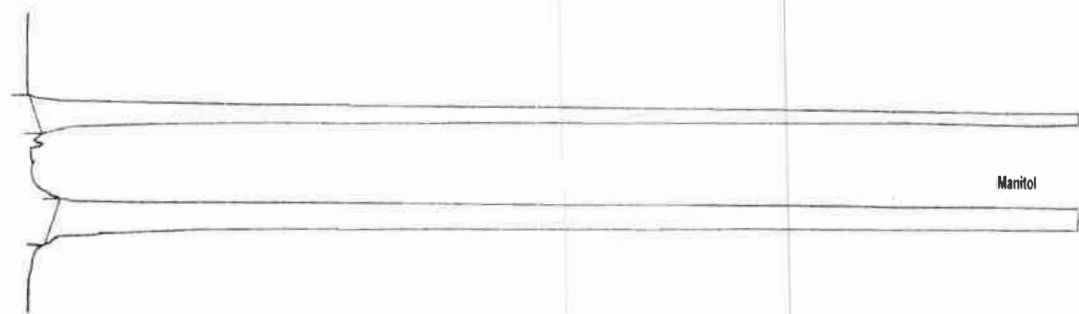


Figura 36: Perfil de azúcares encontrados en los exudados de plántulas de trigo cultivadas en tubos con medio Hoagland adicionado con 100 mM NaCl e inoculadas con 10^7 ufc/ml de *Microbacterium* sp (Ti)

En cuanto a los exudados provenientes de plántulas controles e inoculadas (Ci) que se observan en la figura 34, no hay diferencia en la composición de azúcares con respecto a los exudados controles (C) (figura 33) y como se observa en la figura 36, en los provenientes de plántulas estresadas e inoculadas con el microorganismo (Ti), desaparece la fructosa. Las plántulas estresadas producen azúcares como glucosa y sacarosa, además de manitol y fructosa lo que respondería a una redistribución de asimilados desde la parte aérea hacia las raíces; por el contrario en plántulas estresadas pero inoculadas (Ti) no se

daría tal redistribución a causa de que no perciben al estrés como tal. Alternativamente, el microorganismo podría estar consumiendo los azúcares presentes en los exudados.

Asociando estos resultados con los de rendimiento, observados previamente en las figuras 24 y 25, es posible concluir que la interacción *Microbacterium*-trigo permite un mejor crecimiento de las plántulas cuando las mismas se encuentran sometidas a condiciones de estrés.

III) Análisis de la composición de azúcares solubles en el interior de plántulas de trigo inoculadas con *Microbacterium sp.*

Entre los solutos que son acumulados por las plantas, los azúcares representan la mayor reserva en las semillas que son sintetizados durante la germinación y movilizados luego hacia los distintos tejidos en la forma de sacarosa, glucosa y fructosa que son fácilmente transportables a los sitios donde se requieren para el crecimiento o mantenimiento de la regulación osmótica de la célula (Garham *et al.*, 1981). Hay informes que describen la variación de los azúcares en respuesta al estrés abiótico. Para el caso de la salinidad y estrés hídrico, Gill *et al.*, (2001) y Prado *et al.*, (2000), informaron un incremento en los niveles de azúcares en plántulas de arroz y *Chenopodium quinoa* respectivamente.

Por su parte Jouve *et al.*, (2004) observaron que en plántulas de *Populus trémula* se produce un incremento en los niveles de sacarosa, manitol y raffinosa en plántulas sometidas a estrés por 150 mM de NaCl. El aumento en la sacarosa y manitol podría deberse a que el manitol actúa como secuestrante de radicales mientras que la sacarosa reduce la actividad oxigenasa de la Rubisco durante el estrés salino. La raffinosa actuaría como osmoprotector estabilizante de membranas y proteínas.

Dada la naturaleza endofítica de *Microbacterium sp.* y el hecho de que los azúcares constituyen importantes vías de señalización en el metabolismo de los vegetales, era importante conocer si se producen alteraciones en el contenido de los mismos cuando las

plántulas están en condiciones de estrés así como qué efecto produce la inoculación con este microorganismo.

Para ello se identificaron, los azúcares solubles presentes en plántulas de trigo cultivadas en medio Hoagland sin salinizar (C); plántulas de trigo cultivadas en medio Hoagland adicionado con 100 mM NaCl (T) y plántulas de trigo cultivadas en medio Hoagland adicionado con 100 mM NaCl e inoculadas con 10^7 ufc/ml de *Microbacterium sp.*

De los resultados obtenidos (figuras 37, 38 y 39) se puede apreciar que las plántulas controles poseen en su interior manitol, glucosa, sacarosa y fructosa (figura 37), y que estos azúcares también se encuentran presentes en aquellas plántulas en condiciones de estrés que han sido inoculadas con el microorganismo (figura 39). A diferencia de estos dos tratamientos, las plántulas sometidas a estrés que no han sido inoculadas presentan trehalosa en su interior (figura 38).

La determinación cuantitativa por el método de estándar externo de trehalosa fue de 188 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azúcares totales presentes en la muestra.

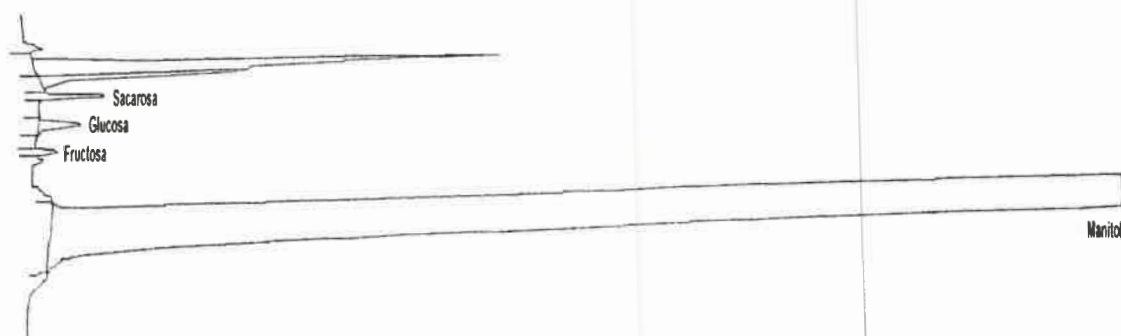


Figura 37: Contenido de azúcares en el interior de plántulas de trigo cultivadas en tubos conteniendo medio Hoagland sin salinizar.

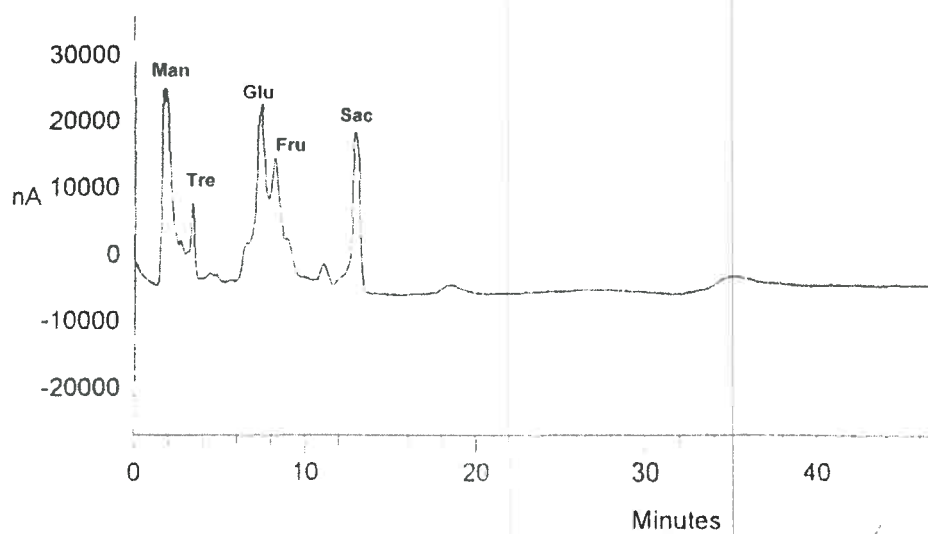


Figura 38: Contenido de azúcares en el interior de plántulas de trigo cultivadas en tubos conteniendo medio Hoagland suplementado con 100 mM NaCl

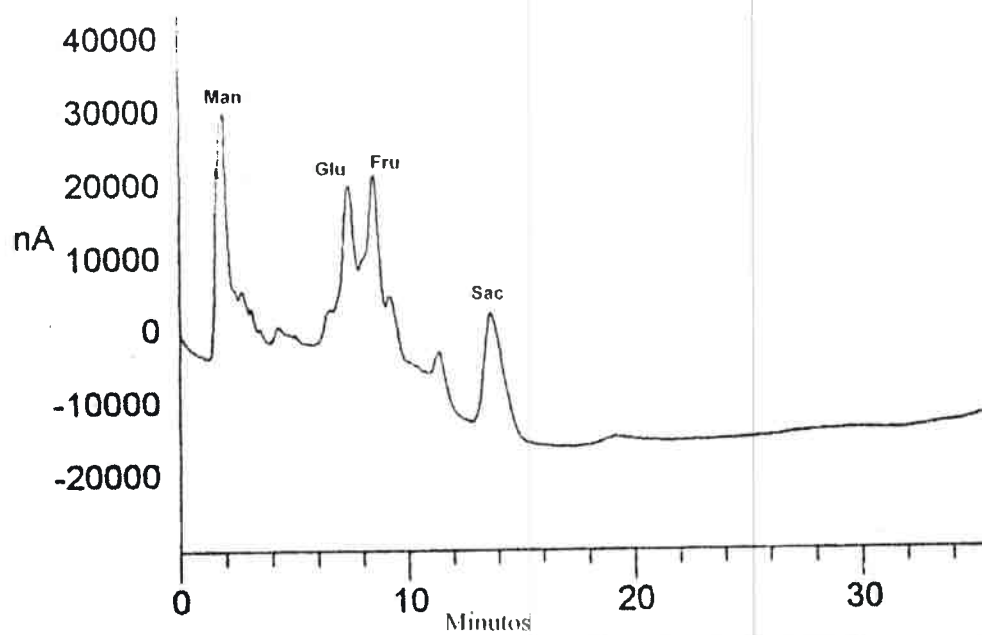


Figura 39: Contenido de azúcares en el interior de plántulas de trigo cultivadas en tubos conteniendo medio Hoagland suplementado con 100 mM NaCl e inoculadas con 10^7 ufc/ml de *Microbacterium* sp.

El-Bashiti *et al.*, (2005) determinaron el contenido de trehalosa en diferentes cultivares de trigo en condiciones de estrés salino y por sequía. Mediante HPLC y GC-MS pudieron establecer que el contenido de trehalosa en el interior de las plántulas se incrementaba a medida que aumentaba la edad de la planta. Por el contrario, la actividad de la enzima trehalasa era máxima en condiciones controles y disminuía significativamente en el caso del estrés. Estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestro sistema en donde aquellas plántulas estresadas contienen trehalosa en su interior. El hecho de que la trehalosa desaparezca en aquellas plántulas en condiciones de estrés que han sido inoculadas (Ti, figura 39), refuerza la idea de que estas plántulas no están percibiendo el estrés como tal siendo el contenido de azúcares similar al encontrado en el control no estresado (C en la figura 37), lo que también se correlaciona con un estado más saludable de las plántulas estresadas que han sido inoculadas con *Microbacterium sp* (Ti).

Alternativamente estos resultados podrían indicar que el microorganismo consume la trehalosa que se encuentra en el interior de las plántulas, disminuyendo los efectos negativos observados en plántulas transgénicas que producen mayor cantidad de trehalosa.

Hay discrepancias acerca de la función que cumpliría la acumulación de trehalosa en el interior de distintas especies vegetales. Mientras que en especies como el arroz, la acumulación de este disacárido en plantas transgénicas está asociada a una mayor tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, como la salinidad (Garg *et al.*, 2002); en el caso de tabaco se observa que los transgénicos que acumulan trehalosa presentan serias alteraciones de crecimiento, menor contenido de sacarosa y alteraciones en la fotosíntesis (Suprasanna, 2003). Müller *et al.*, 1999, explican que las posibles causas de estas anomalías podrían ser:

- a) La acumulación de trehalosa causaría disturbios en el metabolismo de la planta como por ej. Un agotamiento de la UDP glucosa o del reservorio de fosfato.
- b) La trehalosa o trehalosa-6-fosfato son tóxicas para algunas plantas aún en bajas concentraciones.
- c) El metabolismo de la trehalosa es una señal en la vía de azúcares y distribución de asimilados.

Si se observa la apariencia de las plántulas en condiciones de estrés (figura 27) y se comparan las plántulas en condiciones estresantes no inoculadas (T) con aquellas que si han sido inoculadas (Ti) se observa que las no inoculadas (que presentan trehalosa en su interior) muestran un crecimiento severamente afectado, así como también una marcada clorosis, lo que estaría poniendo de manifiesto notables alteraciones metabólicas dadas por los efectos del estrés.

En resumen, la planta que se encuentra en condiciones de estrés produce trehalosa (que es perjudicial o al menos es el resultado no deseado de dicho estrés) y la bacteria favorecería la tolerancia en esas condiciones consumiendo la trehalosa o activando vías de señalización relacionadas a los azúcares que desencadenen una tolerancia frente al estrés.

La capacidad de las plantas superiores de producir trehalosa fue negada hasta el momento en que se identificaron en el genoma de *Arabidopsis* los genes correspondientes a su biosíntesis de trehalosa homólogos a los que se conocían para levaduras (Goddijn and van Dun, 1999).

11 b) Determinación de la producción de ácido salicílico por parte de *Microbacterium sp.*

Los estudios por cromatografía gaseosa revelaron que no hay producción de ácido salicílico por parte del microorganismo ni en condiciones controles ni en condiciones de elevada salinidad.

11 c) Determinación de la actividad ACC (1-aminociclopropano 1-carboxilato) deaminasa por parte de *Microbacterium sp.*

Microbacterium sp. no presentó crecimiento en el medio para determinar la presencia de ACC deaminasa. Esto puede deberse a que el microorganismo no posee la capacidad de utilizar ACC como fuente de nitrógeno o que, dado que el medio utilizado es un medio salino mínimo (apartado 12c de materiales y métodos) y que el microorganismo posee requerimientos nutricionales complejos, no pueda crecer en dicho medio por falta de algún nutriente específico.

11 d) Determinación de la actividad catalasa en plántulas de trigo inoculadas con *Microbacterium sp.*

Si bien la catalasa no es la única enzima involucrada en la respuesta antioxidante de los vegetales, la determinación de la actividad de la misma puede darnos una visión de cómo se encuentra la defensa antioxidante de las plántulas frente a un estrés salino en cultivos inoculados con *Microbacterium* y sin inocular.

Está ampliamente aceptado que en condiciones de estrés abiótico los niveles de especies activas del oxígeno se incrementan, por lo que también se incrementa la actividad de las enzimas encargadas de detoxificar estos compuestos.

Como podemos observar en la figura 40, nuevamente en nuestro sistema encontramos que aquellas plántulas sometidas a estrés que han sido inoculadas con *Microbacterium sp* (Ti) muestran un patrón de respuesta similar a las plántulas no estresadas (C y Ci) y se diferencian de aquellas que han estado sometidas a estrés y no han sido inoculadas (T).

La reducción de la actividad de la enzima catalasa en las plántulas sometidas a estrés que han sido inoculadas (Ti) en comparación con aquellas estresadas no inoculadas (T) indicaría que la inoculación con *Microbacterium sp* disminuye el estrés oxidativo en las plántulas.

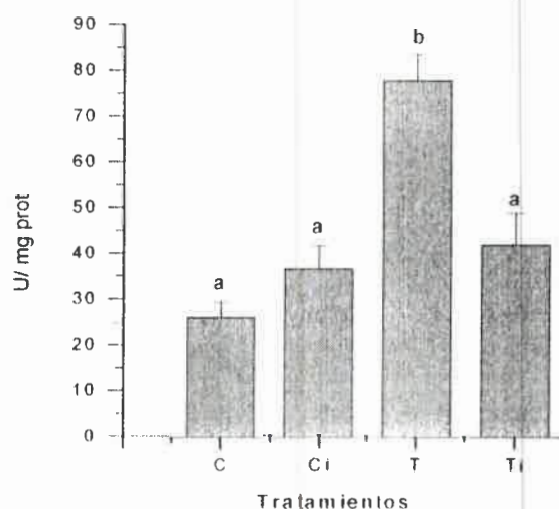


Figura 40: Determinación de la actividad catalasa en plántulas de trigo cultivadas en medio Hoagland e inoculadas con *Microbacterium sp*.

11 e) Determinación del contenido de iones Na^+ y K^+ en el interior de plántulas de trigo

Muchos de los esfuerzos por desarrollar plantas transgénicas se han centrado en la necesidad de una mayor compartimentalización del Na^+ dentro de las vacuolas y de esta manera mantener el citoplasma con menores concentración de iones.

También se ha postulado esta capacidad de compartimentalizar iones como una de las características indicadoras de tolerancia a la sal en la selección de cultivares o especies más tolerantes.

La determinación del contenido de iones Na^+ y K^+ se realizó en tallos y raíces ya que la respuesta a la presencia de iones es diferente en cada uno de estos órganos.

a) Contenido de iones Na^+ y K^+ y relación Na^+/K^+ en tallos de trigo

Los mecanismos de tolerancia a la sal a nivel celular en las plantas se relacionan en mantener a la misma fuera del citoplasma y contenerla en las vacuolas.

En trigo la tolerancia a la sal está asociada con una baja tasa de incorporación de Na^+ en tallos y mantener una alta selectividad del K^+ sobre el Na^+ (Munns *et al.*, 2002), o lo que es equivalente a mantener una relación Na^+/K^+ baja.

En la figura 41, que describe la acumulación de iones sodio en los tallos, se observa que las plántulas de trigo sometidas a estrés e inoculadas con *Microbacterium sp.* (Ti) presentan menor contenido de Na^+ interno que las estresadas sin inocular (T) y además que el contenido de Na^+ en estas plántulas no presenta diferencias con las controles no estresadas (C y Ci). Por otra parte, en la figura 42 se observa que el contenido de K^+ disminuye drásticamente en los dos tratamientos donde las plántulas están sometidas a estrés, esto es T y Ti independientemente de si han sido inoculadas o no. La disminución en el contenido de K^+ en condiciones de salinidad coincide con lo encontrado en trigo por Sairam *et al.*, (2002). Esta baja en el contenido del ión potasio en el interior de las células se debería a que no hay transportadores específicos para Na^+ si no que el mismo ingresa por competencia con otros cationes particularmente K^+ (Munns *et al.*, 2002).

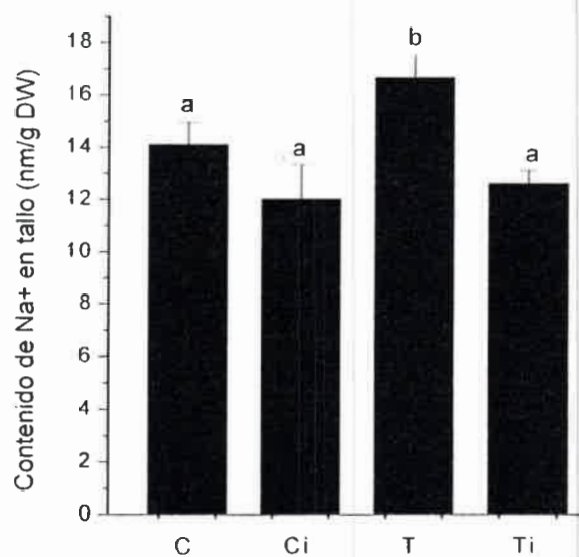


Figura 41: Contenido en tallo de Na^+ en nm/g de tejido seco. Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una \pm ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD ($p < 0,05$)

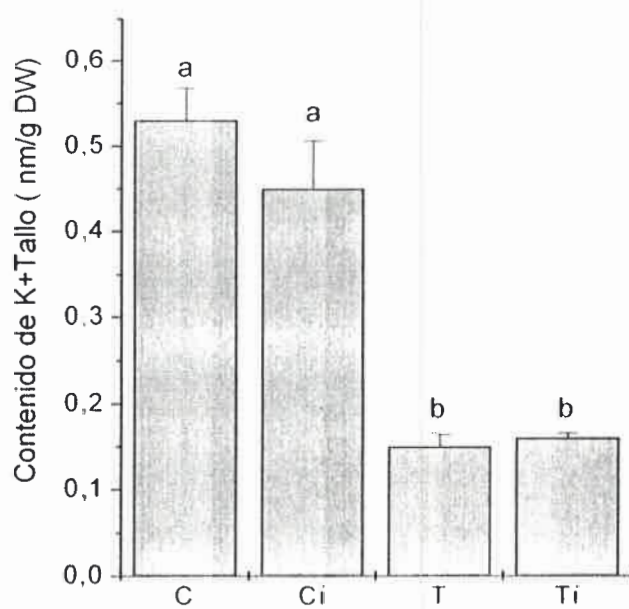


Figura 42: Contenido en tallo de K^+ en nm/g de tejido seco. Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una \pm ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD ($p < 0,05$).

Cuando la concentración externa de Na^+ es muy elevada, este ión puede bloquear a los transportadores de K^+ provocando una disminución del ingreso de este ión y un aumento del ingreso de Na^+ que a su vez ocasionaría una despolarización de la membrana seguida de eflujo de K^+ y en consecuencia, una reducción en la incorporación neta de este ión (Muhling y Lauchli, 2002).

La mayor o menor tolerancia a la sal va a depender de cuan efectivos sean los mecanismos de compartimentalización o exclusión de los iones Na^+ y Cl^- fundamentalmente a nivel del tallo. Por lo tanto una planta que muestre un contenido menor de Na^+ en su interior tendrá mayores posibilidades de supervivencia dado que sus funciones metabólicas podrán ser llevadas a cabo de un modo mas adecuado. Generalmente el Na^+ comienza a inhibir a la mayoría de las enzimas en concentraciones superiores a 100 mM (Munns *et al.*, 2002).

La relación Na^+ / K^+ también ha sido postulada como característica indicadora de tolerancia a la sal. Variedades de trigo sensibles a estrés salino muestran un relación mayor que aquellas variedades tolerantes (Sairam *et al.*, 2002). Una relación alta indica que las células poseen mayor cantidad de Na^+ en el interior y que el transporte de este ión ha interferido con la incorporación de K^+ y de persistir el estrés en el tiempo posiblemente se manifestarán los efectos de la toxicidad del ión sodio en el funcionamiento celular y en la planta entera. En nuestros resultados, se observa que la relación Na^+ / K^+ de tallo es máxima en aquellas plántulas sometidas a estrés que no han sido inoculadas y disminuye cuando las mismas son inoculadas (figura 43). Por lo que la inoculación favorece una disminución en el contenido de Na^+ y de la relación Na^+ / K^+ lo que permitiría a las plántulas tolerar las condiciones de estrés.

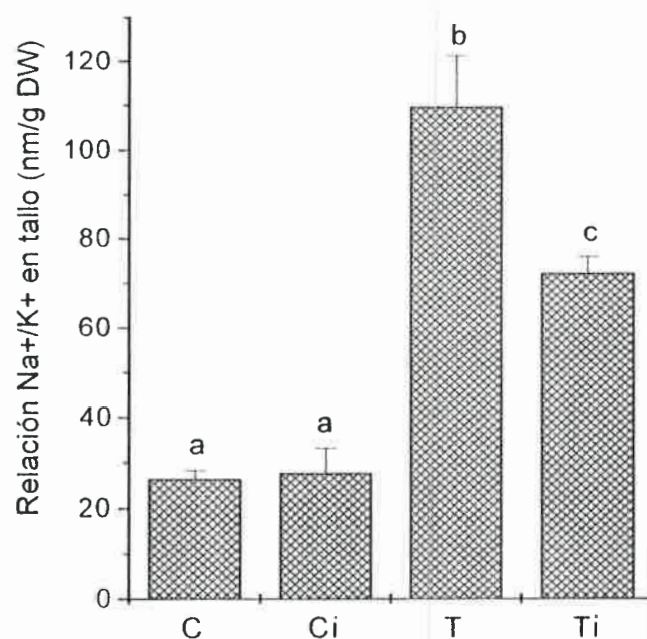


Figura 43: Relación Na⁺/K⁺ en tallo de trigo

Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una \pm ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD ($p < 0,05$)

b) Contenido de iones Na⁺, K⁺ y relación Na⁺/K⁺ en raíces de trigo.

Para el caso de las raíces, lo que se observa tanto en el contenido de Na⁺ como de K⁺, (figuras 44 y 45) es que existe una tendencia, a que en el caso de las plántulas sometidas a estrés inoculadas (Ti), posean menor cantidad de Na⁺ y mayor cantidad de K⁺ en su interior que aquellas plántulas estresadas que no fueron inoculadas (T). Sin embargo

nuevamente se observa una drástica disminución en el contenido de iones K^+ en aquellas plántulas sometidas a estrés (T) y (Ti).

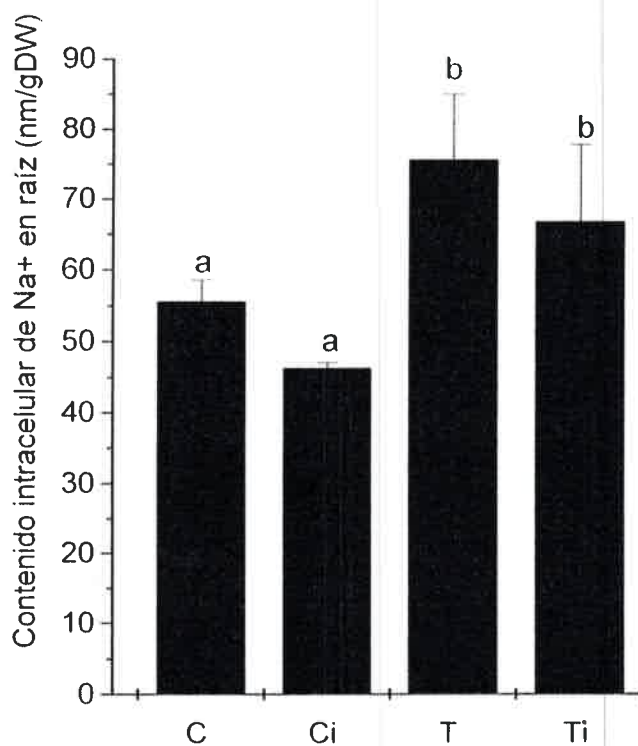


Figura 44: Contenido en raíz de Na^+ en nm/g de tejido seco. Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una \pm ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD ($p < 0,05$)

Saqib *et al.*, (2005) observaron en experimentos con trigo que aquellos genotipos que poseen una mayor expresión de los antiporters Na^+/H en las raíces y tallos, retienen mayor cantidad de Na^+ en la raíz y evitan que este ión llegue a los tallos logrando una mayor resistencia a la sal en términos de crecimiento absoluto y relativo del tallo.

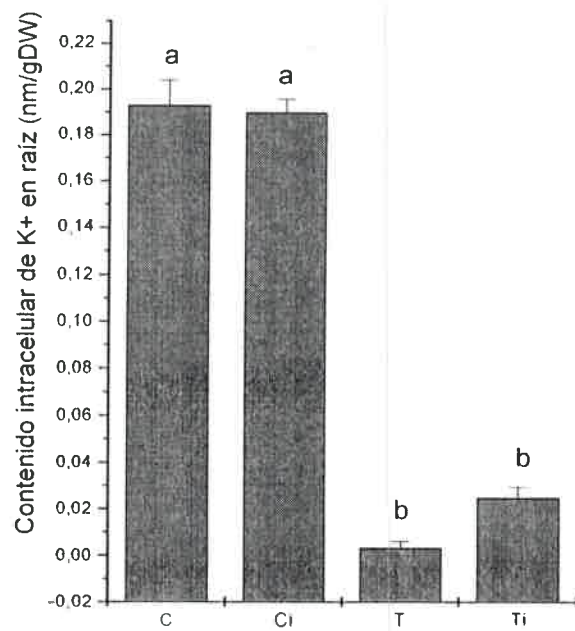


Figura 45: Contenido en raíz de K^+ en nm/g de tejido seco.

Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una \pm ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD ($p < 0,05$)

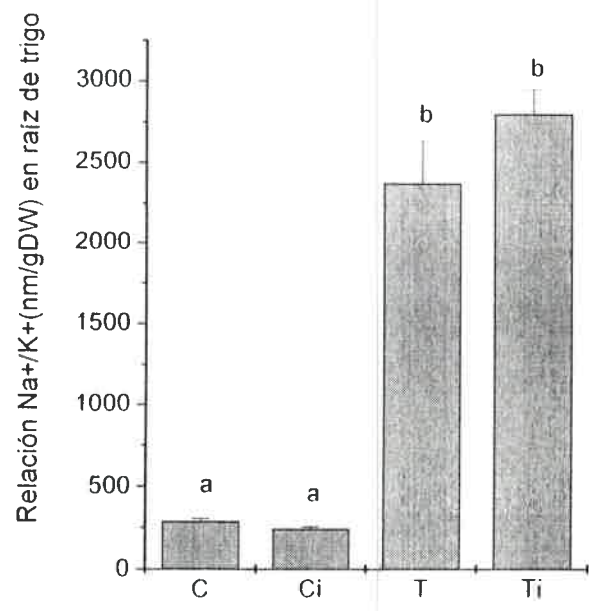
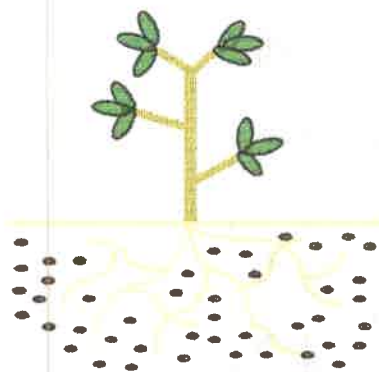


Figura 46: Relación Na⁺ / K⁺ en raíz de trigo

Los datos representan la media de tres determinaciones de tres plantas cada una ± ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas. ANOVA test LSD (p< 0,05)

Los resultados de concentraciones iónicas y relación Na⁺/K⁺ encontrados para raíz en comparación con los de tallo indicarían que en concentraciones de elevada salinidad (T9 y (Ti) las raíces poseen una concentración de iones similares pero la translocación hacia los tallos es lo que marcaría la diferencia de tolerancia. La translocación de Na⁺ hacia los tallos en las plántulas sometidas a estrés que han sido inoculadas (Ti) es menor y por lo tanto estas plántulas presentan una relación Na⁺ / K⁺ mas baja que las estresadas (T) y pueden sobrellevar mejor las condiciones de elevada salinidad.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Aislamiento de cepas nativas con potencialidades de PGPR tolerantes a estrés salino

Dentro de la gran variedad de géneros bacterianos que han sido utilizados como PGPR en inoculaciones a campo, el género *Rhizobium* ha sido el más extensamente empleado con el fin de establecer relaciones simbióticas con diversas especies de leguminosas para incorporar nitrógeno al suelo de un modo sustentable y económico.

También, con el mismo fin, han sido utilizadas especies de bacterias no simbióticas donde se destacan las bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Klebsiella*. El empleo de estas cepas está menos difundido que el de los rizobios y en muchos casos es necesario un estudio más profundo para determinar, las condiciones óptimas necesarias a campo para lograr una correcta colonización y asociación de los microorganismos con las especies vegetales involucradas.

El nivel óptimo y efectivo necesario de microorganismos introducidos en el suelo va a depender fundamentalmente de las condiciones ecológicas. Cuando los microorganismos introducidos son beneficiados por alguna ventaja ecológica selectiva (nutricional o espacial), presente en el suelo, se necesita menor densidad de células activas para que la aplicación sea eficiente y activa a lo largo del tiempo.

La selección de PGPR nativas y tolerantes a la sal, y su utilización como inoculantes en suelos con problemas de salinidad continuos o temporales, le proporcionaría una ventaja selectiva frente a otros microorganismos del suelo que no estén adaptados a dichas condiciones. En este sentido y mediante la utilización de agropiro alargado como huésped trampa y de tres muestras de suelo de Córdoba, se logró una colección de 80 aislamientos tolerantes a NaCl 1M. A partir de los estudios de los mismos, podemos concluir que los suelos de la provincia de Córdoba analizados, poseen una enorme diversidad bacteriana en cuanto a tipos y morfologías coloniales, así como también representan una fuente importante de bacterias tolerantes a elevadas concentraciones de sal con buenas potencialidades de PGPR en distintas condiciones.

De este conjunto de aislamientos se seleccionaron cuatro por presentar tres características de PGPR para continuar con estudios de caracterización e interacción con cultivos como trigo y soja.

También se seleccionó para su estudio un aislamiento proveniente del interior de plántulas de agropiro que presentó una elevada tolerancia a la sal, así como también un buen potencial de PGPR.

Estudios fisiológicos de las bacterias seleccionadas

Si bien la capacidad de crecer en distintas condiciones de salinidad de los 5 aislamientos seleccionados respondió a un patrón similar en todos los casos se presentaron diferencias especialmente cuando la salinidad asciende a valores elevados como 1M de NaCl.

En concentraciones de salinidad de 250 mM de NaCl, los aislamientos 86, 96,66 y 36 no presentaron diferencias con respecto a sus controles en cuanto a patrones de crecimiento mientras que *Microbacterium sp.* mostró un crecimiento superior al del control. Cuando la salinidad se incrementó a 1M NaCl, se observó en los aislamientos 86, 96, 66 y 36 un alargamiento de la fase de latencia y la fase estacionaria fue alcanzada a un valor de DO inferior a la encontrada en los controles. En el caso de *Microbacterim sp.* si bien hay una fase de latencia mayor, el crecimiento se recupera alcanzando los valores de DO del control prácticamente al mismo tiempo. Esta respuesta pone en evidencia un comportamiento netamente halofílico.

Microbacterium sp., representa un modelo de estudio sumamente interesante y dinámico, aunque complejo. El hecho de que sea un Gram positivo atípico, con peptidoglucano de tipo beta y alejado filogenéticamente de los otros géneros de Gram positivos más estudiados, dificulta mucho su estudio ya que no hay información de cuales herramientas moleculares podrían ser utilizadas para realizar estudios de mutagénesis y lograr así, una caracterización más completa.

Por otra parte tampoco fue posible cultivarlo en medios mínimos sin el agregado de una pequeña cantidad de peptona como fuente de nitrógeno. Ésta fue reemplazada, sin buenos resultados, por nitrógeno inorgánico y por numerosos aminoácidos que no fueron suficientes para el crecimiento.

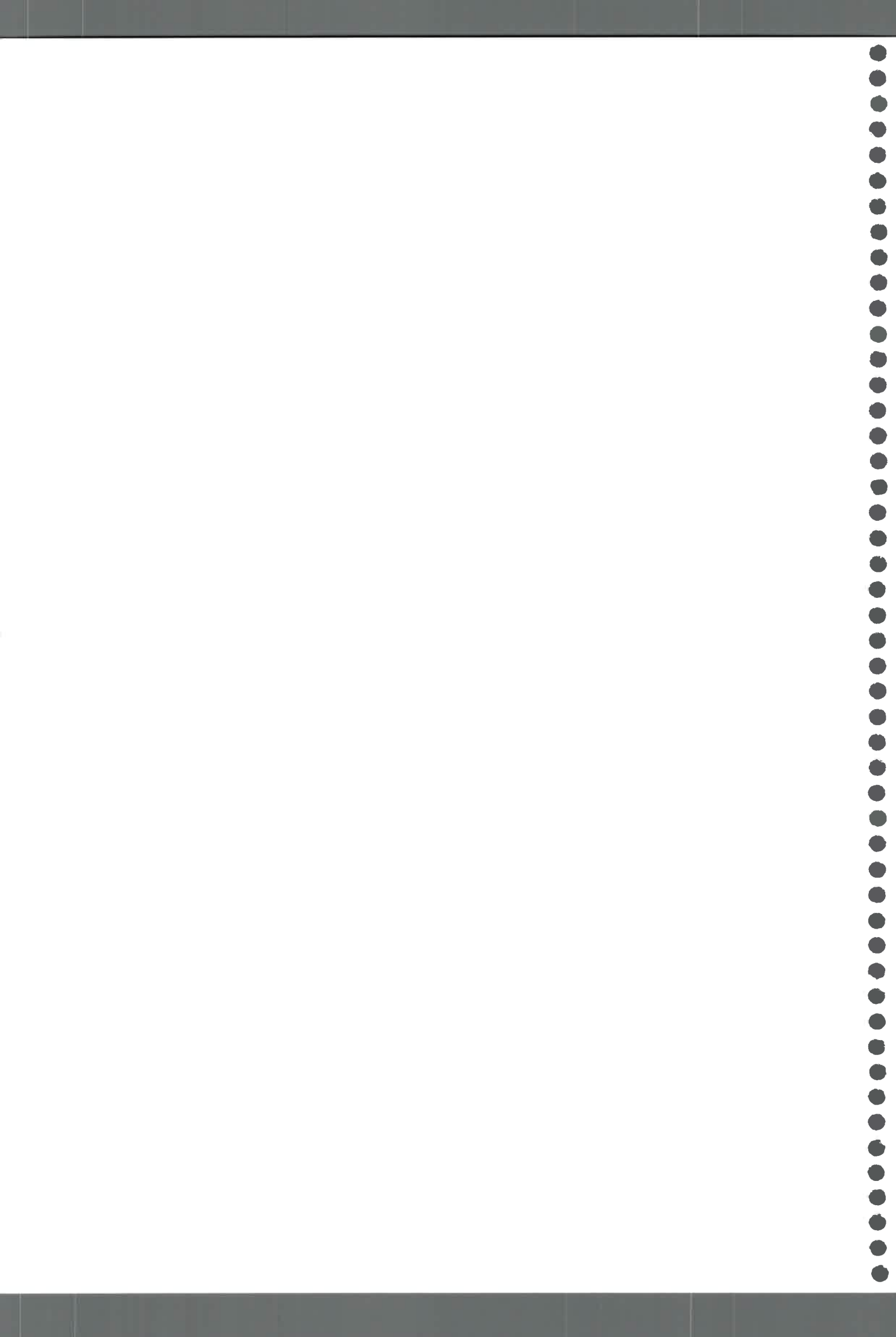
Su naturaleza endofítica lo hace "tentador" para estudios de biocontrol y promoción del crecimiento especialmente en condiciones de estrés ya que los endófitos tienen una ventaja competitiva frente a los microorganismos rizosféricos porque al estar en el interior de la planta, la competencia por los nutrientes es menor y además se encuentran protegidos por la misma.

Cuando se evalúa la tolerancia a otros tipos de estrés además del salino, *Microbacterium sp.* muestra ser altamente tolerante a estrés térmico y oxidativo, mientras que presenta una tolerancia diferente frente al estrés osmótico no iónico dado por PEG 8000, manitol o glicerol. En este caso, el crecimiento se ve severamente afectado cuando el osmolito empleado es PEG 8000 y menos afectado cuando se emplea glicerol o manitol.

La elevada tolerancia al estrés, especialmente a estrés oxidativo y salino, observada en *Microbacterium sp.* podría beneficiarlo para la supervivencia no solo cuando el microorganismo se encuentra en el interior de especies vegetales sometidas a estrés sino que también cuando se encuentra en el suelo, dado que en la naturaleza los agentes estresantes actúan simultáneamente y no de un modo aislado. Es razonable suponer que microorganismos que se encuentran en suelos rizosféricos, se vean sometidos a otros tipos de estrés además del causado por las sales a causa de la presencia de los exudados y sustancias de desecho que sean eliminados por las raíces.

Esta multiresistencia a distintos tipos de estrés podría estar asociada a la acumulación de trehalosa, disacárido que fue encontrado mediante TLC y GC, en el interior de células de *Microbacterium sp.* cultivadas en 400 mM NaCl y no fue encontrado en células controles que presentaban glucosa y manitol en su interior. La trehalosa ha sido ampliamente relacionada con la disminución de los efectos perjudiciales de condiciones estresantes (estrés oxidativo, hídrico, salino, térmico) en numerosos organismos.

Finalmente el microorganismo presenta un comportamiento netamente halofílico. Hay un incremento en los niveles de iones Na^+ y una disminución de los iones K^+ en el interior de sus células cuando crece en medios con elevada concentración de NaCl. Esto se



observa claramente en la relación Na^+/K^+ observada en condiciones de salinidad es más de tres veces superior a la encontrada para las células controles.

Estudios de interacción y promoción de crecimiento vegetal.

Los dos sistemas hidropónicos empleados permitieron observar el efecto que ejerce la elevada salinidad en las plántulas de manera diferente. En los experimentos en tubos conteniendo medio Hoagland, el efecto de disminución de crecimiento y clorosis en las plántulas, a causa de la salinidad, se observa a los 3 o 4 días de la transferencia de las semillas pregerminadas, mientras que en el sistema de soporte sólido, arena-perlita, este efecto se visualiza transcurridos entre 7 y 10 días de la transferencia de las semillas. Probablemente la diferencia observada se deba a que en el soporte sólido, las partículas de arena-perlita retengan las sales ejerciendo un efecto moderador de la salinidad en el medio.

Los recuentos de *Microbacterium sp.* a partir de plántulas de agropiro, trigo y soja, cultivados en condiciones controles y salinas, demuestran una íntima asociación microorganismo-planta. Aquellas plántulas sometidas a condiciones salinas, albergan mayor cantidad de microorganismos en el interior, especialmente en los tallos, tanto en el caso de la soja como en el de trigo.

Estas determinaciones, sumadas a los efectos de protección que se observan en experimentos en macetas en invernadero y en tubos, cuando las plántulas de trigo y soja son inoculadas con el microorganismo, indicarían la puesta en marcha de algún mecanismo de defensa de la planta frente al estrés despertado por el microorganismo o de algún mecanismo de la bacteria que hace que la planta no perciba al estrés como tal.

Determinación de los posibles mecanismos por los cuales Microbacterium sp. disminuye los efectos del estrés salino en plántulas de trigo.

Las plántulas de trigo y soja sometidas a estrés que han sido inoculadas muestran una apariencia mejor con una menor clorosis que aquellas plántulas que no han sido inoculadas. En el caso del trigo, también se observa un mayor número de hojas en las

plántulas estresadas e inoculadas en comparación con aquellas estresadas que no han sido inoculadas.

Hay un cambio cualitativo en el contenido de azúcares solubles que se encuentran en el interior de las plántulas de trigo, donde el patrón de azúcares presente en las plántulas estresadas que no han sido inoculadas (T), difiere del de aquellas estresadas que sí han sido inoculadas (Ti), teniendo estas últimas una composición de azúcares similar al de las plántulas controles (C) que no han sido sometidas a estrés.

De este modo la composición de azúcares solubles en plántulas de trigo en los distintos tratamientos es:

C: Manitol, Sacarosa, Glucosa y Fructosa

T: Manitol, Sacarosa, Glucosa, Fructosa y Trehalosa

Ti: Manitol, Sacarosa, Glucosa y Fructosa

La presencia de trehalosa en plántulas de trigo ha sido informada en condiciones de estrés salino, y ha sido vinculada con una alteración en la vía de señalización de partición de asimilados en las plantas, lo que causaría serios problemas fisiológicos y alteraciones morfológicas en diferentes especies.

La desaparición de la trehalosa en aquellas plántulas estresadas e inoculadas (Ti) podría ser explicada en base a que las plántulas, gracias a la inoculación, no están percibiendo al estrés como tal y por lo tanto la composición es cualitativamente similar a la de las controles. Esta hipótesis también se corrobora en los patrones de exudación encontrados en los diferentes tratamientos. Mientras que las plántulas estresadas que no fueron inoculadas (T) exudan sacarosa, fructosa, glucosa y manitol, las plántulas estresadas inoculadas (Ti) muestran un patrón de exudación similar al de los controles C y Ci que presentan manitol y pequeñas cantidades de fructosa.

Cuando se observa el contenido de iones en el interior de las plántulas de trigo, hay una tendencia a que aquellas plántulas estresadas que han sido inoculadas (Ti), presenten menor contenido de Na^+ en su interior, especialmente en los tallos en comparación con aquellas plántulas estresadas no inoculadas (T). Esto favorecería a estas plántulas dado que

Si tenemos en cuenta que el Na^+ es tóxico para el metabolismo celular interfiriendo con el funcionamiento de numerosas enzimas, que causa desbalances nutricionales por competencia con iones esenciales como el K^+ y que lleva a una disminución en la fotosíntesis, el hecho de que la inoculación con *Microbacterium sp* disminuya la concentración de este ión en el interior de las plántulas, aumenta las posibilidades de las mismas de sobrellevar los efectos del estrés salino.

Por último, si bien no es posible adjudicar la mayor tolerancia al estrés desencadenada por la inoculación con *Microbacterium sp*. a ninguno de estos mecanismos exclusivamente, estos cambios podrían ser resultados de modificaciones más importantes como por ejemplo, estimulación de vías de señalización o cambios hormonales que se desencadenan en respuesta a la inoculación.

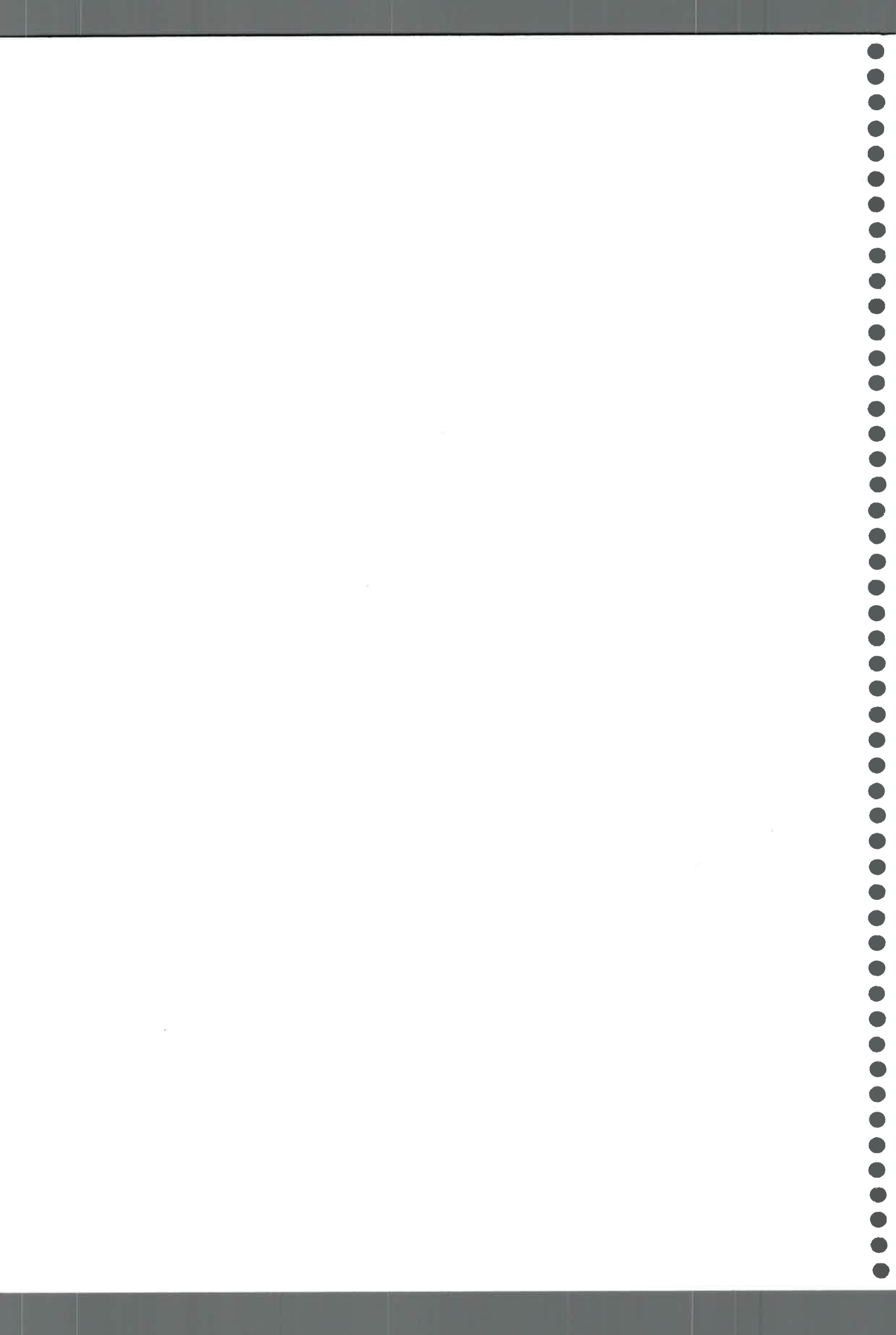
Dada la complejidad del sistema en estudio, es posible que no sea un solo mecanismo de protección el que se pone en juego, si no más bien un conjunto de señales entre el microorganismo y la planta que hagan de la relación un beneficio para ambos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

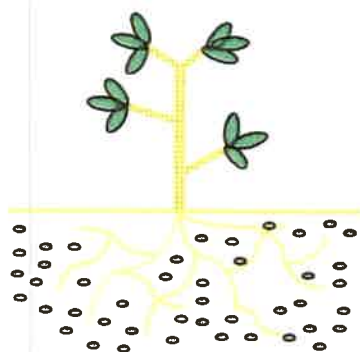
*Realizar estudios a campo en condiciones naturales, para determinar si se mantienen los efectos de protección frente a la salinidad, desencadenados por la inoculación de *Microbacterium sp*. en trigo y soja.

*Profundizar el estudio de aspectos fisiológicos de la interacción planta-bacteria para determinar si hay cambios en las principales hormonas asociadas al estrés como jasmonatos, etileno, ABA.

*Continuar con el estudio de caracterización molecular de *Microbacterium sp* especialmente de aquellos aspectos relacionados a la colonización y tolerancia a estrés.



BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- *Agarwal S., Sairam R., Srivastava G., Tyagi A., and Meena R. 2005. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Science*. 1-12
- *Ashraf M., and Harris P. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166:3-16.
- *Balota E., Lopes E., Hungria M., and Döbereiner J. 1997. Evaluation of indole acetic acid production by diazotrophic bacteria using a colorimetric method and HPLC. *Arq. Biol. Technol.* 40 (2):485-491.
- *Bártoli, C., Gómez F., Martínez D. and Guiamet J. 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.* 55:1663-1669.
- *Bartosz G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologia Plantarum*. 19: 47-64.
- *Bashan Y., and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- *Behrendt U., Ulrich A., and Schumann P. 2001. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphere* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51,1267-1276.
- *Bertin C., Yang X., and Weston L. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67-83.

- *Beumer R.R., Te Gijel, M.C., Cox, L.J., Rombouts, F.M. and Abee, T. 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1359-1363.
- *Bohn H., Mc Neal B., O'Connor G. 1993. *Química del suelo*. 1° edición. Noriega Editores. México.
- *Bohnert H., and Jensen R. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14: 89-97.
- *Boncompagni E., Osteras M., Poggi M. and Le Rudulier D. 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2072-2077.
- *Borsani O., Valpuesta V., and Botella M. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126:1024-1030.
- *Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., and Pharis R. 1989. Identification of gibberellins A1, A3 and iso A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90: 45-47.
- *Bowler C., and Fluhr R. 2000. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross tolerance. *Trends in Plant Science* 5: 241-245.
- *Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- *Bremer E. and Kramer R. 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: *Bacterial stress responses*. Storz G and Hengge - Aronis ed. ASM Press.

- *Brito Alvarez M., Gagné S., and Antoun, H. 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. *App. Environ. Microbiol.* 62: 194-199.
- *Burd G., Dixon G., and Glick B. 1995. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *App. Environ. Microbiol.* 64: 3663-3668.
- *Canovas D., Fletcher S., Hayashi M., and Csonka L. 2001. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar *thyphimurum*. *Journal of Bacteriology* 183: 3365-3371.
- *Cheeseman J. M. 1988. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87:547-550.
- *Chen C., Bauske, E., Musson G., Rodriguez-Kábana, R., and Kloepper J. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control* 5:83-91.
- *Chen C., Bélanger R., Benhamou, N. and Paulitz T. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Phytium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56:13-23.
- *Chester P. 2000. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram positive bacteria. In: *Bacterial stress responses*. Storz G., and Hengge - Aronis ed. ASM Press.
- *Cushman J., Meyer G., Michalowski C., Schmitt C., and Bohnert H. 1989. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of PEP case during CAM induction in the common Ice plant. *Plant Cell* 1:715-725.

*Dardanelli, M. 2001 Efectos de la hiperosmolaridad sobre *Rhizobium sp* y parámetros comprometidos en la interacción *Arachis hypogaea-Rhizobium sp*. Tesis Doctoral. UNRC.

*Dat J., Vandenbeeke S., Vranova E., Van Montagu M., and Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.

*de Bruxelles G., Peacock W., Dennies E., and Dolferus R. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 111:381-391.

*Dennis P., and Schimmin L. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:90-104.

*Dimock J., Beach R. and Carlson P. 1988. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents. In *Biotechnology, biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management*. Edited by D., Roberts and R., Granados. Boyce Thompson institute for Plant Research Ithaca, N.Y. pp.88-92.

*Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., and Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in AIA production on wheat. *Plant Soil* 212:155-164.

*Dobbelaere S., Vanderleyden J., and Okon J. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22,107-149.

*Döbereiner J. 1989. In: *Nitrogen fixation with non-legumes*, 103-108. Ed. by Skinner, Boddey and Fendrik; Kluwer Academic Publishers.

*Dvorák J., Edge, M. and Ross K. 1988. On the evolution of the adaptation of *Lophophyrum elongatum* to growth in saline environments. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 85: 3805-3809.

- *Elbein A., Pan Y., Pastuszak I., and Carroll D. 2003. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- *El-Bashiti T., Hamamci, H., Oktem, H. and Yucel, M. 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science* 169:47-54.
- *Epstein W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 73-78.
- *Fajon,C., Schaefer,H., Cauwet,G., Godon,J.J., Muyzer,G., Stackebrandt,E., Wassman,P. and Lebaron,P. High phylogenetic diversity among marine bacterial strains with glucosidase and aminopeptidase enzyme activities from the Adriatic Sea (Trabajo no publicado).
- *Fan T., Lane A., Shenker D., Bartley M., Crowley J. and Higashi R. 2001. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* 57:209-221.
- *Fischer S., Rivarola,V., and Mori, G. 2000. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. *Plant and Soil* 225: 187-191.
- *Frioni, L. 1990. Ecología microbiana del suelo. Universidad de la República. Montevideo Cap. 20, 497.
- *Frommel M., Nowak, J. and Lazarovits G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *Tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant. Physiol.* 96: 928-936.

- *Fulchieri M., Lucangeli C. and Bottini R. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 1305-1309.
- *Galinski E. 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: Molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.
- *Galinski E. and Truper H. 1994, Microbial behavior in salt stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:95-108.
- *Ganesan V., and Thomas G. 2001 Salicylic acid response in rice: Influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Sci.* 160: 1095-1106.
- *Garham J.; Hughes L. and Wynjanes R. 1981. Low molecular weight carbohydrates in some salt stressed plants. *Physiol. Plant.* 53:27-33.
- *Garg A., Kim J. Owens T., Ranwala A., Choi Y., Kochian L. and Wu R. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (99) 25: 15898-15903.
- *Genard H., Le Saos J., Hillard J., Tremolieres A. and Boucaud J. 1991. Effect of salinity on lipid composition, glycinebetaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*. *Plant. Physiol. Biochem.* 29: 421-427.
- *Gill P.; Sharma A.; Singh P. and Bhullar S. 2001. Effect of various biotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. *Bulg. J. Plant Physiol* 27: 72-84.
- *Giraudat J., Parcy, N., Bertauche, F., Gosti, J., Morris P., Bouvier-Durand, M and Vartanian N. 1994. Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1557-1577.

- *Glick B., Karaturovic P., and Newell A. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *pseudomonads*. *Can J. Microbiol.* 41: 533-536.
- *Glickmann E. and Dessaux Y. 1995. A critical Examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 61:793-796.
- *Goddjin O and van Dun K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant. Sci.* 4:315-319.
- *Gómez Cadenas A., Tadeo F., Primo Millo E., and Talom M. 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus plants. *Plant Physiol.* 103:475-484.
- *Gómez Cadenas A., Arbona V., Jacas J., Primo Millo E., and Talom M. 2002. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *J. Plant. Growth Regul.* 21:234-240.
- *Gonzalez-Hernández J. y Peña A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismo halófilos y *Debaryomises hansenii*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44 (3-4): 137-156.
- *Goude R., Renaud S., Bonnassie S., Bernard T. and Bianco C. 2004. Glutamine, glutamate and α -glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6535-6541.
- *Gouffi K., Pica N., Pichereau V and Blanco C. 1999. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1491-1500.

- *Hall J., Peirson D., Ghosh S. and Glick B. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. Israel. J. Plant Sci. 44:37-42.
- *Hallmann J., Kloepper J., Rodriguez-Kábana R. and Sikora R. 1995. Endophytic rhizobacteria as antagonistic of *Meloidogyne incognita* on cucumber. Phytopathology 85:1136.
- *Hallman J., Quadt-Hallmann, W., Mahaffee, W. and Kloepper J. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol 43:895-914.
- *Hoagland D and Arnon D. 1950. Water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 347.
- *Hoffland E., Pieterse C. and Van Pelt J. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 46:309-320.
- *Hogarth P J., 1999. The biology of Mangroves. Oxford University Press, New York.
- *Hong Yang C., and Crowley, D. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. Appl. Environ. Microbiol. 66: 345-351.
- *Hua S., Tsai V., Lichens G. and Noma A. 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. Appl. Environ. Microbiol. 44:135-140.
- *Janda T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effects of chilling injury in maize (*Zea mays*) plants. Planta 208: 175-180.

*Jarsún B., Gorgas J., Zamora E., Bosnero E., Lovera E., Ravelo A., y Tassile J. 2003. Los suelos. Agencia Córdoba D.A.C y T.S.E.M e INTA- Manfredi .

*Jetiyanon K., Tuzun S. and Kloepper J. 1997. Lignification, peroxidase and superoxidase dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR-mediated induced systemic resistance. In: Ogoshi A, Kobayashi K., Homma Y., Kodama F and Akino S., eds. Plant growth promoting rhizobacteria: Present status and future prospects. Japan: Sapporo, 265-268.

*Jiang M. and Zhang J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant. Cell Physiol. 42:1265-1273.

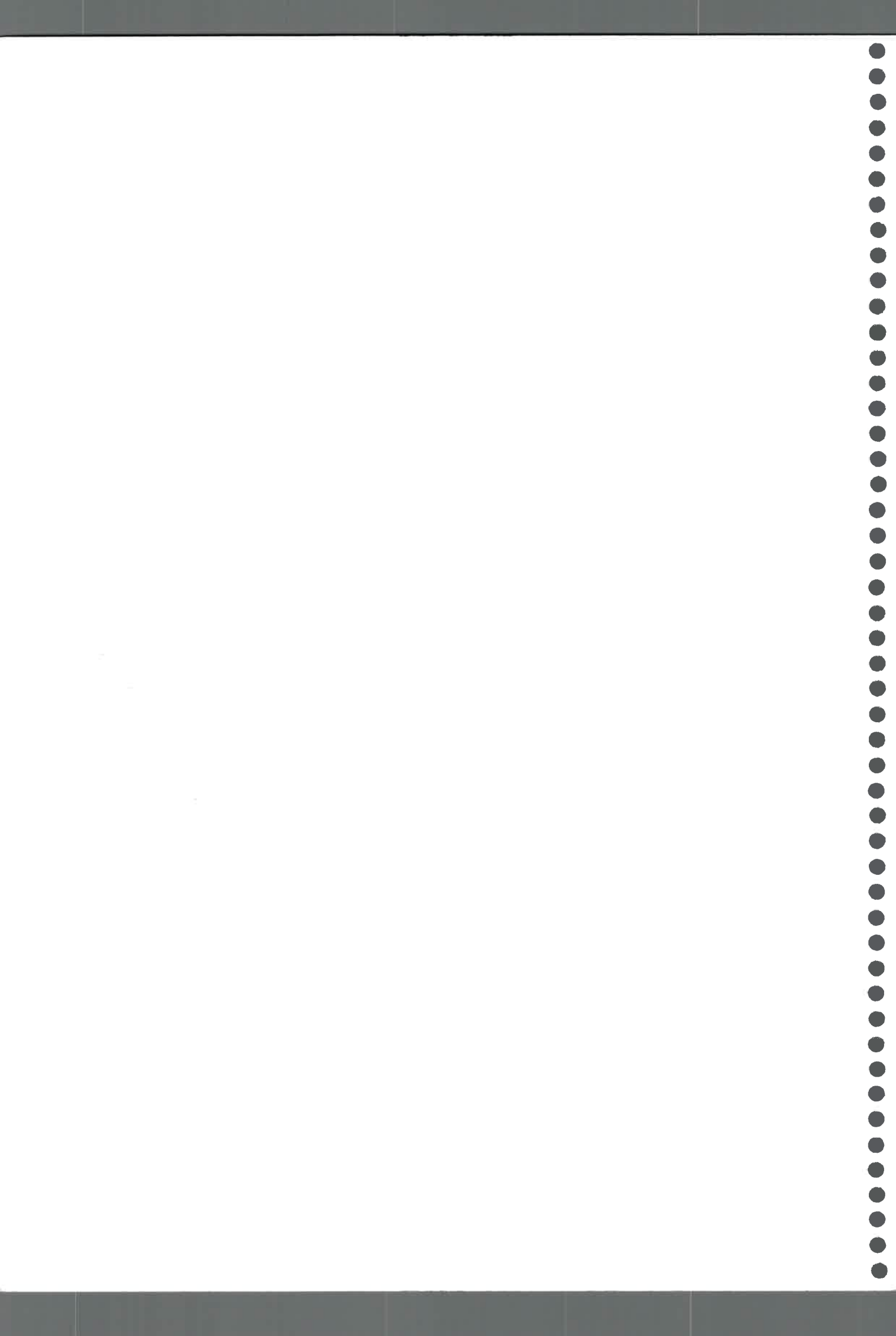
*Jiang M. and Zhang J. 2002 Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. Free Radical Res. 36:1001-1015.

*Jofré. E., Fischer S., Rivarola V., Balegno H., and Mori G., 1998-a. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. Can. J. Microbiol. 44:416-422.

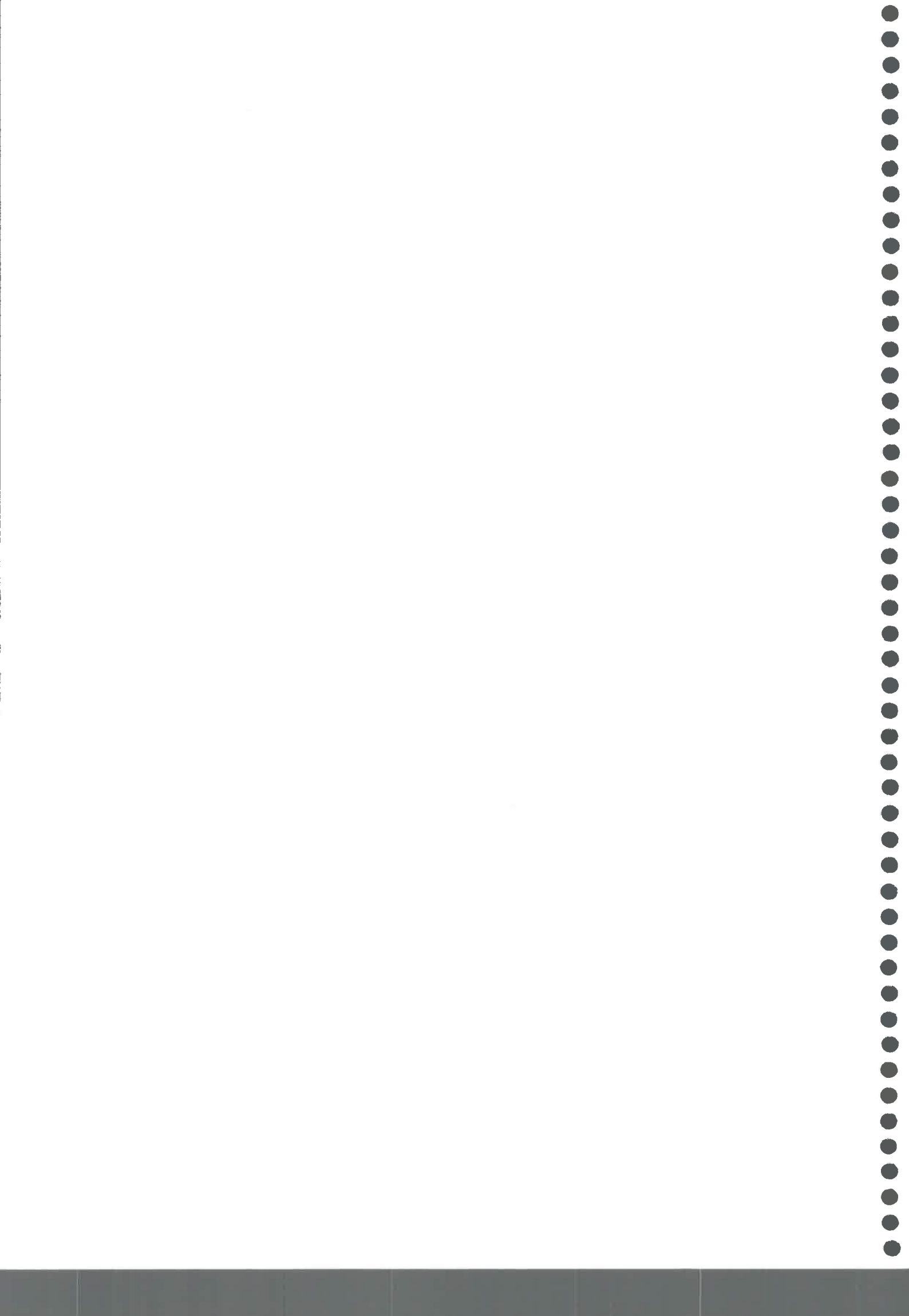
*Jouve L; Hoffman L. and Hausman F. 2004. Polyamine, carbohydrate and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): Involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. Plant Biology 6:74-80.

*Kempf B. and Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. 170:319-330.

*Kets E.P.W., Galinski E.A. and de Bont J.A.M. 1994. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. Arch. Microbiol. 162: 243-248.

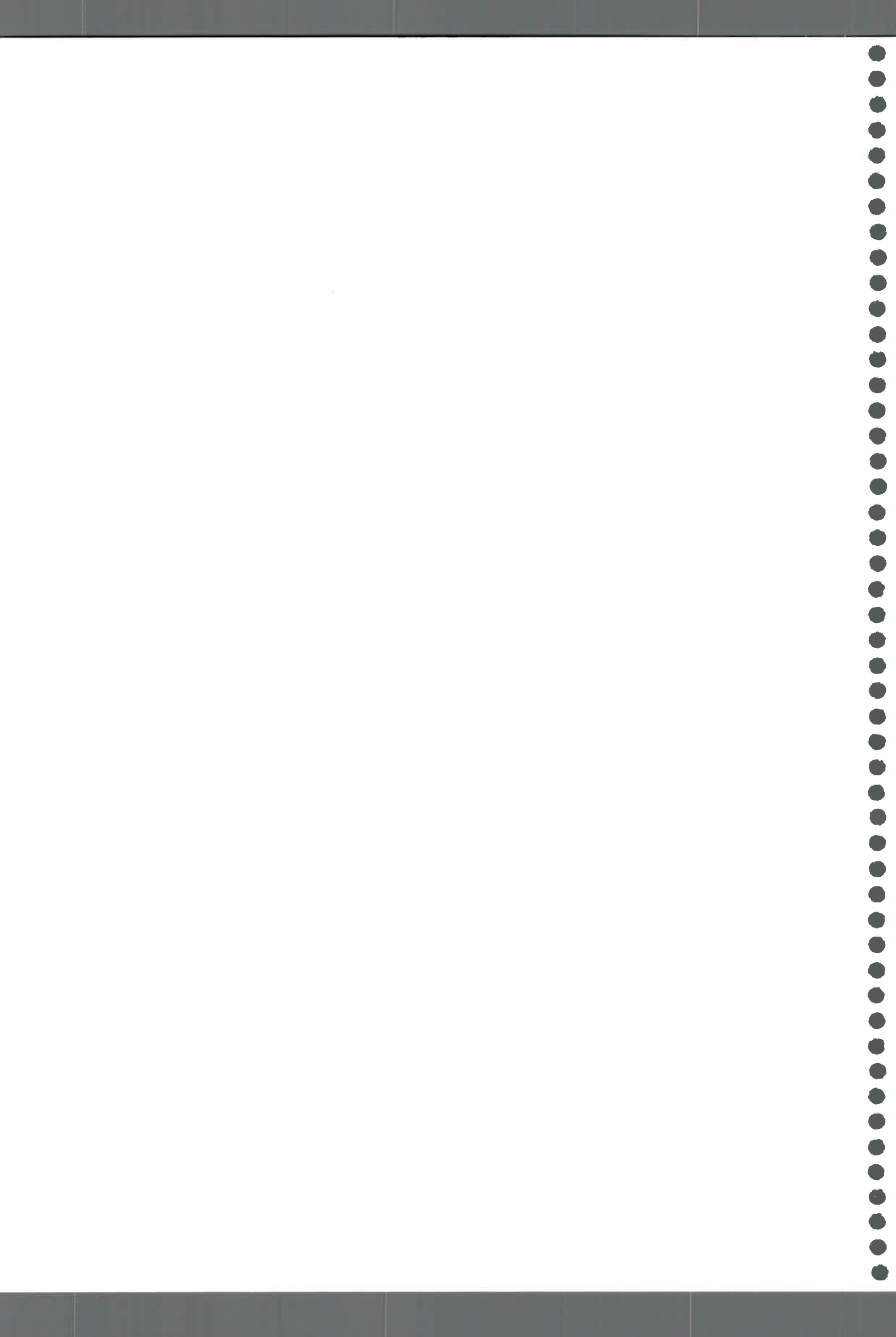


- *Kets E., de Bont J. and Heipierper H. 1996. Physiological response of *Pseudomonas putida* S12 subjected to reduced water activity. FEMS 139:133-137.
- *Khatkar D and Kuhad M. 2000. Short term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. Biol. Plant. 43:629-632.
- *Kloepper J., Zablotowicz R., Tipping E. and Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: The rhizosphere and plant growth. D Keister and P. Gregan Eds. Pp315-326. Printed in Netherlands.
- *Kloepper, J., Tuzun, S. and Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Sci. Technol. 2:349-351.
- *Kushner DJ. 1978. Life in high salt and solute concentrations. In: Kusnner DJ (ed) Microbial life in extreme environments. Academic Press. London, pp 317-368.
- *Landa B., Mavrodi D., Thomashow L., and Wéller D. 2003. Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 93:982-994.
- *Lanyi J., 1974. Salt dependent properties of proteins from extreme halophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 38: 272-290.
- *Lee D., KimY. and Lee C. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in rice (*Oryza sativa*) J. Plant. Physiol. 158: 737-745.
- *Le Rudulier D., Strom A., Dandekar A., Smith L. and Valentine R. 1984. Molecular biology of osmoregulation. Science. 224:1064-1068.
- *Levitt J., 1980. Responses of plant to environmental stress chilling freezing and high temperature stresses, second edition. Academic press, New York.



- *Mansour M. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.* 43:491-500.
- *Martins L., Huber R., Huber H., Stetter K., da Costa M. and Santos H. 1997. Organic solutes in hyperthermophilic archaea. *App. Environ. Microbiol* 63:896-902.
- *Mayak S., Tirosh T., and Glick B. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science.* 166:525-530.
- *Measures J C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature (Lond)* 257:398-400.
- *Meyer J., Azelvandre P. and Georges C. 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biofactors* 4:23-27.
- *Miller K and Wood J. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:101-136.
- *Milner J; Silo-Suh L; Lee,J; He, H and Handelsman, J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3061-3065.
- *Mittova V., Tai M., Volokita M. and Guy M. 2002. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt tolerant wild tomato species *Lycopersicon pannellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115: 393-400.
- *Mittova V., Tai M., Volokita M. and Guy M. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative system in response to salt induced oxidative stress in the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pannellii*. *Plant Cell. Environ.* 26: 845-856

- *Morris L., 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107: 254-255.
- *M'Piga P., Belanger R., Paulitz T and Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50, 301-320.
- *Muhling K and Lauchli A. 2002 Effects of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J.Plant Physiol.* 159:137-146
- *Müller J., Wiemken and Aeschbacher R. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development *Plant. Sci.*147:37-47.
- *Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25:239-250.
- *Muuns R., Husain S., Rivelli A., James R., Condon T., Lindsay M., Lagudah E., Schachtman D and Hare R. 2002 Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* 247: 93-105
- *Neill S., Desikan R., Clarke A., Hurst R., and Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 372:1237-1247.
- *Ongena M., Daay F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T., Cornelis P., Koedam N. and Bélanger R. 1999. Protection of cucumber against *Phytophthora* root rot by fluorescent pseudomonads; Predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology* 48: 66-76.
- *Oren A, 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63: 334-348.



- *Parida K. and Das A. 2004 Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 1-24
- *Pattanapitpaisal P., Brown N., and Macaskie L. 2001. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnology letters* 23:61-65
- *Pedrazzini H., Racagni G., Alemano S., Taleisnick E., Machado E., Abadala G. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* 41: 149-158
- *Persello- Cartieaux F., Nussaume L., and Robaglie C. 2003. Tales from the underground: Molecular plant rhizobia interactions. *Plant Cell Environ.* 26:189-199.
- *Pichereau V., Hartke A. and Auffray 2000. Starvation and osmotic stress induced multiresistances influence of extracellular compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 55:19-25.
- *Pieterse C., Van Wees S., Hoffland E, Van Pelt J. and Van Loon LC. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is in-dependent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene ex-pression. *Plant Cell* 8:1225-37.
- *Ping L. and Boland W. 2004 Signals from the underground: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9:263-266.
- *Pocard J., Smith G., Smith L., and Le Rudulier D. 1994. A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB 70 to osmotic stress. *J Bacteriol.* 176:531-537.
- *Prado F., Boero M., Gallardo J. and Gonzales A. 2000. Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* wild seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41:27-34.

- *Raaijmakers, J; Weller D and Tomashow, L. 1997 Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas spp.* In natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:881-887.
- *Rabe B. 1990. Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen containing compounds. *J. Hort. Sci.* 65:231-243.
- *Rao M., Paliyath G., Ormrod, D., Murt, D. and Watkins C. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂ metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115:137-149.
- *Reiter B., Pfeifer U., Schwab H. and Sessitsch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2261-2268.
- *Rivarola V., Castro S., Mori G., Jofré E., Fabra A., Garnica R and Balegno H. 1998. Response of *Azospirillum brasilense* Cd to Sodium Chloride Stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:255-261.
- *Roberts D., Dery P., Yucel I., Buyer J., Holtman M. and Kobayashi D. 1999. Role of pfk A and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2513-2519.
- *Robinson S. and Jones J. 1986. Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustments during salt stress. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13:659-668.
- *Roeßler M. and Müller V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences 2001. *Environmental Microbiology* 3(12) 743-754.
- *Ryu C., Farag M., Hu C, Reddy M., Wei H., Pere P. and Kloepper J. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4927-4932.

*Sairam R., Veerabhadra R., and Srivastava G. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163: 1037-1046.

*Saqib M., Zórb C., Rengel Z. and Schubert S. 2005. The expression of the endogenous vacuolar Na⁺ /K⁺ antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) *Plant. Sci.* 169:959-965.

*Schwyn B and Nilands J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.

*Shannon M., 1998. Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron.* 60:75-119.

*Shiratsu K., Nakajima H., Rajashekar K., Dixon R. and Lamb C. 1997. Salicylic acid potentates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signal in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9:261-270.

*[www. Sigmaaldrich.com/img/18160/catalase](http://www.Sigmaaldrich.com/img/18160/catalase)

*www.sagpya.gov.ar

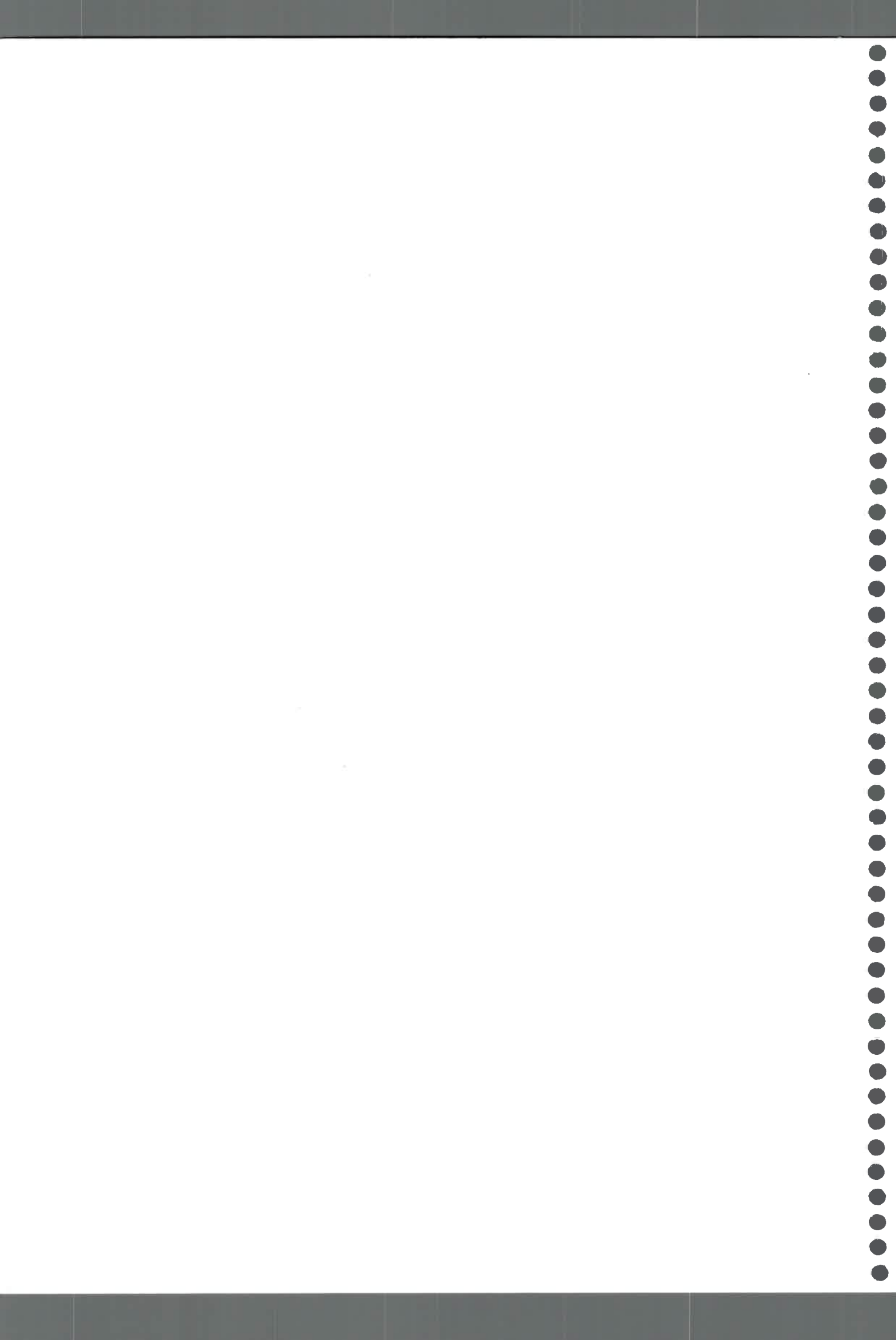
*Singh S., Sharma H., Goswami A., Datta S. and Singh S.2000. In vitro growth and leaf composition of grapevines cultivars as affected by sodium chloride. *Biol. Plant.* 43:283-286.

*Singh S.; Sinha R and Hader D. 2002. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool.* 41; 297-308.

*Sleator R., and Hill C. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:49-71.

- *Soussi M., Ocaña A. and Llunch, C. 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea. *J. Exp. Bot.* 325: 1329-1337.
- *Sturz, A. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Soil* 175:257-263.
- *Suprasanna P. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8: 355.
- *Surette M., Sturz A., Rajasekaran L. and Nowak J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 253:381-390.
- *Talibar R., Le Henaff M., Bernard T. and Wroblewski H. 1990. Identification of bacterial periplasmic glycine betaine binding protein after electrophoresis and affinity labeling. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 21:155-164.
- *Tarrand J., Krieg R. and Döbereiner J. 1978. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* Sp.nov. *Can. J. Microbiol.* 39: 219-286.
- *Timmusk S., and Wagner E. 1999. The plant growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymixa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12:951-959.
- *Tu, J 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 61:231-239.
- *Van Loon, L. and Bakker, P.A.H.M. 2003. Signalling in rhizobacteria-plant interactions. *Ecological studies.* 168:297-330.

- *Van Peer R., Punte H., de Weger L. and Schipperes B. 1990. Characterization of roots surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2462-2470.
- *Varnam A., and Evans M. 2000. *Environmental Microbiology*. Manson Publishing.
- *Vorobjeva L. 2003. Stressors, stress reactions and survival of bacteria: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40:217-224.
- *Whatmore M., Chudek A. and Reed R.H. 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2527-2535.
- *Weimberg R., Lerner H. and Poljakoff-Mayber A. 1984. Changes in growth and water soluble solute concentrations in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium. *Physiol. Plant.* 62:472-480.
- *Weisburg W., Barns S., Pelletier D., and Lane D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- *Welsh D., and Herbert R. 1999. Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters.* 174:57-63.
- *Whipps J. 1990. Carbon economy .In the rhizosphere. Ed. J M Linch. Pp59. Wiley and Son. Chichester UK.
- *Whipps J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.



*Wu J. L.; Seliskar D. and Gallagher J. 1998. Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*; impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiol. Plant.* 102:307-317.

*www.usssl.ars.usda.gov

*Yang W., Rich, P., Axtell, J., Wood, K., Bonham C., Ejeta, G., Mickelbart D and Rhodes D. 2003. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. *Crop. Sci.* 43:162-169.

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

*Zinniel D., Lambrecht P., Harris B., Feng Z., Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru A., Berletta R., and Vidaver A. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2198-2208.

*Zhu J., and Meinzer F. 1999. Efficiency of C-4 photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:79-86.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



62178

62178