

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR

"Estudios básicos en las señales de comunicación
mutualista entre *Arachis hypogaea* (maní) y bacterias
asociadas, aplicables en la tecnología de inoculantes"

FUMERO, MARIA VERONICA
DARDANELLI, MARTA SUSANA
MEDEOT, DANIELA BEATRIZ

Trabajo Final de Grado para acceder al Título de Microbióloga:

*“Estudios básicos en las señales de comunicación mutualista entre *Arachis hypogaea* (maní) y bacterias asociadas, aplicables en la tecnología de inoculantes”*

FUMERO, M. VERONICA

Alumna

DARDANELLI, MARTA S.

Directora

MEDEOT, DANIELA B.

Co- Directora

TRIBUNAL:

Dra. BENSI, NORA

Dr. BOGINO, PABLO

Dra. DARDANELLI MARTA

UNRC. Febrero, 2012

"No creas lo que tus ojos te dicen. Solo muestran limitaciones. Mira con tu entendimiento, descubre lo que ya sabes, y hallarás la manera de poder volar mejor"

Juan Salvador Gaviota. Richard Bach.
Escritor y aviador estadounidense.



AGRADECIMIENTOS

A la UNRC, en especial al Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales por permitirme realizar este Trabajo.

A “Vicky” Dardanelli y Dani Medeot, por toda la paciencia, colaboración, confianza y ayuda.

A Nati Paulucci, la “co- co- directora” que cualquier aprendiz desearía tener, gracias por tu presencia y colaboración incondicional.

A los integrantes del Laboratorio 17, Mirta García, Miguel Bueno, Mariela Woelke, Natalia Paulucci, Yanina Reguera, por todos los gratos momentos y todas las “veroaventuras” compartidas.

A Pablo B. y Nora B., cuyos aportes han sido muy significativos para el presente Trabajo. Gracias por la buena predisposición y la dedicación en la tarea de observar cada detalle.

A mi familia, por aconsejarme seguir el camino de ser una “profesional”, y confiar en mí para llevar a cabo esta tarea; tarea que tan determinante resultará para mi vida... ¡¡Un enorme gracias!!

A mis amigos y compañeros microbios, y a todas las personas que hicieron posible alcanzar este objetivo tan importante en mi vida.

Un especial agradecimiento a Silvi G., Juli L., Aye G., Silvi A. Agu G., Nerea M., Luci D., Ceci F., Romi C., Gabi R., Vicky O., Aye T., Majo B., por estar en lo cotidiano, por la convivencia, por ser la pata de palo que nunca faltó, por saber cómo aplacar momentos de tanta ansiedad... ¡¡Qué hermosos fueron estos años con cada una de ustedes!!

INDICES

Índice General

INDICES

Índice General.....	8
Índice de Abreviaturas.....	12

RESUMEN

Resumen.....	16
--------------	----

I. INTRODUCCION

I.1. Contexto.....	20
I.2. El maní en Argentina: una economía regional.....	21
I.2.a. El maní.....	22
I.2.b. El cultivo de maní.....	24
I.3. La Rizósfera.....	26
I.3.a. Fijación Biológica de Nitrógeno.....	26
I.3.b. La simbiosis rizobio-leguminosa.....	27
I.3.c. Promoción de Crecimiento Vegetal por Rizobacterias.....	30
I.3.d. El género <i>Azospirillum</i>	31
I.3.e. Biofertilizantes bacterianos.....	32
I.4. El problema de la salinidad.....	33
I.5. Rizodeposiciones.....	34

II. HIPOTESIS

Hipótesis.....	41
----------------	----

III. OBJETIVO

Objetivo.....	43
---------------	----

IV. MATERIALES Y METODOLOGIA

IV.1. Microorganismos.....	45
IV.2. Medios de cultivo.....	45
IV.2.a. Medio YEM (Somasegaran y Hoben, 1994).....	45
IV.2.b. Medio Mínimo NFB (Estévez Amador, 2007).....	45
IV.3. Parámetros fisiológicos microbianos.....	46
IV.3.a. Crecimiento bacteriano.....	46

IV.3.b. Viabilidad celular.....	47
IV.3.c. Cálculo de parámetros de crecimiento microbiano.....	48
IV.4. Producción de rizodeposiciones de maní.....	48
IV.4.a. Medio de germinación de semillas de maní.....	48
IV.4.b. Medio de crecimiento de plantas de maní.....	49
IV.4.c. Obtención de rizodeposiciones de maní.....	50
IV.4.d. Diseño de los tratamientos aplicados.....	51
IV.5. Parámetros de crecimiento de plantas de maní.....	53
IV.5.a. Peso Seco de Tallo y Peso Seco de Raíz.....	53
IV.5.b. Índice Raíz/Parte Aérea.....	53
IV.6. Investigación molecular de las rizodeposiciones.....	53
IV.6.a. Preparación de la muestra.....	53
IV.6.b. Análisis moleculares.....	54
IV.6.b.i. Ácidos grasos.....	54
IV.6.b.ii. Auxinas.....	55
IV.6.b.iii. Aminoácidos.....	55
IV.6.b.iv. Flavonoides.....	56
IV.7. Análisis estadístico.....	56
V. RESULTADOS	
V.1. Parámetros de crecimiento de microorganismos rizosféricos.....	58
V.2. Parámetros de crecimiento de la planta de maní.....	64
V.3. Composición molecular de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i>	72
V.3.a. Estudio de ácidos grasos de rizodeposiciones de maní.....	72
V.3.b. Estudio de moléculas señales de rizodeposiciones de maní.....	83
V.3.b.i. Estudio de ácido indol acético.....	83
V.3.b.ii. Estudio de triptófano.....	84
V.3.b.iii. Estudio de flavonoides.....	86
VI. DISCUSION	
VI.1. Estudio Preliminar.....	95
VI.2. El cultivo de maní.....	96
VI.3. Rizodeposiciones de maní.....	98
VI.3.a. Limitaciones metodológicas.....	98

VI.3.b. Valor de acidez (pH) de las rizodeposiciones.....	99
VI.3.c. Análisis de la presencia de ácidos grasos.....	99
VI.3.d. Análisis de ácido indol acético y triptófano.....	106
VI.3.e. Análisis de la presencia de flavonoides.....	108
VII. CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	115
VIII. BIBLIOGRAFIA	
Bibliografía.....	118
IX. ANEXOS	
IX. Anexo I.....	136
IX. Anexo II.....	137

Índice de Abreviaturas

AG	Ácido graso
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AIA	Ácido indol acético
ANOVA	Análisis de la Varianza (<i>Analysis of Variance</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
BIOFAG	Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente
bv.	Biovariedad
C	Carbono
°C	Grado Centígrado
Cm	Centímetro
Co.	<i>Company</i>
col.	Colaboradores
c.s.p	Cantidad suficiente para
cv.	Cultivar
DE	Desviación estándar
DO	Densidad Óptica
e-	Electrón
Ext.	Extracto
FAME	Metil-éster de ácido graso (<i>Fatty Acid Methyl Esther</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<i>Food and Agriculture Administration</i>)
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
g	Tiempo de Generación
GC	Cromatografía de Gases (<i>Gas Chromatography</i>)
ha	Hectárea
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ O (d)	Agua destilada
H ₂	Hidrógeno
H ⁺	Protón
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (<i>High</i>

Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRPA	Índice Raíz/Parte Aérea
It	<i>Infection thread</i> (Hilo de infección)
JA	Ácido Jasmónico
kg	Kilogramo
LCO	Lipo-quitín oligosacáridos (Factores Nod)
ln	Logaritmo natural
LSD	Mínima Diferencia Significativa (Least Significant Difference)
M	Molar
MeJA	Metil jasmonato
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Nitrógeno
N ₂	Nitrógeno molecular
ND	No detectado
ng	Nanogramo
NH ₃	Amoníaco
NH ₄ ⁺	Amonio
NaCl	Cloruro de sodio
NifTal	Nitrogen Fixation by Tropical Agriculture Legumes (Instituto de Fijación de Nitrógeno para Leguminosas Tropicales, Univ. de Hawaii)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica, EEUU)
nm	Nanomolar
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)
pH	Logaritmo decimal negativo de la actividad molar de los iones H ⁺
Pi	Fosforo inorgánico
PSPA	Peso seco de la parte aérea
PST	Peso seco de tallo
PSR	Peso seco de raíz

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Ion hidroxilo
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del oxígeno)
RR	Resistente a <i>Roundup</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SA	Acido salicílico
SIIA	Sistema Integrado de Información Agropecuaria
<i>sp.</i>	Especie
<i>spp.</i>	Especies
Tf	Tiempo final
Ti	Tiempo inicial
Trp	Triptófano
Tr	Tiempo de retención
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
UFC	Unidad formadora de colonias
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de EEUU)
%	Por ciento

RESUMEN

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) es importante en la alimentación humana y animal así como en la industria, y Argentina es uno de sus principales exportadores mundiales. La productividad de este cultivo se ve afectada por la salinidad del suelo, condición que inhibe el crecimiento de las plantas. El nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes para la productividad agraria, y en este sentido, la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) constituye una de las principales fuentes de este elemento para las leguminosas que se asocian simbióticamente a bacterias denominadas rizobios. Además, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) benefician a las plantas gracias a su capacidad de estimular su crecimiento por diversos mecanismos. Por ello, la aplicación de biofertilizantes bacterianos sobre el suelo o raíces de las plantas, constituye un método biotecnológico que le reporta al vegetal beneficios de manera natural. La posibilidad de utilizar estos microorganismos para favorecer la nutrición, el desarrollo de las plantas y la tolerancia a diferentes estreses ambientales, ofrece nuevas alternativas para incrementar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica como el maní, evitando el uso indiscriminado de fertilizantes químicos. Las raíces pueden modificar las características físico-químicas del suelo a su alrededor debido a la liberación de compuestos orgánicos o “rizodeposiciones” que presentan amplia diversidad estructural y química y proveen fuentes de carbono y nitrógeno así como moléculas señalizadoras y quimioatrayentes para las rizobacterias. Este proceso de liberación puede verse afectado por la presencia de microorganismos o el estrés hídrico.

En este trabajo, en primer lugar se caracterizó el desarrollo de maní creciendo en ausencia y presencia de estrés salino y de las rizobacterias beneficiosas *Azospirillum brasilense* Cd (PGPR) y *Ochrobactrum* TAL1000 (rizobio de crecimiento rápido), y *Bradyrhizobium* sp. C145 (rizobio de crecimiento lento). En ausencia de salinidad, los pesos secos de tallos y de raíces se incrementaron entre 50% para las inoculaciones simples (destacándose el efecto de *A. brasilense* Cd) y 80% para las coinoculaciones con la PGPR (destacándose el efecto de la combinación entre *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd), con respecto al control. En presencia de salinidad, todos los pesos secos resultaron menores a sus respectivos controles sin sal; no obstante, con este estrés y en respuesta a las inoculaciones, los pesos secos se incrementaron entre un 40% para las inoculaciones simples (destacándose el efecto de *B. sp.* C145) y un 80% para las coinoculaciones con la PGPR (preponderando el efecto de la combinación *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd), con respecto al control sin inocular. Los IRPA (índice raíz/parte aérea), no se modificaron por la

salinidad, pero si resultaron aumentados en respuesta a las inoculaciones, indicando un efecto principal de las rizobacterias sobre la raíz de la planta, no así sobre el tallo.

En segundo lugar, se describió la composición molecular de las rizodeposiciones de maní, referente a ácidos grasos (AG) por cromatografía gaseosa (GC), y flavonoides, triptófano (Tpr) y ácido indol acético (AIA), por HPLC-masa. Los principales AG encontrados fueron 16:1, 16:0, 18:1, 18:0, 20:3 y 24:0. En ausencia de inóculos, se detectaron los 5 AG mencionados, excepto 24:0. Los insaturados 16:1 y 18:1 redujeron sus porcentajes por la salinidad, mientras que 20:3 se incrementó en respuesta al estrés aplicado; los saturados de 16 y 18 C se incrementaron debido a la salinidad. En presencia de *A. brasilense* Cd, los AG 16:0 y 18:0 fueron los principales, y sus niveles se incrementaron entre 10 y 20% en respuesta a la salinidad, mientras que para 18:1 ocurrió lo contrario, reduciéndose su porcentaje por el estrés aplicado. Con el rizobio *B. sp.* C145, 16:0 experimentó un incremento por la salinidad, mientras que 18:0 se redujo por dicho factor, y la coinoculación entre *B. sp.* C145 y *A. brasilense* Cd mostró a 16:0 respondiendo a la salinidad con un aumento en su porcentaje y a 18:0, con el comportamiento opuesto. Por último, con el rizobio *O. TAL1000*, los principales AG fueron 18:0 que se incrementó por la salinidad y 24:0, que por el contrario, experimentó una reducción. Este rizobio combinado con *A. brasilense* Cd, generó rizodeposiciones que mostraron niveles de 16:0 y 18:0 en condición control menores al 10% para ambos AG, pero en salinidad ambos se incrementaron para alcanzar entre 40 y 50%, y se destacó el nivel del AG 24:0 en la condición control, el cual se redujo en respuesta a la salinidad.

Respecto a la fitohormona ácido indol acético, la misma no se detectó en ausencia de inóculos, pero sí en presencia de *O. TAL1000*, en cuyo caso los niveles de auxina fueron los mayores, y se observó un pronunciado incremento por la sal. En presencia de las coinoculaciones entre *B. sp.* C145 y *A. brasilense* Cd y entre *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd, se detectó la auxina en condiciones salinas pero no en los controles sin salinidad. Los niveles del aminoácido triptófano fueron superiores a los de la auxina en todas las condiciones, y al igual que lo sucedido con ella, en ausencia de inóculos no se detectó. En cuanto a los flavonoides, se detectaron niveles significativos de: apigenina, genisteína, naringenina y naringina, y hubo niveles bajos de crisina en todos los tratamientos. En ausencia de inóculos, la salinidad redujo el número de flavonoides presentes. Con *A. brasilense* Cd en presencia de sal, elevaron sus niveles apigenina, genisteína, naringenina y naringina, y crisina. Con *B. sp.* C145, genisteína fue el flavonoide principal, y redujo su concentración por la salinidad, mientras que con *O. TAL1000*, el

principal fue naringina, cuyo nivel se elevó por la salinidad. En presencia de ambas coinoculaciones, el principal flavonoide fue naringina, el cual incrementó su nivel en respuesta al estrés.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten confirmar las capacidades de las rizobacterias de beneficiar al maní en presencia de factores ambientales perjudiciales como la salinidad del suelo. Conjuntamente, los presentes resultados sugieren la existencia de roles en la interacción planta-microorganismos rizosféricos, para las moléculas componentes de las rizodeposiciones de maní, aportando las primeras referencias en cuanto a su composición relativa a ácidos grasos, ácido indol acético, triptófano y flavonoides, creciendo en condiciones normales y en presencia de salinidad.

I. INTRODUCCION

I.1. Contexto

Al comenzar este trabajo es apropiado realizar una descripción de la situación socioeconómica en que nos encontramos inmersos a nivel global y como país, ya que en el análisis de la misma residen los fundamentos de los objetivos planteados en este trabajo, y la importancia del área de investigación. En un estudio elaborado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de nuestro País (INTA), Muchnik (2006) realizó una descripción de la misma haciendo hincapié en tres fenómenos actuales: el primero, se refiere al explosivo incremento en la demanda de alimentos de base, que tuvo lugar en todo el mundo en los últimos 20 años, para satisfacer las necesidades nutricionales de una población mundial cada vez mayor. Según un estudio de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (en adelante: FAO, por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*, 2008), la población mundial pasará de los actuales 6000 millones de personas a 8300 millones en 2030, y en paralelo, la demanda mundial de productos agrícolas aumentará un 1,5% anual hasta 2030, ya que los granos son la fuente más importante para la alimentación humana así como para la producción ganadera y avícola. Para 2030, serán necesarias 1000 millones de toneladas más de granos que en la actualidad (FAO, 2008). En este contexto mundial nuestro país se presenta como pieza fundamental en el abastecimiento de granos ya que se ubica entre los exportadores tradicionales junto a Estados Unidos, Unión Europea, Canadá, y Australia (FAO, 2008).

El segundo fenómeno, se refiere a la crisis del campo en Argentina, la cual se originó en la manera en que las estructuras productivas se adaptaron al contexto internacional (Velarde y col., 2008): la expansión de la soja como monocultivo debido a la introducción del gen "RR" (resistente al herbicida *Roundup*) y al paquete tecnológico que vinculó al glifosato (herbicida *Roundup*) con la siembra directa, el desplazamiento de las cuencas lecheras, la desaparición de las economías regionales, entre otros factores, exigen un replanteo de los fundamentos de la política agropecuaria argentina (Velarde y col., 2008).

En tercer lugar, Muchnik (2006) analiza como factor determinante de la producción alimenticia, los límites que la "*madre natura*" impone a los modelos productivos, enfrentándose estos a circunstancias nocivas como el calentamiento global, los deterioros de calidad nutricional de los suelos empleados para explotaciones agrícolas extensivas, como erosión y pérdida de nutrientes (Echeverría, 2000), y la escasez de nuevos terrenos cultivables, debido a que muchas de las zonas fértiles de la tierra tienden a ser protegidas.

Debido a las secuelas negativas que el empleo indiscriminado de los recursos generó a lo largo de los años, desde los distintos sectores se comenzó a pensar en diversas estrategias tendientes a revertir al menos en parte, estos deterioros (Resch, 2003). En el campo de la investigación agropecuaria, se concibió la necesidad de pensar en nuevas habilidades que permitan incrementar los rendimientos agrícolas para poder afrontar la demanda creciente de alimentos para la población, en un marco de problemáticas ambientales y de disminución de la fertilidad y deterioro de los suelos.

En este contexto, el principal rol de la investigación en ciencias agroalimentarias, es el de participar en la construcción de un paradigma agrícola y agroalimentario sustentable, es decir, aquel que asegura a las generaciones futuras la opción de disfrutar, al menos, el mismo nivel de bienestar que disfrutaron sus antecesores (Solow, 1992). La sustentabilidad agropecuaria, es aquella que es capaz de mantener a través de los años, niveles aceptables de productividad biológica y económica, preservando el ambiente y los recursos naturales (Ikerd, 1990; Resch, 2003).

La Microbiología Agrícola tiene mucho para ofrecer a los sistemas productivos agropecuarios, no solo aportes que hagan foco en la producción, sino también en la sustentabilidad de los sistemas de producción, ya que ofrece alternativas agronómicas eficientes, limpias y de bajo costo (Ventimiglia y Torreus Baudrix, 2008).

I.2. El maní en Argentina: una economía regional

Una economía regional es una actividad productiva que se desarrolla en una zona geográfica determinada, utilizando materias primas locales y procesos típicos de esa zona, en la cual los productos adquieren características específicas debido a condiciones agroecológicas, humanas y ambientales que le son propias, y confieren a la región una identidad diferenciada y reconocida (Velarde y col., 2008).

En nuestro país, el maní es un ejemplo cabal de este concepto: es la economía regional emblemática de Córdoba y a su vez un *cluster*¹ de prestigio internacional. Argentina es uno de los principales exportadores mundiales de maní, ya que envía unas

¹ Un *cluster*. es una concentración de empresas e instituciones de un rubro determinado, que trabajan de manera coordinada (Cámara Argentina del Maní).

500.000 toneladas anuales de manufacturas hacia 70 países, y no exporta *commodities*², sino alimentos con alto valor agregado.

El sector manisero cordobés es pionero en el diseño y aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas, que son los pilares que rigen la producción argentina de maní, determinantes de la alta calidad y el éxito comercial de los productos finales (Cámara Argentina del Maní).

I.2.a. El Maní

El maní, *Arachis hypogaea* L., es una leguminosa que pertenece a la familia de las Fabáceas. El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en Inglés: **National Center for Biotechnology Information**) establece la siguiente clasificación botánica para esta leguminosa:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta (*Plantas con flores*)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae/Leguminosae

Género: *Arachis* L.

Especie: *Arachis hypogaea* L.

Subespecies:

Español: *Arachis hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris*

Valencia: *Arachis hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata*

Virginia: *Arachis hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*



Es una hierba anual estival (crece de primavera a otoño), fibrosa, que llega a medir de 30 a 50 cm de altura según las variedades y las condiciones del medio. Su tallo

² *Commodities*: son aquellos bienes producidos en masa por el hombre, o del cual existen enormes cantidades disponibles en la naturaleza, que tienen valor o utilidad y un muy bajo nivel de diferenciación o especialización. Los commodities no son diferenciados por marcas, habida cuenta que por lo general, estos productos no tienen un valor agregado.

<http://www.eblog.com.ar/7743/%C2%BFque-son-los-commodities/>

principal es ascendente y presenta ramificaciones, las cuales pueden ser ascendentes, o crecer sobre el suelo en las formas rastreras (Gillier y Silvestre, 1970).

El sistema radical está formado por un pivote central que puede hundirse a más de 1,30 m en los suelos cultivados, y por raíces laterales que nacen a diversas alturas de este pivote y se ramifican abundantemente para constituir una densa cabellera. Las raíces laterales presentan pelos radiculares (Bonadeo y col., 2003; Krauss y col., 1996).

Los frutos crecen bajo el suelo, dentro de una vaina leñosa, redondeada, que llega a medir de 2 a 7 cm, y que contiene de una a cinco semillas. A causa de su modo particular de fructificación, las características del suelo de cultivo influyen en la maduración, calidad del fruto y realización de la cosecha. El suelo debe ser poroso para brindar buen drenaje y buenas condiciones de aireación, de manera tal de facilitar la penetración de los ginóforos y el arrancado de los frutos durante la cosecha (Gillier y Silvestre, 1970; Pedelini, 2008).

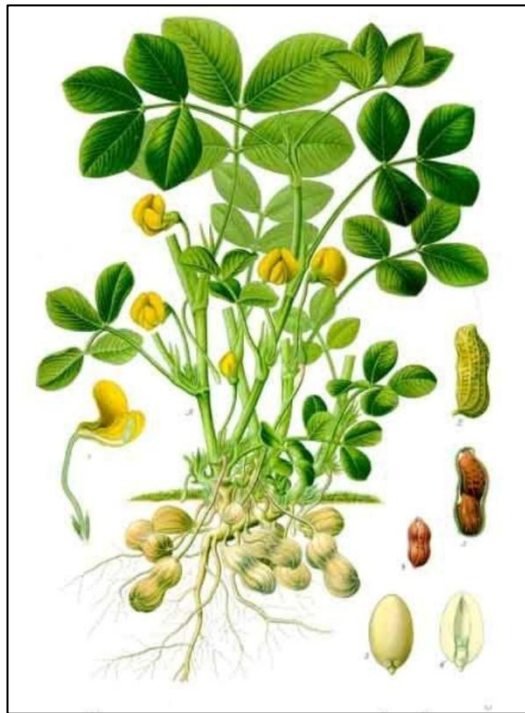


Figura I.1. Planta de maní (*Arachis hypogaea* L.).

Requiere temperaturas cálidas para su crecimiento y desarrollo, su óptima se sitúa entre 25 y 35°C (Gillier y Silvestre, 1970). La temperatura óptima del suelo debe ser igual o mayor a 16° C, y en nuestro país se logra normalmente en la segunda quincena del mes de Octubre (Pedelini, 2008).

El déficit hídrico reduce el establecimiento del cultivo y su crecimiento vegetativo, así como las etapas reproductiva y de producción de frutos (Ketring, 1991; Wheeler y col., 1997). El cultivo es sensible a la salinidad, mostrando efectos negativos sobre el crecimiento con concentraciones de NaCl a partir de 40 mM (Gillier y Silvestre, 1970).

I.2.b. El cultivo de maní

Este cultivo es importante en la alimentación humana y animal, ya que sus granos son fuente de energía (Ofuya y Akhidue, 2005), ricos en azúcares, lípidos y proteínas (Ahmed y Young, 1982). En la industria, el maní es útil como oleaginosa, brindando un aceite de alta calidad por su riqueza en ácidos grasos insaturados que contribuyen a reducir los niveles plasmáticos de colesterol y disminuyen hasta un 70% la incidencia de problemas cardíacos (infarto de miocardio). Además, son responsables de la formación de prostaglandinas, y son fuente de tocoferoles y vitamina E (antioxidantes) (Holman y col., 1993; Viola y Audisio, 1987).

En nuestro país es de relevancia tanto su producción como su exportación. Para la última campaña, 2010-2011, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca informó un total de siembra de 238.368 hectáreas, de las cuales el 76% (180.900 hectáreas) se sembraron en la provincia de Córdoba (SIIA). Se estima que en promedio, aproximadamente el 25% se exporta como grano, el 28% se destina a la producción de aceite, el 46% a la de manteca y pasta, y tan solo el 1% se consume internamente (Bongiovanni y Giletta, 2008).

Actualmente un 80% del maní sembrado a nivel nacional se ubica en la provincia de Córdoba, que es el epicentro de la producción e industrialización; no obstante, y debido principalmente al buen precio internacional de esta oleaginosa, su cultivo se ha extendido a algunas áreas de otras provincias, como San Luis, Santa Fe, Corrientes, Salta, y Jujuy, que tienen programas de desarrollo del maní (SIIA).

A continuación se muestran las áreas geográficas cultivadas con esta leguminosa en nuestro país:

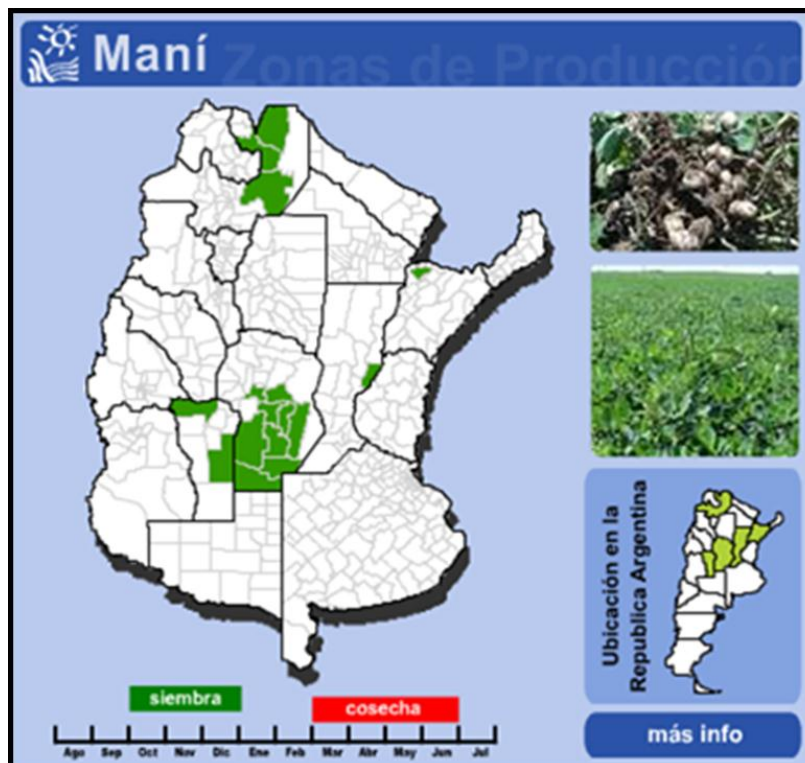


Figura I.2. Distribución geográfica del cultivo de maní en función del área sembrada promedio de las últimas cinco campañas (Sistema Integrado de Información Agropecuaria).

En Córdoba, esta actividad tiene gran relevancia para toda la región, ya que moviliza otros factores de la producción porque agrega valor al producto a lo largo de la cadena productiva, y es importante remarcar que prácticamente toda la producción de maní es industrializada en el país (Keller, 2009).

De acuerdo a datos proporcionados por el Departamento de Agricultura del Gobierno de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés: *United States Department of Agriculture*), la principal oferta mundial de maní procede de China, que es el primer productor con el 39% del total, seguido por la India (19%) y Estados Unidos (7%). Por detrás de estos países se ubica la Argentina (2%) (USDA, 2009). Nuestro competidor más fuerte es Estados Unidos, única nación, además de la nuestra, que se halla en condiciones de exportar a la Unión Europea (Keller, 2009).

I.3. La Rizósfera

La Rizósfera se define como el volumen de suelo inmediatamente adyacente a la raíz, el cual recibe su influencia fisicoquímica (Hiltner, 1904; Melo, 2002), y cuyas características son determinadas por las raíces (Russel, 1982). Es un microecosistema muy especializado que propicia el crecimiento de una población microbiana diversificada, ya que a través de la liberación de compuestos orgánicos provee el material que bacterias, hongos, pequeños insectos y demás microorganismos que conviven allí emplean como fuente de energía para su crecimiento y establecimiento en la zona (Hardoim y col., 2008).

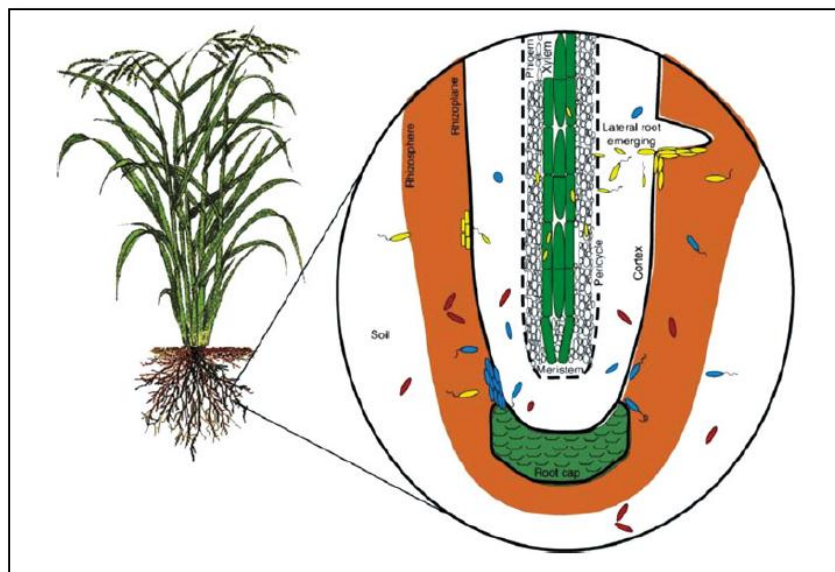


Figura I.3. Esquema de un sistema rizosférico en detalle, y su rol en el aporte de nutrientes para el desarrollo de microorganismos rizosféricos y colonizadores de raíz. (Hardoim y col., 2008).

I.3.a. Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno (en adelante: N) es uno de los nutrientes que suelen resultar limitantes para el crecimiento de las plantas y la productividad agraria (Vance, 1998; Bohlool y col., 1992). La aplicación de N y la Fijación Biológica de Nitrógeno (en adelante: FBN) constituyen las principales fuentes de este elemento para los cultivos en general y las leguminosas en particular (Sprent, 2001), siendo la FBN un proceso fundamental en su

ciclo biogeoquímico ya que permite reducir el N atmosférico gaseoso (N_2) a amonio (NH_4^+). Dicho proceso es llevado a cabo por un conjunto de organismos procariotas conocidos como diazótrofos.

Debido a la naturaleza inerte del nitrógeno gaseoso, su reducción es energéticamente muy costosa, y por esta razón, la mayoría de las bacterias diazotróficas han desarrollado asociaciones simbióticas con plantas de las que obtienen la energía necesaria para llevar a cabo la fijación del N. En la agricultura, la fijación simbiótica del N está confinada fundamentalmente a especies de leguminosas que establecen asociaciones con rizobacterias que en conjunto se conocen como rizobios. (Lum y Hirsch, 2003; López Gómez, 2007).

I.3.b. La simbiosis rizobio-leguminosa

Las simbiosis fijadoras de nitrógeno más conocidas e importantes desde una perspectiva económica son las que se establecen entre las raíces de leguminosas y las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* (Aparicio-Tejo, 1993).

Los rizobios son alfa-proteobacterias, de morfología bacilar, aerobios, Gram negativos, no formadoras de endosporas, y pueden utilizar gran variedad de azúcares como fuentes de carbono. Son móviles por la presencia de un flagelo polar, o de dos a seis flagelos peritricos. Pueden fijar nitrógeno en vida libre o en simbiosis, y habitualmente viven como saprofitos en el suelo (Sprent, 1979).

El establecimiento de la simbiosis implica la formación de un órgano especializado, en el cual se lleva a cabo la FBN, llamado nódulo. El proceso de nodulación comprende una secuencia de etapas que comienzan por la quimioatracción del rizobio hacia la raíz, iniciándose el contacto físico entre los dos simbioses (Caetano-Anollés, 1997).

En la Figura I.4 se muestran los eventos que ocurren durante el proceso que conduce al establecimiento de la simbiosis entre un rizobio y su leguminosa huésped:

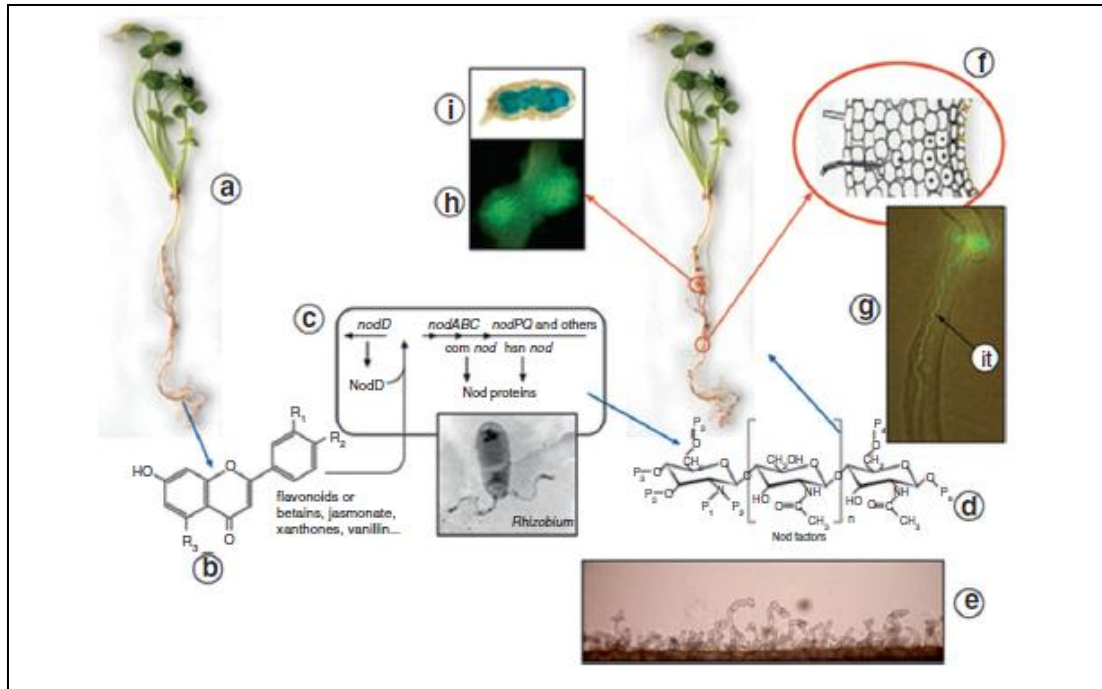


Figura I.4. Eventos involucrados en la simbiosis rizobio-leguminosa: **(a)** raíces de la leguminosa; **(b)** liberación de flavonoides hacia la rizósfera, a través del proceso de rizodeposición; **(c)** percepción de flavonoides por la proteína regulatoria rizobiana NodD, **(d)** transcripción de los genes *nod* bacterianos, resultando en la biosíntesis de los lipocitín-oligosacáridos (LCOs), más conocidos como “factores Nod”; **(e)** secreción de factores Nod por los rizobios y curvado de los pelos radicales; **(f - g)** formación del primordio nodular, adhesión de los rizobios a los pelos radicales y penetración a la raíz a través de una estructura tubular especializada denominada hilo de infección (it: por sus siglas en inglés “*infection thread*”) **(h - i)** Los rizobios ingresando a través de los hilos de infección, penetran hasta los tejidos radicales con actividad meristemática, invaden el primordio nodular, se diferencian morfológica y fisiológicamente en bacteroides³ y finalmente se desarrolla el nódulo. (Skorupska y col., 2010).

³ Bacteroide: los rizobios se multiplican rápidamente en el interior de las células vegetales y adoptan formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, quedan rodeados por la membrana peribacteroidal, y desarrollan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Madigan y col., 2006).

Mientras que la penetración vía pelos radicales ocurre en la mayoría de las leguminosas, un segundo mecanismo, denominado “*crack-entry*” ocurre en unos pocos géneros, como *Arachis* y *Sesbania*. En el maní los nódulos se desarrollan únicamente en los sitios de emergencia de las raíces laterales (Uheda y col., 2001), donde la epidermis y la corteza de la raíz están dañadas (Boogerd y van Rossum, 1997). Posteriormente, la diseminación bacteriana se produce por los espacios intercelulares hacia la zona del tejido vegetal con actividad meristemática (Medeot, 2009).

Durante el desarrollo del nódulo, los rizobios se diferencian en bacteroides y permanecen rodeados por una membrana propia de este nuevo órgano, llamada membrana peribacteroidal, de origen vegetal, para constituir, en conjunto, la unidad de FBN o *simbiosoma* (Medeot, 2009).

Una vez en el nódulo, los bacteroides, mediante un complejo enzimático particular, presente en los microorganismos diazotróficos, denominado Nitrogenasa, catalizan la conversión del N gaseoso a amonio, según la siguiente reacción (Werner, 1992):



La planta aporta ácidos dicarboxílicos que proporcionan al bacteroide la energía y los esqueletos carbonados requeridos para la fijación. La asimilación del amonio tiene lugar en la fracción vegetal de los nódulos (Aparicio-Tejo, 1993).

La participación del N aportado por FBN en la nutrición vegetal, está regulada por diferentes factores, entre los que se destaca la fertilidad del suelo, de allí que la práctica de inoculación no siempre forme parte de las prácticas habituales de manejo del cultivo. Es conocido que en los suelos del área manisera, las bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con la planta de maní, se encuentran en poblaciones de alto número como cepas nativas, siendo bacterias muy competitivas aunque a menudo ineficientes en la fijación de nitrógeno (Nutinez y col., 2008). En la actualidad, la inoculación de maní no es una práctica demasiado común en Argentina, sin embargo, recientemente está comenzando a ser utilizada con éxito en algunas regiones de la zona manisera de Córdoba (Nutinez y col., 2008).

I.3.c. Promoción del Crecimiento Vegetal por Rizobacterias

Cuando las rizobacterias son benéficas para el crecimiento de las plantas, se las denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o "*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*" (PGPR) (Kloepper y col., 1989). Estos microorganismos comprenden un grupo de habitantes de la rizósfera, de vida libre, no simbióticos, que benefician a las plantas debido a su capacidad de estimular su crecimiento por medio de diversos procesos (Kloepper, 1993), que se pueden clasificar en directos o indirectos:

➤ La **promoción directa** del crecimiento se debe al aporte a la planta de moléculas previamente sintetizadas por la bacteria. El metabolito producido por la bacteria es en sí capaz de estimular el crecimiento vegetal, por ejemplo, fitohormonas vegetales como auxinas (Glick y col., 1999), citoquininas (Tien y col., 1979), giberelinas (Bottini y col., 1989), etileno (Strzelczyk y col., 1994); el incremento en la incorporación de nutrientes desde el suelo hacia la planta mediante la captación de minerales como el hierro (mediante los complejos hierro-sideróforo bacterianos) y el fósforo (mediante su solubilización) (Jones y col., 1994); la producción de sustancias movilizadoras de nutrientes, como ácidos orgánicos (Yoshikawa y col., 1993) o aminoácidos (Jones y col., 1994) liberados por las bacterias al medio, que son capaces de movilizar fósforo (P), hierro (Fe) y aluminio (Al) (Rodríguez y Fraga, 1999). La FBN por este tipo de bacterias no simbióticas, representa una contribución mínima para la planta (Döbereiner y col., 1980). De hecho, no todas las PGPR son diazótrofes y aquellas que poseen la capacidad de fijar nitrógeno, lo hacen en niveles reducidos (Glick, 1995).

➤ La **promoción indirecta** ocurre cuando las bacterias previenen o reducen los efectos deletéreos causados por el ataque de microorganismos patógenos, ya sean otras bacterias u hongos (Davison, 1988; Kloepper y col., 1989; Haas y De Fago, 2005) y puede efectuarse por mecanismos como producción de sideróforos para la obtención de hierro del suelo, con lo que la PGPR compite satisfactoriamente contra patógenos (Kloepper, 1993), competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Kloepper y col., 1989; O'Sullivan y O'Gara, 1992; Devliegher y col., 1995), antagonismo o competencia mediante síntesis de compuestos antibacterianos y antifúngicos, y enzimas degradativas de pared celular fúngica (Howell y Stipanovic, 1980; Lindberg y col., 1985; Schnider y col., 1992).

Cada bacteria es capaz de afectar el crecimiento de la planta utilizando uno o varios mecanismos, pero es difícil delimitar el mecanismo exacto utilizado, ya que muchas veces, pueden emplear varios de ellos (Holf y col., 1988). Una PGPR puede poseer uno o más mecanismos de promoción. En la figura siguiente se resumen estos mecanismos:

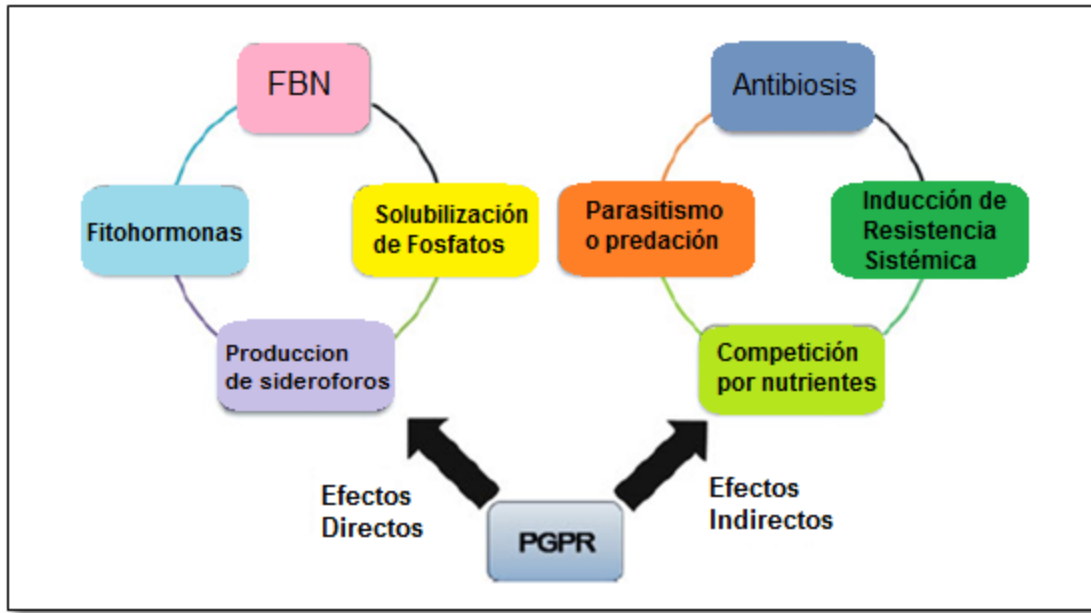


Figura I.5. Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal llevados a cabo por parte de rizobacterias (Akhtar y Siddiqui, 2010).

I.3.d. El género *Azospirillum*

Este género está compuesto por bacterias pertenecientes a la subclase alfa de las proteobacterias (Okon, 1994; Okon, y Vanderleyden, 1997). Poseen morfología vibroide, son pleomórficas y su movilidad es en espiral, por flagelos (Döbereiner, 1992). Presenta uno a seis plásmidos, siendo obligatorio el *p-90*, involucrado en la biosíntesis del ácido indol acético y en la adherencia a las raíces (Caballero-Mellado y col., 1999).

El efecto estimulante del crecimiento de las plantas luego de la inoculación con *Azospirillum* se ha atribuido a varios mecanismos, entre los que se destacan la producción de fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal en especial la auxina Ácido Indol-Acético (en adelante: AIA) (Umali-García y col., 1980) y el incremento en la velocidad de incorporación de minerales por la raíz (Lin y col., 1983). Las raíces desarrollan un mayor número de raíces laterales y pelos radiculares de mayor longitud, que incrementan la zona

de absorción de nutrientes. Esto resulta en un mejor estatus nutricional y mayor incorporación de agua, pudiendo ser el principal factor que desencadena el mayor crecimiento de la planta (Lin y col., 1983; Sarig y col., 1988; Okon, 1994).

La inoculación con *Azospirillum*, por otra parte, promueve la proliferación y el establecimiento en la rizósfera de otros microorganismos favorables para el cultivo (Russo y col., 2005), causando tanto la elongación como el aumento de la superficie total de la raíz (Dobbelaere y Okon, 2007). En el caso particular de las leguminosas, favorece la infección por *Rhizobium* porque brinda mayor número de sitios de infección para el rizobio, incrementando la cantidad de nódulos por planta, y así, su nutrición nitrogenada (Itzigsohn y Okon, 1995).

La contribución de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal por la fijación del N no es significativa y ha sido cuestionada (Patriquin y col., 1983; Barbieri y col., 1986; Boddey y col., 1986; Fages, 1994).

I.3.e. Biofertilizantes bacterianos

La aplicación de biofertilizantes bacterianos, más comúnmente denominados inoculantes, constituyen un método biotecnológico mediante el cual un inóculo bacteriano se dispone sobre el sustrato en el que se desarrollan las plantas, o sobre las semillas antes de la siembra (Biofag). Los inoculantes están constituidos por cepas bacterianas que son habitantes nativos de la rizósfera de plantas y presentan capacidades especiales mediante las que reportan beneficios a la planta de manera natural (Somers y col., 2004).

La posibilidad de utilizar microorganismos del suelo que favorezcan la nutrición y el desarrollo de las plantas ofrece nuevas alternativas para incrementar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica como el maní, y evitar el uso indiscriminado de fertilizantes químicos (Fischer y col., 2006).

A la hora de obtener un inoculante, es necesario tener en cuenta varios factores, ya que el efecto positivo que puede ejercer sobre la planta depende de la bacteria utilizada, de la planta, del tipo de suelo, de la densidad del inoculante y de las condiciones ambientales (Fischer y col., 2006). De esto surge la importancia en la caracterización básica de cada cepa frente a los diferentes cultivos y en amplia gama de condiciones ambientales.

I.4. El problema de la salinidad

Todos los suelos contienen sales solubles, algunas de las cuales son esenciales para el crecimiento de las plantas. La excesiva concentración de sales en el suelo se denomina *salinidad*. Esta condición representa un factor perjudicial para las plantas, ya que limita su crecimiento. La restricción es mayor a medida que aumenta la concentración de sales, pudiendo provocar la muerte de la planta (Maas, 1986).

La salinidad del suelo es uno de los factores limitantes más relevantes para la productividad agrícola (Greenway y Munns, 1980). Actualmente, millones de hectáreas en el mundo están afectadas por salinidad y más tierras todos los años se vuelven menos productivas por esta problemática (Rhoades y col., 1992). De acuerdo a FAO, entre 20 y 30 millones de hectáreas están afectadas por salinidad, y 0,25 a 0,50 millones dejan de producir anualmente por este problema (FAO, 2008). El crecimiento de plantas importantes en la agricultura es inhibido a una salinidad de 50 mM de NaCl (Downton, 1984), lo que resulta en una reducción en la producción.

Cualquier condición desfavorable o sustancia que afecte o bloquee el metabolismo, desarrollo o crecimiento de la planta puede considerarse como un estrés, y puede estar inducido por factores naturales o antropogénicos (López Gómez, 2007).

Se define al *estrés salino* como “una condición perjudicial para el crecimiento normal de la planta, que es causada por la presencia en el suelo (u otro soporte de crecimiento), de una concentración de sales superior a la que la planta, por sus mecanismos naturales, puede tolerar. Dicha condición negativa es presentada por el ambiente en que se desarrolla la planta”. El efecto del estrés se puede medir en relación a la capacidad de supervivencia de la planta, rendimiento del cultivo, acumulación de biomasa, procesos de asimilación de nutrientes (minerales, dióxido de carbono), entre otros parámetros que revelan el desarrollo vegetal en presencia del factor estresante (Zieger y Taiz, 2006).

Se ha postulado en la bibliografía que en suelos áridos y semiáridos la nodulación de leguminosas es menos eficiente, y esto se debería a un decrecimiento en la población de rizobios durante la estación seca. Un gran número de los rizobios que nodulan leguminosas de importancia agrícola son susceptibles a los efectos deletéreos de la sal y la desecación, estreses que a menudo se presentan en forma asociada (Smith, 1992; Mittler, 2006). Se ha reportado que el NaCl inhibe la actividad Nitrogenasa debido a que perturba el transporte de electrones, entre otras razones (Rai y col., 1999).

Se pudo comprobar que los rizobios simbiotes de maní son capaces de desarrollarse en condiciones de crecimiento adversas como es la presencia de concentraciones de NaCl de alrededor de 100 mM (Dardanelli y col., 2009). En cambio otras rizobacterias como las del género *Azospirillum*, son capaces de tolerar valores de estrés salino de 200 mM de NaCl (Nabti y col., 2007).

I.5. Rizodeposiciones

Además de su rol como órgano de anclaje y exploración del suelo, y adquisición de agua y nutrientes para la planta, las raíces pueden modificar las características fisicoquímicas del suelo a su alrededor, por alteraciones en su actividad fisiológica (Hinsinger, 1998).

Los compuestos orgánicos liberados por la raíz son llamados en su conjunto, “rizodeposiciones” (Rovira, 1969; Marschner, 1986; Uren y Reisenauer, 1988). Presentan una amplia diversidad estructural, (Dixon, 2001; Dardanelli y col., 2010; Castro, 2010) y química, pudiéndose encontrar azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, flavonoides, vitaminas, entre otros (Rengel y Römheld, 2000; Koo, 2005; Dardanelli y col., 2008-a). Pueden tener impacto directo en la solubilidad de minerales o, indirectamente, influenciar la disponibilidad de ciertos nutrientes por impulsar la actividad de microorganismos del suelo que los transforman (Neumann, 2007).

En las plantas superiores, una proporción sustancial (20 al 60%) del carbono fijado durante la fotosíntesis es translocado hacia el suelo (Grayston y col., 1996; Kuzyakov y Domanski, 2000) como rizodeposición orgánica (Kuzyakov y Domanski, 2000; Lynch y Whipps, 1990).

La liberación de compuestos orgánicos por las raíces tiene una influencia decisiva sobre la disponibilidad de nutrientes y en consecuencia sobre la actividad microbiana (Bowen y Rovira, 1991), debido a que el crecimiento microbiano en el suelo está limitado por la disponibilidad de estos elementos (Grayston, y col., 1996). Las plantas modifican las comunidades microbianas del suelo de un modo fundamental: diferentes especies de plantas en un mismo tipo de suelo presentan rizósferas muy diferentes, mientras que la rizósfera de una misma especie cultivada en suelos muy distintos varía poco (Grayston, y col., 1996).

Los compuestos presentes en las rizodeposiciones se pueden agrupar de acuerdo a diferentes criterios, estableciendo categorías para clasificarlas (Grayston y col., 1996):

- **Exudados:** son solubles en agua, y comprenden sustancias de bajo peso molecular que se pierden pasivamente como resultado de la actividad metabólica de la raíz. Esta pérdida ocurre a favor de un gradiente de concentración (Burström, 1955; Bowen y Rovira, 1991).
- **Secreciones:** comprenden sustancias de alto peso molecular cuya liberación depende de procesos metabólicos que requieren energía. Ellas pueden ser liberadas en contra de gradientes electroquímicos (Hale y col., 1978).
- **Lisados,** que son desprendidos luego de autólisis celulares, y comprenden grandes fragmentos de raíces, fragmentos celulares y a menudo, la raíz completa (Whipps, 1990).
- **Gases,** como etileno, dióxido de carbono y cianuro de hidrogeno. Se consideran como sustancia de bajo peso molecular (Rovira, 1959, 1969, 1973).
- **Mucilagos,** que cubren las superficies de muchas raíces, se componen de polisacáridos y ácidos poligalacturónicos de alto peso molecular (Watt y col., 1993; Marschner, 1986). En presencia de microorganismos se llama mucigel, y está compuesto por sustancias de origen vegetal y microbiano (Jenny y Grossenbacher, 1963; Oades, 1978).

A continuación se resumen las clases de rizodeposiciones en la Figura I. 6:

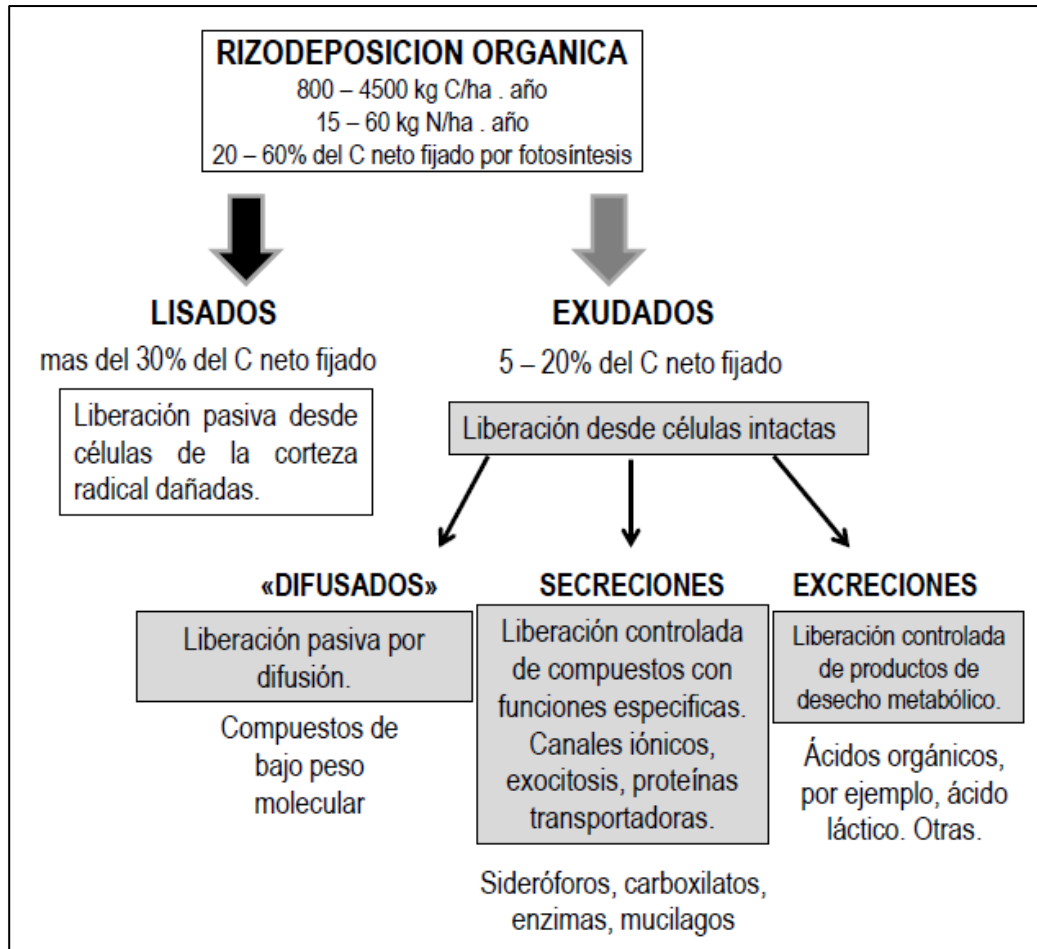


Figura 1.6. Clasificación, cantidades y mecanismos de liberación de las rizodeposiciones orgánicas. La rizodeposición orgánica comprende fragmentos de células dañadas y provenientes del recambio tisular (“lisados”), y fracciones provenientes de células intactas (“exudados”), que se subdividen en (1) compuestos orgánicos de bajo peso molecular liberados continuamente por difusión pasiva (“difusados”), (2) “secreciones”: compuestos liberados de manera controlada, con funciones especializadas en movilización de nutrientes, detoxificación, señalización planta-microorganismos, defensa, y (3) “excreciones”: comprende la liberación controlada de sustancias de desecho provenientes del metabolismo (Grayston y col., 1996; Neumann y Romheld, 2000; Werner, 2000).

El mecanismo de producción y liberación de rizodeposiciones es un proceso dinámico que resulta influenciado cuantitativamente y cualitativamente por la especie vegetal y el cultivar, por la edad de la planta y el estado fisiológico (Lynch y Whipps, 1990).

Muchos factores abióticos como intensidad de luz, fotoperíodos, temperatura y estrés hídrico, también determinan los patrones de exudación, advirtiéndose en general, que las situaciones de estrés estimulan las exudaciones (Lynch y Whipps, 1990).

En la Tabla I.1 se presenta un resumen de la bibliografía consultada acerca de la diversidad química de las moléculas que componen las rizodeposiciones. Se puede observar en ella la abundancia y variedad en la naturaleza de estos componentes:

Tabla I.1. Composición química de rizodeposiciones de diversas especies vegetales.

Clase de compuesto	Componentes	Funciones
AZUCARES	Glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa, rhamnosa, ribosa, xilosa, arabinosa, rafinosa, desoxirribosa, manitol, oligosacáridos, polisacáridos	Lubricación, protección contra toxinas, quimioatrayentes, estimulantes del crecimiento microbiano (fuentes de C y energía)
COMPUESTOS AMINADOS	Los 20 aminoácidos proteínogénicos, ácido gamma-aminobutírico, cistationa, cistina, cisteinmetionina, homoserina, ácido mugénico, ornitina, betaína, estachidrina, sideróforos	Inhibición de nemátodos, estimulantes del crecimiento microbiano, quimioatrayentes, osmoprotectores, quelantes de hierro
ACIDOS ALIFATICOS	Acético, acetónico, aconítico, aldónico, butírico, cítrico, eritrónico, fórmico, fumárico, glucónico, glutárico, glicólico, isocítrico, láctico, maleico, málico, malónico, oxálico, oxaloacético, oxaloglutárico, piscídico, propiónico, pirúvico, shikímico, succínico, tartárico, tetrónico, valérico	Regulación del crecimiento vegetal, estimulantes del crecimiento microbiano, quimioatrayentes
ACIDOS AROMATICOS	P-hidroxibenzoico, cafeico, p-cumérico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatecuico, sinápico, siríngico	Regulación del crecimiento vegetal, quimioatrayentes
FENOLICOS	Flavonoles, flavonas (luteolina, biochanina, sorgolactona), flavononas, antocianinas, flavonoides, isoflavonoides,	Regulación del crecimiento vegetal, interacciones alelopáticas, defensa de la planta, fitoalexinas, quimioatrayentes, iniciadores de las

	acetosiringona.	interacciones rizobio-leguminosa, micorrizas arbusculares y actinorrizas y sus huéspedes vegetales, estimulantes del crecimiento microbiano, estimulantes de la degradación bacteriana de xenobióticos
ACIDOS GRASOS	Linoleico, linolénico, oleico, palmítico, esteárico.	Regulación del crecimiento vegetal
ESTEROLES	Colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol	Regulación del crecimiento vegetal
VITAMINAS y FACTORES DE CRECIMIENTO	Acido p-aminobenzoico, biotina, colina, ácido n-metionilnicotínico, niacina, pantotenato, piridoxina, riboflavina, tiamina, inositol	Estimulantes del crecimiento microbiano
ENZIMAS Y PROTEINAS	Fosfatasa ácida, amilasa, proteasas, invertasa, poligalacturonasa, hidrolasa, lectinas	Defensa de la planta, degradación de factores Nod
HORMONAS	Auxinas, etileno y su precursor (ácido aminociclopropano carboxílico), putrescina, jasmonatos, ácido salicílico, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, ácido cianhídrico	Regulación del crecimiento vegetal
IONES INORGANICOS	Cationes (88%): calcio, sodio, potasio, amonio, magnesio; aniones (12%): sulfato, cloruro, fosfato, nitrato	Regulación del crecimiento vegetal, adhesión microbiana, estimulantes del crecimiento microbiano
OTROS	Adenina, guanina, uridina, citidina, glucósidos, saponinas, scopoletinas, compuestos orgánicos fosforados, acil-homoserin-lactonas, xantona, estrigolactonas, especies reactivas del oxígeno: radicales oxhidrilo, aniones superóxido, H ₂ O ₂	Quorum sensing, defensa de la planta, regulación del crecimiento vegetal, adhesión microbiana, estimulantes del crecimiento microbiano

Fuente: elaboración propia en base a: Faure y col., 2009; Kamilova y col., 2006; Somers y col., 2004; Bertin, y col., 2003; López de Vittoria y Lovell, 1993; Curl y Truelove, 1986.

Cualquier modificación en la abundancia o en las proporciones de grupos microbianos, afecta a la planta a través de las transformaciones de la materia orgánica y mineral (Simmons y col., 1996). La presencia de microorganismos estimula la rizodeposición, especialmente la fracción de bajo peso molecular (Meharg y Killham, 1991). Además de ser fuentes de carbono y nitrógeno para los microorganismos, las rizodeposiciones también tienen funciones específicas como moléculas señalizadoras en el diálogo planta-microorganismo. Diversos metabolitos secundarios producidos por las plantas como los flavonoides, son ejemplos bien conocidos de sustancias quimioatrayentes de rizobios y estimulantes de la síntesis de factores Nod en la simbiosis rizobio-leguminosa (Shaw y col., 2006).

Varios estreses impiden el desarrollo normal de las raíces, como toxicidad por aluminio, por bicarbonato, salinidad, sequía, hipoxia, metabolitos microbianos tóxicos, microorganismos patógenos. En muchos casos, los exudados radicales parecen estar involucrados en dar respuestas para aliviar los efectos inhibitorios de estos estreses sobre el crecimiento de las raíces, y por consiguiente sobre el crecimiento de la planta (Neumann, 2007).

El estrés hídrico es uno de los factores que más inducen la exudación radical debido al incremento de la presión osmótica del medio y a la necrosis radical (Curl y Truelove, 1986; Whipps, 1990). Martin observó que el número total de bacterias es mayor en presencia de estrés salino, debido a que la exudación radical es mayor durante periodos de estrés (Martin, 1977). En suelos secos, la raíz genera mayor exudación de sustancias mucilaginosas, con funciones protectoras para los meristemas radicales que penetran el suelo (Vivanco y col., 2002), ya que los mucilagos mejoran el contacto entre la raíz y el suelo facilitando la captación de nutrientes (McCully, 1999; Nambiar, 1976).

II. HIPOTESIS

“La composición de diversas moléculas de las rizodeposiciones de maní es afectada por estrés salino y por la presencia de microorganismos”

III. OBJETIVO

“Estudiar las señales de comunicación entre maní y microorganismos beneficiosos y determinar si la composición de las rizodeposiciones de dicha planta pueden verse afectadas por factores abióticos”

IV. MATERIALES Y METODOLOGIA

IV.1. Microorganismos

Se utilizaron los rizobios *Ochrobactrum* TAL1000 (NifTal, Hawaii) y *Bradyrhizobium* sp. C145 (INTA), ambos recomendados como inoculantes para maní; y la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* Cd ATCC 29729 (Tarrand y col., 1978).

IV.2. Medios de cultivo

IV.2.a. Medio YEM (Somasegaran y Hoben, 1994)

Manitol	10 g
Ext. Levadura	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0, 2 g
K ₂ HPO ₄	0, 5 g
NaCl	0, 1 g
H ₂ O (d) c.s.p	1000 ml

Se ajustó a valor de pH 6,8.

IV.2.b. Medio Mínimo NFB (Estévez Amador, 2007)

Acido málico/ Fructosa	5 g
KOH	4,5 g
K ₂ HPO ₄	0, 5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0, 5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0, 2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,02 g
Fe-EDTA 1,64 % p/v	4 ml
Microelementos ^a	2 ml
H ₂ O (d) c.s.p	1000 ml

Se ajustó a valor de pH 6,8. Luego de autoclavar se agregó 1ml de solución de vitaminas^b.

a. Solución de microelementos

H ₃ BO ₃	1,4 g
ZnSO ₄ .H ₂ O	1,2 g
MnSO ₄ .2H ₂ O	1,17 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g
H ₂ O (d) c.s.p	100 ml

b. Solución de vitaminas

Piridoxal-HCl	0,2 g
Biotina	0,1 g
H ₂ O (d) c.s.p	1000 ml

Se esterilizó mediante filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y se añadió al medio una vez frío.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos, después de ajustar el pH adecuado. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 15 g por litro de agar al medio líquido correspondiente.

IV.3. Parámetros fisiológicos microbianos**IV.3.a. Crecimiento bacteriano**

Los rizobios *Ochrobactrum* TAL1000 y *Bradyrhizobium* sp. C145 se hicieron crecer en medio YEM, mientras que la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* Cd se cultivó en medio NFB con fuente de carbono fructosa.

El crecimiento bacteriano se determinó midiendo a intervalos de tiempo regulares, la turbidez de cultivos de cada microorganismo creciendo a 28°C en un baño termostático con agitación rotatoria (90 r.p.m.), tomando lecturas de densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 620 nanómetros (nm), en un espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes para cada cepa y

en cada una de las condiciones en estudio, y posteriormente se determinaron los parámetros de crecimiento microbiano.

IV.3.b. Viabilidad celular

Durante el período de crecimiento de cada cultivo bacteriano, se recolectaron alícuotas de 1 ml para determinar la viabilidad celular. Se realizaron diluciones seriadas, de acuerdo a las lecturas de DO a 620 nm obtenidas, que se resumen a continuación:

a) $DO_{620\text{ nm}} < 0,5$:

- 5 μl de cultivo + 495 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-2})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-3})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-4})

b) $DO_{620\text{ nm}} > 0,5$:

- 5 μl de cultivo + 495 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-2})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-3})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-4})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-5})
- 100 μl de la dilución anterior + 900 μl de solución fisiológica (dilución 10^{-6})

El recuento de células viables se realizó mediante la técnica de la microgota de Miles y Misra (Somasegaran y Hoben, 1994), donde alícuotas de cada dilución se sembraron por triplicado en placas con el medio sólido correspondiente. Los valores del recuento se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/ml).

IV.3.c. Cálculo de parámetros de crecimiento microbiano. Velocidad Específica y Tiempo de Generación

Se determinó la velocidad específica crecimiento bacteriano (μ) empleando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln \text{UFC/ml (Tf)} - \ln \text{UFC/ml (Ti)}}{\text{Tf} - \text{Ti}}$$

(Tf y Ti representan tiempos final e inicial, respectivamente, dentro de la fase exponencial de crecimiento bacteriano).

Con el valor de μ se realizó el cálculo del tiempo de generación (g), o de duplicación (expresado en horas) utilizando la siguiente ecuación:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Conociendo los parámetros de crecimiento de cada cepa bacteriana, se calculó el tiempo de incubación necesario para obtener inóculos con recuentos de 1×10^8 UFC/ml, los cuales se aplicaron sobre los medios de crecimiento de las semillas de maní.

IV.4. Producción de Rizodeposiciones de maní

IV.4.a. Medio de germinación de semillas de maní: Agar Agua 0,8%

Agar	8 g
H ₂ O (d) c.s.p	1000 ml

IV.4.b. Medio de crecimiento de plantas de maní: solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938)

KH_2PO_4 1M	1 ml
KNO_3 1M	6 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	4 ml
MgSO_4 1M	2 ml
Micronutrientes stock ^a	1 ml
Solución de Hierro stock ^b	2 ml
H_2O (d) c.s.p.	1000 ml

a. Solución stock de micronutrientes 1000X

H_3BO_3	286 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	901,3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21,84 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,66 mg
H_2O (d) c.s.p.	100 ml

b. Solución de Hierro al 0,5 %

EDTA.Na	0,745 g
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,557 g
H_2O (d) c.s.p.	100 ml

Para obtener la condición de estrés salino, se adicionó NaCl hasta alcanzar una concentración final de 50 mM a la solución nutritiva utilizada.

IV.4.c. Obtención de rizodeposiciones de maní en presencia y ausencia de estrés salino y diversos inóculos bacterianos

1. Selección de material vegetal

Se emplearon para los ensayos semillas de *Arachis hypogaea* L. cultivar PEPE cedidas por INTA-Manfredi (Manfredi, provincia de Córdoba).

2. Desinfección superficial de semillas de maní

Las semillas fueron lavadas tres veces en agua destilada estéril y posteriormente sumergidas en alcohol etílico 95° durante 30 segundos para limpiar la superficie y por su efecto astringente, aumentar la porosidad y favorecer el ingreso del posterior desinfectante. Luego se quitó el alcohol y las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente fueron sometidas a desinfección utilizando el agente peróxido de hidrogeno al 15% durante 7 minutos. Nuevamente se quitó el agente y las semillas fueron enjuagadas abundantemente con agua destilada estéril.

3. Pre-germinación de semillas de maní

Las semillas desinfectadas se transfirieron asépticamente a placas de Petri con el medio Agar-Agua al 0,8%, en una proporción de seis semillas por placa (Dardanelli y col., 2009). Las placas se incubaron en estufa de cultivo durante tres días, a 28°C, en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó aproximadamente 2 centímetros de longitud.

4. Desarrollo de la planta de maní en sistema hidropónico para la producción de rizodeposiciones (Dardanelli y col., 2008-b)

Cada semilla pre-germinada se transfirió asépticamente a un sistema de producción, consistente de un tubo de vidrio portador de un soporte para la semilla (realizado en alambre galvanizado para evitar su oxidación) que facilita a la radícula sumergirse en la solución nutritiva para permitir el desarrollo de la raíz, pero evita el contacto entre la semilla y la solución. El contenido de cada tubo fue de 30 ml de solución nutritiva de Hoagland, en ausencia y presencia de NaCl a una concentración final de 50 mM. En esta etapa, es decir, al momento de colocar las semillas en sus tubos de crecimiento, se colocó en cada uno 1 ml de los inóculos bacterianos correspondientes. Las plantas se incubaron asépticamente durante siete días en cámara de crecimiento sometidas a un fotoperiodo de 16 horas de luz a 24°C alternadas con 8 horas de oscuridad a 20°C, preservando las raíces de la luz.

5. Cosecha de plantas y recolección de rizodeposiciones de maní

Al cabo de siete días cada planta se retiró del tubo y las rizodeposiciones se recogieron asépticamente y se esterilizaron empleando un sistema de filtración al vacío *Millipore* con filtros de nitrato de celulosa con poro de 0,22 μm de diámetro. Para evitar la contaminación microbiana los filtros fueron esterilizados en autoclave previamente a su utilización.

6. Almacenamiento y conservación de las rizodeposiciones

Las rizodeposiciones obtenidas se conservaron al resguardo de la luz para proteger a los componentes fotosensibles y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

IV.4.d. Diseño de los tratamientos aplicados

Previo a la colocación de las semillas en sus soportes de crecimiento, los tubos conteniendo solución nutritiva de Hoagland se inocularon con 1 ml de un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento, con un recuento de 10^8 UFC/ml.

Las inoculaciones mixtas se realizaron colocando en cada tubo de crecimiento de planta de maní, 1 ml de cultivo bacteriano con un recuento de 10^8 UFC/ml, de una cepa de rizobio (*Bradyrhizobium sp.* C145 u *Ochrobactrum* TAL1000) y 1 ml de cultivo con un recuento de 10^8 UFC/ml, de una cepa de una bacteria promotora del crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense* Cd).

En el presente ensayo, se generaron 12 tratamientos por combinación de todos los niveles de cada uno de los dos factores aplicados: uno de ellos fue la sal NaCl, en dos concentraciones diferentes: 0 mM para generar la condición Control (ausencia de salinidad en el medio de cultivo) y 50 mM, para generar la condición de estrés salino sobre el medio de crecimiento de las plantas.

El segundo factor aplicado fueron los inóculos bacterianos simples y mixtos. Los seis niveles empleados para este factor fueron: ausencia de inóculo (condición control sin inocular), *Azospirillum brasilense* Cd, *Bradyrhizobium sp.* C145 y *Ochrobactrum* TAL1000, y las combinaciones entre ellos: *Bradyrhizobium sp.* C145 + *Azospirillum brasilense* Cd y *Ochrobactrum* TAL1000 + *Azospirillum brasilense* Cd.

Los tratamientos resultantes son los que se tabulan a continuación:

Tabla IV.1. Detalle de los doce tratamientos aplicados a las plantas de maní en el presente trabajo

Tratamientos	
1	0 mM NaCl – Sin inocular
2	50 mM NaCl – Sin Inocular
3	0 mM NaCl - <i>Azospirillum brasilense</i> Cd
4	50 mM NaCl - <i>Azospirillum brasilense</i> Cd
5	0 mM NaCl- <i>Bradyrhizobium sp.</i> C145
6	50 mM NaCl – <i>Bradyrhizobium sp.</i> C145
7	0 mM NaCl - <i>Ochrobactrum</i> TAL1000
8	50 mM NaCl - <i>Ochrobactrum</i> TAL1000
9	0 mM NaCl – <i>Bradyrhizobium sp.</i> C145 + <i>A. brasilense</i> Cd
10	50 mM NaCl – <i>Bradyrhizobium sp.</i> C145 + <i>A. brasilense</i> Cd
11	0 mM NaCl - <i>Ochrobactrum</i> TAL1000 + <i>A. brasilense</i> Cd
12	50 mM NaCl - <i>Ochrobactrum</i> TAL1000 + <i>A. brasilense</i> Cd

Posteriormente a la puesta en marcha de cada sistema, y al cabo de siete días de crecimiento en las condiciones ambientales ya mencionadas, se procedió a medir las variables seleccionadas. Dichas variables fueron cualitativas (caracterización molecular de las rizodeposiciones de maní), cuyas mediciones se realizaron por duplicado; y cuantitativas (medición de parámetros de crecimiento vegetal), en cuyo caso se realizaron 2 réplicas del experimento con 6 unidades experimentales por tratamiento, en cada una.

IV.5. Parámetros de crecimiento de plantas de maní

IV.5.a. Peso Seco de Tallo (PST) y Peso Seco de Raíz (PSR)

Se quitaron los cotiledones y se cortó la planta a la altura del nacimiento de la raíz, para separar la misma de la parte aérea y cada fragmento se pesó por separado. Se utilizaron sobres de papel cuadrados de diez centímetros de lado, secados durante cinco días en estufa a 60°C, hasta obtener peso constante. Cada fragmento vegetal se colocó individualmente dentro de un sobre y se pesó por diferencia; el resultado obtenido fue el Peso Húmedo.

Para obtener el Peso Seco, cada fragmento dentro del sobre anteriormente pesado, se colocó en estufa a 60°C durante cinco días hasta obtener peso constante. Los pesos se tomaron en miligramos, por diferencia, empleando una balanza analítica.

IV.5.b. Índice Raíz/Parte Aérea (IRPA) (López-Gómez, 2007)

Para obtener el Índice R/PA se realizó el siguiente cociente (López-Gómez, 2007).

$$I R/PA = \frac{\text{Peso Seco Raíz (mg)}}{\text{Peso Seco Parte Aérea (mg)}}$$

IV.6. Investigación molecular de las rizodeposiciones

IV.6.a. Preparación de la muestra

Se liofilizaron hasta sequedad 100 ml de rizodeposiciones obtenidas de cada uno de los doce tratamientos, y luego fueron resuspendidas en agua destilada estéril hasta volumen final de 10 ml, con el objetivo de concentrar la muestra diez veces para aumentar la sensibilidad de los análisis moleculares.

Las rizodeposiciones así obtenidas se conservaron a resguardo de la luz a -20°C hasta su procesamiento.

IV.6.b. Análisis moleculares

IV.6.b.i. Ácidos Grasos

1. Extracción de lípidos

Los lípidos fueron extraídos a partir de fracciones de 1,2 ml de rizodeposiciones concentradas diez veces. La extracción se realizó de acuerdo a lo indicado por Bligh y Dyer (1959):

Primera Etapa. 3,75 ml de una mezcla de cloroformo-metanol en proporción 1:2 se añadió sobre 0,6 ml de muestra, y todo se sometió a agitación en frío durante 1,5 horas. Posteriormente se realizó una centrifugación, se recogió el sobrenadante en una probeta graduada y el pellet se sometió a la segunda extracción.

Segunda Etapa. 4,75 ml de una mezcla de cloroformo-metanol-ácido clorhídrico en proporción 1:2:0,8 se añadió sobre el pellet obtenido en la fase anterior, luego se agitó en vórtex durante treinta segundos. Se centrifugó, se recogió el sobrenadante junto al obtenido en la primera etapa, y el pellet se descartó.

Tercera Etapa. Se añadieron 2,5 ml de cloroformo puro cada 0,6 ml de volumen inicial de muestra sobre las fases recogidas anteriormente en la probeta graduada.

Cuarta Etapa. Se añadieron 2 ml de una solución de KCl 0,1 M en metanol 50% cada 2 ml del extracto lipídico obtenido en la tercera etapa.

Al cabo de 24 horas se obtuvieron dos fases. Se recuperó la fase inferior o “fase clorofórmica”, contenedora de los lípidos.

2. Metilación de Ácidos Grasos.

Las fracciones extraídas en la etapa anteriormente descrita se colocaron en tubos especiales para metilación, y se sometieron a secado con corriente de nitrógeno. La metilación se realizó de acuerdo a lo indicado por Morrison y Smith (1964):

Generación de Metil-ésteres de Ácidos Grasos ó FAMES (por sus siglas en inglés: *Fatty Acid Metil-Esters*). Se añadió sobre cada muestra solución de Trifluoruro de Boro 14% en metanol (Sintorgan, calidad HPLC) y las mezclas se sometieron a calentamiento a 100°C durante 1,5 horas.

Recuperación de los Metil-ésteres de Ácidos Grasos. Los FAMES fueron recuperados extrayendo la fase superior formada luego de añadir tres volúmenes de hexano (Sintorgan, calidad HPLC) al tubo de extracción.

3. Separación e Identificación de Metil-ésteres de Ácidos Grasos (FAMES).

Los FAMES obtenidos, se secaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en hexano para su análisis por Cromatografía Gaseosa (GC), ajustando las condiciones de la separación según lo propuesto por Medeot (2009):

Se tomó una alícuota de 2 µl y se inyectó en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con una columna de metil-silicona (25 m x 0,2 mm x 0,33 µm), acoplado a un detector de Ionización de Llama. La temperatura de la columna se programó a 180°C durante 60 minutos y luego una rampa de 3°C/minuto hasta alcanzar 250°C. La temperatura del detector se ajustó a 300°C, y la temperatura del inyector a 250°C.

Los picos correspondientes a cada ácido graso se identificaron usando una mezcla de testigos provista por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Kates, 1973) y por Supelco.

IV.6.b.ii. Auxinas

Los niveles de la hormona vegetal Acido Indol Acético fueron identificados según Kamilova y col., (2006), utilizando un HPLC-MS, trabajando con concentraciones patrones de la auxina.

IV.6.b.iii. Triptófano

Los niveles de este aminoácido fueron identificados según Kamilova y col., (2006), utilizando un HPLC-MS, trabajando con concentraciones patrones del aminoácido.

IV.6.b.iv. Flavonoides

Los flavonoides fueron identificados según Dardanelli y col., (2008-b) con modificaciones, utilizando un HPLC-MS, trabajando con patrones de flavonoides.

IV.7. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables cuantitativas (ver secciones IV.4.d: “Diseño de los tratamientos aplicados” y IV.5: “Parámetros de crecimiento de plantas de maní), se realizaron tablas ANOVA y *a posteriori* pruebas LSD (Mínima Diferencia Significativa de Fisher) empleando el software STATGRAPHICS Centurión XVI.

V. RESULTADOS

En este trabajo se estudiaron los efectos de factores abióticos (salinidad) sobre el crecimiento de plantas de maní y sobre sus patrones de rizodeposición, creciendo durante siete días en medio de crecimiento hidropónico. También se analizó el efecto de las inoculaciones con diversas cepas bacterianas recomendadas como inoculantes para maní, sobre dichos parámetros en condiciones óptimas de crecimiento y frente a estrés salino (NaCl 50 mM).

Se emplearon las rizobacterias recomendadas como inoculantes para maní mencionadas en la sección IV.1 de Materiales y Métodos, y para su formulación como inoculantes de maní, en primer lugar se determinaron los parámetros de crecimiento de cada cepa, para conocer el estado fisiológico de los inóculos empleados.

Para evaluar el crecimiento vegetal en las diferentes condiciones probadas, se emplearon los parámetros mencionados en la sección IV.5 de Materiales y Métodos, que se describen a continuación.

La caracterización molecular de las rizodeposiciones se basó en la composición de ácidos grasos (AG) (analizada por GC), y flavonoides, triptófano (Tpr) y ácido indol acético (AIA) (analizados por HPLC-MS).

V.1. Parámetros de crecimiento de microorganismos rizosféricos

Con la finalidad de caracterizar microbiológicamente las bacterias *Bradyrhizobium* sp. C145 y *Ochrobactrum* TAL1000 (recomendadas como inoculantes de maní), y *Azospirillum brasilense* Cd, se realizaron curvas de crecimiento y se estudiaron los parámetros fisiológicos, como se indicó en Materiales y Métodos. La Figura V.1 muestra a modo de ejemplo una placa con colonias obtenidas después de realizar el recuento de viabilidad según la técnica de la microgota de Miles y Misra (Somasegaran y Hoben, 1994), descrita en la sección Materiales y Métodos:



Figura V.1. Recuento de UFC/ml por la técnica de la microgota de Miles y Misra. Se muestra como ejemplo una placa correspondientes a las 15 horas de crecimiento bacteriano de la cepa *A. brasilense* Cd en medio sólido NFB con fuente de carbono fructosa, en la condición Control.

A partir de los valores obtenidos de variación de densidad óptica (DO) y de viabilidad respecto del tiempo, se construyeron las correspondientes curvas de crecimiento para cada cepa, las cuales se grafican a continuación (Figuras V.2, V.3 y V.4):

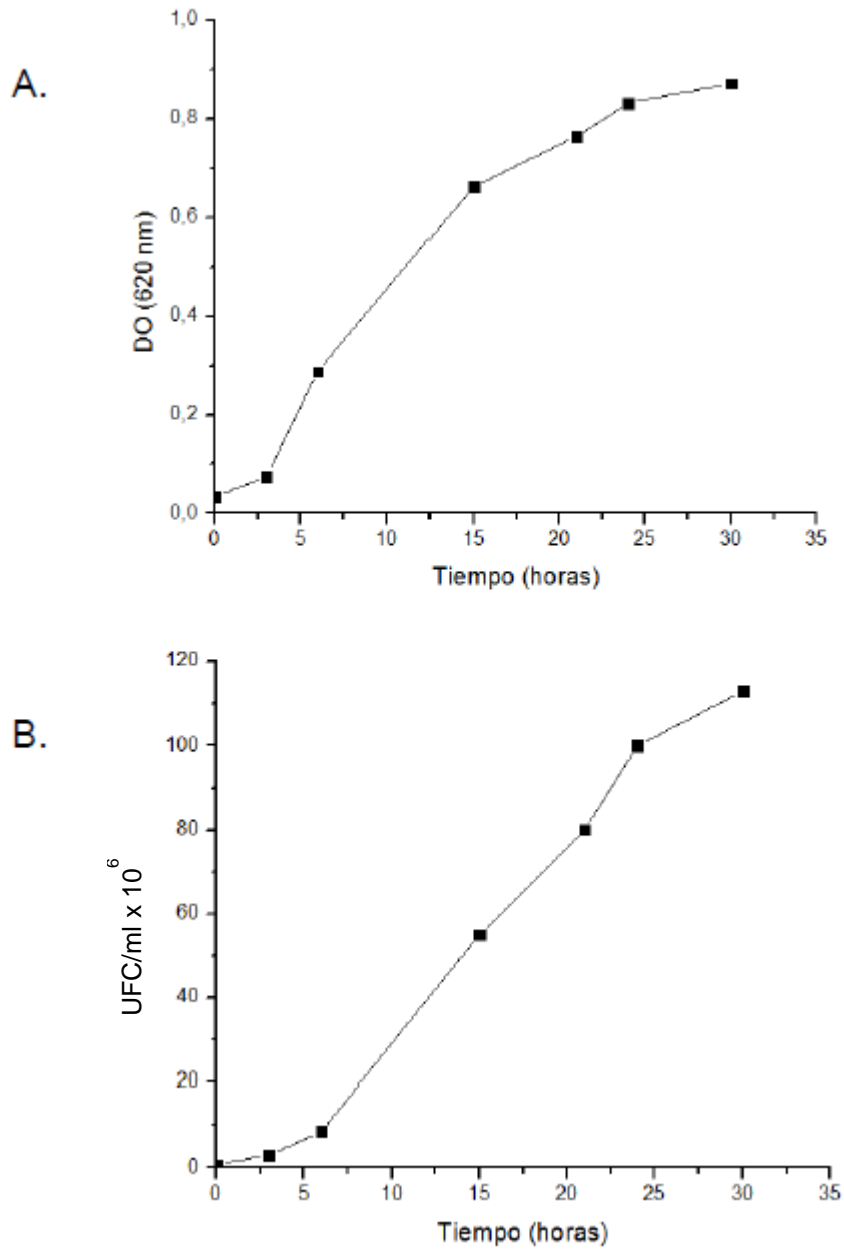


Figura V.2. Crecimiento de la cepa *A. brasilense* Cd evaluado mediante incremento de la densidad óptica (DO) respecto al tiempo **(A)** y la viabilidad expresada en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) respecto al tiempo **(B)**. Esta cepa fue cultivada en el medio NFB y los valores representan la media de dos determinaciones independientes.

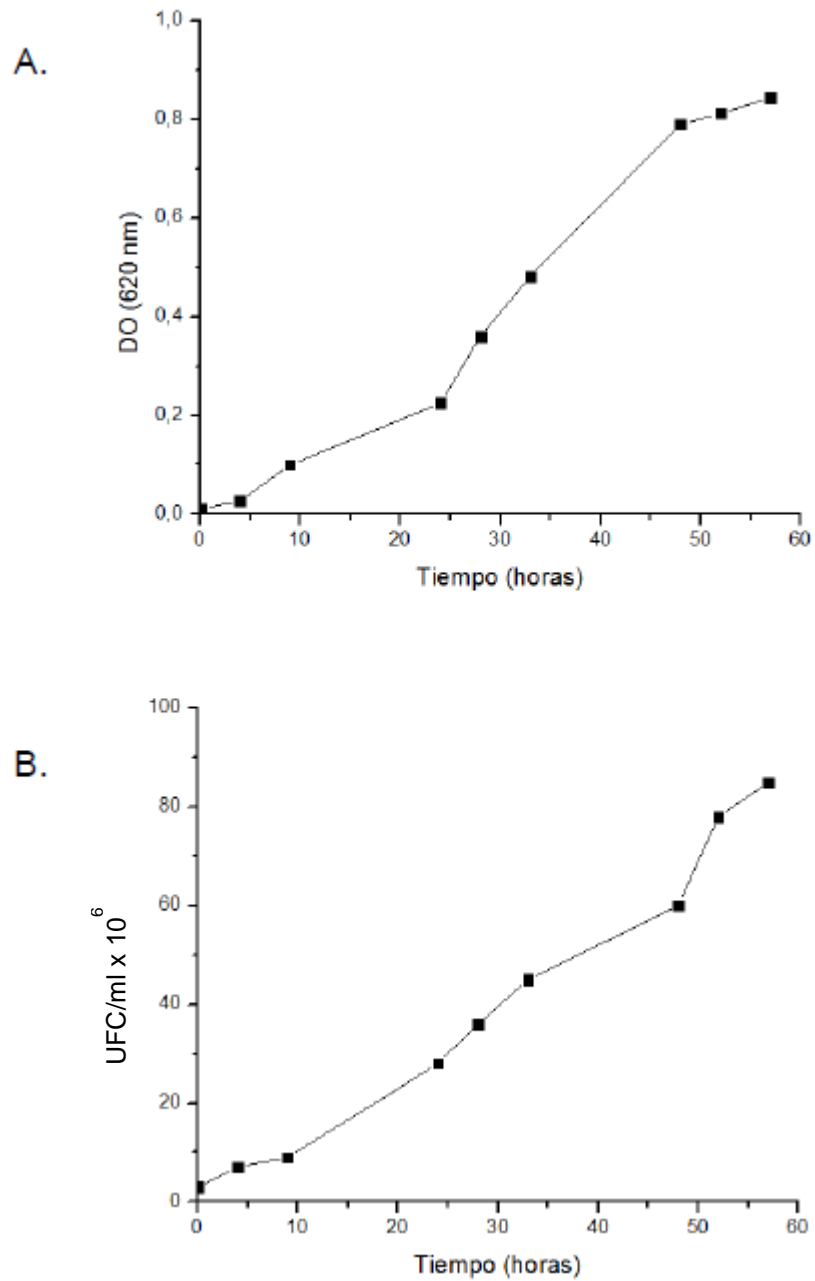


Figura V.3. Crecimiento de la cepa *B. sp.* C145 evaluado mediante incremento de la densidad óptica (DO) respecto al tiempo **(A)** y la viabilidad expresada en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) respecto al tiempo **(B)**. Esta cepa fue cultivada en el medio YEM y los valores representan la media de dos determinaciones independientes.

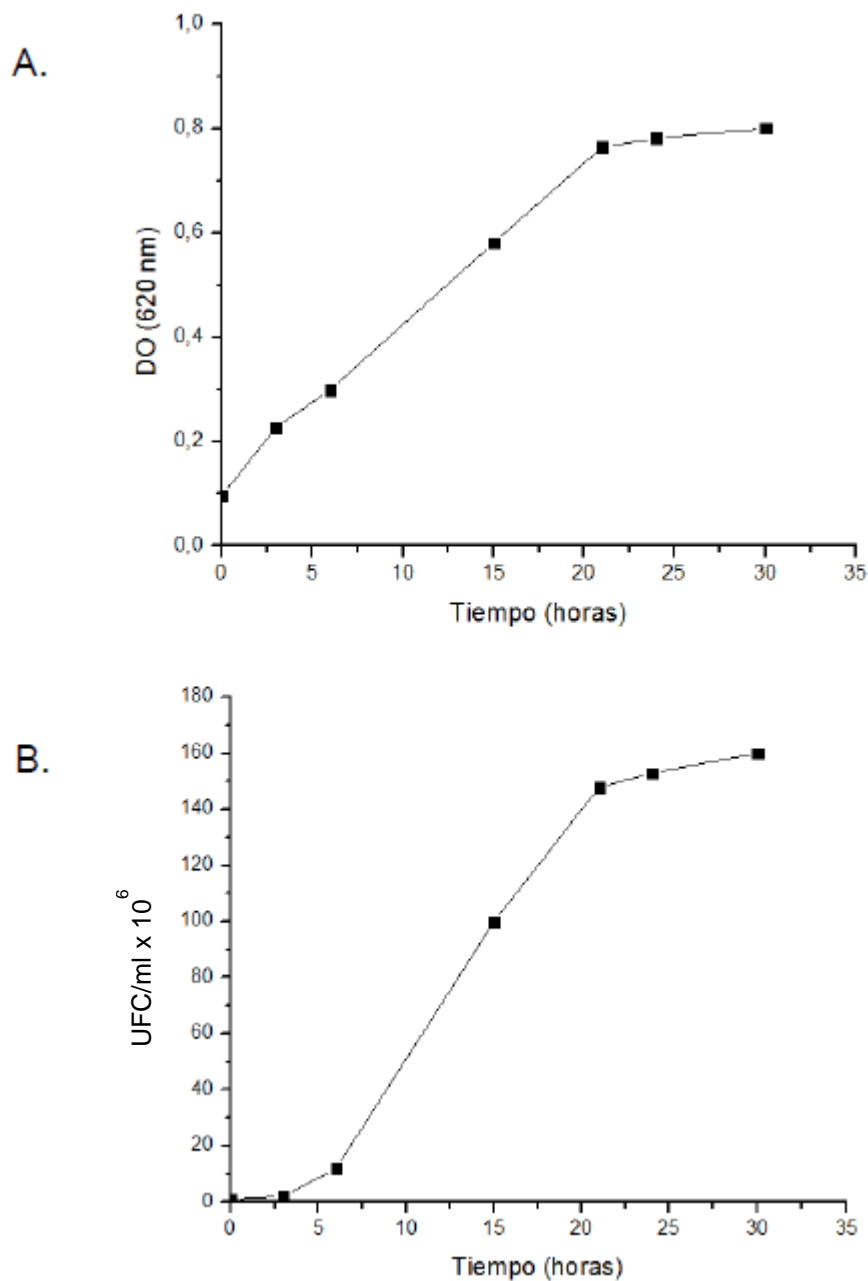


Figura V.4. Crecimiento de la cepa *O. TAL1000* evaluado mediante incremento de la densidad óptica (DO) respecto al tiempo **(A)** y la viabilidad expresada en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) respecto al tiempo **(B)**. Esta cepa fue cultivada en el medio YEM y los valores representan la media de dos determinaciones independientes.

A partir de las curvas de las Figuras V.2, V.3 y V.4 se determinaron la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación para cada cepa, empleando las ecuaciones indicadas en la sección IV.3.c de Materiales y Métodos, y se resumen a continuación.

Tabla V.1. Velocidad de crecimiento y tiempo de generación de *A. brasilense* Cd, *Bradyrhizobium* sp. C145 y *Ochrobactrum* TAL1000.

	Velocidad específica de crecimiento (UFC/min)	Tiempo de generación (horas)
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	8,4	5
<i>Bradyrhizobium</i> sp. C145	3,0	14
<i>Ochrobactrum</i> TAL1000	7,2	6

Los valores fueron calculados a partir de los datos obtenidos en las curvas de viabilidad mostradas en las Figuras V.2 (B), V.3 (B) y V.4 (B), y corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Como se puede apreciar en la Tabla V.1., la cepa C145 mostró un crecimiento lento, acorde al comportamiento que presenta el género *Bradyrhizobium*. De igual forma las otras dos bacterias TAL1000 y Cd, también mostraron valores de DO que se ajustan a las referencias bibliográficas. Analizando los valores de viables (Figuras V.2 (B), V.3 (B) y V.4 (B)), se puede apreciar que desde el final de la fase de crecimiento exponencial las bacterias mostraron recuentos del orden de 10^8 UFC/ml, valor óptimo para inoculaciones sobre plantas.

En la Tabla V.1 se observa que las bacterias empleadas en este trabajo, presentaron valores de velocidad de crecimiento acordes a sus géneros, al igual que sus tiempos de generación (g). Es de destacar el resultado obtenido para la cepa TAL1000, debido a que las referencias bibliográficas lo citan como perteneciente al género *Bradyrhizobium*. Pero todos nuestros estudios previos mostraron un comportamiento de crecimiento, una composición de moléculas de membrana y una respuesta de interacción con plantas de maní diferentes a las que presentan los géneros *Bradyrhizobium* o *Rhizobium* simbiotes de maní. Posteriormente mediante estudios genéticos de 16S, los mismos confirmaron que la cepa TAL1000 pertenece al género *Ochrobactrum*, lo cual implica que se deben realizar diferentes estudios para confirmar que TAL1000 pertenece a este género. Esta capacidad que tiene la planta de maní de asociarse simbióticamente con géneros de rizobia de crecimiento rápido ha sido reportado por diversos autores (Taurian y col., 2006; El-Akhala y col., 2008), pero la propiedad de *Ochrobactrum* de asociarse a las raíces de maní es novedoso.

V.2. Parámetros de crecimiento de la planta de maní

Para conocer el efecto de la salinidad y la presencia de rizobacterias sobre las rizodeposiciones de maní, las semillas fueron desinfectadas y crecidas según lo descrito en la sección IV.4 de Materiales y Métodos, para ser posteriormente empleadas en la obtención de las rizodeposiciones en las diferentes condiciones experimentales.

La Figura V.5 muestra el sistema de producción de rizodeposiciones de plantas de maní al cabo de los siete días de ensayo. Después de dicho período de crecimiento en el sistema hidropónico con solución nutritiva de Hoagland control, con 50 mM de NaCl, con diferentes microorganismos y con diversas combinaciones de estrés y bacterias, las plantas fueron separadas de la solución y se les determinó el peso seco de la parte aérea (PSPA) y el peso seco de la raíz (PSR), los cuales se grafican en las Figuras V.6 y V.7 respectivamente, y se calculó el índice raíz/parte aérea (IRPA) (Figura V.8).

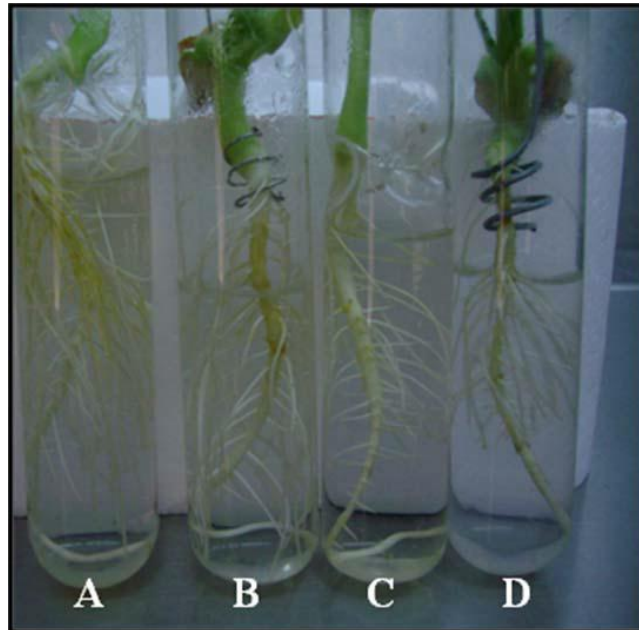


Figura V.5. Sistema de producción de rizodeposiciones y desarrollo radicular de *A. hypogaea* luego de siete días de crecimiento. Condiciones **A** y **C**, raíces de maní crecidas en solución de Hoagland control, sin inóculos; **B** y **D**, raíces de maní crecidas en solución de Hoagland con NaCl 50 mM, sin inóculos. **A** y **C**, sistema de tubo con soporte de vidrio, **B** y **D**, sistema de tubo con soporte de alambre.

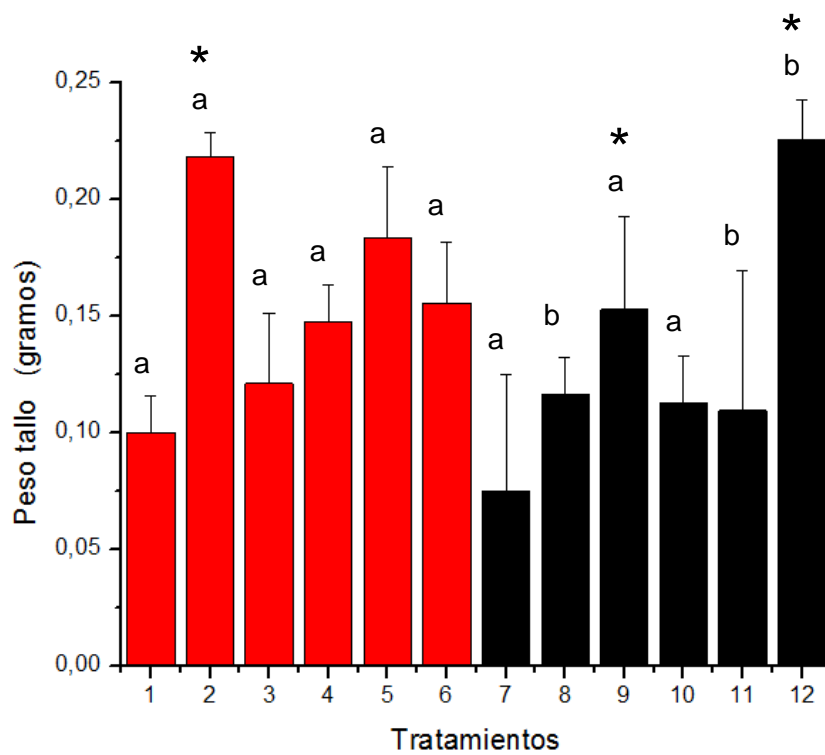


Figura V.6. Determinación del peso seco de tallos de maní crecidos durante siete días en medio hidropónico. En rojo condiciones control, en negro condiciones de estrés salino (50 mM de NaCl). Los inóculos aplicados se graficaron en el siguiente orden: **1 y 7**, Sin Inocular; **2 y 8**, *A. brasilense* Cd; **3 y 9**, *B. sp.* C145; **4 y 10**, *O. TAL1000*; **5 y 11**, *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd; **6 y 12**, *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd. Los datos corresponden a la media de 6 determinaciones independientes \pm DE. Se realizó el test ANOVA para corroborar el efecto de la salinidad e inóculos sobre el peso seco del órgano, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en ambos casos. Las letras (a y b) señalan diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento salinos y su control sin sal, mientras que las estrellas señalan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados en relación a los respectivos controles sin inocular. En ambos procedimientos, el nivel de confianza fue de 90%.

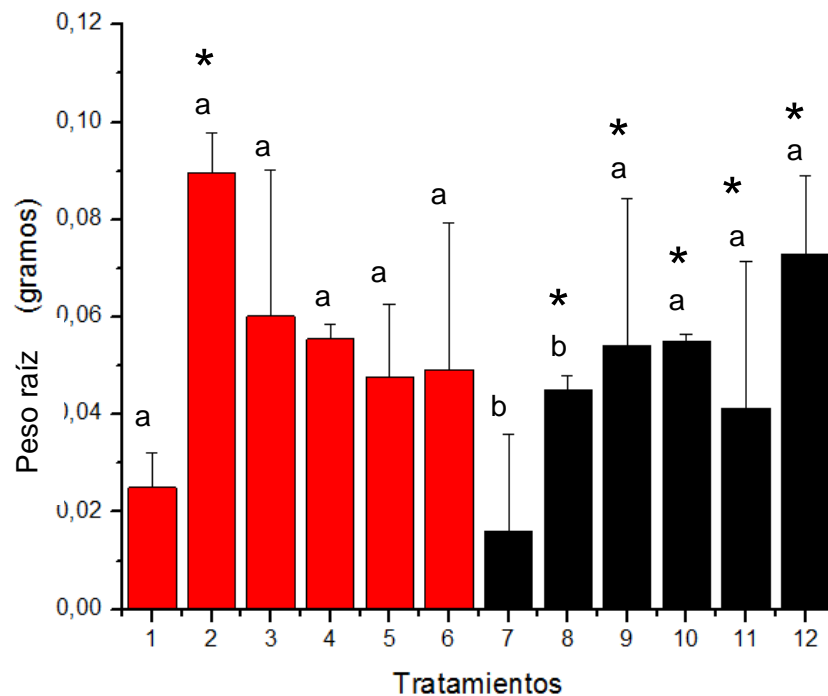


Figura V.7. Determinación del peso seco de raíces de maní crecidas durante siete días en medio hidropónico. En rojo condiciones control, en negro condiciones de estrés salino (50 mM de NaCl). Los inóculos aplicados se graficaron en el siguiente orden: **1 y 7**, Sin Inocular; **2 y 8**, *A. brasilense* Cd; **3 y 9**, *B. sp.* C145; **4 y 10**, *O. TAL1000*; **5 y 11**, *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd; **6 y 12**, *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd. Los datos corresponden a la media de 6 determinaciones experimentales \pm DE. Se realizó el test ANOVA: para corroborar el efecto de la salinidad e inóculos sobre el peso seco del órgano, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en ambos casos. Las letras (a y b) señalan diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento salinos y su control sin sal, mientras que las estrellas señalan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados en relación a los respectivos controles sin inocular. En ambos procedimientos, el nivel de confianza fue de 90%.

En general se observó que cualquier condición de inoculación mejoró el peso seco del vegetal respecto a las sin inocular.

Al analizar los sistemas inoculados en ausencia de salinidad, se registraron aumentos en los PSPA de todos los tratamientos respecto al control, los que fueron más notables en presencia de ciertos inóculos. En presencia de la PGPR inoculada sola (Figura V.6, tratamiento 2) se obtuvo el mayor efecto sobre PSPA, aumentando en más del 100% el valor con referencia a la condición control (Figura V.6, tratamiento 1). Los menores efectos se percibieron con las dos cepas rizobianas inoculadas individualmente (Figura V.6, tratamientos 3 y 4), mientras que cuando se coinocularon con la PGPR el aumento en el PSPA fue más pronunciado, siendo entre un 60 y un 80% mayor que el PSPA control (Figura V.6, tratamientos 5 y 6 respectivamente).

En presencia de salinidad, hubo una reducción en el PSPA para cuatro de las seis condiciones ensayadas respecto a sus controles sin sal. Sin embargo, con la cepa *B. sp.* C145 en salinidad, se observó incrementado el PSPA respecto a su control sin sal (tratamiento 9, Figura V.6). Del mismo modo, para la coinoculación entre *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd (tratamiento 12, Figura V.6), se manifestó un significativo aumento en el PSPA a pesar de crecer en presencia del factor estresante, el cual resultó ser un 70% mayor que para dicha coinoculación sin salinidad. Además, el PSPA con esta combinación de cepas en salinidad fue 3 veces mayor que su control sin inocular (tratamiento 7, Figura V.6), y superó en un promedio del 50% a los PSPA obtenidos con las restantes inoculaciones.

En los tratamientos sin inocular, la salinidad provocó una reducción en el PSR de la planta (Figura V.7, tratamientos 1 y 7 respectivamente). Como puede apreciarse, el efecto sobre la variación del peso seco fue mayor sobre las raíces que sobre los tallos, ya que las diferencias respecto a los controles fueron más pronunciadas para este órgano.

En ausencia de salinidad todos los PSR de las plantas inoculadas fueron mayores, al menos en un 50%, que los de las plantas controles sin inocular. La cepa que produjo el mayor aumento en el PSR en condición control fue la PGPR *A. brasilense* Cd, siendo dicho incremento del 360% con relación al tratamiento control in inocular (Figura V.7, tratamientos 2 y 1, respectivamente). Esto se correlaciona con el incremento del PSPA que tuvieron las plantas de maní al ser inoculadas con esta cepa (Figura V.6, comparación entre tratamientos 1 y 2).

En salinidad se destacaron los efectos de las inoculaciones simples y dobles frente a la condición sin inocular, ya que los aumentos en los PSR fueron significativamente

mayores, observando un mayor efecto de inoculación en la combinación entre *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd (Figura V.7, tratamiento 12).

A continuación se muestran los resultados registrados de la relación entre raíz/parte aérea (IRPA) calculados para todos los tratamientos experimentales ensayados. La relación raíz/parte aérea se considera como un índice de equilibrio del crecimiento de los órganos de una planta. Si una condición produce una mayor variación en el crecimiento de un órgano en relación al otro, esto se reflejará en dicho índice (López-Gómez, 2007).

Para el maní, en ausencia de inóculo, y como consecuencia de la salinidad, se observó que la reducción en el PSPA fue del 25%, mientras que la reducción en el PSR fue del 36%, mostrando, en principio, una tendencia a una mayor afectación de la salinidad sobre la raíz que sobre el tallo (Figuras V.6 y V.7, tratamientos 1 y 7). Sin embargo, estos porcentajes de reducción no modificaron marcadamente a los IRPA, si bien los índices experimentaron leves reducciones (Figura V.8, tratamientos 1 y 7). En los tratamientos inoculados, al igual que lo sucedido con los controles sin inocular, los IRPA no sufrieron modificaciones debidas a la salinidad aplicada debido a que aun en presencia del factor estresante, ambos órganos experimentaron reducciones coordinadas de sus pesos secos (Figura V.8, comparaciones entre los tratamientos inoculados con la misma cepa, en presencia y ausencia de salinidad; comparar tratamientos: 2 y 8, 3 y 9, 4 y 10, 5 y 11, 6 y 12).

Contrariamente, al analizar el efecto sobre los IRPA, de las inoculaciones respecto a los controles sin inocular, tanto en ausencia como en presencia de salinidad, los índices aumentaron entre 30 y 50% respecto a los controles (Figura V.8, comparaciones entre los tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6, respecto de 1; y 8, 9, 10, 11 y 12, respecto de 7), indicando la ocurrencia de un efecto de los inóculos sobre la raíz.

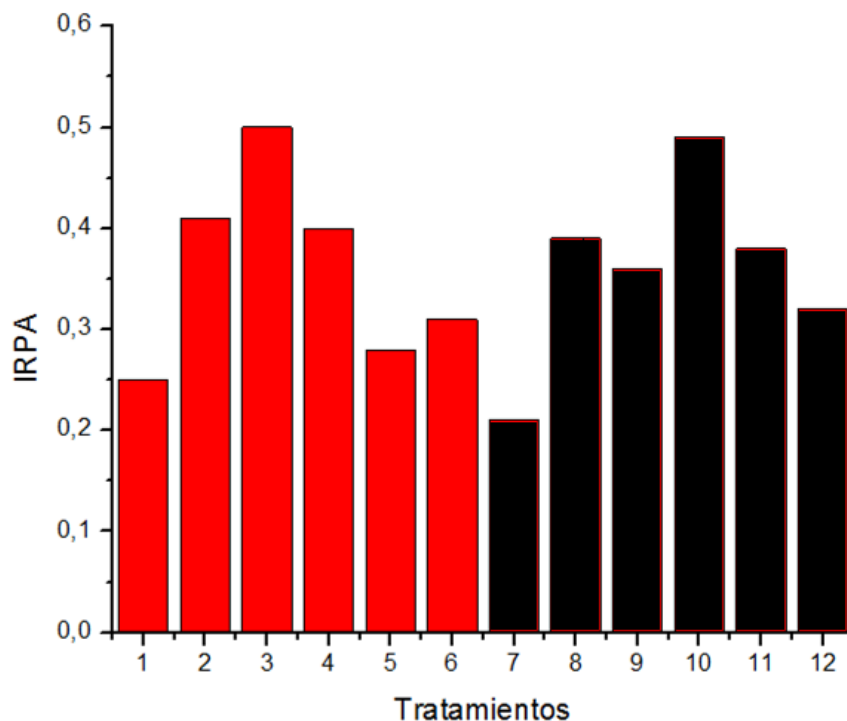


Figura V.8. Determinación del Índice Raíz/Parte aérea (IRPA) empleando el peso seco de órganos de plantas de maní crecidas durante siete días en medio hidropónico. En rojo condiciones control, en negro condiciones de estrés salino (50 mM de NaCl). Los inóculos aplicados se graficaron en el siguiente orden: **1 y 7**, Sin Inocular; **2 y 8**, *A. brasilense* Cd; **3 y 9**, *B. sp.* C145; **4 y 10**, *O. TAL1000*; **5 y 11**, *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd; **6 y 12**, *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd. Los datos corresponden a la media de 6 determinaciones experimentales.

Observando los pesos por separado, se detectó que los incrementos en los PSR fueron superiores al 100% para todas las cepas (Figura V.7, tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 respecto a 1), mientras que para los tallos, se vieron aumentos del 50% (Figura V.6, tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6 respecto a 1), resultando en un incremento de los índices del doble respecto de los controles sin inocular (Figura V.8). Este resultado indica que podría existir un efecto temprano de las cepas sobre la raíz, durante los primeros 7 días de crecimiento de la planta.

Las coinoculaciones generaron incrementos tanto en los pesos secos de los tallos como de las raíces, pero las diferencias entre ambos fueron menos marcadas que en el caso anterior. Esto hizo que los índices aumentaran en menor medida que lo que ocurrió

con las inoculaciones simples (Figura V.8, tratamientos 5 y 6), mostrando un efecto de las inoculaciones sobre los pesos no solo de las raíces, sino también sobre los tallos (ver: Figura V.6 y Figura V.7, tratamientos 5 y 6).

En presencia de salinidad, todos los inóculos, tanto individuales como combinados, provocaron aumentos de los índices (Figura V.8, tratamientos 8, 9, 10, 11 y 12 respecto a 7), indicando que ocurrieron efectos favorables en el crecimiento de las plantas de maní a pesar de la presencia de salinidad en el medio.

También otro parámetro que fue analizado en este estudio es la variación del potencial de hidrógeno (pH) de la solución nutritiva de Hoagland al cabo de 7 días de ensayo. Dicha solución tiene un valor de pH de 7, el cual fue modificado por el crecimiento de las raíces. Los pH medidos a las rizodeposiciones producidas por las raíces de maní en los 12 tratamientos aplicados se resumen en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Valores de pH medidos a las soluciones de crecimiento de plantas de maní, recolectadas luego de los siete días de crecimiento, y posteriormente a ser filtradas con filtros estériles *Millipore* de 0,22 μm de diámetro de poro.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	5,5	6,5	6,5	6,0	6,5	6,5	5,5	6,5	6,0	7,0	6,5	6,5

Tratamientos **1 a 6**: condición control. Tratamientos **7 a 12**: condición de estrés salino (50 mM de NaCl). Los inóculos aplicados se ordenan de la siguiente manera: **1 y 7**, Sin Inocular; **2 y 8**, *A. brasilense* Cd; **3 y 9**, *B. sp.* C145; **4 y 10**, *O. TAL1000*; **5 y 11**, *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd; **6 y 12**, *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd.

En todos los tratamientos, los pH resultaron acidificados luego del crecimiento de las raíces. En ausencia de microorganismos (Tabla V.2, tratamientos 1 y 7) se obtuvieron los valores de pH más bajos, de 5,5, que no difirieron por la salinidad.

En presencia de los inóculos se obtuvieron valores entre 6 y 7, siendo levemente más ácidas las rizodeposiciones obtenidas para todos los tratamientos controles que salinos, excepto para los tratamientos 3 y 9 (inoculados con *B. sp.* C145), en cuyo caso el tratamiento en salinidad produjo un pH inferior al control.

En todos los casos, los inóculos aplicados ejercieron un efecto sobre la reducción del pH generada por el crecimiento de las raíces.

V.3. Caracterización de la composición molecular de rizodeposiciones de *A. hypogaea*

Según lo señalado en la introducción (apartado I.5), las raíces son productoras de diversas moléculas con variadas funciones en la rizósfera. Para conocer la composición de las rizodeposiciones de maní, se realizó un ensayo con plantas de maní durante siete días, las cuales fueron crecidas en solución nutritiva de Hoagland. Al cabo de dicho tiempo las muestras fueron filtradas, y una vez libres de contaminación se procedió a la identificación de moléculas con relevancia en la comunicación rizosférica: ácidos grasos, fitohormonas, aminoácidos y flavonoides.

Luego de estudiar este tipo de rizodeposición se aplicaron diversas variantes como es el estrés salino y la presencia o ausencia de microorganismos rizosféricos, para analizar si frente a estas nuevas condiciones el patrón de moléculas liberadas por las raíces de maní era modificado.

V.3.a. Estudio de la composición de ácidos grasos de rizodeposiciones de maní

Para la extracción de la fracción lipídica de las rizodeposiciones se ha seguido la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959) modificado por Medeot (2009), utilizando como principio la solubilidad diferencial de los lípidos en solventes orgánicos. Los lípidos totales fueron recuperados de las fracciones de rizodeposiciones liofilizadas y concentradas y los ácidos grasos (AG) fueron metilados y analizados por cromatografía gaseosa (GC). Se obtuvieron los perfiles de metil-ésteres de ácidos grasos o FAMES presentes en los exudados de raíces de maní creciendo en las condiciones experimentales descritas en la sección Materiales y Métodos. Los FAMES obtenidos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención (t_r) en la columna cromatográfica con patrones conocidos. Los resultados se expresaron como porcentaje de área de cada pico correspondiente a cada FAME, respecto al área total.

En el Anexo IX.I se presenta la tabla IX.1, mostrando los valores porcentuales alcanzados por cada FAME en cada tratamiento. Se obtuvieron porcentajes muy variables entre los distintos FAMES, por lo que se expresaron categorías a fin de ser más explicativas y facilitar la interpretación de los resultados de los perfiles cromatográficos obtenidos. Ellas son:

- **ND:** No Detectado (en el cromatograma, a un determinado tiempo de retención que coincide con el tr de un testigo puro, no se puede observar indicio de un pico).
- **Tr:** Trazas (% de área: menor o igual al 1%).
- **Minoritarios:** porcentajes entre 1 y 10%.
- **Intermedios:** porcentajes entre 10 y 20%.
- **Mayoritarios:** porcentajes mayores al 20%.

Las rizodeposiciones de maní mostraron a los FAMEs 16:0 y 18:0 con porcentajes mayoritarios en todos los tratamientos, excepto en ausencia de sal coinoculado con *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd (ver: niveles porcentuales para tratamiento 11 en Tabla IX.1 del anexo IX.1), en el que redujeron su porcentaje a expensas del gran incremento porcentual del AG 24:0.

En aquellas condiciones en las que estuvieron presentes, los AG saturados de 13, 15 y 17 carbonos (C), lo hicieron en cantidades minoritarias o de trazas y de igual forma para los AG saturados de cadenas largas, de 20, 21, 22 y 23 C.

Por otro lado el AG de 24 C fue mayoritario en los tratamientos controles tanto en presencia de *O. TAL1000* inoculada individualmente (ver: niveles porcentuales para tratamiento 9 en Tabla IX.1 del anexo IX.1) así como coinoculada con la PGPR (ver: niveles porcentuales para tratamiento 11 en Tabla IX.1 del anexo IX.1); además mostró niveles intermedios en el resto de los tratamientos, y finalmente estuvo ausente en las muestras obtenidas en ausencia de bacterias (ver: niveles porcentuales para los tratamientos 1: sin inocular control y 2: sin inocular salino, en Tabla IX.1 del anexo IX.1).

Se encontraron, en general, porcentajes bajos de los FAMEs insaturados y solo 18:1 mostró niveles porcentuales altos en el tratamiento control sin NaCl y sin inocular (ver: tratamiento 1 en Tabla IX.1 del anexo IX.1), en la inoculación con *A. brasilense* Cd en ausencia de salinidad (ver: tratamiento 3 en Tabla IX.1 del anexo IX.1), y en presencia del rizobio *B. sp. C145* en el tratamiento salino (ver: tratamiento 6 en Tabla IX.1 del anexo IX.1).

En ausencia de microorganismos se detectaron 8 AG diferentes en ambas condiciones. Debido a la salinidad aplicada, se produjo una reducción en el porcentaje para los insaturados 16:1 y 18:1, y para los saturados 17:0 y 20:0, mientras que hubo incrementos en los porcentajes de los saturados 16:0 y 18:0 del insaturado 20:3.

Como consecuencia de la aplicación de los inóculos bacterianos sobre las raíces de maní, se detectaron alteraciones en el patrón de exudación de AG. Las rizodeposiciones

provenientes de las raíces inoculadas mostraron, en general, entre 5 y 8 FAMEs diferentes, excepto la coinoculación entre *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd sin NaCl, en la que se detectaron solo 3 FAMEs diferentes. Se mantuvieron altos los porcentajes de los FAMEs 16:0, 18:1, 18:0 y, en menores niveles, 24:0, excepto en el tratamiento coinoculado con *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd en condición control, en el que este FAME sufrió un incremento destacado a expensas de los niveles de todos los restantes, ya que solo se detectaron en cantidades muy pequeñas los FAMEs 16:0 y 18:0.

En los tratamientos salinos, prevalecieron los FAMEs 16:0, 18:1, 18:0 y el 24:0. Los AG saturados de 16 y 18 C experimentaron incrementos en la condición salina en todos los tratamientos, excepto para las inoculaciones con *B. sp. C145* tanto en forma individual como coinoculado con la PGPR, en los cuales la salinidad redujo el porcentaje del 18:0.

A continuación se detallan los resultados individualizados por tratamientos, en las siguientes figuras:

V.3.a.i.a) Tratamientos sin inocular, control y con salinidad

En el tratamiento control sin inóculos y sin salinidad, en las rizodeposiciones de maní se detectaron 8 AG diferentes. Tres de ellos mostraron porcentajes mayoritarios, en primer lugar el 18:0 seguido por el 16:0, ambos presentando alrededor del 30%, y luego el 18:1 con un porcentaje cercano al 20% (Figura V.9), y con porcentajes minoritarios se presentaron los AG 20:0, 17:0, el insaturado 16:1, 15:0 y 13:0. Se detectaron trazas de los AG 20:3 y 21:0.

La salinidad modificó el patrón de exudación de las raíces en ausencia de inóculos bacterianos. En esta condición, se obtuvieron 8 FAMEs diferentes. Hubo dos mayoritarios que fueron 18:0 seguido por 16:0, ambos exhibiendo porcentajes alrededor del 40%. Respecto al control sin sal, se produjeron reducciones del 50% para el insaturado 16:1 y para el saturado 20:0; y de casi el 100% para el insaturado 18:1, y para el 17:0, ya que prácticamente desaparecieron en salinidad. Contrariamente, se incrementaron los porcentajes del 16:0 en un 45%; 18:0 aumentó un 35%; y el tri-insaturado 20:3 aumentó casi 10 veces su nivel respondiendo al estrés salino. Los dos AG restantes se incrementaron levemente por esta condición, y fueron los saturados 13:0 y de 15:0, que se obtuvieron en porcentajes minoritarios (Figura V.9).

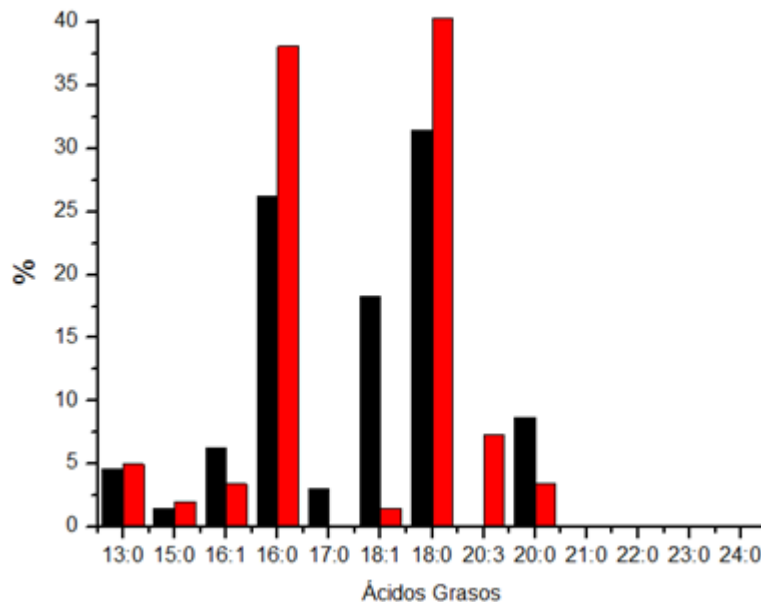


Figura V.9. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Control sin inocular y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Control sin inocular, con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.i.b) Tratamientos inoculados con *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

En presencia de *A. brasilense* Cd sin estrés salino se observaron 8 AG diferentes en las rizodeposiciones de maní (ver Figura V.10, barras negras). Los FAMEs mayoritarios fueron 18:0, 18:1 y 16:0, los tres con porcentajes de aproximadamente un 30%. El nivel de 16:0 aumentó un 10% por la salinidad. 18:1 sufrió una reducción de casi 20 veces a causa de la salinidad mientras que por el contrario, 18:0 aumentó 20 veces por la salinidad y fue el AG y la condición que mayor porcentaje mostró. El insaturado 16:1 mostró un porcentaje minoritario en ambas condiciones, pero sufrió un ligero aumento debido a la salinidad. Debido a la inoculación con *A. brasilense* Cd el FAME 23:0, que no había sido detectado en tratamientos previos, mostró un porcentaje del 2% en la condición sin sal, y sufrió un incremento de 4 veces por la salinidad, alcanzando aproximadamente un 8% en esta condición. Finalmente, 24:0 presentó un porcentaje cercano al 6%, y disminuyó en casi 6

veces su nivel, en respuesta a la salinidad. Los insaturados mantuvieron niveles similares al control salino sin inocular. El resto de los FAMEs se observaron en trazas y otros estuvieron ausentes.

Los AG 13:0 y 21:0 estuvieron en porcentajes minoritarios, alrededor del 1,5% en la condición control sin sal, y no se vieron en presencia de dicho factor estresante.

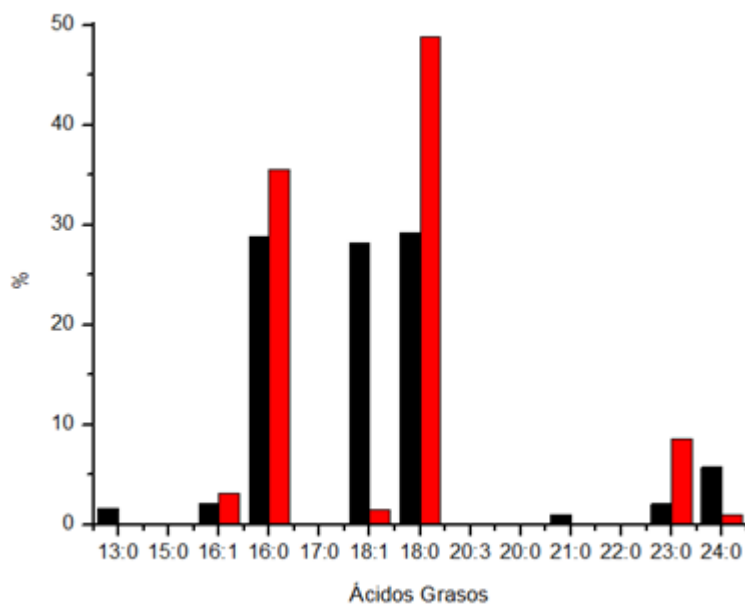


Figura V.10. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.i.c) Tratamientos inoculados con *B. sp. C145* en condiciones control y con salinidad

En presencia del rizobio *B. sp. C145* el cromatograma de las rizodeposiciones de maní mostró 6 AG. En ausencia de sal, fueron mayoritarios los FAMEs 16:0, con un porcentaje cercano al 30% y 18:0, cercano al 60%. 18:1 mostró un porcentaje de menos del 10% y hubo trazas de 16:1 con este inóculo, mientras que el AG 24:0, mostró valores cercanos al 5% (Figura V.11, barras negras).

En presencia de salinidad hubo un solo FAME mayoritario, 16:0, para el cual se determinó un porcentaje de alrededor del 60%, experimentando un aumento del 40% respecto al control sin sal. En las rizodeposiciones salinas no se detectó 16:1. Los AG 18:1 y 18:0, mostraron un mismo nivel porcentual, siendo de alrededor del 15% (Figura V.11, barras rojas); 18:1 se incrementó 5 veces comparado con la inoculación libre de sal (comparación barras negras y rojas) mientras que 18:0 redujo su porcentaje en la misma proporción. En ausencia de salinidad se detectaron trazas de 23:0, pero su porcentaje se incrementó hasta aproximadamente un 3% por salinidad, y el AG 24:0 en salinidad se aproximó al 10%.

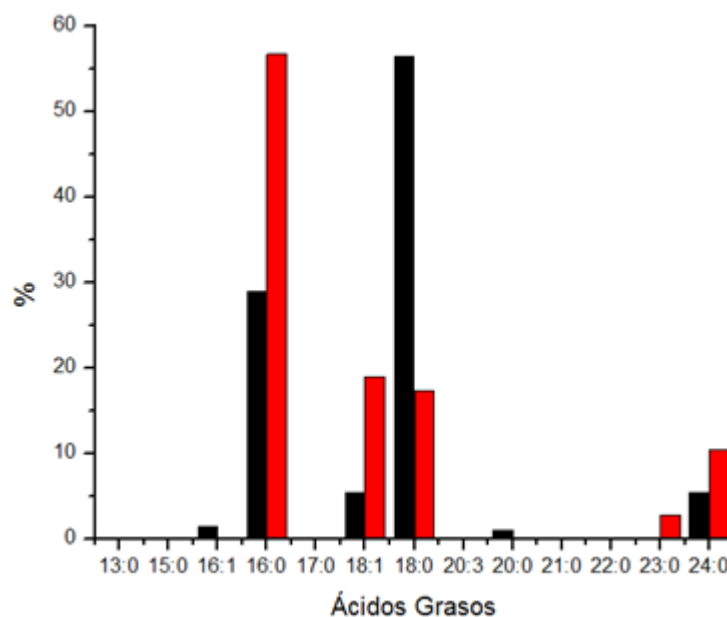


Figura V.11. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.i.d) Tratamientos inoculados con *B. sp. C145* + *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

Con la coinoculación entre el rizobio *B. sp. C145* y la PGPR (Figura V.12), se observaron 8 AG en las rizodeposiciones de maní obtenidas en ausencia de sal. Se obtuvieron porcentajes superiores al 50% de 18:0, seguido por un 35% del FAME 16:0. Al igual que lo sucedido con los tratamientos control inoculados con la PGPR y con el rizobio en forma individual, el AG 16:1 se detectó en porcentajes minoritarios, y no varió su nivel por la salinidad. También se detectaron los AG 13:0, 21:0, 23:0 y 24:0 en porcentajes minoritarios.

Debido a la salinidad se vieron respuestas por parte de 16:0, que se incrementó un 10%; 18:1, que si bien mostró porcentajes minoritarios, se incrementó 4 veces por el factor estresante; finalmente, 18:0 mostró una leve reducción en su porcentaje por la salinidad. El resto de los FAMES detectados, no mostraron variaciones. Para esta coinoculación en salinidad, se detectaron trazas de 15:0, 17:0, 20:0, 21:0 y 22:0.

En ausencia de salinidad, el patrón de AG de las rizodeposiciones influenciado por la coinoculación, se asemejó más al producido por el rizobio que al de la PGPR, cuyo patrón se pareció más al mostrado por la condición control sin inocular.

En salinidad, el patrón de FAMES de la coinoculación se asemejó más al producido por la PGPR que al producido por el rizobio solo.

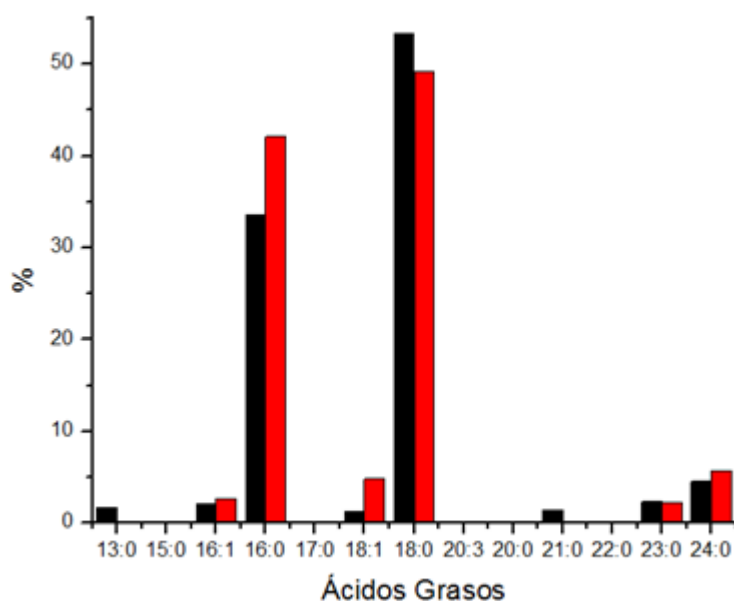


Figura V.12. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 + *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 + *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.i.e) Tratamientos inoculados con *O. TAL1000* en condiciones control y con salinidad

Cuando la inoculación se realizó con el rizobio *O. TAL1000* en condiciones control, se obtuvieron 5 AG diferentes, siendo mayoritarios en este caso los AG 16:0, 18:0, y 24:0. Para este último AG, se observó un nivel porcentual destacado en este tratamiento, respecto a los previamente analizados, y alcanzó casi un 40% (Figura V.13, barras negras). Los AG insaturados fueron minoritarios, el 16:1 mostró porcentajes cercanos al 5% y 18:1 alcanzó casi un 2%. Hubo trazas de 13:0, 15:0 y 21:0.

Al comparar los resultados con los obtenidos en salinidad, se observó un cambio en la composición porcentual de AG de los exudados sometidos a estrés. En particular, el porcentaje de 18:0 aumentó, el porcentaje de 24:0 disminuyó, mientras que el 16:1 y 16:0 se mantuvieron (Figura V.13, barras rojas).

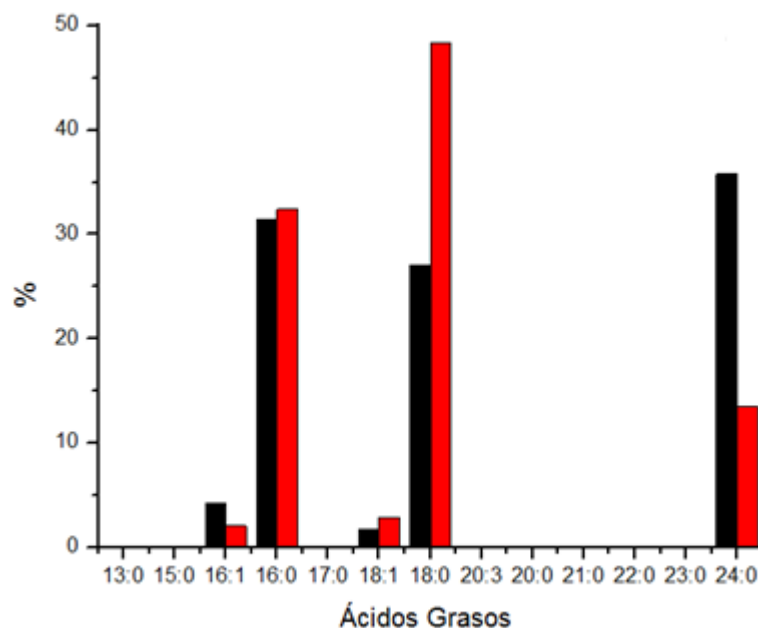


Figura V.13. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.i.f) Tratamientos inoculados con *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

Para este rizobio combinado con la PGPR el patrón de AG de las rizodeposiciones de maní fue muy específico y diferente a lo observado con el resto de los tratamientos controles. En condición control, apareció el 24:0 como el único AG mayoritario, alcanzando niveles de 90%, y además hubo pequeños porcentajes de 18:0 y 16:0, que no superaron el 10% (Figura V.14, barras negras).

En esta coinoculación se produjeron notables modificaciones en los exudados salinos frente a los exudados controles, dados por un marcado aumento en el porcentaje de ambos, 16:0 y 18:0. Se observó la aparición de 18:1, que en condición control no fue detectado. Finalmente, se produjo una gran reducción del 24:0 que en control sin sal fue el mayoritario para esta combinación de cepas.

El patrón de AG de rizodeposiciones de maní obtenido frente a la inoculación entre estas dos cepas en ausencia de salinidad, fue muy específico, diferenciándose de los observados con ambas inoculaciones individuales, excepto que coincidió con la inoculación simple con el rizobio en el alto nivel del AG 24:0 (comparar Figura V.14, barras negras con Figura V.13, barras negras).

El patrón obtenido para esta coinoculación en presencia de salinidad (Figura V.14, barras rojas) fue semejante en número y porcentajes de AG, a los mostrados por las rizodeposiciones producidas por la raíz en presencia de este rizobio solo (Figura V.13, barras rojas), así como al patrón producido por la PGPR en condición salina (Figura V.10, barras rojas).

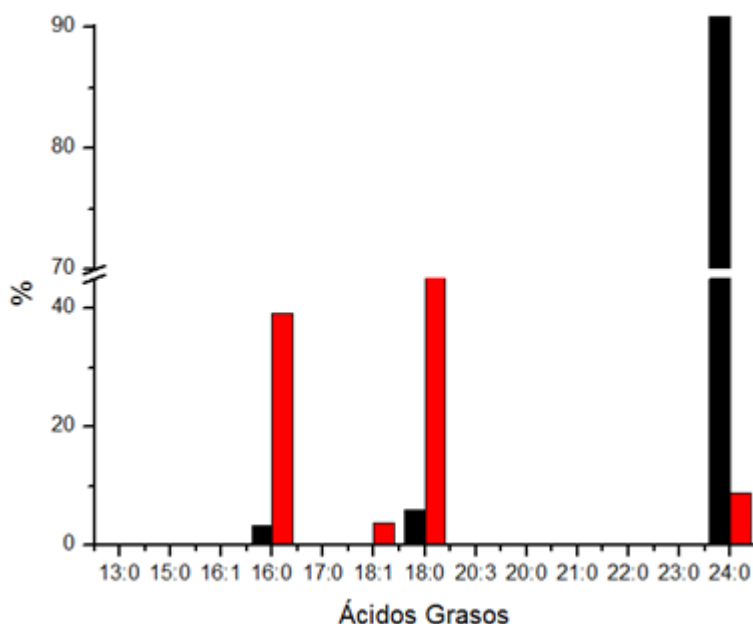


Figura V.14. Porcentajes de los ácidos grasos detectados por cromatografía gaseosa e identificados por comparación de tiempo de retención con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 + *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 + *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.a.ii. Índices de insaturación

En la Figura V.15 se muestran los resultados de los índices de grado de insaturación calculados según Svenningsson y col., (1990). El índice calculado establece la relación AG insaturados/ AG saturados, por lo cual si el índice sufre incrementos, significa que la proporción de insaturados aumenta, ó viceversa (Svenningsson y col., 1990).

En la figura mencionada se puede observar que en ausencia de inóculos bacterianos (Figura V.15, barras 1 y 2), el índice se redujo levemente por la salinidad, lo cual indica una reducción en la proporción de insaturados en las rizodeposiciones debido a este factor ambiental adverso.

En presencia de los inóculos y en ausencia de salinidad, los índices se modificaron de la siguiente manera: en respuesta a la PGPR el índice no varió marcadamente (Figura V.15, barra 3); en presencia de los dos rizobios empleados el índice se redujo

significativamente (Figura V.15, barras 5 y 7), al igual que con las coinoculaciones (Figura V.15, barras 9 y 11).

En presencia de salinidad, y para los cinco inóculos ensayados (Figura V.15, barras 4, 6, 8, 10 y 12), los índices disminuyeron respecto al tratamiento control sin inocular (Figura V.15, barra 2), y vale mencionar que para la cepa *B. sp.* C145 en salinidad (barra 6), el índice obtenido fue superior a los demás.

Estas reducciones de los índices observadas para todos los casos en presencia de inóculos, sugieren que hubo aumentos en la proporción de ácidos grasos saturados en las rizodeposiciones.

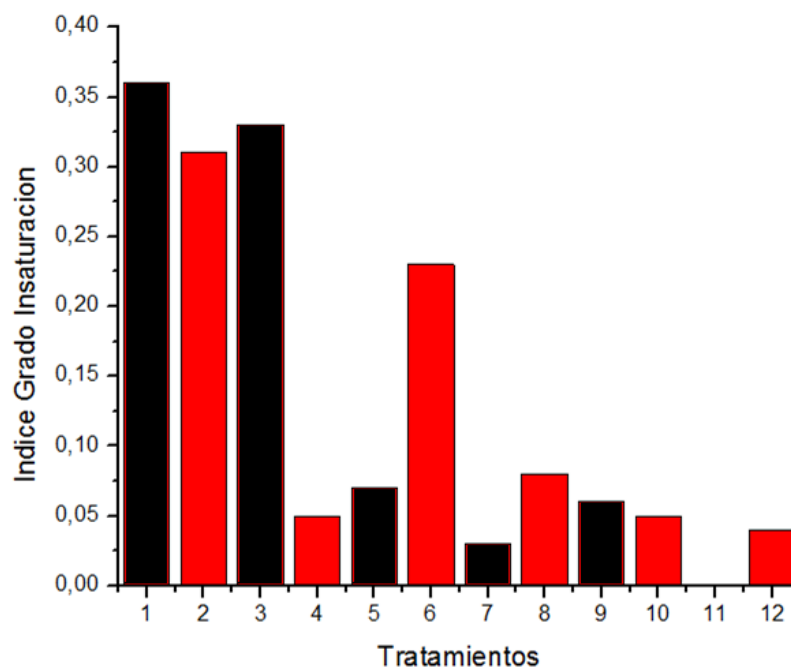


Figura V.15. Gráficos de barra ilustrando los Índices de grado de insaturación calculados de acuerdo a Svenningsson y col., (1990) para los AG detectados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Tratamientos sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Tratamientos con Cloruro de Sodio 50 mM. Los inóculos se graficaron en el siguiente orden: **1 y 2:** Sin Inocular. **3 y 4:** *A. brasilense* Cd. **5 y 6:** *B. sp.* C145. **7 y 8:** *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd. **9 y 10:** *O. TAL1000*. **11 y 12:** *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd.

V.3.b. Estudio de la composición de moléculas señales (auxinas, triptófano y flavonoides) en rizodeposiciones de maní

En las diversas rizodeposiciones detalladas anteriormente, se analizaron moléculas vegetales implicadas en procesos de interacción y comunicación con los microorganismos en la rizósfera. En la Tabla 2 presentada en el Anexo IX.I, se muestran los resultados de los datos obtenidos por HPLC-MS, cuantificando los niveles de AIA, triptófano y flavonoides. Para un estudio detallado de las diversas moléculas, se han realizado un análisis por separado de cada tipo de molécula obteniendo diversas gráficas que se presentan a continuación.

V.3.b.i. Estudio de ácido indol acético en rizodeposiciones de maní

En la Figura V.16 se muestran los niveles de la fitohormona AIA hallados en las rizodeposiciones de maní obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo que se ensayaron en este trabajo.

En las rizodeposiciones libres de microorganismos, en condiciones control y salina (Figura V.16, tratamientos 1 y 2), no se cuantificó AIA mediante la técnica empleada. Cuando las rizodeposiciones se obtuvieron en presencia de microorganismos, la respuesta fue variable, destacando la cuantificación de esta hormona en todas las condiciones salinas y en presencia de las bacterias en ensayos simples y de coinoculaciones (Figura V.16, tratamientos 4, 6, 8, 10 y 12), en especial se destacó la cuantificación en presencia de *O. TAL1000* inoculada de forma individual, con y sin salinidad, destacándose el incremento del nivel de la auxina provocado por dicho factor estresante.

Con los tratamientos 7 (coinoculación entre *B. sp. C145* + *A. brasilense* Cd libre de sal) y 11 (coinoculación entre *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd libre de sal) no se detectó la auxina.

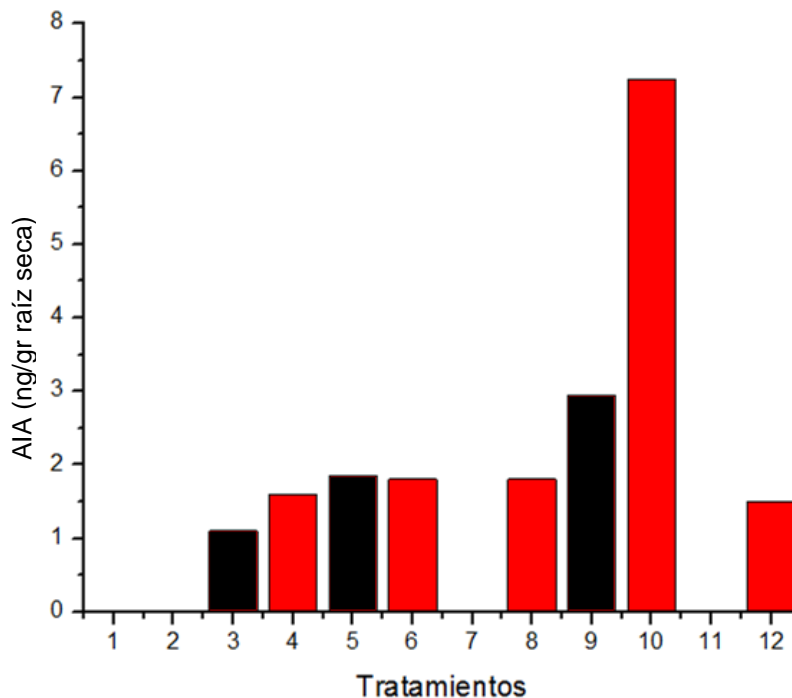


Figura V.16. Niveles de AIA hallados en rizodeposiciones de maní de siete días de crecimiento creciendo en solución nutritiva líquida. Los niveles detectados por HPLC-MS se cuantificaron y se expresan en ng/gr de raíz seca. **Barras negras:** Tratamientos sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Tratamientos con Cloruro de Sodio 50 mM. Los inóculos se graficaron en el siguiente orden: **1 y 2:** Sin Inocular. **3 y 4:** *A. brasilense* Cd. **5 y 6:** *B. sp.* C145. **7 y 8:** *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd. **9 y 10:** *O. TAL1000*. **11 y 12:** *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd.

V.3.b.ii. Estudio de triptófano en rizodeposiciones de maní

En la Figura V.17 se graficaron los niveles del aminoácido triptófano, precursor para la síntesis de AIA, hallados en las rizodeposiciones de maní obtenidas en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas.

Los valores registrados en la Figura V.17 muestran que, al igual que para AIA, en condiciones libres de microorganismos (control y salina), no se detectaron niveles de triptófano (Figura V.17, tratamientos 1 y 2). En oposición a esto, en presencia de la PGPR *A. brasilense* Cd y de los rizobios C145 y TAL1000, siempre se pudo cuantificar este aminoácido, a excepción de la inoculación de TAL1000 en la condición 50 mM de NaCl

(Figura V.17, tratamiento 10). Es posible que esta ausencia de triptófano se deba a que se ha transformado en AIA (comparar niveles de ambas moléculas en las Figuras V.17 y V.16, para el tratamiento 10).

También en coincidencia con los datos de la Figura V.16, los tratamientos salinos mostraron altos niveles del aminoácido a excepción de las inoculaciones con TAL1000 (Figura V.17, tratamientos 9 al 12), donde en el caso del ensayo de coinoculación en salinidad disminuyó un 50% en comparación con el tratamiento coinoculado libre de estrés salino (Figura V.17, tratamientos 12 y 11 respectivamente).

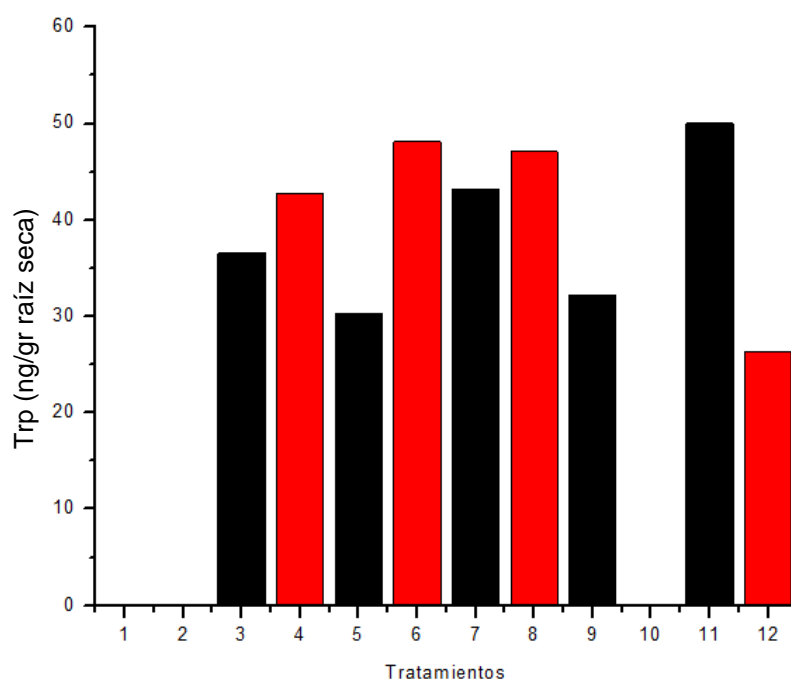


Figura V.17. Niveles de Trp hallados en rizodeposiciones de maní de siete días de crecimiento creciendo en solución nutritiva líquida. Los niveles detectados por HPLC-MS se cuantificaron y se expresan en ng/gr de raíz seca. **Barras negras:** Tratamientos sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Tratamientos con Cloruro de Sodio 50 mM. Los inóculos se graficaron en el siguiente orden: **1 y 2:** Sin Inocular. **3 y 4:** *A. brasilense* Cd. **5 y 6:** *B. sp.* C145. **7 y 8:** *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd. **9 y 10:** *O. TAL1000*. **11 y 12:** *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd.

V.3.b.iii. Estudio de flavonoides en rizodeposiciones de maní

Las diferentes muestras de rizodeposiciones obtenidas, fueron utilizadas para analizar la producción de diferentes flavonoides, de gran importancia en los procesos simbióticos de las leguminosas.

Los resultados de los niveles de los seis flavonoides detectados por cromatografía líquida de alta resolución se graficaron en la Figura V.18:

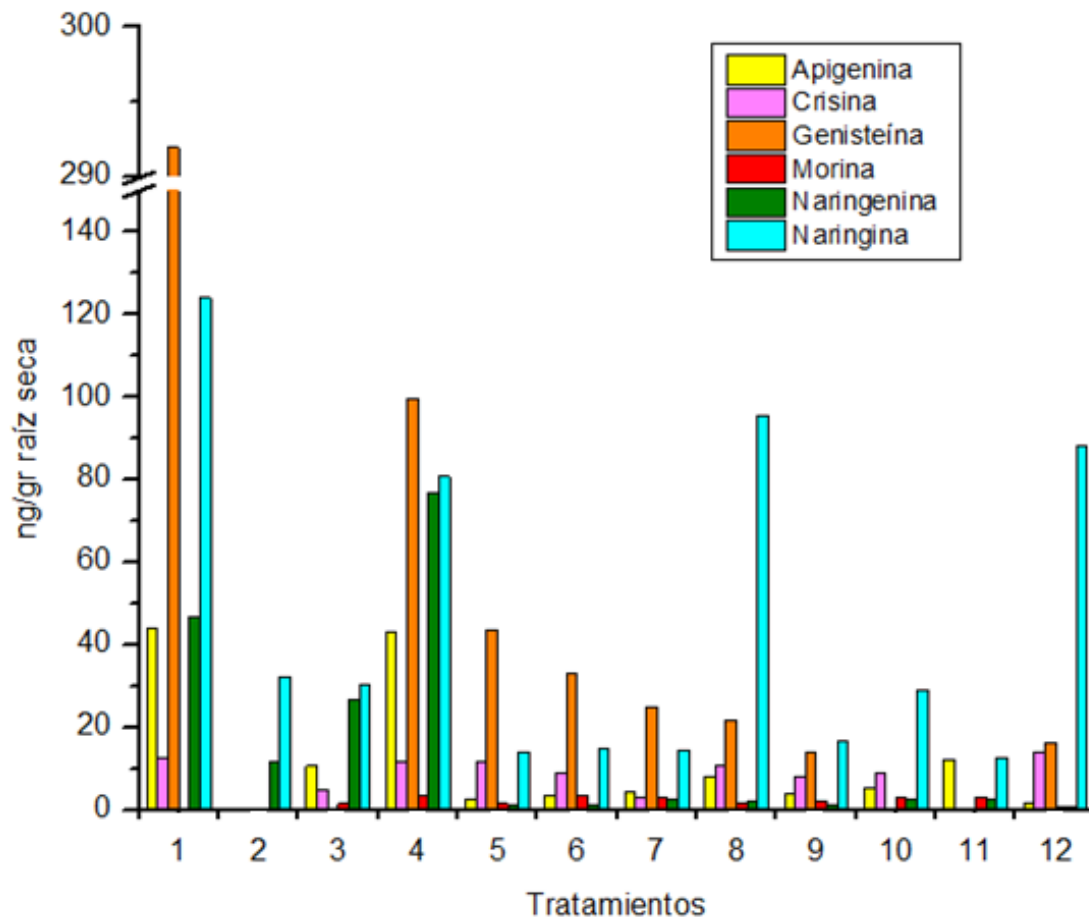


Figura V.18. Detección y cuantificación de distintos flavonoides en rizodeposiciones de maní detectados por HPLC-MS. Los valores se expresan en ng/gr de raíz seca. Tratamientos sin Cloruro de Sodio **1, 3, 5, 7, 9, 11**. Tratamientos con Cloruro de Sodio 50 mM: **2, 4, 6, 8, 10, 12**. Los inóculos se graficaron en el siguiente orden: **1 y 2:** Sin Inocular. **3 y 4:** *A. brasilense* Cd. **5 y 6:** *B. sp.* C145. **7 y 8:** *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd. **9 y 10:** *O. TAL1000*. **11 y 12:** *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd.

En ausencia de inóculos, los niveles de los diferentes flavonoides variaron respondiendo a la condición salina. En condición control los niveles de cada uno de ellos fueron desiguales siendo muy superior el nivel de genisteína, alrededor de 300 ng/gr raíz seca (RS), mientras que naringina le siguió con 124 ng/gr RS, en tercer lugar estuvieron naringenina y apigenina con niveles cercanos a los 45 ng/gr RS, y por último se detectó un bajo nivel de crisina, siendo de 12 ng/gr RS. Morina no fue detectado. Frente a los microorganismos, se detectaron principalmente genisteína, naringenina y naringina.

Apigenina, crisina, genisteína y morina no se detectaron en salinidad, sin inóculos. En esta condición, los únicos flavonoides detectados fueron naringina y naringenina, ambos mostrando menores niveles que en exudados control, y naringina fue mayor a naringenina, superándola en más del 50%. En presencia de inóculos, las raíces respondieron al estrés ambiental mediante la exudación de genisteína, naringina, naringenina y apigenina.

Morina no tuvo un rol importante en los exudados de maní en presencia o ausencia de inóculos, ni tampoco en respuesta al estrés salino.

V.3.b.iii.a) Tratamientos sin inocular, control y con salinidad

En las rizodeposiciones de maní producidas en ausencia de inóculos bacterianos y en presencia de salinidad, se redujo el número de flavonoides presentes, ya que en condición control se detectaron 5 flavonoides diferentes, mientras que en salinidad solo 2 (Figura V.19, tratamiento control: barras negras, y tratamiento 50 mM NaCl: barras rojas). Se destaca la presencia de naringenina en ambos ensayos y su forma conjugada naringina.

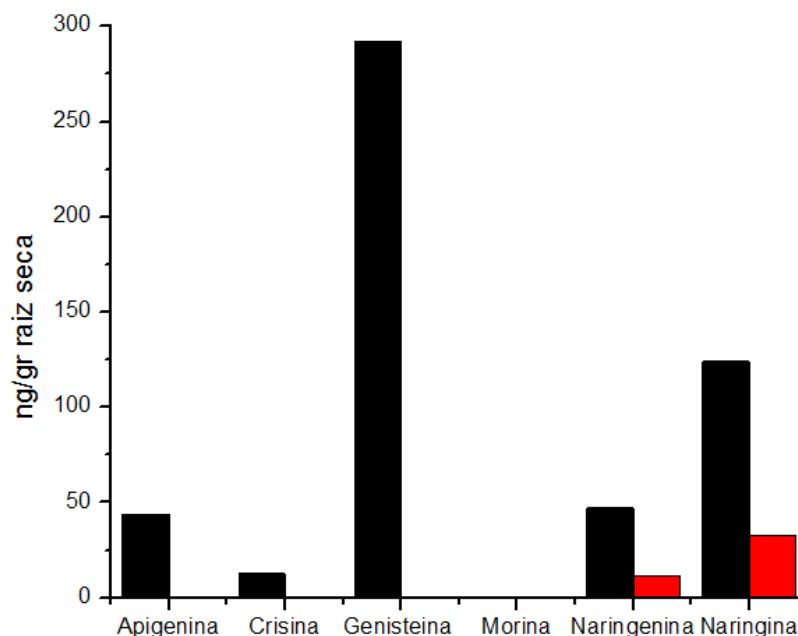


Figura V.18. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Control sin inocular y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Control sin inocular, con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.b.iii.b) Tratamientos inoculados con *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

En presencia de *A. brasilense* Cd, en las rizodeposiciones de maní se obtuvieron niveles reducidos de todos los flavonoides detectados, todos ellos siendo menores que los niveles hallados en la condición control sin inocular. Morina estuvo ausente en los exudados de raíz sin inóculos (Figura V.18), pero en presencia de la PGPR se pudo detectar aunque en un nivel muy bajo (Figura V.19). Los mayoritarios para la inoculación con esta cepa fueron naringenina y naringina, que mostraron niveles muy similares.

En salinidad, y en presencia de *A. brasilense* Cd (Figura V.19, barras rojas) se detectaron 6 flavonoides, y todos en niveles superiores a los tratamientos en ausencia de inóculos (ver: Figura V.18), así como al tratamiento inoculado con *A. brasilense* Cd sin el factor estresante (Figura V.19, barras negras). Los mayores niveles, que se encontraron alrededor de 80 a 100 ng/gr de raíz seca (RS), se registraron para genisteína, naringenina

y naringina, apigenina mostró valores intermedios, hallándose alrededor de 40 ng/gr de raíz seca. Se vio un incremento importante de genisteína por salinidad, ya que en ausencia de este factor no se detectó y en presencia del mismo, su nivel ascendió a 100 ng/gr RS. También se incrementaron de manera significativa naringenina y naringina.

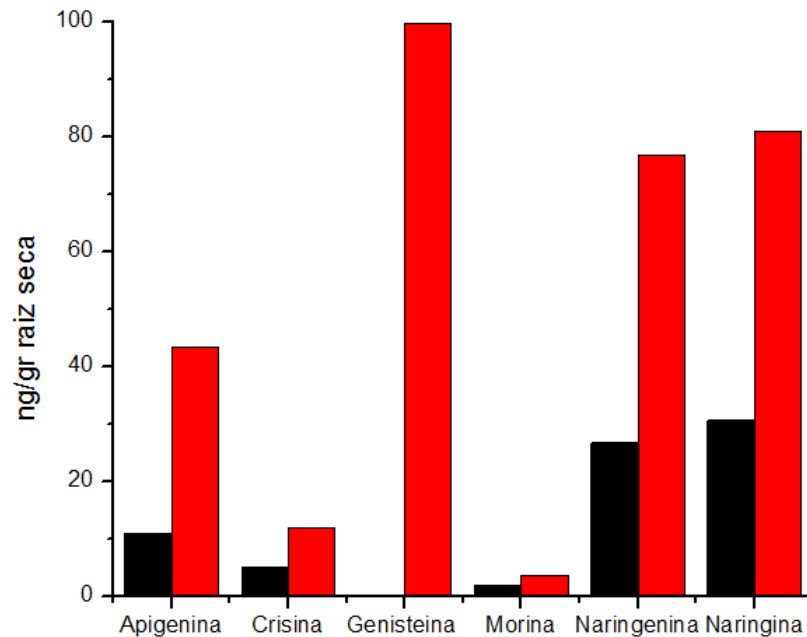


Figura V.19. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.b.iii.c) Tratamientos inoculados con *B. sp.* C145 en condiciones control y con salinidad

En los ensayos realizados en presencia de *B. sp.* C145, se detectaron 6 diferentes flavonoides en los exudados radicales de maní, todos en menor cantidad que los tratamientos sin inocular (comparar Figuras V.18 y V.20). Por la inoculación con este rizobio disminuyeron los niveles de apigenina, naringenina y naringina; y genisteína también se redujo aun siendo el flavonoide mayoritario (comparar Figuras V.18 y V.20).

Al analizar el efecto de la sal en los exudados en presencia de *B. sp.* C145, no se observaron cambios importantes en los flavonoides encontrados, excepto una disminución en el nivel de genisteína. Pero al comparar la condición salina sin inóculo (Figura V.18, barras rojas) con la inoculada con la presente cepa (Figura V.20, barras rojas), se observaron importantes diferencias en número y cantidad de flavonoides, ya que en ausencia de inóculo sólo se hallaron niveles bajos de naringenina y naringina, mientras que en presencia del rizobio se vieron 6 flavonoides en cantidades que llegaron a los 40 ng/gr de raíz seca. Genisteína fue el flavonoide dominante, seguido por naringina.

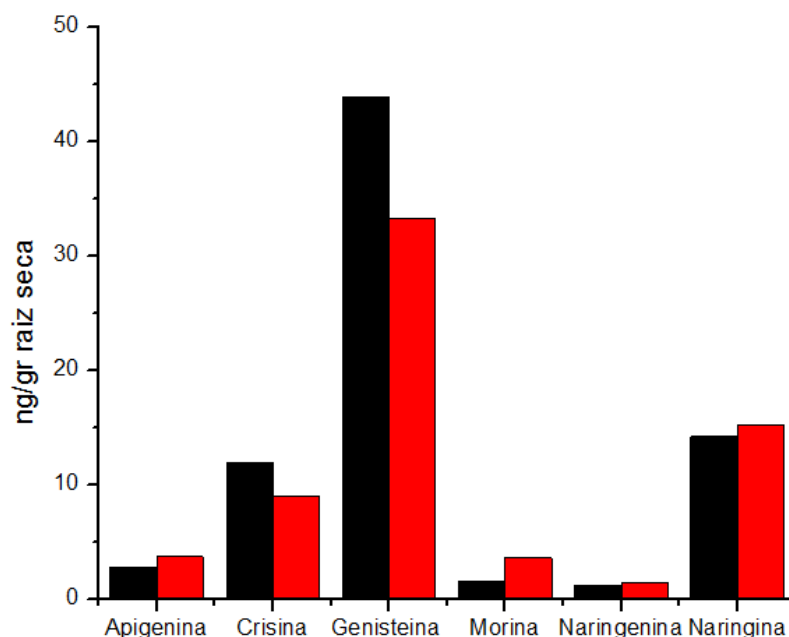


Figura V.20. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.b.iii.d) Tratamientos inoculados con *B. sp.* C145 + *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

En la coinoculación entre el rizobio *B. sp.* C145 y la PGPR empleada, en salinidad (Figura V.21, barras rojas), respecto a la coinoculación en condición control (Figura V.21,

barras negras) se evidenció un leve incremento de los niveles de apigenina y crisina, con un importante incremento de naringina.

Respecto a la inoculación simple, con el rizobio sin la PGPR, en condición control sin sal, hubo descensos en crisina y genisteína (comparar figuras V.20 y V.21, barras negras), mientras que en salinidad, (comparar figuras V.20 y V.21, barras rojas), fue notable el incremento de naringina a causa de la coinoculación, mientras que el resto de los flavonoides mantuvieron aproximadamente iguales sus niveles.

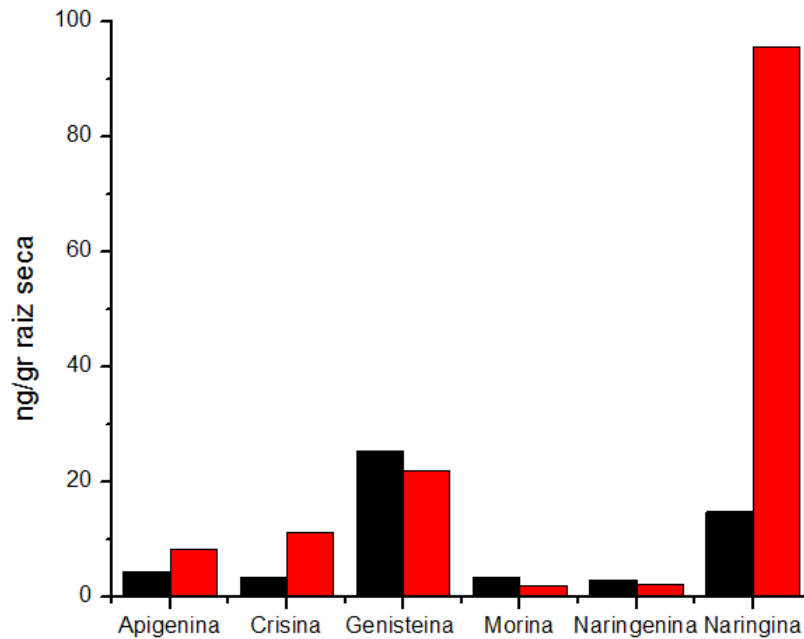


Figura V.21. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 + *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145 + *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.b.iii.e) Tratamientos inoculados con *O. TAL1000* en condiciones control y con salinidad

En presencia del segundo rizobio empleado, *O. TAL1000*, se obtuvieron 6 flavonoides en niveles menores que el control sin inocular (comparar barras negras de las

Figuras V.18 y V.22), siendo los valores más altos los correspondientes a naringina, genisteína y crisina.

Con este rizobio y en salinidad, se observó una reducción significativa de genisteína, quien no se detectó en este tratamiento pero si había sido hallado en ausencia de sal. Además, se observó un aumento de naringina en respuesta al factor estresante aplicado.

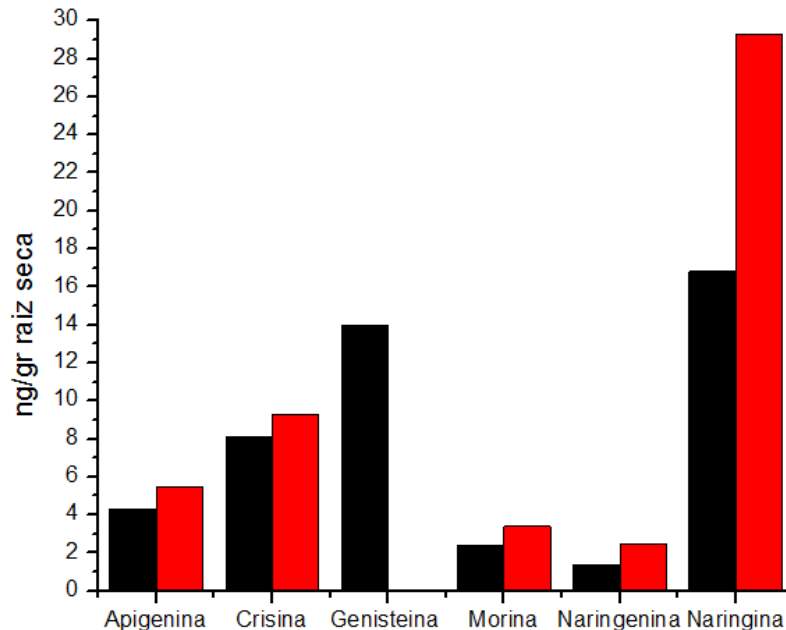


Figura V.22. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 y con Cloruro de Sodio 50 mM.

V.3.b.iii.f) Tratamientos inoculados con *O. TAL1000* + *A. brasilense* Cd en condiciones control y con salinidad

Al analizar la coinoculación en salinidad del rizobio TAL1000 con *A. brasilense* Cd (Figura V.23, barras rojas) respecto al control sin sal (Figura V.23, barras negras), se evidenció un descenso en los niveles de apigenina, mientras que debido a este factor ambiental se incrementaron crisina, genisteína y naringina.

Por efecto de la coinoculación, al comparar los gráficos en barras rojas de las Figuras V.22 y V.23, se observó una reducción leve de apigenina e incrementos en los niveles de genisteína, que en la inoculación simple no se había detectado, y de naringina, cuyo nivel fue elevado en ambos tratamientos, pero lo hizo considerablemente por la inoculación doble.

Al comparar, en condiciones control sin salinidad, esta coinoculación frente a la inoculación con el rizobio solo, se observó que por la coinoculación, dos de los flavonoides que habían sido mayoritarios en la inoculación sencilla, crisina y genisteína, desaparecieron. En oposición, apigenina aumentó su nivel. En salinidad, y respondiendo a la coinoculación, apareció genisteína, que en presencia del rizobio solo no se había detectado, y se incrementó de manera importante el nivel de naringina.

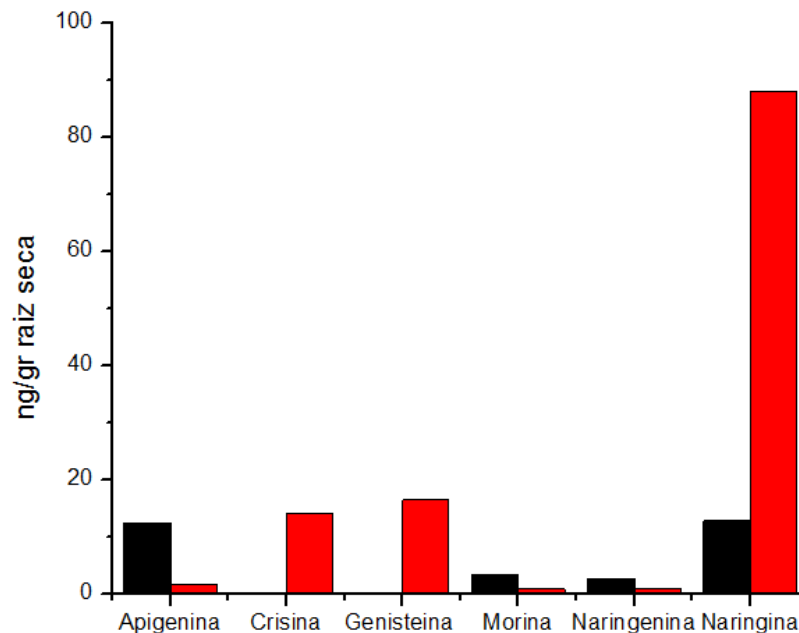


Figura V.23. Niveles de flavonoides detectados por HPLC-MS, identificados por comparación con testigos comerciales, hallados en las rizodeposiciones de maní. **Barras negras:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 + *Azospirillum brasilense* Cd y sin Cloruro de Sodio. **Barras rojas:** Inoculado con *Ochrobactrum* TAL1000 + *Azospirillum brasilense* Cd y con Cloruro de Sodio 50 mM.

VI. DISCUSSION

VI.1. Estudio Preliminar

En este trabajo nos enfocamos a contribuir al conocimiento de la dinámica de la rizósfera de maní, abordando un nuevo estudio de la triple interacción suelo planta microorganismos, definida por Lynch y Whipps como trilogía del suelo (Lynch y Whipps, 1990):



Figura VI.1. Esquema de los elementos que integran el ecosistema rizosférico, representando su interconexión, propuesta por Lynch y Whipps, y denominada trilogía del suelo (Lynch y Whipps, 1990).

En función de conocer íntegramente la rizósfera de maní, comenzamos este trabajo con el estudio de un aspecto particular de la interacción: el diálogo molecular que tiene lugar entre los participantes, en diversas condiciones medioambientales. En primer lugar se demostró que la salinidad ejerció un efecto perjudicial sobre el crecimiento de las plantas de maní, y la manera en que este efecto se revirtió con la inoculación de las mismas con rizobacterias beneficiosas. Nuestro segundo objetivo en este trabajo fue describir la composición química de las rizodeposiciones de maní, con el fin de dilucidar aspectos de la interacción molecular que ocurre entre la raíz de esta leguminosa y los diferentes agentes que conviven con ella en la rizósfera, con el fin de incrementar el conocimiento en esta área específica, el cual en la actualidad es escaso e incompleto. Para ello se comenzaron a caracterizar los componentes exudados por la raíz en su interacción con microorganismos beneficiosos así como en presencia de un factor negativo que perjudica a los suelos cultivables y no cultivables, como es la salinidad. Muchas

investigaciones en la actualidad apoyan la idea de que las distintas clases de exudados de la raíz pueden regular las comunidades microbianas de la rizósfera basándose en el hecho de que gran variedad de microorganismos habitan en el suelo, pero solo unos pocos pueden desarrollar interacciones compatibles con plantas específicas. Es necesario, entonces, realizar esta exploración para comprender la biología de la exudación radical, ya que este proceso activo llevado a cabo por la raíz, puede contribuir a desarrollar nuevas estrategias para mejorar la salud de las plantas, así como el aislamiento de novedosos compuestos con actividades biológicas.

VI.2. El cultivo de maní

El cultivo de esta leguminosa ha cobrado gran relevancia en los últimos años en Argentina, por representar una de las economías regionales más importantes que se desarrollan en la actualidad, y cuya producción e industrialización se lleva a cabo en nuestra provincia. Las exportaciones de productos derivados del complejo manisero aumentan año a año, ya que la demanda internacional crece respondiendo a la excelente calidad fitosanitaria de la semilla, y de los productos que se generan (Cámara Argentina del Maní).

En nuestro país, así como en el mundo entero, el área de siembra de este cultivo se está expandiendo anualmente, principalmente debido al interés de los productores por la suba de los precios internacionales del producto. Muchas de las nuevas áreas cultivadas se caracterizan por ser áridas y semiáridas (Cámara Argentina del Maní), lo cual representa una dificultad ya que la productividad del maní está influenciada por la fluctuación en las precipitaciones (Reddy y col., 2003). En nuestro país las precipitaciones son fluctuantes en la época de crecimiento del maní, y esto afecta a su rendimiento (Pietrarelli, 1980).

En nuestra investigación pudimos demostrar el efecto perjudicial del estrés salino causado por una concentración de NaCl de 50 mM aplicada al medio de crecimiento del maní *in vitro*, en concordancia con previos ensayos realizados en nuestro laboratorio (Albornoz, 2009; Dardanelli y col., 2009). Los tres parámetros de crecimiento medidos a los siete días de desarrollo del maní, resultaron afectados negativamente por la salinidad.

La salinidad causó una considerable reducción en el peso seco de la raíz y del tallo de las plantas de maní. Las inoculaciones tanto simples como dobles generaron

importantes aumentos en dichos pesos, siendo más marcados los efectos de las coinoculaciones con la PGPR. El efecto de las inoculaciones fue significativo aun en presencia de salinidad, aunque, con excepción de la coinoculación entre *O. TAL1000* y *A. brasilense* Cd, los pesos alcanzados fueron menores que en condición control, demostrando así el efecto negativo de la salinidad sobre la planta de maní. Chung y col., (1997) informaron que la planta de maní creciendo con déficit hídrico muestra morfología de las hojas y tallos afectada, presentando hojas notablemente más pequeñas. En el mismo sentido, Bell y col. (1993) demostraron que el déficit de agua y la salinidad reducen la longitud de los espacios internodales en maní. Ambos efectos podrían contribuir a la reducción del peso seco del tallo obtenido en nuestro ensayo.

La reducción del agua disponible o "sequía fisiológica" debida a la salinidad, genera en las plantas que crecen en suelos salinos un ajuste de su potencial osmótico para mantener la absorción de agua y turgencia de los tejidos, para lo que absorben y acumulan solutos, o los sintetizan. Esto produce una reducción del crecimiento, aunque la turgencia sea mantenida, ya que este proceso es de alto costo en términos energéticos para la planta, debido a que la energía disponible no se utiliza para "crecer" sino para mantener la homeostasis hídrica (Turner y Jones, 1980). Este "re-direccionamiento" de las fuentes de energía de la planta, también podría estar contribuyendo a la reducción del peso seco de la planta observada en nuestra investigación.

El crecimiento de la raíz respecto de la parte aérea, definido como IRPA, se considera como un aspecto morfológico relacionado con el rendimiento o eficiencia de la planta, y al estar vinculado al equilibrio en el crecimiento de la misma, cualquier modificación en él refleja un cambio en las proporciones de crecimiento de ambos órganos vegetales. Si una condición ambiental produce una mayor variación en el crecimiento de un órgano en relación al otro, esto se reflejará en dicho índice. Wignarajah (1990) observó, para la leguminosa *Phaseolus vulgaris*, que la sal inhibió más el crecimiento de la PA que de la raíz, relacionando este hecho con la hipótesis del "equilibrio funcional de Munns" (Munns, 1993) según la cual "la inhibición de la actividad fisiológica de las hojas y el incremento de los requerimientos de la raíz para buscar agua y elementos minerales, necesarios para la planta, daría lugar a un desplazamiento de los nutrientes de la planta hacia la raíz". En este mismo sentido, Ocaña y col., (1998), establecieron en un estudio realizado con diez genotipos de la leguminosa *Vicia faba*, que una elevada relación IRPA puede estar relacionada con un bajo suministro de nutrientes.

En nuestro estudio, los índices no se modificaron notablemente debido a la salinidad, lo que atribuimos a una posible reducción coordinada en los pesos de raíces y tallos. Sin embargo, si se vieron importantes incrementos en los índices debido a los inóculos colocados en los sistemas de crecimiento. Al elevarse los IRPA notablemente respecto a los controles sin inocular, podemos pensar que hubo mayores incrementos en los pesos secos de las raíces que de los tallos, lo cual reflejaría el efecto positivo de las rizobacterias aplicadas sobre este órgano de la planta en etapas tempranas del crecimiento.

VI.3. Rizodeposiciones de maní

VI.3.a. Limitaciones metodológicas

La bibliografía consultada acerca del tema en cuestión, indica que los estudios experimentales del proceso de liberación de sustancias orgánicas desde las raíces comenzaron a principios de 1900, pero a pesar de ello, en la práctica, la investigación de los exudados radicales aún tiene dificultades técnicas tales como la unión de las moléculas a componentes de los soportes de crecimiento, la asimilación y mineralización de los compuestos exudados por los microorganismos si están presentes, la dificultad para separar los compuestos de origen radical de los de origen microbiano (Grayston y col., 1996), entre otras. En particular por la última causa mencionada, a través de los años, la mayoría de los estudios se han desarrollado en sistemas sólidos, como arena, o bien líquidos, pero siempre excluyendo a los microorganismos.

En la actualidad no existe el método ideal para las mediciones de composición de rizodeposiciones, no obstante la mayoría de los estudios se realizan en cultivos líquidos ya que facilitan la recolección y el análisis de los componentes. La mayor crítica a estos sistemas es que las raíces creciendo bajo estas condiciones pueden ser morfológica y fisiológicamente muy diferentes de aquellas creciendo en el suelo, porque la aireación, el estatus microbiano y nutricional de los cultivos hidropónicos son muy diferentes de los encontrados en un ambiente típico de suelo (Jones y Darrah, 1995).

Otra limitación importante a considerar al momento de analizar los exudados de raíz es que las técnicas de análisis que se conocen actualmente no permiten distinguir entre la verdadera exudación de las raíces de los productos de ruptura de las células, los

metabolitos provenientes de microorganismos presentes en sistemas no axénicos, y de las moléculas presentes en el sustrato de crecimiento (Grayston y col., 1996).

Teniendo en cuenta las restricciones mencionadas, nuestro estudio fue llevado a cabo en un medio de crecimiento hidropónico, pretendiendo reducir el aporte de exudados por daños celulares y lisis; y se previó la realización de los controles adecuados para poder revelar las diferencias ocasionadas por la aplicación de los inóculos. Los sistemas de crecimiento hidropónicos son ampliamente usados para estudiar la dinámica de las rizodeposiciones, obteniendo resultados satisfactorios a fines de investigación básica y descriptiva (Jaeger y col., 1999). En nuestros ensayos, esta metodología permitió reflejar los cambios en los patrones de exudación de diferentes moléculas en respuesta a los estímulos aplicados.

VI. 3. b. Valor de acidez (pH) de las rizodeposiciones

La solución de Hoagland, medio de crecimiento para las plantas de maní, presenta un pH de 7. Al cabo de los siete días de crecimiento, el pH resultó modificado como se mostró en la Tabla V.2 de la sección Resultados.

Los pH cercanos a la neutralidad favorecen el desarrollo de los microorganismos, la infección por parte de los rizobios, la formación de los nódulos y la actividad de fijación de nitrógeno, así como la liberación de inductores de factores Nod (Hungria y Vargas, 2000). Los incrementos en el pH podrían deberse al efecto del AIA y otras sustancias producidas por los microorganismos sobre los intercambios iónicos en la superficie de la raíz (Bashan, 1991; Spaepen y col., 2007; Dobbelaere y Okon, 2007). Un efecto similar ocurrió en sistemas hidropónicos con raíces de poroto las cuales, al cabo de 14 días fueron modificando sus valores de pH, y evidenciaron modificaciones en la producción de diversas moléculas inductoras (Dardanelli y col., 2008-a).

VI.3.c. Análisis de la presencia de ácidos grasos en rizodeposiciones de maní

Los ácidos grasos (AG) son una importante reserva de energía celular, y también tienen roles estructurales, ya que constituyen lípidos complejos como los fosfolípidos, que son componentes esenciales de las membranas celulares. Actualmente se han implicado

en procesos de señalización y modulación de procesos fisiológicos normales y relacionados con enfermedades, en microbios, insectos, animales y plantas (Kachroo y Kachroo, 2009). En plantas, los AG modulan una variedad de respuestas a estreses abióticos, como por ejemplo, los niveles de AG poliinsaturados en membranas de cloroplasto afectan la fluidez de sus lípidos y determinan la capacidad de las plantas de aclimatarse a ambientes que presentan temperaturas estresantes (Iba, 2002; Routaboul, y col., 2000); en otros trabajos se vio que los AG regulan la tolerancia a sal, sequía y metales pesados (Tumlinson y Engelberth, 2008; Upchurch, 2008).

VII.3.c.i. Composición de lípidos en rizodeposiciones de maní

Los lípidos del suelo se originan a partir de residuos vegetales y microbianos, en los productos de su descomposición y en los exudados radicales, y su variación cualitativa y cuantitativa depende del tipo de vegetación y del pH (Jambu y col., 1985). El interés hacia los lípidos del suelo responde al hecho de que algunos compuestos son fisiológicamente activos (Patrik, 1971; Whittaker y Feeny, 1971), otros tienen la facultad de alterar propiedades físicas del suelo como la estabilidad de los agregados y su grado de humedecimiento (De Bano, 1971; Giovannini y col., 1983; Guidi y col., 1983; Silva y col., 1985), y tienen efectos sobre la descomposición de la materia orgánica y en consecuencia en la liberación de los nutrientes necesarios en el desarrollo vegetal (Panno y col., 1986). Estas macromoléculas se consideran, por su alto peso molecular, como compuestos provenientes de la lisis celular o de procesos de rizodeposición metabólicamente activa (Hale y col., 1978).

En concordancia con lo hallado en nuestra experiencia, AG como los 16:0, 18:1 y 18:0 fueron hallados en rizodeposiciones de varias especies vegetales (Bolton y col., 1992). En exudados de la leguminosa *Lupinus* fue hallado en grandes cantidades el AG 16:0 (Lucas García y col., 2001), lo cual también está en concordancia con nuestros resultados, ya que para nosotros 16:0 fue uno de los AG mayoritarios.

En un estudio realizado para dilucidar la composición lipídica de fracciones de suelo, se encontró que los AG mayoritarios tanto por número como por cantidad fueron los de número par de carbonos (89-95%) y que en casi la totalidad de los suelos estudiados, los AG 16:0 y 18:0 constituyeron la fracción de mayor relevancia, representando su suma más del 50% de los AG encontrados (Panno y col., 1986). Los AG de 20 a 24 C

representaron del 11 al 24%, habiendo a su vez, una preponderancia de los AG 20:0, 22:0 y 24:0. Nuestros resultados de AG presentes en rizodeposiciones de maní, están de acuerdo con la prevalencia de AG de número par de carbonos, en especial 16:0, 18:0 y 24:0.

En el estudio mencionado anteriormente, también se evidenció que la composición ácida resultó influenciada por modificaciones en el pH, afectando la relación insaturados/saturados, la que aumentó notablemente al aumentar el pH (Panno y col., 1986). En nuestro estudio, no analizamos variaciones de pH para un mismo tratamiento, pero análisis de este tipo se podrían incluir en futuras investigaciones.

VI.3.c.ii. Modificaciones de la membrana celular en respuesta al estrés abiótico y a la interacción con microorganismos: relación con el proceso de exudación radical

Para nuestro conocimiento actual, no hay suficientes antecedentes relativos al rol fisiológico que puedan tener los AG en las rizodeposiciones, pero se debe tener presente que son componentes celulares cuyo contenido y composición están considerablemente ligados a variaciones en las condiciones ambientales, ya que son elementos estructurales de las membranas celulares.

Las envolturas celulares son las primeras barreras que protegen a las células contra diferentes estreses ambientales, es por ello que es importante conocer sus características, ya que los cambios en su composición pueden representar mecanismos adaptativos para compensar el estrés producido por condiciones perjudiciales como la salinidad y la temperatura (Correa y col., 1999). Los principales fosfolípidos estructurales en membranas vegetales poseen AG con cadenas de 6 a 18 carbonos (Zieger y Taiz, 2006). En los tejidos no fotosintéticos, los lípidos estructurales son los glicerofosfolípidos, cuyos AG más comunes son los saturados de 12, 14, 16, 18 C, y un alto porcentaje de los insaturados 18:1, 18:2 y 18:3, con los dobles enlaces por lo general en posición cis, para prevenir el empaquetamiento de las cadenas y favorecer la fluidez. Puede haber ácidos grasos con cadenas de hasta 24 átomos de carbono (Zieger y Taiz, 2006).

Una estrategia general encontrada en las células de los organismos para tolerar las variaciones ambientales es la modificación de sus membranas, provocando alteraciones en la fluidez y en el estado de la fase de la bicapa lipídica con el fin de mantener sus propiedades biofísicas en valores óptimos para las funciones vitales (Los y Murata, 2004).

Es conocido que alteraciones en las condiciones del entorno de crecimiento de los organismos, inducen cambios en la composición de los AG de los lípidos de las membranas para permitir la continuación de las funciones vitales de la misma (Sajbidor, 1997).

La estabilidad de las membranas celulares es importante durante periodos de estrés ambiental, ya que la excesiva fluidez de las membranas se correlaciona con pérdida de sus funciones fisiológicas. La salinidad es un factor ambiental que, al igual que la temperatura, induce modificaciones en los AG de las membranas de los organismos (Sajbidor, 1997).

La figura siguiente muestra los cambios en la estructura de la membrana y en el comportamiento de la bicapa lipídica bajo condiciones de estrés por temperatura y salinidad:

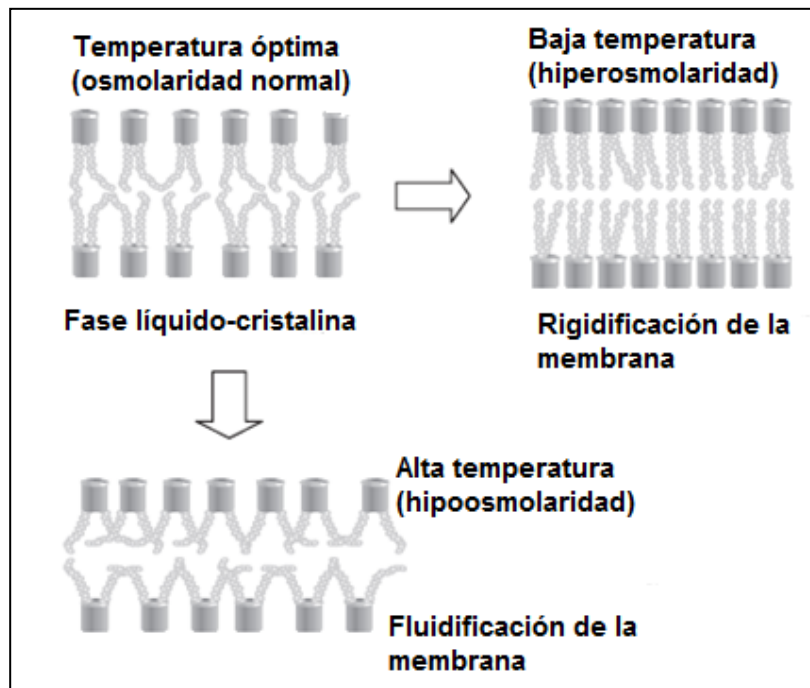


Figura VI.2. Representación esquemática de los cambios en la estructura de las membranas y las características de las bicapas lipídicas sometidas a estrés por alta y baja temperaturas y concentración de solutos. Las bajas temperaturas al igual que la hiperosmolaridad del medio, causan rigidificación de las membranas, mientras que las altas temperaturas y la hipoosmolaridad causan fluidificación de las mismas. Los microorganismos responden a estas modificaciones mediante estrategias que les permiten mantener la homeostasis celular (Los y Murata, 2004).

Varios tipos de estreses ambientales como estrés térmico y estrés osmótico, causan alteraciones en las propiedades físicas de los lípidos de membranas de las células vivas. Modificaciones químicas y genéticas de las propiedades físicas de los lípidos de membranas pueden tener efectos sobre la expresión de genes involucrados en la aclimatación de las células a estas condiciones desfavorables (Vigh y col., 1993; Horvath y col., 1998).

El conocimiento de cómo afecta el déficit hídrico a la exudación radical es limitado. La dinámica de este proceso durante diferentes condiciones ambientales es poco conocida, aun cuando existen investigaciones acerca de muchos factores que influyen en el proceso de exudación. En numerosos trabajos, se demostró que el estrés por déficit de agua, incrementa la exudación de compuestos orgánicos en respuesta a cambios en el metabolismo, aumento en la autólisis celular, incremento en la permeabilidad de la membrana.

En el estudio realizado por Bolton y col. (1992), mencionado en la sección VI.3.c.i., con rizodeposiciones de *Brassica napus* obtenidas en condiciones control y salina, los AG exudados fueron: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3 (los últimos dos mencionados en nuestro estudio no se detectaron), 20:0, 22:0, y 24:0. Al igual que en nuestra investigación, los índices de insaturación no se modificaron significativamente por la salinidad, pero en oposición con nuestros resultados, estos autores obtuvieron aumentos significativos de 18:1 por este factor.

En nuestra investigación, en presencia de salinidad y sin inóculos, se observaron cambios principalmente en los AG insaturados 18:1 y 20:3, pero a diferencia de lo sucedido en los trabajos citados, nuestros resultados reflejaron la disminución de 18:1 en las rizodeposiciones obtenidas en presencia de salinidad y para el tri-insaturado 20:3, se vieron incrementos por dicho estrés. Este resultado puede estar relacionado a una respuesta frente al estrés salino ya que ha sido reportado que los ácidos grasos tri-insaturados desempeñan roles en las respuestas frente a estreses abióticos (Matsuda e Iba, 2005). En un trabajo en el que se analizó el efecto del estrés hídrico, realizado por Fries y col., (1985), los AG hallados en exudados de diferentes especies vegetales fueron principalmente insaturados y estuvieron en concordancia con los encontrados por Svenningsson y col. (1990), quienes establecen que un patrón de recambio de lípidos de membrana durante situaciones de estrés podría explicar al menos en principio, el incremento en la exudación de estas moléculas (Svenningsson y col., 1990).

En un estudio realizado por Svenningsson y Liljenberg (1986), se demostró que todos los AG de membrana de células radicales se redujeron en respuesta al estrés hídrico, pudiendo indicar una reducción en el área total de los sistemas de membranas de las células vegetales. Estos cambios en el metabolismo o en la permeabilidad de la membrana durante periodos de estrés por déficit de agua, así como daños por lisis sobre células de la raíz, pueden generar alteraciones en los patrones de exudación radical (Svenningsson y col., 1990).

Nuestros resultados muestran que los AG saturados 16:0 y 18:0 mostraron incrementos por salinidad en ausencia de inóculos. No se encontraron resultados similares en la bibliografía con los cuales contrastar lo obtenido.

También es escaso lo que se conoce acerca del efecto de las inoculaciones sobre los patrones de rizodeposición de plantas. La liberación de AG desde las membranas afecta su fluidez y parece mediar la tolerancia de la planta a estrés abiótico y biótico (Upchurch, 2008). El AG 18:1 es uno de los más abundantes en membranas vegetales y su acumulación en raíz colonizada con *Bradyrhizobium* podría estar involucrada en la modificación de la fluidez necesaria para el ingreso de esta bacteria a la célula vegetal (Brechenmacher y col., 2010). Brechenmacher y col. (2010), analizando las rizodeposiciones de soja (*Glycine max*) en respuesta a la inoculación con *Bradyrhizobium*, obtuvieron seis AG que modificaron sus patrones significativamente: tres de ellos, 12:0, 14:0 y 18:3 en nuestro ensayo no se detectaron, pero los AG 18:1 y 24:0 en nuestro ensayo estuvieron presentes en las rizodeposiciones con porcentajes variables en respuesta a estrés salino y a la inoculación con rizobacterias.

VI.3.c.iii. Rol potencial de los AG como moléculas señal en la defensa de la planta

En plantas, las vías metabólicas de los AG juegan importantes roles en la defensa contra patógenos. Tradicionalmente solo se asignaban roles pasivos a los AG en la defensa de la planta, como por ejemplo, ser precursores biosintéticos de los componentes de la cutícula o de la fitohormona ácido jasmónico (JA); sin embargo, recientemente se ha demostrado que estos compuestos y los productos de su descomposición, tienen roles importantes en la inducción de varios modos de defensa de la planta (Kachroo y Kachroo, 2009). Principalmente los AG de 16 y 18 C participan en la modulación de las respuestas frente a estreses y estimulan la inmunidad sistémica en plantas. Se conoce por ejemplo,

que niveles incrementados de 18:0 inhibieron la colonización de semillas de soja por el patógeno del suelo *Diaporthe phaseolorum* (Xue y col., 2006). Por otro lado, el insaturado 18:1 parece estar implicado en las respuestas de defensa de las plantas mediadas por ácido salicílico (SA) (Kachroo y col., 2004). Algunos AG de 16 C participan en la mediación de las respuestas a microbios (Xing y Chin, 2000).

VI.3.c.iv. Otros posibles roles de los AG presentes en las rizodeposiciones. Análisis de la bibliografía consultada

Los AG son componentes estructurales de los factores Nod secretados por los rizobios en las primeras etapas de la interacción con la raíz para el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Taurian y col., 2008). Los AG 18:1, 16:0, y 16:1, los cuales estuvieron presentes en las rizodeposiciones de maní obtenidas en presencia de inóculos rizobianos en nuestro ensayo, fueron identificados como sustituyentes en los esqueletos de los factores Nod de una cepa de *Bradyrhizobium* simbiote de soja (D'Haeze y Holsters, 2002), pudiendo ser este su origen y no la rizodeposición radical, ya que la metodología empleada no permitió distinguir los AG según su procedencia. En otro trabajo, para una cepa perteneciente al género *Rhizobium*, los sustituyentes de los Factores Nod fueron los AG 16:1, 18:2, y 16:0 (Perret y col., 2000).

Estudios previos han demostrado que moléculas derivadas de AG de 18 C, tales como ácido jasmónico (JA) y metil-jasmonato (MeJA) al ser liberados al medio, tienen la capacidad de inducir la expresión de genes *nod* en *Rhizobium leguminosarum* y en *Bradyrhizobium japonicum* (Rosas y col., 1998; Mabood y col., 2006). Frente a estos resultados, y al observar que en nuestro estudio los AG de 18 C han sido mayoritarios en todos los tratamientos inoculados, podemos especular que la planta de maní podría estar liberándolos al medio para atraer a los rizobios simbiotes inoculados, no obstante habría que comprobar que dichas sustancias derivadas tienen los mismos tr que los AG patrones.

VII.3.d. Análisis de la presencia de Ácido Indol-Acético (AIA) y Triptófano (Trp) en rizodeposiciones de maní

En el presente trabajo, las inoculaciones simples y mixtas entre cepas de rizobios fijadores de nitrógeno y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, beneficiaron a la planta de maní, generando incrementos en todos los parámetros de crecimiento de las mismas. Este efecto se puede atribuir a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que poseen las rizobacterias aplicadas como inoculantes sobre las raíces.

En este trabajo, se investigó la presencia de la fitohormona AIA y de su precursor el aminoácido Trp, en las rizodeposiciones de maní, estando ambas presentes en las mismas. Al no haber sido detectados en las rizodeposiciones obtenidas en ausencia de inóculos, se puede suponer que los niveles de ambos compuestos detectados corresponden a la producción por parte de las rizobacterias. En concordancia con esto, Kamilova y col. (2006), proponen que las raíces de las plantas secretan cantidades tan bajas de auxinas que la concentración de estos reguladores es difícil de determinar en los exudados.

Además del bien conocido rol de los rizobios en la nutrición nitrogenada de las leguminosas, se conocen muchas cepas capaces de mejorar la nutrición vegetal mediante la producción de auxinas en cantidades variables (Antoun y col., 1998; Vargas y col., 2009). Estos reguladores del crecimiento vegetal estimulan la división y elongación celular, y su producción por rizobacterias es uno de los más conocidos, y quizás el más efectivo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal mostrado por ellas (Schlindwein y col., 2008; Hafeez y col., 2004; Biswas y col., 2000). En el presente estudio, pudimos demostrar la capacidad de ambas cepas rizobianas de comportarse como PGPR, por ser productoras de la fitohormona AIA, así como de su precursor, el aminoácido Trp. Ambos rizobios fueron productores del regulador de crecimiento vegetal en condición control como en salinidad, mostrando incrementos en los niveles del mismo por causa del estrés abiótico. Ambas cepas mejoraron notablemente el estatus nutricional de la planta de maní a los 7 días de crecimiento, y esto se manifestó en el mayor crecimiento de la misma.

En cuanto al empleo de la PGPR, también los efectos causados por la inoculación con la cepa *A. brasilense* Cd sobre el crecimiento de la planta fueron destacables. Es conocido que la mejora en el estatus nutricional causada por PGPR pertenecientes a este género, se debe al incremento del área radical por aumentos en la velocidad de elongación radical, y mayor incorporación de N, fósforo, potasio y microelementos (Dobbelaere y

Okon, 2007). Además, las rizobacterias pertenecientes a este género son grandes productoras de AIA (Kapulnik y col., 1985; Okon y Kapulnik, 1986).

En base al conocimiento de los efectos benéficos de los rizobios y las PGPR sobre los cultivos, los estudios del empleo de inoculantes mixtos son promisorios (Berg, 2009). La inoculación con *Azospirillum spp.* promueve la proliferación y el establecimiento en la rizósfera de otros microorganismos favorables para los cultivos (Russo y col., 2005). Algunas cepas promueven la nodulación de las leguminosas y la fijación de nitrógeno por producción de compuestos como los flavonoides, o estimulando su producción en la planta huésped (Parmar y Dadarwal, 1999). Las inoculaciones duales con rizobios y *Azospirillum* generan mayor contenido total de nitrógeno y macro y micronutrientes, entre otros efectos, en comparación con las inoculaciones individuales (Burdman y col., 1996). Estos resultados se ven confirmados en nuestro ensayo, en el cual el peso seco de las plantas se incrementó en porcentajes de 40-50% con las inoculaciones simples, mientras que los incrementos fueron de 60-80% con las coinoculaciones, tanto en condiciones control como frente a salinidad. Esta mejora en el crecimiento de las plantas debida a las inoculaciones, a pesar del estrés salino, podría estar asociada a la ventaja que tendrían las plantas inoculadas, en relación a la adquisición de agua y nutrientes, otorgada por un mayor crecimiento del área radical.

En relación a estos resultados, se conoce que en etapas de crecimiento tempranas, las auxinas sintetizadas por los microorganismos de las comunidades microbianas del suelo y la rizósfera, incrementan la velocidad de germinación de las semillas y estimulan el desarrollo de los tejidos radicales, mejorando la capacidad del sistema radical para proveer de nutrientes y agua que son tomados por los órganos de las plantas (Arkhipova y col., 2007) y también las ayudan a tolerar estreses abióticos (Yang y col., 2009).

Muchas rizobacterias son capaces de convertir el Trp de los exudados radicales en AIA, resultando en una promoción del crecimiento de la planta (Frankenberger y Arshad, 1995). Si bien este aminoácido no fue detectado en ausencia de microorganismos, hay evidencias de que las raíces de leguminosas son capaces de sintetizarlo y exudarlo en condiciones de crecimiento normales (Jaeger y col., 1999), y muchas rizobacterias son capaces de convertirlo en AIA, que luego podrá ser tomado por la planta resultando en una promoción del crecimiento. Estos autores demostraron, en un estudio empleando biosensores, que los mayores niveles de Trp se encuentran en las zonas de emergencia de los pelos radicales. Los autores especulan que, ya que el Trp es el precursor del AIA, su presencia en dichas zonas podría estar relacionada con el rol de este regulador en la

estimulación de la división celular que debe ocurrir durante la emergencia de los pelos radicales.

Estos autores brindan una explicación alternativa, proponiendo que este aminoácido estaría relacionado con la síntesis de compuestos de defensa de la planta contra microorganismos patógenos, ya que también se detectaron altos niveles de Trp en las primeras secciones donde los primordios de raíces laterales comenzaron a expandirse a través de la epidermis (Jaeger y col. 1999). Las aberturas de la epidermis podrían proveer vías para el ingreso de los patógenos, y esta disrupción del tejido estimularía la síntesis de moléculas de defensa vegetales, como los ácidos hidroxámicos cíclicos, que son sintetizados a partir de la vía biosintética del Trp (Frey y col., 1997), la que también está involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos incluyendo el ácido clorogénico, que tiene efectos protectores contra patógenos fúngicos (Yao y col., 1995).

VI.3.e. Análisis de la presencia de flavonoides en rizodeposiciones de maní

Los flavonoides son un conjunto diverso de compuestos polifenólicos producidos por las plantas como resultado del metabolismo secundario. Poseen un esqueleto básico de 15 carbonos pero se dividen en subclases dependiendo de su estructura química (Shaw y col., 2006). Después de su biosíntesis, los flavonoides son almacenados en vacuolas vegetales, en formas glicosiladas, es decir, conjugados con azúcares (Aoki y col., 2000). Pero, además de cumplir sus funciones en los tejidos vegetales, estas moléculas salen hacia la rizósfera activamente a través del proceso de exudación radical (Armero y col., 2001). También se sabe que un considerable porcentaje de flavonoides son liberados hacia la rizósfera por ruptura de células periféricas (Hawes y col., 2003).

Se conocen más de 4000 flavonoides sintetizados por plantas vasculares, que son liberados a la rizósfera (Perret y col., 2000). Están involucrados en la comunicación planta-planta y planta-microorganismos, participando como señales que se intercambian para establecer simbiosis o en la activación del sistema de defensa de la planta contra patógenos (Phillips y Kapulnik, 1995). Su función más familiar es la señalización en la iniciación de la simbiosis rizobio-leguminosas, pero también están implicados en otras interacciones como las simbiosis de micorrizas arbusculares con sus plantas huéspedes, agentes en la defensa de las plantas y participan en interacciones alelopáticas (Shaw y col., 2006).

La presencia de microorganismos influencia la calidad y cantidad de flavonoides presentes en la rizósfera, a través de modificaciones de los patrones de rizodeposición, sumado al catabolismo microbiano (Shaw y col., 2006).

En la simbiosis rizobio-leguminosa debe ocurrir un diálogo molecular entre los dos participantes para coordinar los eventos tempranos de la interacción (Long, 1989). Las leguminosas liberan flavonoides continuamente al medio, pero sus concentraciones se incrementan significativamente en presencia de rizobios (Schmidt y col., 1993; Zuanazzi y col., 1998). Los flavonoides son liberados principalmente en la zona de emergencia de los pelos radicales, que son los sitios de infección de los rizobios (Zuanazzi y col., 1998).

Estos compuestos se acumulan en la rizósfera y constituyen las primeras señales y más importantes para el establecimiento exitoso de la relación entre rizobios y leguminosas (Dixon y Paiva, 1995), ya que actúan como inductores/inhibidores de los genes rizobianos relacionados con la nodulación (Cooper, 2004).

Nuestros sistemas mostraron la presencia de 6 flavonoides diferentes en las rizodeposiciones de maní: apigenina, genisteína, naringenina y su respectivo glucósido (biológicamente inactivo) naringina, morina y crisina. Los niveles hallados se detallaron en la sección V.3.b.iii del apartado Resultados.

VI.3.e.i. Iniciación y mantenimiento de la asociación con rizobios fijadores de nitrógeno y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Genisteína induce los genes *nod* en *Bradyrhizobium japonicum* (Kosslak y col., 1987). En correspondencia con lo anterior, Gillette y Elkan, (1996) reportaron que este flavonoide estimuló la expresión de *nodA* en otra cepa del mismo género: *Bradyrhizobium* (*Arachis*) *sp.* cepa NC92. Este flavonoide fue encontrado en niveles significativos en rizodeposiciones de maní cultivar Tegua (Taurian y col., 2008), lo cual está en coincidencia con nuestros resultados para rizodeposiciones de maní cultivar PEPE. En nuestro estudio se reveló la presencia de los niveles mas altos de genisteína en las rizodeposiciones obtenidas en presencia de *B. sp.* C145, en ausencia y en presencia de salinidad, y en la inoculación simple así como en la coinoculación con la PGPR; sin embargo, no ocurrió lo mismo con el rizobio del género *Ochrobactrum*, para el cual genisteína no siempre fue detectado, y los niveles fueron bajos. En adición a lo antes mencionado, se puede pensar

que este flavonoide podría tener relevancia en la simbiosis entre leguminosas y rizobios del género *Bradyrhizobium*.

Naringenina es un potente inductor de los genes *nod* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* (Firmin y col., 1986; Begum y col., 2001). Su forma glicosilada, naringina, se incrementó en los exudados de soja luego de la inoculación con *B. japonicum* (Brechenmacher y col., 2010). En nuestro ensayo, en todos los tratamientos inoculados con ambas cepas de rizobios (ver tratamientos: 5, 6, 9 y 10, Tabla IX.2 del Anexo IX.I), en condiciones controles así como salinas, siempre los niveles de la forma glicosilada fue superior a la forma aglicona (este resultado no se vio con la PGPR, frente a la cual estos niveles fueron similares entre ambos flavonoides). Lo mismo sucedió cuando los inóculos fueron mixtos. Esto sugiere para estos flavonoides, roles en la interacción planta-rizobio, así como una participación de la forma glicosilada en la respuesta de la planta al estrés salino, ya que los niveles de esta forma siempre se incrementaron frente a este estrés.

Apigenina es inductor de genes *nod* en *Sinorhizobium meliloti*, *S. medicae*, *R. leguminosarum* y *B. japonicum* (Zuanazzi y col., 1998; Zhang y col., 2009). En nuestros sistemas, se incrementaron sus niveles respondiendo a la salinidad, cuando la raíz fue inoculada con la PGPR, señalando un posible rol de este flavonoide en la respuesta frente a este estrés cuando la planta crece con esta bacteria asociada, ya que en ausencia de inóculos la raíz no exudó este flavonoide en condición salina.

Crisina se encontró en exudados de maní cv. Tegua (Taurian y col., 2008). Nosotros también la pudimos detectar en los exudados de maní cv. PEPE creciendo en condición control, pero no en salinidad. Frente a las dos coinoculaciones ensayadas, los niveles de crisina se incrementaron de manera importante debido a la salinidad. No ocurrió lo mismo con las raíces creciendo en presencia de las inoculaciones individuales. Se pone de manifiesto en este caso, el efecto sinérgico de la coinoculación en contraste con la inoculación individual, y el efecto positivo sobre la estimulación de la respuesta de la planta frente a un estrés.

En concordancia con estudios realizados por Volpin y col. (1996) en alfalfa, Burdman y col. (1996) y Dardanelli y col. (2008-a) en porotos, la inoculación con *Azospirillum* afectó favorablemente la producción de más especies de flavonoides por parte de la leguminosa inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium*.

Morina fue detectada en las rizodeposiciones obtenidas en presencia de todos los tratamientos con los inóculos. No se encontraron roles para este flavonoide en la interacción planta-microorganismo en la bibliografía consultada.

Angelini y col. (2003) reportaron que crisina, apigenina, genisteína, naringenina y luteolina fueron capaces de estimular el promotor *nodC* en distintas cepas de rizobios de maní.

La inoculación de alfalfa con *A. brasilense* resultó en la producción de exudados con una capacidad incrementada para inducir la expresión de genes *nod* en *Rhizobium*, en comparación con los exudados de alfalfa obtenidos sin inocular (Burdman y col., 1998). Este resultado estuvo de acuerdo con un cambio en la composición química de los exudados y la calidad de los flavonoides producidos por las plantas inoculadas (Burdman y col., 1996; Volpin y col., 1996). En nuestros resultados no se observaron modificaciones destacables al comparar la diversidad y los niveles de los flavonoides detectados en las rizodeposiciones producidas por maní frente a las coinoculaciones, respecto a las inoculaciones simples con los rizobios.

En coincidencia con lo sucedido en nuestro ensayo, está informado en la bibliografía que la presencia de microorganismos o de componentes/productos microbianos (factores *nod*, componentes de pared celular), provocaron cambios en la expresión de enzimas involucradas en la vía biosintética de flavonoides en plantas. Se han visto cambios cualitativos y cuantitativos en la exudación de estas moléculas y en su acumulación en las raíces (Cooper, 2004).

En conclusión, bacterias promotoras del crecimiento vegetal simbióticas y de vida libre han provocado cambios en los patrones de exudación de flavonoides vegetales, lo cual está en concordancia con resultados previamente informados por otros autores (Burdman y col., 1996).

VI.3.e.ii. Rol de los flavonoides como moléculas antioxidantes

La exposición de plantas a condiciones ambientales desfavorables dadas por factores como la temperatura, intensidad lumínica, disponibilidad de agua, contaminantes del aire, salinidad de los suelos, incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: **Reactive Oxygen Species**), como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical oxhidrilo (OH^\cdot). Estos radicales causan daños directos sobre la clorofila, proteínas, lípidos, ADN y otras macromoléculas importantes de las células, perjudicando fatalmente el

metabolismo y en última instancia, el crecimiento de la planta y rendimiento del cultivo (Sairam y Tyagi, 2004).

La mejor conocida y ampliamente estudiada acción biológica de los flavonoides en las células es su acción antioxidante (Hendrich y col., 2006). Su capacidad de prevenir la oxidación de lípidos y proteínas (Hendrich y col., 2006) explica al menos, algunos de sus efectos positivos. En relación a esta capacidad, morina mostró capacidad atenuante de la oxidación de lípidos (Chen y col., 1996), y en correspondencia con estos roles, hemos observado en nuestros resultados que, en presencia de los inóculos, se vieron incrementos en las cantidades de ciertos flavonoides implicados en la reducción del estrés oxidativo, como la morina, en los tratamientos con estrés salino.

VI.3.e.iii. Rol de los flavonoides como fuentes de carbono

Los flavonoides representan, para aquellos microorganismos que poseen las enzimas catabólicas apropiadas, una rica fuente de carbono (Cooper, 2004). *B. japonicum*, *R. fredii* y *R. sp.*, mostraron capacidad para degradar aeróbicamente a genisteína por fisión de sus anillos (Rao y Cooper, 1995). Varias cepas rizobianas degradaron naringenina, luteolina, genisteína y apigenina dando anillos aromáticos (Rao y Cooper, 1995; Shaw y col., 2006).

El catabolismo también podría ser un mecanismo de detoxificación ya que ciertos flavonoides han mostrado ser tóxicos para microorganismos, o presentar toxicidad a concentraciones elevadas (Veluri y col., 2004). Es conocido en la bibliografía revisada que los microorganismos competentes de la rizósfera (rizobios, agrobacterias, PGPRs) poseen la capacidad de catabolizarlos y están adaptados al tipo y niveles de flavonoides exudados por cada especie vegetal particular (Shaw y col., 2006).

El catabolismo de los flavonoides en el suelo también puede impactar en la potencia de la señal inicial generada por la planta: los flavonoides exudados como glucósidos pueden ser hidrolizados por los microorganismos a formas agliconas que son más potentes inductores de genes *nod* (Hartwig y Phillips, 1991). La presencia de *A. brasilense* en la rizósfera estimuló la hidrólisis de flavonoides conjugados de los tejidos radicales, logrando la liberación de estos en sus formas activas (Okon y col., 2008). En correspondencia con lo anterior, en nuestro trabajo pudimos observar en las rizodeposiciones obtenidas en ausencia de inóculos, una diferencia en los niveles entre

naringenina y su forma glicosilada, naringina, esta última siendo tres veces mayor. En oposición a ello, en presencia de *A. brasilense* Cd esta diferencia se redujo, indicando que podría haber una transformación llevada a cabo por estos microorganismos, que resultó en el pasaje de las formas glicosiladas a las no glicosiladas. No ocurrió en presencia de los rizobios ni de las coinoculaciones.

VII. CONCLUSIONES

En esta Tesina pudimos demostrar que:

VII.1. Sobre el crecimiento de la planta de maní:

- Los cinco inóculos aplicados produjeron incrementos en el contenido de materia seca de la planta de maní de siete días de crecimiento, en condición control.
- *Azospirillum brasilense* Cd fue la cepa que produjo el mayor contenido de materia seca en maní, en condición control.
- La salinidad redujo significativamente el contenido de materia seca de la raíz de maní creciendo en ausencia de inóculos bacterianos.
- La salinidad no logró reducir significativamente el contenido de materia seca de la planta de maní cuando se desarrolló en presencia de los inóculos simples y dobles, mostrando menor sensibilidad a este factor perjudicial.
- La inoculación simple con *Bradyrhizobium* sp. C145 y la coinoculación entre *Ochrobactrum* TAL1000 y *Azospirillum brasilense* Cd, causaron los mayores pesos secos en plantas de maní, creciendo en presencia de salinidad.

VII.2. Sobre la composición molecular de las rizodeposiciones de maní:

- La exudación de metabolitos por parte de la raíz de maní creciendo en presencia y ausencia de salinidad, acidificó el medio de crecimiento, y la inoculación con los distintos microorganismos, independientemente de la salinidad, resultó en un menor grado de acidificación del mismo.
- Trece diferentes ácidos grasos estuvieron presentes en las rizodeposiciones de maní. Los principales AG hallados fueron los AG saturados 16:0, 18:0, 24:0, y los AG insaturados 16:1, 18:1 y 20:3. Los AG obtenidos en presencia de estrés salino se diferenciaron de los obtenidos en condiciones libres del estrés, por lo que de alguna

manera estarían involucrados en la interacción suelo-planta en esta condición. También se vieron alterados los patrones de rizodeposición de AG al crecer en presencia de los inóculos bacterianos.

- La fitohormona ácido indol acético fue detectada en rizodeposiciones de maní solo en presencia de rizobacterias. Sus mayores contenidos se detectaron frente a las dos cepas de rizobios.
- El aminoácido triptófano fue detectado en rizodeposiciones de maní sólo en presencia de rizobacterias. Su concentración dependió del tratamiento ensayado, incrementándose en tres de ellos por la salinidad, mientras que en los otros dos se redujo por este estrés.
- Seis flavonoides estuvieron presentes en las rizodeposiciones de maní. Sus contenidos fluctuaron respondiendo a los diferentes tratamientos ensayados.

En resumen, mediante la metodología empleada hemos podido detectar moléculas señales que forman parte de las rizodeposiciones de maní, estudiar su comportamiento frente a los diversos factores aplicados y demostrar que se vieron afectadas por la presencia de estrés salino y microorganismos rizosféricos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 📖 **AHMED, E.M., YOUNG, C.T.** (1982). Composition quality and flavor of peanut. *Peanut Science and Technology*. EE.UU. Cap.17. p: 655-689.
- 📖 **AKHTAR, M.S., SIDDIQUI, Z.A.** (2010). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Biocontrol of Plant Diseases and Sustainable Agriculture. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs*. Springer-Verlag.
- 📖 **ALBORNOZ, A.** (2009). Tesis de Grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- 📖 **ANGELINI, J.G., CASTRO, S.M., FABRA, A.** (2003). Alteration in root colonization and *nodC* gene induction in the peanut-rhizobia interaction under acidic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 289-294.
- 📖 **ANTOUN, H., BEAUCHAMP, J., GOUSSARD, N., CHABOT, R., LALANDE, R.** (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* .204: 57–67.
- 📖 **AOKI, T., AKASHI, T., AYABE, S.** (2006). Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis. *J. Plant. Res.* 113: 475-488.
- 📖 **APARICIO-TEJO, P.M.** (1993). Fijación de Nitrógeno. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid.
- 📖 **ARKHIPOVA, T.N., PRINSEN, E., VESELOV, S.U., MARTINENKO, E.V., MELENTIEVE, A.I., KUDOYAROVA, G.R.** (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil*. 292: 305–315.
- 📖 **ARMERO, J., REQUEJO, R., JORRIN, J., LOPEZ-VALBUENA, R., TENA, M.** (2001). Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 785-795.
- 📖 **BARBIERI, P., ZANELLI, T., GALLI, E., ZANETTI, A.** (1986). Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutant salt, dinnitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 87-90.
- 📖 **BASHAN, Y.** (1991). Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone in cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Canadian J of Microbiol.* 37: 958-963.
- 📖 **BEGUM, A.A., LEBOVITCH, S., MIGNER, P., ZHANG, F.** (2001). Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) Nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* 152: 1537–1543.
- 📖 **BELL, M.J., WRIGHT, G.C., HARCH, G.** (1993). Environmental and agronomic effects

- on the growth of four peanut cultivars in a subtropical environment. II. Dry matter partitioning. *Exp. Agric.* 29 (4): 491–501.
- 📖 **BERG, G.** (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.*84: 11–18.
- 📖 **BERTIN, C., YANG, X., WESTON, L.** (2003). The role of exudates and allelochemical synthesis in rhizosphere. *Plant Soil.* 256: 67-83.
- 📖 **BISWAS, J.C., LADHA, J.K., DAZZO, F.B.** (2000). Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of low land rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*64: 1644–1650.
- 📖 **BIOFAG. RED IBEROAMERICANA DE FERTILIZANTES BIOLÓGICOS PARA LA AGRICULTURA Y EL MEDIOAMBIENTE.** www.biofag.org.ar
- 📖 **BLIGH, E., DYER, W.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-918.
- 📖 **BODDEY, R.M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J.** (1986). Effect of inoculation of *Azospirillum spp.* on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant Soil*, 90: 265- 292.
- 📖 **BOHLOOL, B.B., LADHA, J.K., GARRITY, D.P., GEORGE, T.** (1992).-Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. *Plant Soil* 141: 1-11.
- 📖 **BOLTON, H., FREDRICKSON, J.K., ELIOTT, L.F.** (1992). Microbial ecology of the rhizosphere. *Soil microbial ecology.* 27-63.
- 📖 **BONADEO, E., CANTERO, A., GUTIERREZ, A., BONGIOVANNI, M.** (2003). Relación entre la resistencia a la penetración, la densidad aparente y el contenido hídrico en un Hapludol típico. *Rev. UNRC.* 23 (1-2): 13-22.
- 📖 **BONGIOVANNI, R., GILETTA, M.** (2008). Los Cultivos Industriales y el Cluster de Maní en Córdoba. *Cultivos Industriales* N°10. Ed. INTA.
- 📖 **BOOGERD, F.C., VAN ROSSUM, D.** (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS. Microbiol. Rev.* 21: 5-27.
- 📖 **BOTTINI, R., FULCHIERI, M., PEARCE, D., PHARIS, R.** (1989). Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45-47.
- 📖 **BOWEN, G.D., ROVIRA, A.D.** (1991). The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. *Plant Roots, the Hidden Half.* Marcel-Dekker. pp.: 641-649.
- 📖 **BRECHENMACHER, L., LEI, Z., LIBAULT, M., FINDLEY, S., SUGAWARA, M., SADOWSKY, M.J., SUMNER, L.W., STACEY, G.** (2010). Soybean metabolites

- regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* 153: 1808-22.
- 📖 **BURDMAN, S., VOLPIN, H., KAPULNIK, Y., OKON, Y.** (1996). Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) root inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3030–3033.
- 📖 **BURDMAN, S., VEDDER, D., GERMAN, M., ITZIGSOHN, R., KIGEL, J., JURKEVITCH, E., OKON, Y.** (1998). Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. *Biological nitrogen fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic, pp 609–612.
- 📖 **BURSTRÖM, H.G.** (1955). The physiology of plant roots. *Ecology of soil-borne plant pathogens*. UC Press. pp: 154-166.
- 📖 **CABALLERO-MELLADO, J., LÓPEZ-REYES, L., BUSTILLOS-CRISTALES, R.** (1999). Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178: 283-288.
- 📖 **CAETANO-ANOLLÉS, G.** (1997). Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crops Res.* 53: 47-68.
- 📖 **CÁMARA ARGENTINA DEL MANÍ.** www.camaradelmani.com.ar
- 📖 **CASTRO, H.F.** (2010). *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 999-1007.
- 📖 **CHEN, Z.Y., CHAN, P.T., HOA, K.Y., FUNGA, K.P., WANG, J.** (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem. Phys. Lipids.* 79: 157-163.
- 📖 **CHUNG, S.Y., VERCELLOTTI, J.R., SANDERS, T.H.** (1997). Increase of glycolytic enzymes in peanuts during peanut maturation and curing: evidence of anaerobic metabolism. *45 (12): 4516–4521.*
- 📖 **COOPER, J.E.** (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* 41: 1-62.
- 📖 **CORREA, O., RIVAS, E., BARNEIX, A.** (1999). Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*. *Current Microbiol.* 38: 329-334.
- 📖 **CURL, E.A., TRUELOVE, B.** (1986). *The rhizosphere*. Springer-Verlag, New York.
- 📖 **DARDANELLI, M.S., F.J. FERNÁNDEZ, M.R. ESPUNY, M.A. RODRÍGUEZ, M.E. SORIA, A.M. GIL SERRANO, Y. OKON, AND M. MEGÍAS.** (2008-a). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry* ISSN 0038-0717, 40: 2713-2721.

- 📖 **DARDANELLI, M.S., RODRÍGUEZ NAVARRO, D.N., MEGÍAS, M. Y OKON, Y.** (2008-b). -Influencia de la coinoculación *Azospirillum*-rizobios sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno de leguminosas de interés agronómico. Asociación Argentina de Microbiología. Argentina. pp: 141-151.
- 📖 **DARDANELLI, M.S., GONZÁLEZ, P.S., MEDEOT, D.B., PAULUCCI, N.S., BUENO, M.A., GARCÍA, M.B.** (2009). Effects of rizobia species on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis*. 40: 175-180
- 📖 **DARDANELLI, M.S., MANYANI, H., GONZALEZ-BARROSO, S., RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A., GIL-SERRANO, A.M., ESPUNY, M.R., LOPEZ-BAENA, F.J., BELLOGIN, R.A., MEGIAS, M., OLLERO, F.J.** (2010) Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil*. doi:10.1007/s11104-009-0127-6
- 📖 **DAVISON, J.** (1988). Plant beneficial bacteria. *Bio. Technol.* 6. p. 282–286.
- 📖 **DE BANO, L.F.** (1971). The effect of hydrophobic substances on water movement in soil during infiltration. *Soil Sci*, 35: 340-343.
- 📖 **DEVLIEGHER, W., SYAMSULARIF, M.A., VERSTRAETE, W.** (1995). Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP 15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7 NSK 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3865-3871.
- 📖 **D'HAENZE, W., HOLSTERS, M.** (2002). MiniReview: Nod factors structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*. 12: 79-105.
- 📖 **DIXON, R.A., PAIVA, N.L.** (1995). Stress-induced phenyl-propanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–1097.
- 📖 **DIXON, R.A.** (2001). *Nature*. 411: 843-847.
- 📖 **DOBELAERE, S., OKON, Y.** (2007). The plant growth-promoting effect and plant responses. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Applications and Research Progress*. Springer. p: 145-170.
- 📖 **DÖBEREINER, J., DE-POLLI, H., BOHLOOL, B.B.** (1980). Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. *Arch. Microbiol.* 126: 217-222.
- 📖 **DÖBEREINER, J.** (1992). The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identifications and applications. Springer-Verlag. New York.
- 📖 **DOWNTON, W.J.S.** (1984). *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1: 183-201.

- 📖 ECHEVERRÍA, H. (2000). Suelo y fertilidad. Ed. INTA Balcarce.
- 📖 EL-AKHALA., M.R., RINCON, B.A., ARENAL, B.F., LUCAS, M.M., EL MOURABITC, N., BARRIJALA, S., PUEYOB, J.J. (2008). Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2911–2914.
- 📖 ESTÉVEZ AMADOR, J. (2007). Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.
- 📖 FAGES, J. (1994). *Azospirillum* inoculants and field experiments. *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC. p. 87-109.
- 📖 FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. (2008). La agricultura en el mundo: hacia 2015/2030". Informe resumido. www.fao.org.
- 📖 FAURE, D., VEREECKE, D., LEVEAU, J.H.J. (2009). Molecular communication in rhizosphere. *Plant Soil* 321: 279–303.
- 📖 FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., ROSSEN, L., JOHNSTON, A.W.B. (1986). Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324: 90–92.
- 📖 FISCHER, S., MARTY, C., PRÍNCIPE, A., ÁLVAREZ, F., MAGRIS, S., CASTRO, M. (2006). Supervivencia y respuesta a diferentes tipos de estrés en PGPR nativas de Córdoba. UNRC.
- 📖 FRANKENBERGER, W.T., ARSHAD, M. (1995). Phytohormones in soils: microbial production and function. Marcel Dekker Inc, New York.
- 📖 FREY, M., CHOMET, P., GLAWISCHING, E., STETTNER, C., GRUNS, A., WINKLMAIR, A. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 277: 696-699.
- 📖 FRIES, N., BARDETM., SERCK-HANSEN, K. (1985). Growth of ectomycorrhizal fungi stimulated by lipids from a pine root exudate. *Plant and soil.* 86: 287-290.
- 📖 GILLETTE, W.K., ELKAN, G.H. (1996). *Bradyrhizobium* (*Arachis*) *sp.* strain NC 92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *noIA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *J. Bacteriol.* 178: 2757–2766.
- 📖 GILLIER, P., SILVESTRE, P. (1970) El Cacahuete o Maní. Ed. Barcelona Blume, España.
- 📖 GIOVANNINI, G., LUCCHESI S., CERVELLI, S. (1983). Water repellent substances and aggregate stability in hydrophobic soil. *Soil Sci.*135: 110-113.

- 📖 **GLICK, B.R., PATTEN, C.L., HOLGUIN, G., PENROSE, D.M.** (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- 📖 **GLICK, B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- 📖 **GRAYSTON, S.J., VAUGHAN, D., JONES, D.** (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5: 29.
- 📖 **GREENWAY, H., MUNNS, R.** (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149-190.
- 📖 **GUIDI, G., PETRUZZELLI, G., GIACCHETTI, M., LEVI-MINZI, R.** (1983). Effect of three fractions extracted from anaerobic and anaerobic sewage sludge on the water stability and surface area of aggregates. *Soil Sci.*, 136: 158-163.
- 📖 **HAAS, D., DE FAGO, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4): 307-19.
- 📖 **HAFEEZ, F.Y., SAFDAR, M.E., CHAUDHRY, A.U., MALIK, K.A.** (2004). Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Aust J Exp Agric.* 44: 617-622.
- 📖 **HALE, M.G., MOORE, L.D., GRIFFIN, G.J.** (1978). Root exudates and exudation. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier. p: 163-203.
- 📖 **HARDOIM, P.R., VAN OVERBEEK, L.S., VAN ELSAS, J.D.** (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.
- 📖 **HARTWIG, U., PHILLIPS, D.A.** (1991). Release and modification of *nod* gene inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiol.* 95: 804-807.
- 📖 **HAWES, M.C., BENGOUGH, G., CASSAB, G., PONCE, G.** (2003). Root caps and rhizosphere. *J. Plant Growth Regul.* 21: 352-367.
- 📖 **HENDRICH, A.B.** (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica.* 27: 27-40.
- 📖 **HILTNER, L.** (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arb DLG* 98: 59-78.
- 📖 **HINSINGER, P.** (1998). How do plants acquire mineral nutrients? Chemical processes

involved in the rhizosphere. *Adv Agron.* 64: 225-265.

- 📖 **HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I.** (1938). The water-culture method for growing plants without soil. Circular California University Agricultural Experiment Station. 347:1-39.
- 📖 **HOLLF, B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R., RADLEY, R.A.** (1988). Response of crested wheat grass (*Agropyron cristatum L.*), perennial ryegrass (*Loliumperenne L.*) and white clover (*Trifolium repens L.*) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 20:19–24.
- 📖 **HOLMAN, R.T., JOHNSON, S.B., HATCH, T.F.** (1993). A case in human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Amer. J. Clin. Nutr.* 36: 617-623.
- 📖 **HORVATH, I., GLATZ, A., VARVASOVSKI, V., TOROK, Z., PALI, T., BALOGH, G., KOVACS, E., NADASDI, L., BENKO, S., JOO, R., VIGH, L.** (1998). Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17asa fluidity gene.
- 📖 **HOWELL, C.R., STIPANOVIC, R.D.** (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70: 712–715.
- 📖 **HUNGRIA, M., VARGAS, M.A.T.** (2000). Environmental factors affecting nitrogen fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field crops research*.65: 151-164.
- 📖 **IBA, K.** (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*53: 225–45.
- 📖 **IKERD, J.** (1990). Agricultura Sostenible. N° 1. Serie Agricultura Sostenible. Buenos Aires.
- 📖 **INTA. INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGRICOLA.** Argentina.
- 📖 **ITZIGSOHN, R., OKON, Y.** (1995). The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnol. Adv.*13: 415-424.
- 📖 **JAEGER, C.H., LINDOW, S.E., MILLER, W., CLARK, E., FIRESTONE, M.K.** (1999). Mapping of sugar and aminoacid available in soils around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl and environ microb* 65: 2685-2690.
- 📖 **JAMBU, P., MOUCAWI, J., FUSTEC, E., AMBLES, A., JACQUESY, R.** (1985). Inter-relatione entre Ph et nature descomposes lipidiques du sol: etude compare d'une rendzine et d'un sol lessive glossique. *Agroquimica*, 29: 186-198
- 📖 **JENNY, H., GROSSENBACHER, K.** (1963). Root-soil boundary zones as seen in the

- electron microscope. *Soil Science*. 27: 273-277.
- 📖 **JONES, D.L., DARRAH, P.R.** (1995). Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* land its implications in rhizosphere C flow. *Plant soil* 173:103-109.
- 📖 **JONES, D.L., EDWARDS, A.C., DONACHIE, K., DARRAH, P.R.** (1994). Role of proteinaceous aminoacids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant and Soil*.158: 183-192.
- 📖 **KACHROO, A., VENUGOPAL, SC., LAPCHYK, L., FALCONE, D., HILDEBRAND, D., KACHROO, P.** (2004). Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*101: 5152-57.
- 📖 **KACHROO, A., KACHROO, P.** (2009). Fatty acid derived signals in plant defense. *Annual review of phytopatology*. 47: 153-176.
- 📖 **KAMILOVA, F., KRAVCHENKO, L.V., SHAPOSHNIKOV, A. I., AZAROVA, T., MAKAROVA, N., LUGTENBERG, B.** (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact* 19: 250-256.
- 📖 **KAPULNIK, Y., OKON, Y., HENIS, Y.** (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum inoculation*. *Can. J. Microbiol.* 31: 881–887.
- 📖 **KATES, M.** (1973). Techniques of lipidology. Work, T. y Work, E. (eds). North Holland Publishing Company. pp: 465-469.
- 📖 **KELLER, M.E.** (2009). Maní. Alimentos Argentinos N° 46: Pastas alimenticias: Tradición, variedad y calidad. Publicación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, realizada por la Subsecretaría de Agroindustria y Mercados. Argentina.
- 📖 **KETRING, D.L.** (1991). Physiology of oil seeds. IX. Effects of water deficit on peanut seeds quality. *Crop. Sci.* 31: 459-463.
- 📖 **KLOEPPER, J., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWICZ, R.** (1989). Free-living bacteria inoculation for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- 📖 **KLOEPPER, J.** (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biocontrol agents. *Soil Microbiol. Ecology*. Marcel. Dekker Inc., New York.
- 📖 **KOSSLAK, R.M., BOOKLAND, R., BERKEI, J., PAAREN, H.E., APPLEBAUM, E.R.** (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7428–7432.
- 📖 **KOO.** (2005). Encyclopedia of soils in the environment. Ed. Hiller. Elsevier. The

Netherlands.

- 📖 **KRAUSS, T., HAMPP, E., GROSSO, M., BASCONSUELO, S., MALPASSI, R., BIANCO, C.** (1996). Morfología de sistemas radicales de *Arachis hypogaea* L. en función de las condiciones físicas del suelo. *Rev. UNRC*. 16 (1): 41-55
- 📖 **KUZYAKOV, Y., DOMANSKI, G.** (2000). Carbon input in to the soil. *J Plant Nutr Soil Sci* 163: 421-431.
- 📖 **LIN, W., OKON, Y., HARDY, R.W.F.** (1983) Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1775-1779.
- 📖 **LINDBERG, T., GRANHALL, U., TOMENIUS, K.** (1985). Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic rhizosphere bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic conditions. *Biol. Fertil Soils*1: 123–129.
- 📖 **LONG, S.R.** (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*. 56: 203-214.
- 📖 **LÓPEZ DE VITTORIA, G., LOVELL, C.R.** (1993). Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2951-2955.
- 📖 **LÓPEZ GÓMEZ, M.** (2007). Metabolismo carbonado nodular en *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, *Lotus japonicum*-*Mesorhizobium loti*, en estrés salino: implicación de la trehalosa. Tesis Doctoral. Granada. España.
- 📖 **LOS, D.A., MURATA, N.** (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1666: 142–157.
- 📖 **LUCAS GARCÍA, J.A., BARBAS, C., PROBANZA, A., BARRIENTOS, M.L., GUTIERREZ MAÑERO, F.J.** Low Molecular Weight Organic Acids and Fatty Acids in Root Exudates of Two *Lupinus* Cultivars at Flowering and Fruiting Stages (2001). *Phytochem.* 12: 305-311.
- 📖 **LUM, M.R., HIRSCH, A.M.** (2003). Root and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorous in a nutrient-limiting environment. *J. Plant Growth Regul.* 21: 368-382.
- 📖 **LYNCH, J.M., WHIPPS, J.M.** (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129: 1-10.
- 📖 **MAAS, E.V.** (1986). Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*. 1: 12-26.
- 📖 **MABOOD, F., ZHOU, X., LEE, K.D., SMITH, D.L.** (2006). Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and *Bradyrhizobium japonicum* increases soybean (*Glycine max* L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. *Field*

- Crop Res.* 95: 412–419.
- 📖 **MADIGAN, M., MARTINKO, J.M., PARKER, J.** (2006). BROCK: Biología de los Microorganismos. 10ª Ed. Pearson Prentice Hall.
- 📖 **MARSCHNER, H.** (1986). The root-soil interface (Rhizosphere) in relation to mineral nutrition. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2ª Ed. 537-595.
- 📖 **MARTIN, J.K.** (1977). Effect of soil moisture on the release of organic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* 9: 303-304.
- 📖 **MATSUDA, O., IBA, K.** (2005). Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. *Plant Biotechnol.* 22: 423-430.
- 📖 **MC CULLY, M.E.** (1999) Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 50: 695–718.
- 📖 **MELO, I.S.** (2002). Recursos genéticos microbianos. Recursos Genéticos e Melhoramento. Microorganismos. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, pp 2–48.
- 📖 **MEDEOT, D.** (2009). Funcionalidad de moléculas bacterianas en la interacción maní-rizobio. Comportamiento frente a estreses ambientales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- 📖 **MEHARG, A.A., KILLHAM, K.** (1991). A novel method of quantifying root exudation in the presence of soil microflora. *Plant and Soil* 133:111-116.
- 📖 **MITTLER, R.** (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11:15-19.
- 📖 **MORRISON, W., SMITH, L.** (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
- 📖 **MUCHNIK, J.** (2006). Sistemas agroalimentarios localizados: evolución del concepto y diversidad de situaciones. 3er Congreso Internacional de la red SIAL, Alimentos y Territorios (ALTER). España.
- 📖 **MUNNS, R.** (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant cell environm.* 16:15-24.
- 📖 **NABTI, E., SAHNOUNE, M., ADJRAD, S., VANDOMMELEN, A., GHOUL, M., SCHMID, M.Y, HARTMANN, A.** (2007). A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* strain from Algerian soil restores wheat growth under saline conditions. *Eng. Life Sci.* 4:354-360.
- 📖 **NAMBIAR, E.K.S.** (1976). The uptake of zinc by roots in relation to soil water content and root growth. *Aust. J. Soil. Res.* 14:67–74.
- 📖 **NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.**

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser.

- 📖 **NEUMANN, G., ROMHELD, V.** (2000). The release of root exudates as affected by the plant physiological status. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. pp 41-89.
- 📖 **NEUMANN, G.** (2007). Root Exudates and Nutrient Cycling. *Soil Biology*. Springer-Verlag. V.10.
- 📖 **NIF TAL. NITROGEN FIXATION BY TROPICAL AGRICULTURE LEGUMES.** Centro de Investigación, Universidad de Hawai.
- 📖 **NUTINEZ, D., MANESCOTTO, M., MONTELEONE, E.** (2008). Práctica de inoculación en el cultivo de maní. Porqué inocular. Evolución de cuatro años de ensayos. Ed. INTA. EEA Manfredi.
- 📖 **OCAÑA, A., CABA, J.M., LIGERO, F., LLUCH, C.** (1998). Nitrogen fixation in *Vicia faba* root nodules over ontogeny. *1st J. Plant Sci.* 47: 35-41.
- 📖 **OADES, J.M.** (1978). Mucilages at the root surface. *J. Soil Science.* 29: 1-17.
- 📖 **OFUYA, Z.M., AKHIDUE, V.** (2005). The Role of Pulses in Human Nutrition: A Review. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 9 (3): 99-104.
- 📖 **OKON, Y., KAPULNIK, Y.** (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 90: 3-16.
- 📖 **OKON, Y.** (1994). *Azospirillum*/plant associations. p: 175. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 📖 **OKON, Y., VANDERLEYDEN, J.** (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News.* 63: 366-370.
- 📖 **O'SULLIVAN, D.J., O'GARA, F.** (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- 📖 **PANNO, M., BAZAN, E., PETROCINI, C.** (1986). Ciencia del suelo. Vol. 2.
- 📖 **PARMAR, N., DADARWAL, K.R.** (1999). Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 86: 36-44.
- 📖 **PATRIQUIN, D.G., DÖBEREINER, J., JAIN, D.K.** (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-915.
- 📖 **PATRIK, Z.A.** (1971). Phytotoxic substances associated with the composition in soil on plant residues. *Soil sci.*, 111: 13-18.
- 📖 **PEDELINI, R.** (2008). Maní: Guía Práctica para su Cultivo. Boletín de Divulgación Técnica Numero 2. INTA EEA Manfredi.
- 📖 **PERRET, X., STAEHLIN, C., BROUGHTON, W.J.** (2000). Molecular basis of symbiosis promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol.* 64: 180-201.

- 📖 **PIETRARELLI, J.R.** (1980). Groundnut production, utilization, research problems and further research needs in Argentina. In: Proc. Int. Workshop on Groundnuts, India.
- 📖 **PHILLIPS, D.A., KAPULNIK, Y.** (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3: 58–63.
- 📖 **RAI, A.K., TIWARI, S.P.** (1999). Response to NaCl of nitrate assimilation and nitrogenase activity of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 and its mutants. *J. Appl. Microbiol.* 87: 877-883.
- 📖 **RAO, J.R., COOPER, J.E.** (1995). Soybean nodulating rhizobia modify nod gene inducers daidzeína and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol. Plant Microbe Int.* 8: 855-862.
- 📖 **REDDY, T.Y., REDDY, V.R., ANBUMOZHI, V.** (2003). Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant Growth Regulation.* 41: 75–88.
- 📖 **RENGEL, Z., RÖMHELD, V.** (2000). Root exudation and Fe uptake and transport in wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. *Plant Soil.* 222: 2–34.
- 📖 **RESCH, G.** (2003). La sustentabilidad como contexto productivo. Ed. INTA. Canals.
- 📖 **RHOADES, J.D., KANDIAH, A., MASHALI, A.M.** (1992). The use of saline waters for crop production. FAO Irrigation and Drainage, paper 48.
- 📖 **ROSAS, S., SORIA, R., CORREA, N., ABDALA, G.** (1998). Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 38: 1161–1168.
- 📖 **ROUTABOUL, J.M., FISCHER, S.F., BROWSE, J.** (2000). Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol.* 124:1697–705.
- 📖 **ROVIRA, A.D.** (1959). Root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant Soil.* 11: 53-64.
- 📖 **ROVIRA, A.D.** (1969). Plant Root Exudates. *The Botanical Review.* 35: 35-57.
- 📖 **ROVIRA, A.D.** (1973). Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Science.* 4: 361-366.
- 📖 **RUSSELL, R.S.** (1982). Plant Root Systems. First Edition. Mc Graw-Hill. 214p.
- 📖 **RUSSO, A., FELICI, C., TOFFANIN, A., GOTZ, M., COLLADOS, C., BAREA, J.M., MOENNE-LOCCOZ, Y., SMALLA, K., VANDERLEYDEN, J., NUTI, M.** (2005). Effects of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. *Biol. Fertil. Soils.* 41: 301-309.
- 📖 **SAIRAM, R.K., TYAGI, A.** (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress

- tolerance in plants. *Current Science*. V. 86(3).
- 📖 **SAJBIDOR, J.** (1997). Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical Rev. on Biotechnol.* 17: 87-103.
- 📖 **SARIG, S., BLUM, A., OKON, Y.** (1988) Improvement of the water status and yield of field grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci. Camb.*110: 271-277.
- 📖 **SCHLINDWEIN, G., VARGAS, L.K., LISBOA, B.B., AZAMBUJA, A.C., GRANADA, C.E., GABIATTI, N.C., PRATES, F., STUMPF, R.** (2008). Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. *Ciencia Rural.* 38: 658–664.
- 📖 **SCHMIDT, J., ROHRIG, H., JOHN, M., WIENEKE, U., STACEY, G., KONCZ, C., SCHELL, J.** (1993). Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharides in signal molecules. *Plant J.* 4: 651–658.
- 📖 **SCHNIDER, U., VOISARD, C., HAAS, D., DE FAGO, G.** (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology.* 82: 190–195
- 📖 **SHAW, L.J., MORRIS, P., HOOKER, J.E.** (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8: 1867–1880.
- 📖 **SILVA, S., BUSCONI, C., FONTANA, P.** (1985). Influence of lipids free metallic oxides and metallic-organic complexes on the structural stability of soils. *Agrochimica.* 29: 227-237.
- 📖 **SIMMONS, M., VAN DER BIJ, A.J., BRAND, I., DEWEGER, L.A., WIJFFELMAN, C.A., LUGTENBERG, B.J.J.** (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 600-607
- 📖 **SIIA. SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACIÓN AGROPECUARIA.**
www.sii.gov.ar/estimaciones_agricolas.
- 📖 **SKORUPSKA, A., WIELBO, J., KIDAJ, D., MAREK-KOZACZUK, M.** (2010). Enhancing *Rhizobium*–Legume Symbiosis Using Signaling Factors. *Microbes for Legume Improvement*. Springer. New York.
- 📖 **SMITH, R.S.** (1992). Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492
- 📖 **SOLOW, R.** (1992). An Almost Practical Step toward Sustainability. *Resources and Conservation Center*. 22p.

- 📖 **SOMASEGARAN, P., HOBEN, H.** (1994). Handbook for Rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology. Spring-Verlag New York, Inc.
- 📖 **SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J., SRINIVASAN, M.** (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205-240.
- 📖 **SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J., REMANS, R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.*31: 425-448.
- 📖 **SPRENT, J.I.** (1979). The biology of Nitrogen-Fixing Organisms. McGraw-Hill. U.K
- 📖 **SPRENT, J.I.** (2001). Nodulation in legumes. Royal Botanical Gardens. London.
- 📖 **STRZELCZYK, E., KAMPER, M., LI, C.** (1994). Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.*149: 55-60.
- 📖 **SVENNINGSSON, H., LILJENBERG, C.** (1986). Membrane lipid changes in root cells of rape (*Brassica napus*) as a function of water deficit stress. *Physiol Plant* 68: 53-58.
- 📖 **SVENNINGSSON, H., SUNDIN, P., LILJENBERG, C.** (1990). Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water deficit stress. *Plant, cell and environment.* V.13.
- 📖 **TARRAND, J.J., KRIEG, N.R., DÖBEREINER, J.** (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- 📖 **TAURIAN, T., MORON, B., SORIA-DIAZ, M.E., ANGELINI, J.G., TEJERO-MATEO, P., GIL-SERRANO, A., MEGIAS, M., FABRA, A.** (2008). Signal molecules in the peanut-bradyrhizobia interaction. *Arch Microbiol* 189:345–356.
- 📖 **TIEN, T.M., GASKINS, M., HUBBELL, D.H.** (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- 📖 **TUMLINSON, J.H., ENGELBERTH, J.** (2008). Fatty acid derived signals that induce or regulate plant defenses against herbivore. *Induced Plant Resistance to Herbivory.* Springer.
- 📖 **TURNER, N.C., JONES, M.M.** (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment, a review and evaluation. p. 87–103. *Adaptation of plants to water and high temperature stress.* Wiley-Interscience, New York.
- 📖 **UHEDA, E., DAIMON, H., YOSHIZAKO, F.** (2001). Colonization and invasion of peanut roots by gus-A marked *Bradyrhizobium* sp. *Can. J. Botany.* 79: 733-738.

- 📖 **UMALI-GARCIA, M., HUBELL, D.H., GASKINS, M.H., DAZZO, F.B.** (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
- 📖 **UPCHURCH, R.G.** (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30: 967–77.
- 📖 **UREN, N.C., REISENAUER, H.M.** (1988). The role of root exudates in nutrient acquisition. *Adv. Plant Nutrition.* 3: 97-114.
- 📖 **USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** (2009). Economic Research Service. U.S.
- 📖 **VANCE, C.P.** (1998). Legumes Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- 📖 **VARGAS, L.K., LISBOA, B.B., SCHLINDWEIN, G., GRANADA, C.E., GIONGO, A., BENEDEZI, A., PASSAGLIA, L.M.P.** (2009). Occurrence of plant growth-promoting traits in clover nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. *R Bras Ci Solo.* 33: 1227–1235.
- 📖 **VELARDE, I., MAGGIO, A., OTERO, J.** (2008). Sistemas Agroalimentarios Localizados en Argentina. Ed. INTA. Buenos Aires.
- 📖 **VELURI, R., WEIR, T.L., BAIS, H.P., STERMITZ, F.R., VIVANCO, J.M.** (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1077-1082.
- 📖 **VENTIMIGLIA, L., TORREUS BAUDRIX, L.** (2008) Formas de inoculación y carga bacteriana. Resultados de experiencias campaña 2007/08. Ed. INTA. EEA Pergamino. p: 166-168.
- 📖 **VIGH, L., LOS, D.A., HORVATH, I., MURATA, N.** (1993). The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desaturase in *Synechocystis* PCC6803.
- 📖 **VIVANCO, J.M., GUIMARAES, R.L., FLORES, H.E.** (2002). Underground plant metabolism: the biosynthetic potential of plant roots. *Plant roots.* 3rd ed. Dekker, New York, pp 1045-1070.
- 📖 **VIOLA, P., AUDISIO, M.** (1987). El aceite de oliva y la salud. Consejo Oleícola Internacional. Madrid. 36 p.
- 📖 **VOLPIN, H., BURDMAN, S., CASTRO-SOWINSKI, S., KAPULNIK, Y., OKON, Y.** (1996). Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod gene inducers by alfalfa roots. *Molecular Plant-Microbe Interaction.* 9: 388-394.
- 📖 **WATT, M., Mc CULLY, M.E., JEFFREE, C.E.** (1993). Plant and bacterial mucilages of

- the maize rhizosphere-comparison of their soil binding properties and histochemistry in a model system. *Plant Soil*. 151: 151-165
- 📖 **WERNER, D.** (1992). *Symbiosis of Plants and Microbes*. Chapman and Hall, University Press, Cambridge
- 📖 **WERNER, D.** (2000). Organic signals between plants and microorganisms. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. pp 197-222.
- 📖 **WHEELER, T.R., CHATZIALIOGLOU, A., CRAUFURD, P.Q., ELLIS, R.H., SUMMERFIELD, R.J.** (1997). Dry matter partitioning in groundnut exposed to high temperature stress. *Crop. Sci.* 37 (5) 1507-1513.
- 📖 **WHIPPS, J.M.** (1990). Carbon economy. *The Rhizosphere*. John Wiley pp. 59-97
- 📖 **WHITTAKER, R.H., FEENY, P.P.** (1971). Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171: 757-770.
- 📖 **WIGNARAJAH, K.** (1990). Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environ exp bot* 30: 141-147.
- 📖 **XING, J., CHIN, C.K.** (2000). Modification of fatty acids in eggplant affect sits resistance to *Verticillium dahlia*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* .56: 217-25
- 📖 **XUE, H.Q., UPCHURCH, R.G., KWANYUEN, P.** (2006). Ergosterol as a quantifiable biomass marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchi*". *Plant Dis*. 90: 1395-98.
- 📖 **YANG, J., KLOEPPER, J.W., RYU, C.M.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci*. 14: 1–4.
- 📖 **YAO, K., DE LUCA, V., BRISSON, N.** (1995). Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*. 7: 1787-1799.
- 📖 **YOSHIKAWA, M., HIRAI, N., WAKABAYZSHI, K., SUGIZAKI, H., IWAMURA, H.** (1993). Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol*. 39: 1150-115.
- 📖 **ZHANG, J., SUBRAMANIAN, S., STACEY, G., YU, O.** (2009) Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J*. 57:171–183
- 📖 **ZIEGER, E., TAIZ, L.** (2006). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 4° Ed.
- 📖 **ZUANAZZI, J.A.S., CLERGEOT, P.H., QUIRION, J.C., HUSSON, H.P., KONDOROSI, A., RATET, P.** (1998). Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and

repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:784–794.

IX. ANEXOS

Anexo IX.I. Tabla IX.I.1. Niveles porcentuales de AG en rizodeposiciones de maní obtenidas bajo diferentes tratamientos.

FAME TRATAMIENTOS	13:0	15:0	16:1	16:0	17:0	18:1	18:0	20:3	20:0	21:0	22:0	23:0	24:0	Total
(1) Sin Inocular C	4,5	1,5	6,3	26,2	3	18,3	31,5	Tr	8,5	Tr	ND	ND	ND	100%
(2) Sin Inocular S	5	2	3,1	38	Tr	1,3	40,1	7,1	3,2	Tr	ND	ND	ND	100%
(3) <i>A. brasilense</i> Cd C	1,7	Tr	2,2	28,8	Tr	28,2	29,2	ND	Tr	1	ND	2,1	5,8	100%
(4) <i>A. brasilense</i> Cd S	ND	Tr	3,2	35,6	Tr	1,5	48,8	ND	ND	Tr	ND	8,6	1	100%
(5) <i>B. sp.</i> C145 C	Tr	Tr	1,4	29	Tr	5,4	56,4	ND	1,1	Tr	Tr	Tr	5,5	100%
(6) <i>B. sp.</i> C145 S	ND	ND	ND	53,7	Tr	17	15,4	ND	ND	Tr	ND	2,8	10,4	100%
(7) <i>B. sp.</i> C145 + <i>A. br.</i> Cd C	1,7	Tr	2,1	33,5	ND	1,2	50,3	ND	ND	1,4	Tr	2,3	4,5	100%
(8) <i>B. sp.</i> C145 + <i>A. br.</i> Cd S	ND	Tr	2,3	40,1	Tr	4,5	45,2	ND	Tr	Tr	Tr	2,1	5,5	100%
(9) <i>O. TAL1000</i> C	Tr	Tr	4,3	31,4	ND	1,7	27	ND	ND	Tr	ND	Tr	34,8	100%
(10) <i>O. TAL1000</i> S	ND	ND	2,1	32,4	Tr	2,9	48,3	ND	ND	Tr	Tr	Tr	13,5	100%
(11) <i>O. TAL1000</i> + <i>A. br.</i> Cd C	ND	ND	ND	3,2	ND	ND	5,9	ND	ND	ND	ND	ND	90,6	100%
(12) <i>O. TAL1000</i> + <i>A. br.</i> Cd S	ND	ND	ND	38,2	Tr	3,8	47,3	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	8,8	100%

Los FAMES fueron identificados mediante la técnica de cromatografía gaseosa, e identificados por comparación de tiempos de retención (tr) con testigos puros. **ND**: No Detectado; **Tr**: Trazas; **C**: Control; **S**: Salinidad (NaCl 50 mM).

Anexo IX.I. Tabla IX.I.2. Niveles de AIA, Trp y Flavonoides en rizodeposiciones de maní obtenidas bajo diferentes tratamientos.

MOLECULAS SEÑAL TRATAMIENTOS	AIA	Triptófano	Apigenina	Crisina	Genisteína	Naringenina	Morina	Naringina
(1) Sin Inocular C	ND	ND	44	12,6	292	47	ND	124
(2) Sin Inocular S	ND	ND	ND	ND	ND	11,6	ND	32,5
(3) <i>A. brasilense</i> Cd C	1,1	36,6	10,9	5	ND	26,7	1,8	30,6
(4) <i>A. brasilense</i> Cd S	1,6	42,8	43,4	12	99,8	76,9	3,7	80,9
(5) <i>B. sp.</i> C145 C	1,85	30,3	2,8	11,9	43,9	1,2	1,6	14,25
(6) <i>B. sp.</i> C145 S	1,8	48,1	3,7	9	33,3	1,45	3,6	15,2
(7) <i>B. sp.</i> C145 + <i>A. br.</i> Cd C	ND	43,2	4,4	3,4	25,2	2,9	3,4	14,8
(8) <i>B. sp.</i> C145 + <i>A. br.</i> Cd S	1,8	47,1	8,3	11,1	21,9	2,1	1,9	95,7
(9) <i>O. TAL1000</i> C	2,95	32,2	4,3	8,1	14	1,4	2,4	16,8
(10) <i>O. TAL1000</i> S	7,24	ND	5,5	9,3	ND	2,5	3,4	29,3
(11) <i>O. TAL1000</i> + <i>A. br.</i> Cd C	ND	50	12,4	ND	ND	2,7	3,4	12,8
(12) <i>O. TAL1000</i> + <i>A. br.</i> Cd S	1,5	26,4	1,64	14,1	16,4	0,9	0,8	88,2

Los niveles de Trp, AIA, Apigenina, Crisina, Genisteína, Naringenina, Morina y Naringina fueron detectados y cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-MS), e identificados por comparación con testigos conocidos. Todos los niveles se expresaron en ng/gr de raíz seca. **ND**: No Detectado.

