

SANTORO, VALERIA MAR
Interaccion microorg

73216

2014

73216



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

Tesis para aspirar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

“Interacción microorganismo-plantas aromáticas:
rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de
importancia para la agricultura de *Mentha piperita*”

Lic. Valeria Maricel Santoro

DIRECTOR

Dra. Erika Banchio

Co-DIRECTOR 73216

Dr. Walter Giordano

Río Cuarto
Marzo 2014

73216

73216

MFN:
Clasif:
T. 878

*“Nunca debes abandonar lo que quieres.
En esta vida todo se logra con esfuerzo y
perseverancia, sólo hay que seguir
intentándolo. Luchar por nuestros sueños
es el motor que nos motiva día a día”*

A mi familia

Agradecimientos

A la Dra Erika Banchio por darme la oportunidad y la confianza sin conocerme en el momento más difícil de mi vida. Gracias por la colaboración, la comprensión y la fe en mi trabajo. A lo largo de estos 5 años supo darme la libertad y al mismo tiempo, guiarme hacia el objetivo final. Porque hasta en las diferencias de pensamiento se puede lograr encontrar un punto de encuentro.

Al Dr Walter Giordano por abrirme las puertas de su laboratorio, apoyar cada decisión tomada y haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo las actividades propuestas.

Al CONICET y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba por brindarme el apoyo económico necesario durante estos 5 años de beca doctoral.

A los miembros de la comisión asesora y tribunal de tesis Dra. Mirta Demo, Dr. Ramiro Lascano y Dr. Rubén Grosso por las críticas y los valiosos aportes científicos ofrecidos.

A mi mamá y a mi papá porqué me han brindado el cariño y el apoyo necesario en cada decisión tomada. Por darme la palabra necesaria en los momentos difíciles y animarme siempre a seguir para adelante. Por ser la base de lo que soy y de cada pequeño y gran logro de mi vida.

A Vanesa por ser mi hermana mayor, amiga, compañera, confidente y columna siempre lista a enderezar mi camino, a brindarme la fuerza y la positividad necesaria. Gracias a esas similitudes y diferencias que hacen a la hermosa relación que supimos construir. Porque si tuviera que elegir una hermana, te elegiría mil veces.

A Emma por alegrar mi vida con sus visitas y amor incondicional. Porque cuando me mira con sus hermosos ojitos sabe despertar lo mejor de mí.

A mis primas, hermanas y compañeras de vida Cintia y Desirée. Porque los lazos del corazón son los más verdaderos. Gracias por estar y acompañarme en el día a día de esta gran aventura que es la vida.

A mis tíos Hugo y Graciela y a mi primo Germán por hacerme sentir acompañada cuando estoy lejos de casa. Por los abrazos y la contención que me supieron brindar desde la niñez. Porque la distancia física no logra borrar el cariño sincero.

A mis compañeros del Laboratorio 10, los que están y los que se fueron: Pablo, Luciana, Fernando, Fiorela, Julio, Lorena y Ayelén. Por las risas compartidas que hacen que cada día sea especial, las canciones con la letra cambiada, los chistes y la capacidad que tiene de cambiar mi humor en los momentos de mayor tristeza. Por saber crear ese hermoso ambiente de trabajo que hace que siempre tenga ganas de ir al laboratorio. Por ser esa familia de amigos que me acompaña día a día en mi trabajo y en mi vida personal.

A Pablo por la colaboración brindada en el análisis genotípico de las cepas nativas. Por dedicar horas de tu tiempo y sentarte conmigo para ayudarme en el análisis de datos y la redacción de posters, resúmenes y tesis con tu lapicera roja siempre lista. Por crear la canción que me inspira a ser por fin doctora.

A Luciana, mi BFF. Aunque no te saludé el primer día en el laboratorio, fuiste mi compañía en mi primer tiempo en Río Cuarto y no obstante la distancia te llevó a caminos distintos, mantenemos el mismo cariño de siempre.

A Fernando por la paciencia ofrecida en los primeros días de laboratorio. Por hacer la lista en el azulejo de palabras en italiano, por mugirme al oído con el tubo de cartón, por tirarme el agua de la taza y por muchas cosas más que aunque superaron mi paciencia, hacen que te recuerde con una sonrisa. Vayas donde vayas siempre vas a ser parte del 10.

A Fiorela por la compañía y la amistad brindada en estos años. Aunque seamos muy distintas siempre estás ahí para escucharme, aconsejarme y ayudarme en todo momento de mi vida. Por tu capacidad de hacerme reír, porque no te cansas nunca de crear situaciones graciosas.

A Julio porque después de tantas idas y vueltas a Córdoba, de historias contadas y horas de series compartidas te convertiste en un gran amigo. Por acompañarme dentro y fuera del ambiente de trabajo, por tu capacidad de escucharme y brindarme siempre una palabra de apoyo.

A Lorena por pasarme el paper con la metodología que me permitió identificar los volátiles. Porque aunque al principio tuvimos muchas diferencias y me hiciste renegar mucho, te incorporaste al grupo y nos alegras día a día con tus historias y tu risa particular.

A Ayelén porque con el tiempo logramos entendernos. Por ser la cebadora de mates oficial del laboratorio que crea la situación ideal para las charlas que compartimos las chicas del 10.

A mis compañeros de almuerzo de antes y de ahora: Emi, Cristhian, Lucas, Julio y Fernando por las charlas y situaciones graciosas que me permitieron distraerme y despejarme todos los días, logrando así hacer más rápido y llevadero el día.

A mi amigacha Soledad por brindarme su amistad, compañía, ayuda, consejos y palabras de aliento cuando más lo necesito. Por alegrarme en todo momento desde ese famoso día que nos juntamos a tomar mates y no me fui más de tu casa. Gracias por todo lo que hiciste y seguís haciendo por mí. Le agradezco a la vida por haberte puesto en mi camino.

A mi amiga Flor por brindarme siempre la tranquilidad que necesito para ser yo misma, sin miedos ni temor. Porque tenés la palabra necesaria para darme apoyo en mis momentos más grises. Gracias por ser mi oreja, mi pierna y mi psicóloga. Agradezco a los sorteos de docencia que me dieron la posibilidad de encontrarte y conocerte.

A mis amigas Luli y Meli por los momentos y las charlas compartidas.

A mis amigos del otro lado del océano: Graziella, Rosalia, Teresa y Giuseppe por estar siempre a pesar de las distancias.

A los vecinos del Laboratorio 14: Flor, Juli, Sol, Renzo, Belén, Exe, Laura, Inés y Viviana, por permitir escabullirme todos los días a robarles unos mates y compartir momentos de alegría.

A los chicos del Laboratorio 21: Sole, Lili, Fer, Laura, Vani, Sole F., Lucio, Jorge, Ana y Eliana por recibirme siempre con una sonrisa, escucharme y considerarme una más de ustedes en mis visitas, así como en el congreso y los almuerzos compartidos.

A mis compañeros de italiano Guille, Guille S., Gustavo, Lili, Sofi, Fiore y Vale por las cenas y clases compartidas. Gracias por la alegría y la buena onda que me transmiten cada vez que nos juntamos.

A Nico, Maria, Vicky, Walter, Ramiro, Flor O., Carito y Pao B. por las salidas, las charlas y las noches compartidas. Porque la vida nos lleva a tomar caminos distintos pero la amistad cuando es verdadera perdura en el tiempo.

A mis compañeros de calvario en nuestras luchas con el MinCyT: Gabi, Emi, Evangelina y Ana. Por compartir las penas, tener el impulso necesario y enseñarme a luchar por lo que nos corresponde.

A los técnicos Mariela y Miguel por la amabilidad y la disponibilidad para realizar todos los pedidos de equipamiento que necesité para cumplir con los objetivos de tesis.

A Roxana por la disponibilidad a brindarme un laboratorio cuando lo necesité.

A Julio Zygadlo y Marcela Palacio por el análisis y la identificación de los aceites esenciales y compuestos volátiles bacterianos.

A toda la gente que encuentro repetidas veces en el pasillo del Departamento de Biología Molecular que me saludan siempre con una sonrisa.

Y...a todos los que me acompañaron de una forma o de otra en el camino recorrido en estos últimos 5 años.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo la dirección de la Dra. Erika Banchio y la co-dirección del Dr. Walter Giordano, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Dra. Erika Banchio
Director

Dr. Walter Giordano
Co-Director

Aprobado por el Tribunal de Tesis:

Dra. Mirta Susana Demo

Dr. Ramiro Lascano

Dr. Nelson Rubén Grosso

Río Cuarto, 7 de Marzo de 2014

Recursos financieros para la realización de esta Tesis Doctoral:

- ▶ Programa PPI, SECYT (UNRC). Estudios bioquímicos y moleculares en rizobacterias: impacto en la promoción del crecimiento vegetal. Director: Dr. Walter Giordano. Periodo 2009-2010. Subsidio Res.664/09. Subsidio otorgado \$40.000.
- ▶ Proyecto PIP 112-200801-00545 – CONICET. Biofilms de rizobios: análisis genético de su formación y relevancia en ecofisiología de la bacteria. Director: Dra. Angeles Zorreguieta - Codirector: Dr. Walter Giordano. Periodo 2009-2011. Subsidio otorgado \$300.000.
- ▶ Proyecto PIR-FONBIO - Ministerio de Ciencia y Tecnología, Córdoba. Periodo 2010-2012. Eficiencia de la inoculación y co-inoculación con distintos microorganismos promotores de crecimiento vegetal sobre la productividad del cultivo del maní. Investigador responsable: Dr. Walter Giordano. Subsidio otorgado \$251.140.
- ▶ PID-2011-2013- Inducción sistémica de la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas aromáticas mediada por rizobacterias. Director: Dra. Erika Banchio. Periodo 2011-2013. Subsidio otorgado \$40.000.
- ▶ PICT-2010-1866- Inducción sistémica de la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas aromáticas mediada por rizobacterias. Director: Dra. Erika Banchio. Periodo 2011-2013. Subsidio otorgado \$120.000.
- ▶ Proyecto PPI, SECYT (UNRC). Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta. Director: Dr. Walter Giordano. 2012-2014. Subsidio otorgado \$11.166.
- ▶ PICT-2011-0965- Comunidades microbianas y sus interacciones en el ecosistema rizosférico. Impacto sobre la fertilidad y conservación de los suelos con uso agrícola del centro-sur de la provincia de Córdoba. Director: Dr. Walter Giordano. Periodo: 2012-2014. Subsidio otorgado \$343.200.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis, han derivado en las siguientes publicaciones:

- ✓ **Santoro M.V.** y Banchio E. (2013). Growth regulators enhance secondary metabolite production by peppermint tissue cultures. *Agricell Report* 61(2): 11.
- ✓ **Santoro M.V.**, Nievas F., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. (2013). Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. *American Journal of Plant Sciences* 4: 49-55.
- ✓ **Santoro M.V.**, Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry* 49(10):1177-82.

y presentaciones a congresos:

- ✓ **Santoro M.**, Bogino P., Giordano W., Banchio E. (2013). Estudio polifásico de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de rizósfera de *Mentha piperita* L. XIII Congreso Argentino de Microbiología - CAM 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental – DIMAyA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Asistente, presentación de poster.
- ✓ **Santoro M.**, Giordano W. F., Banchio E. (2013). Isolation, identification and evaluation of plant growth promotion effects of native fluorescent *Pseudomonas* from rhizosphere soil of a *Mentha × piperita* plantation. XXXII New Phytologist Symposium. Buenos Aires, Argentina. Asistente, presentación de poster.
- ✓ **Santoro M.**, Bogino P., Giordano W. F., Banchio E. (2012). Volatile organic compounds produced by native fluorescent *Pseudomonas* improves essential oils in *Mentha piperita* L. 2º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ecología Química (ALEQ). Huerta Grande, Córdoba, Argentina. Asistente, presentación de poster.
- ✓ **Santoro M.**; Cappellari L.; Giordano W.; Banchio E. Effect of rhizobacterial volatile organic compounds (VOCs) in the production of essential oil of *Mentha piperita* L". (2011). VII Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE) del bicentenario. San Miguel de Tucumán, Argentina. Asistente, presentación de poster.

- ✓ **Santoro M., Bogino P., Giordano W., Banchio E.** Compuestos volátiles emitidos por rizobacterias promueven el crecimiento vegetal en Menta. (2009). II Reunión de biotecnología aplicada a plantas medicinales y aromáticas. Córdoba- Argentina. Asistente, presentación de poster.

Resumen

En el presente trabajo se realizaron ensayos destinados a comprobar los efectos que poseen los compuestos orgánicos volátiles producidos por rizobacterias (mVOCs) sobre el crecimiento y producción de aceites esenciales (AE) de plantas de *Mentha piperita* L.

Inicialmente se testearon 3 cepas PGPR de referencia a fin de identificar el género que produce mejor efecto sobre la planta modelo elegida. Así se determinó que los mVOCs emitidos por una determinada especie bacteriana no presentaron el mismo efecto o el mismo grado de respuesta en plantas de menta, determinando que la respuesta es especie-específica de la interacción bacteria-planta. Entre éstos, los mVOCs sintetizados por *P. fluorescens* WCS417r produjeron un efecto positivo en el desarrollo vegetal a nivel radicular y foliar, así como también en la composición de los AE, aumentando su contenido total y el contenido de los componentes mayoritarios mentona, pulegona y mentofurano.

A fin de poder demostrar si el efecto depende del género o de las cepas en particular, se aislaron de rizósfera de cultivares de menta un total de 50 cepas fluorescentes, a las cuales se las caracterizó fenotípica y genotípicamente. El conjunto de pruebas bioquímicas, los análisis RFLP de tipo ARDRA y los análisis de rep-PCR de tipo BOX y ERIC demostraron una gran heterogeneidad dentro de este grupo, revelando al mismo tiempo una buena concordancia entre ellos. El análisis de tipo BOX-PCR fue más apropiado para evidenciar diferencias más finas en el genoma de las cepas estudiadas produciendo, a su vez, un mayor grado de agrupación y una mayor similitud entre ellas. El análisis de la secuencia de nucleótidos de tipo BLAST del gen *ARNr 16S* y la construcción del árbol filogenético de las cepas nativas aisladas confirmó a *P. putida* como la principal especie fluorescente presente en la rizósfera de plantas de menta.

El total de la colección de bacterias fluorescentes fue caracterizado para determinar posibles actividades PGPR. Éstas exhibieron actividad productora de sideróforos, solubilizadora de fosfato y productora de AIA. Los mVOCs producidos por algunas cepas nativas presentaron una destacada capacidad biocontroladora del fitopatógeno *A. alternata* RC21. El efecto en la promoción del crecimiento de plantas de menta producido por mVOCs emitidos por las cepas aisladas no presentó el mismo efecto o el mismo grado de respuesta con respecto a las demás, determinando que la

respuesta no solamente es especie-específica de la interacción bacteria-planta o fitopatígeno-bacteria PGPR, sino que depende en mayor grado de la cepa utilizada. La producción de mVOCs por parte de algunas cepas nativas presentó un efecto positivo en el crecimiento de plantas de menta, aumentado el peso de la parte aérea y el contenido de los AE totales y de los compuestos mayoritarios limoneno y mentol.

Se realizó además, la caracterización de los mVOCs emitidos por las principales cepas que generaron un efecto de promoción del crecimiento y producción de AE. De este modo se pudo determinar las cepas analizadas producen un conjunto de mVOCs característico y específico para cada una de ellas. Algunos compuestos fueron característicos del grupo de estudio presentándose en la emisión de mVOCs de cepas fluorescentes nativas y de referencia y se identificaron como etanotiol, dimetil disulfuro y 1-undeceno. Otros componentes del conjunto de mVOCs se definieron como típicos para cada una de ellas, entre los cuales se identificaron el compuesto octanonitrilo y 2-isononenal.

La inoculación directa de las cepas PGPR en el medio de cultivo de plantas de menta no produjo los mismos resultados que la sola exposición a los mVOCs producidos por las mismas. Esta generó un aumento en la biomasa radicular y foliar, aumentando el peso seco de la raíz, el número de hojas y de tricomas glandulares. El análisis de la composición de los AE mostró un aumento el contenido y el porcentaje relativo de mentol y mentona, disminuyendo al mismo tiempo la presencia de los monoterpenos no deseados. El análisis multivariado de componentes principales manifestó que la producción de AIA por parte de las cepas nativas estudiadas, se encuentra íntimamente relacionada con el número de tricomas glandulares y el contenido de mentol y mentona en la composición general de AE de menta luego de la inoculación directa de las mismas.

Abstract

The present study reports the effects of volatile organic compounds produced by rhizobacteria (mVOCs) on growth and essential oils (EO) production of *Mentha piperita* L.

Three different PGPR bacteria were tested. mVOCs emitted from each bacterium generate different response on mint plant. The effects generated by VOCs exposition were dependent of bacteria specie tested. Between them, mVOCs of *P. fluorescens* WCS417r improved root and leaves development. Parameters of EO total, mentona, pulegona and mentofurano content were enhanced after bacterial mVOCs exposition.

50 native fluorescent pseudomonads were isolated from rhizospheric soil collected in a commercial crop of *Mentha × piperita*. A phenotypic and genotypic characterization was carried out on the total collection of fluorescent bacteria. The results obtained on biochemical test and RFLP analysis like ARDRA and rep-PCR like BOX and ERIC were coherent, demonstrating high heterogeneity among native strains isolated. BOX-PCR analysis was more suitable to detect small differences in native fluorescent bacteria genome generated bigger clusters at higher similarity among them. *P. putida* was confirmed as the main fluorescent specie present on rhizospheric soil of peppermint by BLAST analysis of sequences of gen *ARNr 16S* and construction of phylogenetic tree.

Bacteria isolated were tested for promoting activities on plant growth and EO production. Some fluorescent *Pseudomonas* were capable of siderophore, AIA production and phosphate solubilization. mVOCs emitted by some strains were capable of biocontrol against *A. alternata* RC21. The promotion growth effect produced by mVOCs emitted by native strains did not present the same response on peppermint. The effects were dependent on bacterial strain involved in the interaction bacteria-plant or phytopathogen-bacteria. The production of mVOCs of some strains showed a positive effect on growth of mint and EO yield, increasing leave fresh weight, total EO, limonene and menthol content.

mVOCs produced by strains that generated a positive effect on growth and EO production were characterized. All analyzed strains produced a characteristic and specific pool of VOCs. Some compounds were typical of the group studied and they were identified as ethanethiol, dimethyl disulfide and 1-undecene. Other compounds

were typical of each strain studied. Among them only two compounds were identified as octane nitrile and 2-isononenal.

Direct inoculation of native strains on growth medium of mint plants did not produced the same results that the simple exposition to mVOCs. Inoculation of bacteria increased root dry weight, number of leaves and number glandular tricome. Analysis of EO composition showed an improvement on content and relative percent of menthol and menthone, simultaneously decreasing the presence of not desired monoterpenes.

In conclusion, the multivariate analysis of principal components showed a high relationship among AIA production, number of glandular trichomes, menthol and menthone yield parameters after fluorescents bacteria inoculation.

Índice general

	Pag.
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	xii
Abreviaturas y siglas.....	xiv
Capítulo	
1 Introducción	1
1.1. La rizósfera como nicho ecológico.....	2
1.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	3
1.2.1. La producción de VOCs (<i>Volatile Organic Compounds</i>) como mecanismo PGPR.....	5
1.3. El género <i>Pseudomonas</i> en el suelo.....	9
1.3.1. Diversidad intraespecífica de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	10
1.4. <i>Mentha piperita</i> L.....	13
1.5. Síntesis de monoterpenos en <i>Mentha piperita</i> L.....	15
Capítulo	
2 Hipótesis y Objetivos	19
2.1. Hipótesis.....	19
2.2. Objetivo general.....	19
2.3. Objetivos específicos.....	19
Capítulo	
3 Materiales y Métodos	20
3.1. Microorganismos.....	20
3.1.1. Cepas utilizadas.....	20
3.1.2. Medio de conservación.....	21
3.1.3. Condiciones de crecimiento.....	21
3.2. Material vegetal.....	21
3.2.1. Cultivo in vitro – Micropropagación de menta.....	21
3.3. Bioensayos de compuestos orgánicos volátiles.....	21

3.4. Extracción de aceites esenciales.....	22
3.5. Cromatografía gaseosa.....	22
3.6. Aislamiento y caracterización de bacterias de suelo rizosféricos de plantas de menta.....	23
3.6.1. Análisis y caracterización fenotípica.....	23
3.6.2. Análisis y caracterización genotípica.....	25
3.6.2.1. Extracción de DNA genómico.....	25
3.6.2.2. Análisis del polimorfismo de la secuencia del gen <i>ARNr 16S</i> mediante ARDRA (<i>Amplified rDNA</i> <i>Restriction Analysis</i>).....	25
3.6.2.2.1. Amplificación del gen <i>ARNr 16S</i>	
3.6.2.2.2. Digestión de los fragmentos amplificados del gen <i>ARNr 16S</i>	26
3.6.2.3. Amplificación de secuencias repetidas a lo largo del genoma.....	27
3.6.2.3.1. ERIC-PCR <i>fingerprint</i>	27
3.6.2.3.2. BOX-PCR <i>fingerprint</i>	28
3.6.2.4. Análisis de los datos genotípicos.....	29
3.6.2.5. Análisis de las secuencias del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas nativas aisladas de rizósfera de menta.....	29
3.7. Determinación de los principales mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.....	30
3.8. Análisis químico del conjunto de mVOCs producidos por <i>Pseudomonas fluorescens</i>	31
3.8.1. Cromatografía gaseosa.....	32
3.9. Bioensayos de plantas inoculadas con cepas nativas.....	32
3.10. Recuento de tricomas glandulares foliares.....	33
3.11. Análisis estadísticos.....	33

Capítulo

4

Resultados y Discusión:

<i>Influencia de mVOCs de cepas de referencia sobre el crecimiento vegetal de plantas de menta</i>	34
---	----

4.1. Influencia de mVOCs sobre la biomasa de plantas de menta....	34	
4.2. Influencia de mVOCs sobre la producción de AE de plantas de menta.....	37	
Capítulo		
5	Resultados y Discusión:	
	<i>Aislamiento y caracterización de bacterias benéficas de suelo rizosférico de plantas de menta.....</i>	42
5.1.	Análisis y caracterización fenotípica.....	42
5.2.	Análisis y caracterización genotípica.....	44
5.2.1.	Análisis del polimorfismo de la secuencia del gen <i>ARNr 16S</i> mediante ARDRA (<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>).....	44
5.2.2.	ERIC-PCR <i>fingerprint</i>	52
5.2.3.	BOX-PCR <i>fingerprint</i>	56
Capítulo		
6	Resultados y Discusión:	
	<i>Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.....</i>	62
6.1.	Bioensayos de compuestos orgánicos volátiles microbianos (mVOCs).....	62
6.1.1.	Efecto de VOCs bacterianos sobre biomasa y producción de aceites esenciales en plantas de menta.....	62
6.1.2.	Biocontrol de fitopatógenos.....	68
6.2.	Bioensayos de otras actividades PGPR.....	69
6.3.	Análisis filogenético de cepas con actividad PGPR aisladas de rizósfera de cultivos de menta.....	70
6.4.	Análisis químico del conjunto de mVOCs producidos por cepas nativas con actividad promotora del crecimiento vegetal.....	73

Capítulo		
7	Resultados y Discusión:	
	Bioensayos de inoculación directa en plantas de menta con <i>Pseudomonas fluorescentes nativas</i>.....	81
	7.1. Influencia de la inoculación directa sobre la biomasa de plantas de menta.....	81
	7.2. Influencia de la inoculación directa sobre la producción de AE de plantas de menta.....	84
	7.3. Análisis multivariado de componentes principales.....	89
Capítulo		
8	Conclusiones.....	94
Capítulo		
9	Perspectivas.....	98
Capítulo		
10	Bibliografía.....	99
Anexo		
I	Medios de cultivo.....	118
Anexo		
II	Identificación de mVOCs.....	124

Índice de figuras

Figura	Pag
1.1. Esquema de los principales mecanismos PGPR efectuados por bacterias rizosféricas.....	5
1.2. Figura modelo de los mecanismos de resistencia sistémica inducida (ISR) y tolerancia sistémica inducida (IST) generados por VOCs emitidos por microorganismos PGPR.....	8
1.3. Clasificación del género <i>Pseudomonas</i> e imagen de <i>P. fluorescens</i> al microscopio electrónico de transmisión.....	10
1.4. <i>Mentha piperita</i> L.....	13
1.5. Tricomas glandulares de tipo peltado.....	15
1.6. Vía biosintética de monoterpenos de <i>M. piperita</i>	17
4.1. Placas tabicadas obtenidas en los tres tratamientos de plantas de <i>M. piperita</i> con las cepas de referencia	34
4.2. Efecto generado sobre el crecimiento vegetal por la exposición a VOCs producidos por bacterias PGPR de referencia.....	35
4.3. Efecto de la exposición a VOCs producidos por bacterias PGPR de referencia sobre el contenido de AE.....	38
5.1. Agrupación obtenida a partir de los aislamientos nativos y las cepas de referencia <i>P. fluorescens</i> y <i>P. putida</i> en base a la caracterización fenotípica.....	44
5.2. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción <i>HaeIII</i> del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas fluorescentes nativas.....	45
5.3. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción <i>MspI</i> del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas fluorescentes nativas.....	46
5.4. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción <i>AluI</i> del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas fluorescentes nativas.....	46
5.5. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción <i>HinfI</i> del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas fluorescentes nativas.....	46
5.6. Descripción de los marcadores genotípicos obtenidos a través del análisis ARDRA.....	48

5.7.	Dendrograma obtenido a partir de los patrones de RFLP del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas de referencia y nativas pertenecientes al grupo de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	49
5.8.	ERIC- <i>fingerprint</i> obtenido a partir de diferentes cepas aisladas de rizósfera de plantas de menta.....	53
5.9.	Descripción de datos de marcadores obtenidos por ERIC-PCR.....	53
5.10.	Dendrograma obtenido con los perfiles ERIC de cada una de las cepas fluorescentes de referencia y nativas aisladas de rizósfera de menta.....	54
5.11.	BOX <i>fingerprint</i> obtenido a partir de las diferentes cepas aisladas de rizósfera de plantas de menta.....	57
5.12.	Descripción de datos de marcadores obtenidos por BOX-PCR.....	57
5.13.	Dendrograma obtenido con los perfiles BOX de cada una de las cepas fluorescentes de referencia y nativas aisladas obtenidas a partir de rizósfera de menta.....	58
6.1.	Efecto de la exposición de mVOCs producidos por bacterias nativas sobre plantas de menta micropropagadas.....	63
6.2.	Efecto de la exposición a mVOCs producidos por bacterias fluorescentes nativas sobre la producción total aceites esenciales y sus componentes mayoritarios de plantas de menta micropropagadas.....	65
6.3.	Esquema representativo de los principales efectos PGPR encontrados por exposición de plantas de <i>M. piperita</i> a mVOCs producidos por cepas fluorescentes nativas.....	67
6.4.	Diámetro de crecimiento fúngico de la cepa de <i>A. alternata</i> RC21 en exposición a VOCs producidos por cepas de referencia y aisladas de rizósfera de menta.....	68
6.5.	Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas nativas y de referencia perteneciente al grupo de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	72
6.6.	Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por cepas de referencia y nativas aisladas de rizósfera de menta que presentaron un aumento en la producción de AE.....	75

6.7.	Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por las cepas nativas aisladas de rizósfera de menta con actividad de biocontrol.....	75
6.8.	Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por las cepas utilizadas como control.....	76
7.1.	Efecto de la inoculación de bacterias fluorescentes aisladas de rizósfera de menta sobre parametros de crecimiento vegetal de plantas de menta micropropagadas.....	82
7.2.	Efecto de la inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas sobre la producción total aceites esenciales y sus componentes mayoritarios en plantas de menta micropropagadas.....	85
7.3.	ACP realizado con parámetros de biomasa vegetal de plantas de menta micropropagadas obtenidos por inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas.....	90
7.4.	ACP realizado con parámetros de producción de AE en plantas de menta micropropagadas obtenidos por inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas.....	91
7.5.	Esquema representativo de los principales efectos PGPR encontrados por inoculación directa de plantas de <i>M. piperita</i> con cepas fluorescentes nativas.....	93
II.1.	Identificación del compuestos acetoína (T.R. 6,02) presente en el conjunto de VOCs de la cepa GB03.....	124
II.2.	Identificación del compuestos 2,3-butanediol (T.R. 7,72) presente en el conjunto de VOCs de la cepa GB03.....	124
II.3.	Identificación del compuestos volátil correspondiente al T.R. 3,27, típico del género <i>Pseudomonas</i>	125
II.4.	Identificación del compuestos volátil correspondiente al T.R. 6,62, típico del género <i>Pseudomonas</i>	125
II.5.	Identificación del compuestos volátil correspondiente al T.R. 14,05, típico del género <i>Pseudomonas</i>	126
II.6.	Identificación del compuestos volátil correspondiente al T.R. 13,89 típico de la cepa SJ25.....	126
II.7.	Identificación del compuestos volátil correspondiente al T.R. 15,54 típico de la cepa SJ25.....	127

Índice de tablas.

Tabla	Pag
3.1. Cepas empleadas.....	20
4.1. Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios analizados luego de la exposición de plantas de menta a mVOCs emitidos por cepas de referencia.....	39
4.2. Compuestos analizados y sus respectivos tiempos de retención en el perfil cromatográfico de los aceites esenciales de plantas de <i>M. piperita</i> expuestos a VOCs producidos por bacterias de referencia..	40
5.1. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sobre los aislamientos nativos.....	43
5.2. RFLP general del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas de referencia y nativas pertenecientes al grupo de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	47
6.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de <i>M. piperita</i> expuestas a VOCs producidos por cepas nativas.....	63
6.2. Actividades PGPR determinadas en las cepas nativas aisladas de rizósfera de plantas de menta.....	69
6.3. Datos relativos al análisis realizado con software BLAST sobre las secuencias del gen <i>ARNr 16S</i> de cepas nativas de rizósfera de menta.....	71
6.4. Tiempos de retención e identificación correspondiente a los compuestos volátiles típicos de las cepas del género <i>Pseudomonas</i> analizadas.....	77
6.5. Tiempos de retención e identificación correspondiente a los compuestos volátiles característicos de la cepa SJ25.....	78
6.6. Características genotípicas y fenotípicas de las cepas nativas cuyos mVOCs han sido analizados.....	80
7.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de menta inoculadas con cepas PGPR nativas.....	81

7.2.	Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios analizados en plantas de menta micropropagadas inoculadas con las cepas de referencia y nativas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i>	87
------	--	----

Abreviaturas y siglas

°:	grado(s).
%:	porcentaje.
°C:	grados centígrados.
µg:	microgramo(s).
µl:	microlitro(s).
µm:	micrómetro(s).
µM:	micromolar.
ACC:	1-aminociclopropano-1-carboxilato.
ACP:	Análisis de Componentes Principales.
ADN:	ácido desoxiribonucleico.
<i>ADNr16S:</i>	gen que codifica para la síntesis del ARNr 16S.
AE:	Aceites Esenciales.
ARDRA:	<i>Amplified rDNA Restriction Analysis.</i>
ARN:	ácido ribonucleico.
ARNr:	ácido ribonucleico ribosomal.
ARNr 16S:	ácido ribonucleico ribosomal 16S.
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool.</i>
BOX:	secuencias repetitivas de tipo BOX a lo largo del genoma.
cel:	células.
c/u:	cada uno.
cm:	centímetro(s).
cm ² :	centímetro(s) cuadrado(s).
csp:	cantidad suficiente para cultivar.
cv.:	cultivar.
DAPG:	diacetilfloroglucinol.
DMADP:	dimetilalil difosfato.
dNTPs:	desoxiribonucleitidos.
DO:	densidad óptica.
ERIC:	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus.</i>
g:	gramo(s).
GC:	cromatografía gaseosa.

GC-MS:	cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas.
GDPS:	enzima geranil difosfato sintetasa.
hs:	horas.
IBA:	ácido indolbutírico.
IDP:	isopentil difosfato.
IPI:	enzima (+)- <i>cis</i> -isopulegona isomerasa.
IPR:	enzima (-)-isopiperitenona reductasa.
ISR:	<i>Induced Systemic Resistance</i> .
IST:	<i>Induced Systemic Tolerance</i> .
l:	litro(s).
LB:	medio de cultivo Luria y Burrous.
LH:	enzima (-)-(4 <i>S</i>)-limoneno-3-hidroxilasa.
LS:	enzima limoneno sintasa.
m:	metro(s).
M:	molar.
m/z:	relación masa/carga.
MAT:	enzima (-)-(3 <i>R</i>)-mentol acetil transferasa.
MEF:	vía plastidial de síntesis de monoterpenos a partir del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato.
MFS:	enzima mentofurano sintasa.
mg:	miligramo(s).
min:	minuto(s).
ml:	mililitro(s).
mm:	milímetro(s).
mm ² :	milímetro(s) cuadrado(s).
mM:	milimolar.
MMR:	enzima (-)-mentona-(-)-(3 <i>R</i>)-mentol reductasa.
MNR:	(-)-mentona-(+)-(3 <i>S</i>)-neomentol reductasa.
MS:	medio de cultivo Murashige-Skoog.
mVOCs:	<i>microbial Volatile Organic Compunds</i> .
NAD ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada.

NADPH:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida.
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Informatton.</i>
O/N:	<i>over night.</i>
p/v:	peso en volumen.
pb:	pares de bases.
PCR:	<i>polymerase chain reaction.</i>
PGPR:	<i>Plant-Growth Promoting Rhizobacteria.</i>
<i>phl D:</i>	gen involucrado en la biosíntesis del DAPG.
PR:	enzima (+)-pulegona reductasa.
REP:	<i>repetitive extragenic palyndromic secuencias.</i>
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism.</i>
rpm:	revoluciones por minuto.
s:	segundo(s).
SI:	índice de similitud.
SJ:	San José.
sp.:	especie.
spp.:	especies.
SPME:	<i>Solid Phase MicroExtraction</i> , microextracción en fase sólida.
TAE:	tris-acetato-EDTA.
TPDH:	enzima (-)-trans-isopiperitenol deshidrogenasa.
U:	unidades por microlitro.
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias.
UV:	luz ultravioleta.
V:	voltios.
var:	variedad.
VOCs:	<i>Volatile Organic Compunds.</i>
y col.:	y colaboradores.



Capítulo 1

Introducción



Capítulo 1: Introducción.

Las plantas aromáticas incluyen una gran diversidad de especies vegetales cuya característica común es la producción de aceites esenciales (Günther, 1948). Éstos están formados por una compleja mezcla de metabolitos secundarios compuestos, principalmente, por mono y sesquiterpenos volátiles responsables del aroma característico de la especie vegetal que los produce (Harrewijn y col., 2001).

El cultivo de especies aromáticas es una actividad productiva que en Argentina no alcanzó todavía un nivel de desarrollo acorde a las potencialidades que tiene nuestro país (Collado y col., 2003). La menta inglesa (*Mentha x piperita*) representa uno de los principales cultivos de aromáticas y su producción no satisface la demanda doméstica. Esta especie es valorada por la acumulación de monoterpenos cíclicos como mentol y mentona, cuyos principales destinos son: saborizante y aromatizante en la producción de alimentos, perfumería y medicina (Gupta y col., 2002). La importancia que ha alcanzado esta actividad para la economía de diferentes estratos sociales de la población y la tendencia al autoabastecimiento de materias primas para la industria nacional, no tiene correlación con sus avances en la investigación. La ampliación de conocimientos en el área adquiere relevancia si se observa que la superficie dedicada al cultivo de plantas aromáticas aumentó sustancialmente en las últimas décadas (Inf. Sect. Aromas y Esencias, 2006).

En el mundo desarrollado, la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos y pesticidas para mantener altas las producciones agrícolas, sin tener en cuenta los daños que éstos pueden ocasionar, entre otras cosas, afectando el ciclo global del nitrógeno, contaminando las aguas subterráneas y superficiales, incrementando los riesgos de intoxicaciones químicas de los espejos de agua y ríos y aumentando los niveles de óxido nitroso (N₂O) atmosférico, que es un potente gas invernadero (Crews y Peoples, 2004).

Razones de índole económica, ambiental y sanitaria, justifican e incluso exigen la búsqueda de mecanismos que permitan un adecuado manejo sustentable de los cultivos. La necesidad de encontrar nuevos modelos que incrementen la producción vegetal de manera eficientes y sin efectos tóxicos indeseables ha desencadenado interés en el desarrollo de nuevas estrategias. Esto impulsa investigaciones sobre alternativas no convencionales como la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*). Adoptando este tipo de

innovación tecnológica, que se inclina hacia la conservación del ambiente, se incrementará la productividad de los cultivos, contribuyendo a una agricultura sustentable que trata de usar los recursos naturales con respeto del ambiente, sin comprometer a nuestras generaciones futuras. Este mecanismo constituye un punto de partida importante para mejorar la producción vegetal, incluyendo la optimización de la producción de metabolitos secundarios, implicando un incremento en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales. Considerando como objetivo final adecuar estos nuevos conocimientos a productores de plantas aromáticas y medicinales a fin de mejorar el rendimiento de la producción actual nacional.

1.1. La rizósfera como nicho ecológico.

El suelo es una parte fundamental de los ecosistemas terrestres. Éste representa un sistema dinámico y complejo donde ocurren una serie de relaciones de alimentación, muerte, descomposición, reciclado y convivencia que se manifiesta a través de una profunda correlación entre sus partes mineral, orgánica y biológica.

La rizósfera ha sido definida por Hiltner (1904), como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores (Foster, 1998).

Las raíces liberan distintos compuestos que crean un ambiente único en la rizósfera. Los exudados radicales son compuestos químicos liberados por exudación, secreción o autólisis de raíces viejas. Estos contienen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, vitaminas, proteínas y polisacáridos. Ha sido estimado que entre un 20-40% de los carbohidratos fotosintetizados son transferidos a la rizósfera, representando la mejor fuente de nutrientes disponible en el suelo (McNear, 2013). Esto es percibido por la comunidad rizosférica, que confluye aumentando su concentración de 10-100 veces con respecto a la presente en el resto del suelo (Tan y col., 2013). Por lo tanto, la quimiotaxis y la capacidad de formar biofilms son características esenciales para la selección de buenos colonizadores. A través de la quimiotaxis las bacterias se mueven hacia sustancias químicas de interés presentes en el ambiente circundante, alcanzando así condiciones óptimas de crecimiento y supervivencia. A través de la formación de biofilms las bacterias se agregan entre sí y se adhieren a una superficie encastradas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia (Tan y col., 2013). Factores como cambios climáticos, presencia de fitopatógenos y escasez de nutrientes cambian la composición de los exudados radicales. Esto puede ser percibidos

por los microorganismos circundantes que, a su vez, responden segregando sustancias que también pueden afectarlo. La rizósfera provee, entonces, un complejo y dinámico microambiente donde bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas con un considerable potencial para la manipulación a fin de lograr mejoras en los rendimientos agrícolas y en el mantenimiento sustentable de los suelos. La interacción y la comunicación entre raíz y microorganismos es un proceso altamente regulado y utilizado para controlar y alterar las actividades de los organismos involucrados. Hongos y bacterias son capaces de detectar plantas huéspedes e iniciar la estrategia de colonización de la rizósfera. Por otra parte, las plantas son capaces de reconocer compuestos sintetizados por microorganismos, regulando sus líneas de defensa de acuerdo a la especie encontrada. Este diálogo molecular resulta en una relación que pasa de la patogenicidad a la simbiosis a través de un proceso celular altamente coordinado (Walker y col., 2003; Bais y col., 2004; Ortiz-Castro y col., 2009; Babalola, 2010a).

1.2. **Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.**

Los variados mecanismos mediante los cuales los microorganismos llevan a cabo una acción PGPR en cada interacción rizobacteria-planta son altamente específicos y por lo tanto, es necesario determinar con precisión su efecto particular en la biología de la planta beneficiada. Esto puede ocurrir por varios mecanismos de origen bacteriano (Fig. 1.1):

- Producción de fitohormonas: en plantas inoculadas contribuyen a la tasa de respiración, metabolismo, crecimiento de raíz, absorción de minerales y agua, así como también al desarrollo vegetal, participando en el proceso de dominancia apical y en la arquitectura de raíces y hojas (Aloni y col., 2006; Babalola, 2010a; Glick, 2012; Bhattacharyya y Jha, 2012). Se ha demostrado, en especies pertenecientes al género *Azospirillum*, la producción de ácido indol-3-acético y ácido indol-3-butírico, así como también en especies pertenecientes al género *Bacillus*, la producción de citocininas, (Ortiz-Castro y col., 2008; Saharan y Nehra, 2011).
- Regulación del nivel de etileno: es un mecanismo de regulación del crecimiento vegetal que implica procesos como la ruptura de la dormición de las semillas, el aumento del número de raíces, el desarrollo de raíces adventicias, la diferenciación de hojas y raíces, la abscisión de hojas y frutos, la inducción de la floración y la senescencia de flores y hojas. Del mismo modo, la presencia de etileno a niveles

elevados inhibe la elongación de las raíces, llevando a un desarrollo anormal de las mismas, que limita el crecimiento vegetal. Las rizobacterias son capaces de producir etileno (Babalola, 2010b; Glick, 2012), así como también de utilizar el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), precursor de la vía biosintética, disminuyendo la concentración del producto final y mejorando el crecimiento de las plantas cuando éste está inhibido por la presencia de dicha fitohormona (Bhattacharyya y Jha; 2012).

- Producción de sideróforos: son productos de bajo peso molecular que tienen la capacidad de solubilizar y secuestrar hierro insoluble (Fe^{3+}) del suelo, favoreciendo la absorción (Fe^{2+}) por parte de las raíces de la planta huésped (Glick, 2012).
- Fijación de nitrógeno atmosférico: se presenta en plantas leguminosas que son capaces de formar una relación simbiótica con bacterias del género *Rizobium* en grado de fijar el nitrógeno atmosférico, que no es asimilable por parte de la planta. Existen también bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, como por ejemplo algunas especies pertenecientes al género *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*. Todas ellas tienen como característica común la producción de nitrogenasa, la enzima responsable de la reducción de N_2 a NH_3 (Saharan y Nehra, 2011).
- Producción de exoenzimas líticas: incluyen celulasas, quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteasas y lipasas que confieren la capacidad de lisar células fúngicas y rizobacterias nocivas (Muleta y col., 2007; Babalola, 2010a; Glick; 2012).
- Solubilización del fosfato inorgánico: es la capacidad de romper enlaces fosfóricos presente en las fuentes de fósforo inorgánico que compone las rocas, enriqueciendo así el suelo con HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , que son las formas de fosfato asimilables por la planta (Anzuay y col., 2013).
- Producción de vitaminas: es una importante característica en la colonización. Se ha demostrado la producción bacteriana de biotina y/o tiamina (Hayat y col., 2010).
- Biocontrol: proceso de control biológico destinado a crear un entorno benéfico para la planta y es debido a la presencia de bacterias que protegen las mismas contra enfermedades fúngicas, con o sin la presencia contemporánea del fitopatógeno (Bhattacharyya y Jha; 2012). El proceso de biocontrol puede manifestarse a través de varios mecanismos: antagonismo, mediante la síntesis de antibióticos (Chin-A-Woeng y col., 2000); competencia por el hierro, mediante la producción de sideróforos,

secuestrando así este ion que es necesario en el proceso de patogenicidad (Lugtenberg y Kamilova, 2009); resistencia sistémica inducida (ISR: *Induced Systemic Resistance*), mediante la generación de un estado de resistencia en la planta que la protege de futuras exposiciones a patógenos, sin previo contacto con el mismo (Glick, 2012).

Estudios previos demuestran que la aplicación de este tipo de microorganismos como biofertilizantes incrementa la producción de los cultivos (Kloepper y col., 1991; Barriuso y col., 2008; Glick, 2012). Hasta el momento se registran escasos estudios sobre los resultados que produce la inoculación con bacterias PGPR en plantas aromáticas y medicinales (Banchio y col., 2008; Banchio y col., 2009; Cappellari y col., 2013).

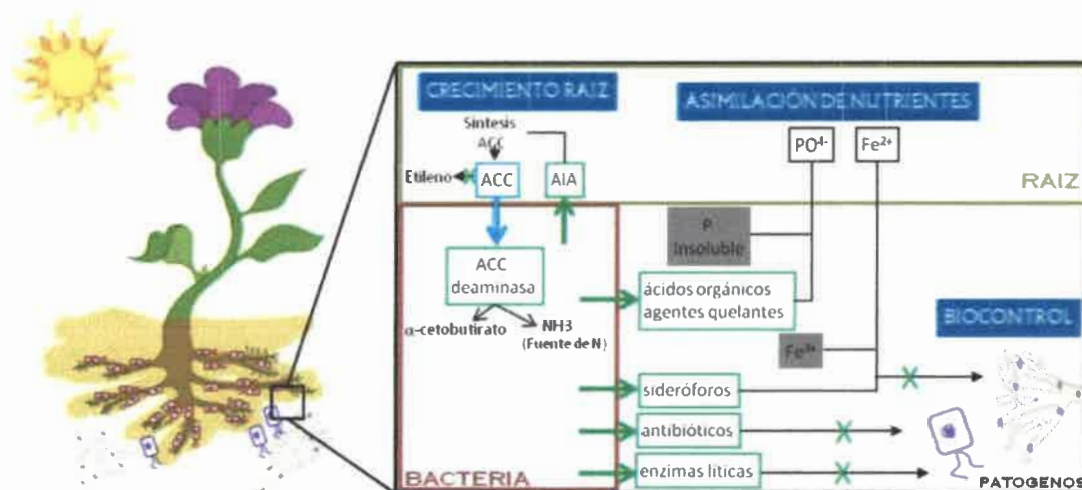


Fig. 1.1. Esquema representante los principales mecanismos PGPR efectuados por bacterias rizosféricas. Las flechas verdes representan los productos bacterianos que favorecen la estatus nutricional y el crecimiento de la planta. Las flechas celeste representan los productos de origen vegetal utilizados por las bacterias en su actividad PGPR.

1.2.1. La producción de VOCs (*Volatile Organic Compounds*) como mecanismo PGPR.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son moléculas que poseen una elevada presión de vapor y una baja temperatura de ebullición, razón por lo cual se volatilizan y se liberan a la atmósfera donde pueden alcanzar lugares distantes al sitio de producción. Los compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos (mVOCs: *microbial Volatile Organic Compounds*) han sido reconocidos como metabolitos secundarios, de bajo peso molecular ($<300\text{g/mol}^{-1}$) principalmente derivados de reacciones de fermentación (Vespermann y col., 2007; Kai y Piechulla

2009; Effmert y col., 2012; Naznin y col., 2013). En los últimos años, se han podido identificar y cuantificar la emisión de más de 300 mVOCs, ya sea con fines agronómicos, medicinales o cosméticos. Entre ellos se encuentran compuestos derivados de ácidos grasos, terpenos, compuestos aromáticos, compuestos que contienen nitrógeno, halógenos, sulfuros y metaloides que han sido organizados en bases de datos de acceso público (Super-Scent y DOVE-MO) (Schulz y Dickschat, 2007; Dunkel y col., 2009; Effmert y col., 2012). Los mVOCs una vez producidos, se mueven a través de los poros del suelo y, debido a que presentan actividad ya sea en estado gaseoso como líquido, son capaces de volatilizarse nuevamente al atravesar poros saturados de agua. Este proceso es influenciado por características de tipo química, inherente al mismo compuesto, así como de tipo fisicoquímicas, dependientes del ambiente circundante, que en conjunto influyen en los procesos de adsorción, desadsorción y degradación. La adsorción y desadsorción del compuesto depende de su polaridad, así como también de la presencia de agua y de la textura y arquitectura del suelo. Por lo tanto, un aumento de humedad reduce la adsorción de compuestos no polares a superficies minerales, pero por otro lado, facilitan su adsorción a superficies orgánicas (Effmert y col., 2012). Los mVOCs también son blancos de degradación biológica, representando fuentes de alimento de microorganismos (Owen y col., 2007), y de degradación abiótica, consecuencia de reacciones químicas catalizadas por las superficies minerales del suelo y por la presencia de radicales libres, generando oxidaciones en grupos funcionales polares (Effmert y col., 2012).

La emisión de un perfil de mVOCs que caracteriza una determinada rizobacteria es un proceso altamente específico. Ha sido comprobado que distintas cepas pertenecientes a la misma especie pueden diferenciarse por el *pool* de volátiles producidos en un determinado momento, así como también éstos varían en base al medio de cultivo y las condiciones de crecimiento. Por lo cual, es un proceso dependiente tanto de la genómica del microorganismo considerado, es decir del conjunto de capacidades metabólicas, como de los nutrientes que se encuentran en el medio (Schulz y Dickschat, 2007; Bloom y col., 2011; Nawrath y col., 2012). Se han llevado a cabo algunos estudios con el objetivo de aclarar la función de los VOCs bacterianos durante las interacciones benéficas planta-microorganismo, determinando así su participación en procesos como comunicación, defensa y promoción del crecimiento vegetal (Fernando y col., 2005; Banchio y col., 2009; Kai y col., 2009; Chernin y col., 2011; Farag y col., 2013).

Los mVOCs producidos por bacterias PGPR han demostrado actuar como bioprotectores causando una respuesta sistémica inducida (ISR) en las plantas colonizadas, generando un estado fisiológico de incremento de la capacidad defensiva, sin previo contacto con patógenos (Ryu y col., 2003). Algunas especies pertenecientes al género *Bacillus* (Ryu y col., 2004) y al género *Pseudomonas* (Han y col., 2006) producen un compuesto volátil de cadena corta (C4) que activa la vía del etileno, generando una ISR que protege plantas de *A. thaliana* y de tabaco contra ataques de bacterias necrotróficas como *Pectobacterium carotovorum* y biotróficas como *Pseudomonas syringae* (Ryu y col., 2004; Han y col., 2006; Radruppa y col., 2010). Más recientemente, ha sido demostrado que VOCs producidos por *Paenibacillus polymyxa* contienen compuestos de cadena larga (C11, C13 y C16) que protege plantas de *A. thaliana* contra ataques de bacterias biotróficas y necrotróficas, generando una ISR mediada por la activación de la vía del ácido salicílico y del ácido jasmónico (Lee y col., 2012; Park y col., 2013). Del mismo modo, se ha demostrado que la presencia de compuestos de cadena corta (C4 y C5), producidos por especies pertenecientes al género *Bacillus*, son capaces de inducir resistencia sistémica protegiendo a plantas de pepino contra infecciones de *P. syringae* y de *Myzus persicae*. Los mismos autores demuestran que este proceso se realiza a través de la activación de la vía del ácido jasmónico (Song y Ryu, 2013).

Así mismo, ha sido demostrado que VOCs producidos, principalmente, por especies pertenecientes al género *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* pueden ejercer un mecanismo de acción indirecta en la defensa de la planta de interés, a través de la reducción de la esporulación y/o del crecimiento vegetativo de especies fúngicas patógenas (Kai y col., 2009; Groenhagen y col., 2013).

También ha sido señalado que los VOCs bacterianos son capaces de aumentar la biomasa de plantas de *Arabidopsis thaliana*, desencadenando distintas señales hormonales, que incluyen citocininas, brasinoesteroides, auxinas, ácido salicílico y giberelinas (Ryu y col., 2003; Ryu y col., 2005; Zhang y col., 2007; Zhang y col., 2008a) (Fig. 1.2). Se examinaron a través de *microarrays* la variación de los niveles de expresión de alrededor de 600 genes relacionados con la modificación de la pared celular, el metabolismo primario y secundario, la respuesta a estrés y la homeostasis de auxina. De este modo, se demostró que los VOCs son capaces de influir directamente sobre la morfogénesis vegetal (Zhang y col., 2007; Ortiz-Castro y col., 2008). Además, ha sido señalado que los mVOCs son capaces, de aumentar la tasa fotosintética,

controlando la señal mediada por el nivel de azúcar/ácido abscísico, que lleva a un aumento en el contenido de clorofila (Zhang y col., 2008a; Farag y col., 2013).

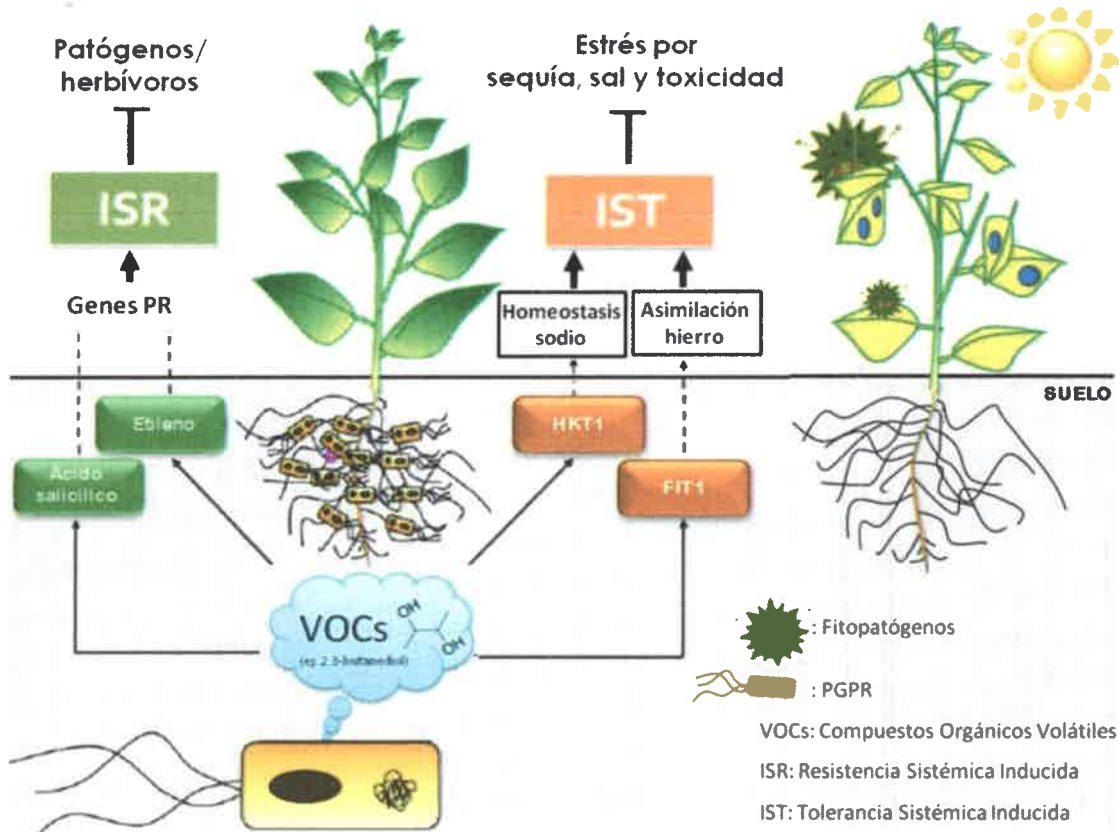


Fig. 1.2. Figura modelo de los mecanismos de resistencia sistémica inducida (ISR) y tolerancia sistémica inducida (IST) generados por VOCs emitidos por microorganismos PGPR. Las flechas puntuadas indican la respuesta de la planta mediada por componentes regulatorios vegetales y las flechas continuas indican los componentes de la planta que se encuentran afectados directamente por VOCs microbianos (Farag y col., 2013).

Asimismo, se estableció que VOCs son capaces de generar un estado de tolerancia a determinadas situaciones de estrés, denominado este proceso tolerancia sistémica inducida (IST: *Induced Systemic Tolerance*). Esto se manifiesta a través de la regulación del mecanismo de absorción de iones. En escasez de hierro, mVOCs son capaces de inducir la absorción de Fe^{3+} , modificando la expresión génica de reductasas y transportadores de membrana, lo cual se traduce, en un aumento en el contenido de clorofila y por ende, en la eficiencia fotosintética (Zhang y col., 2009). En condiciones de estrés salino, VOCs bacterianos son capaces de generar IST también a través de la regulación génica de transportadores de membrana, controlando la concentración intracelular de Na^+ (Zhang y col., 2008b; Farag y col., 2013) (Fig. 1.2).

En nuestro laboratorio se ha determinado que VOCs producidos por *B. subtilis* GB03 son capaces de incrementar la biomasa y la producción de aceites esenciales (AE) en plantas de *Ocimum basilicum* (Banchio y col., 2009), aunque el mecanismo a través del cual se manifiestan estos efectos aún no ha sido esclarecido.

Como resultado de lo expuesto anteriormente, podemos deducir que los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias PGPR representan una estrategia novedosa y prometedora para una agricultura sustentable.

1.3. El género *Pseudomonas* en el suelo.

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más importantes y mejor estudiados debido a su amplia distribución en el ambiente y fácil cultivo en condiciones de laboratorio. Son bacilos rectos o ligeramente curvados y móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares. Las características fisiológicas más importantes son una respuesta bioquímica oxidasa positiva, y a veces, negativa, catalasa positiva y Gram negativa. Presentan principalmente un metabolismo aeróbico, pero en algunos casos pueden utilizar aceptores de electrones distintos del oxígeno, presentándose como anaeróbicos facultativos. Es común la presencia de plásmidos. Pueden acumular gránulos de polihidroxibutirato y poseer ácidos grasos hidroxilados en la membrana plasmática (Palleroni, 2005) (Fig. 1.3).

Algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan la propiedad característica de sintetizar en condiciones de estrés por deficiencia de hierro, un pigmento hidrosoluble amarillo-verdoso fluorescente (Stanier y col., 1966). Este compuesto es denominado pioverdina (Meyer y Abdallah, 1978) o pseudobactina (Teintze y col., 1981), posee acción siderófora ayudando al transporte del hierro (Neilands, 1973; Laguerre y col., 1994; Mehri y col., 2011) y ligando algunas especies a su función patogénica (Fuchs y col., 2001). Este gran grupo de *Pseudomonas* fluorescentes incluye especies de interés ambiental, capaces de promover el crecimiento vegetal (PGPR), degradar xenobióticos o generar fitopatologías, y especies de interés médico, capaces de generar enfermedades en seres humanos y animales (Wu y col., 2009). Entre ellas se pueden mencionar *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de las infecciones nosocomiales más frecuentes y letales (Römling y col., 1994; Ali y col., 1995; Fuchs y col., 2001); *Pseudomonas syringae*, agente productor de toxinas y fitopatologías más frecuentes (Fuchs y col., 2001); *Pseudomonas putida* y

Pseudomonas fluorescens, conocidos promotores del crecimiento vegetal (Kloepper y Schroth, 1978).



REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	γ -Proteobacteria
ORDEN	Pseudomonadales
FAMILIA	Pseudomonadaceae
GENERO	Pseudomonas

Fig. 1.3. Clasificación del género *Pseudomonas* e imagen de *P. fluorescens* al microscopio electrónico de transmisión.

El predominio de las especies fluorescentes del género *Pseudomonas* ha sido reportado en suelos rizosféricos de plantas de algodón (Hu y col., 2005), arroz (Loaces y col., 2011), banana (Naik y col., 2008), trigo y cebada (Mavrodi y col., 2001; Parejko y col., 2012), colza (Pattern y Glick, 2002) y caña de azúcar (Rameshkumar y col., 2012). Como habitantes naturales de la rizósfera y agentes de variados mecanismos PGPR ya expuestos, las especies pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes ofrecen una alternativa atractiva como bioinoculantes y agentes de biocontrol (Palleroni, 1984; Kai y col., 2009). Para poder utilizarlas con éxito, es importante entender la diversidad genotípica y versatilidad metabólica de las mismas (Palleroni, 1993).

1.3.1. Diversidad intraespecífica de *Pseudomonas* fluorescentes.

El objetivo de estudiar la diversidad intraespecífica de una población bacteriana en un determinado nicho ecológico, es revelar los genotipos mejor adaptados o que presentan una mejor respuesta a determinados estreses ambientales y hábitats ecológicos (Achouak y col., 2000). Por lo tanto, la sustentabilidad de los cultivos se basa en la necesidad de conservar un determinado conjunto genético microbiano y en la elasticidad que presentan estos procesos ante los cambios del medio ambiente (Prosser, 2002).

Dos cepas son consideradas pertenecientes a la misma especie cuando presentan al menos un 70% de homología de su genoma total; por lo cual se tolera una alta diversidad genética intraespecífica que nos permite evaluar el impacto de la presión selectiva en la diversidad bacteriana dentro de una misma especie (Achouak y col., 2000). El gran número de especies pertenecientes al género *Pseudomonas* han sido aglomeradas por homología ADN/ARNr en 5 grandes grupos. Las especies

pertenecientes a la colección de *Pseudomonas* fluorescentes pertenecen al grupo denominado ARNr I (Palleroni y col., 1973; De Vos y De Ley, 1983; De Vos y col., 1985; De Vos y col., 1989).

Al momento se disponen de varios enfoques para evaluar la diversidad microbiana. En una clasificación tradicional, el análisis de la frecuencia y la diversidad de rizobacterias autóctonas se basan principalmente en su aislamiento de muestras ambientales. Típicamente la caracterización de las mismas se realiza por medio de una identificación fenotípica, basada en la determinación de características morfológicas, fisiológicas y/o bioquímicas, y por medio de una identificación genotípica, o sea a través del estudio de determinadas secuencias de ácidos nucleicos (Prosser, 2002; Picard y Bosco, 2008). Estos procedimientos son dependientes de un cultivo previo y realizados de manera rutinaria en muestras ambientales (van Elsas y col., 1998). La especificidad del análisis yace en la elección del medio de cultivo y del período de incubación aplicado en el aislamiento, así como en la elección de los ensayos de caracterización. Este procedimiento nos permite la selección y enriquecimiento de un determinado grupo bacteriano de interés que posiblemente esté presente en la muestra (Prosser, 2002; Picard y Bosco, 2008).

Si bien la tipificación fenotípica nos permite detectar las capacidades metabólicas de las especies presentes en la muestra, también manifiesta limitaciones para establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas entre ellas (Patten y Glick, 2002). El avance de las técnicas moleculares, y por lo tanto de los estudios genotípicos, nos permite superar dichas limitaciones. Por lo cual, a fin de obtener una imagen completa de las relaciones filogenéticas entre las cepas, es aconsejable la elección de un análisis integrado a través de una o más metodologías moleculares (Laguerre y col., 1994; Prosser, 2002). Las técnicas de generación de perfiles moleculares ofrecen un método atractivo y confiable para identificar y catalogar aislamientos relacionados (Rameshkumar y col., 2012). Las técnicas más utilizadas en el estudio de la diversidad intraespecífica presente dentro del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes son:

- amplificación de secuencias repetitivas (rep-PCR) como REP-PCR, BOX-PCR y ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*). Es un método desarrollado para clasificar bacterias en base a patrones de perfil genómico. Se basa en el uso de cebadores que corresponden a secuencias repetitivas e intercaladas en genomas bacterianos, que pueden ser del tipo REP, BOX ERIC (Versalovic y col., 1991). Es un método rápido y altamente reproducible que ha sido utilizado para

distinguir especies pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes íntimamente relacionadas, deducir relaciones filogenéticas y estudiar la diversidad y variedad de bacterias dentro de un mismo ecosistema (Parejko y col., 2012; Rameshkumar y col., 2012).

■ polimorfismo de fragmentos del gen de estudio, como ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*). Este método consiste en la amplificación de la secuencia del gen *rDNA16S* con sucesivo corte del amplicón a través del uso de enzimas de restricción. Esto produce patrones característicos para cada enzima y para cada una de las cepas estudiadas. Este tipo de análisis es el más utilizado para establecer relaciones filogenéticas entre cepas aisladas de una comunidad, y más específicamente en el estudio genético de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de diversos hábitats (Alberghini y col., 2008; Tanase y col., 2009; Wu y col., 2009; Rameshkumar y col., 2012). Algunos autores han estudiado la diversidad presente en este grupo basándose en el análisis de los perfiles generados en la restricción de amplicones de otros genes, como por ejemplo el gen *phl D*, involucrado en la biosíntesis del DAPG (diacetilfloroglucinol) que es uno de los productos más importantes en la actividad antibiótica y por lo tanto, antagónica de este género (Ramette y col., 2001; Mazzola y col., 2004; Picard y Bosco, 2008).

Generalmente los grupos se obtienen con estos métodos moleculares basados en el análisis de secuencias presentes en todo el genoma o sólo de la región ribosomal permiten relacionar muy bien las especies fluorescentes del género *Pseudomonas* (Keel y col., 1996; McSpadden Gardener y col., 2000; Ramette y col., 2001). Los estudios realizados comparando estos dos tipos de análisis, sobre las mismas cepas, generan diversos valores de corte en la formación de los agrupamientos. Esto se debe al nivel de resolución taxonómica que ofrece cada método. Por ejemplo, una técnica de generación de perfiles ribosomales, como ARDRA, provee una resolución a nivel de género, mientras que técnicas de generación de perfiles genómicos, como rep-PCR, permiten revelar una mayor diversidad bacteriana hasta por debajo de especie y subespecie (Picard y Bosco, 2008). De hecho, los agrupamientos que se obtienen luego de un análisis de tipo ARDRA se dividen en subgrupos cuando se aplica una técnica de tipo rep-PCR (Keel y col., 1996). A pesar de esto, muchos autores prefieren utilizar técnicas tipo ARDRA, ya que los valores taxonómicos obtenidos tienen un mayor grado de reproducibilidad (Picard y Bosco, 2008).

Este tipo de enfoque, basado en el aislamiento y cultivo previo de las cepas de estudio, es ampliamente aceptado y hasta el día de hoy muy utilizado para la caracterización de distintas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, debido a que las cepas fluorescentes son de fácil aislamiento y cultivo (Johnsen y col., 1999; Thirup y col., 2001). Esto permite las sucesivas caracterizaciones y explotación biotecnológica, en las cuales son imprescindibles los cultivos puros de las cepas de interés (Bosco y col., 1996, Rameshkumar y col., 2012).

1.4. *Mentha piperita* L.

El nombre común “menta” se aplica a las 25 especies perennes del género *Mentha*, perteneciente a la familia de las Lamiaceas. *Mentha piperita* L o *Mentha x piperita*, es un híbrido estéril obtenido del cruce de menta acuática (*Mentha aquatica*) y hierbabuena (*Mentha spicata*). Es una hierba con tallos muy ramificados, de entre 30 y 70 cm de altura, de sección cuadrangular, que nace de un rizoma subterráneo del que brota un extenso sistema radicular. Las hojas son pecioladas, opuestas, ovaladas, con el ápice agudo, los márgenes dentados y con el haz de color verde oscuro nervado de rojo en un patrón pinnado. Tanto hojas como tallos suelen ser ligeramente vellosos (Fig. 1.4). De las axilas foliares brotan los tallos florales en los que, desde comienzos del verano, aparecen inflorescencias terminales en forma de espiga, con las flores dispuestas en verticilos sobre el eje floral. Éstas son pequeñas, de hasta 8 mm, con la corola tetralobulada, de color púrpura o rosado (Fig. 1.4).



Fig. 1.4. *Mentha piperita* L. A.- Parte vegetativa. B.- Flor.

Dada su esterilidad, *M. piperita* se multiplica casi exclusivamente por propagación vegetativa. Se propaga rápidamente por estolones subterráneos y también por esquejes obtenidos de la división de las matas jóvenes de primavera o por división

de rizomas durante el período de descanso vegetativo. Se ha naturalizado con facilidad y hoy es posible encontrarla en zonas templadas de ambos hemisferios, aunque prefiere suelos húmedos, fértiles y no tolera el exceso de sol (Bruneton, 1991; Sanchez y col., 1996; Alonso, 1998).

Las especies pertenecientes al género *Mentha* son un recurso insustituible de aceites esenciales, los cuales, gracias a su diversidad química, son un blanco de explotación humana. Los constituyentes químicos asociados al olor característico del género son moléculas volátiles pertenecientes al grupo de los terpenos, como los monoterpenos y sesquiterpenos (Lange y Croteau, 1999). Actualmente, éstos se utilizan en una gran variedad de campos, por ejemplo, en la industria farmacéutica, perfumística, como aromatizantes, como suplementos alimenticios en forma de vitaminas o edulcorantes, como pesticidas, con fines medicinales, o como base para la industria de materiales. La versatilidad de los terpenos vegetales es una consecuencia de las diversas características fisicoquímicas que poseen, a su vez, dadas por las diferentes vías biosintéticas que los originan. Estos compuestos pueden ser lipofílicos o hidrofílicos, volátiles o no volátiles, cíclicos o acíclicos, quirales o aquirales (Bohlmann y Keeling, 2008).

En *M. piperita* los aceites esenciales (AE) son biosintetizados y almacenados en estructuras anatómicamente especializadas de la superficie foliar, que se denominan tricomas glandulares, y que derivan de los tejidos epidérmicos (Lange y col., 2000). Existen distintos tipos de tricomas (Turner y col., 2000a; Turner y Croteau, 2004; Lawrence, 2007):

- no glandulares, que consisten en un conjunto de células organizadas en un simple pelo;
- glandulares de tipo capitado, pequeños y con una sola célula secretora apical;
- glandulares de tipo peltado, que consisten en una célula basal, una célula tallo, y un conjunto radial de 8 células secretoras que constituyen la corona (Fig. 1.5).

Existen evidencias que sugieren que los tricomas glandulares capitados tienen una capacidad limitada de almacenamiento y segregan sólo pequeñas cantidades de monoterpenos, produciendo principalmente, una mezcla compleja de carbohidratos, lípidos y proteínas (Amelunxen y col., 1969; Ascensão y Pais, 1998; Turner y col., 2000a). Los tricomas glandulares peltados resultan de gran interés por la capacidad de generar rápidamente cantidades sustanciales de monoterpenos específicos. Éstos son sintetizados por las células secretoras de la corona, excretados y almacenados en un



gran espacio subcuticular formado por la expansión de la cutícula (Fig. 1.5) (Bohlmann y Keeling, 2008). Los tipos celulares presentes en esta estructura altamente especializada, que no son fotosintéticos, expresan los genes codificantes la maquinaria enzimática necesaria en la producción de monoterpenos, utilizando como precursor común moléculas de sacarosa importadas desde los tejidos fotosintéticos (McCaskill y col., 1992; Lange y Croteau, 1999).

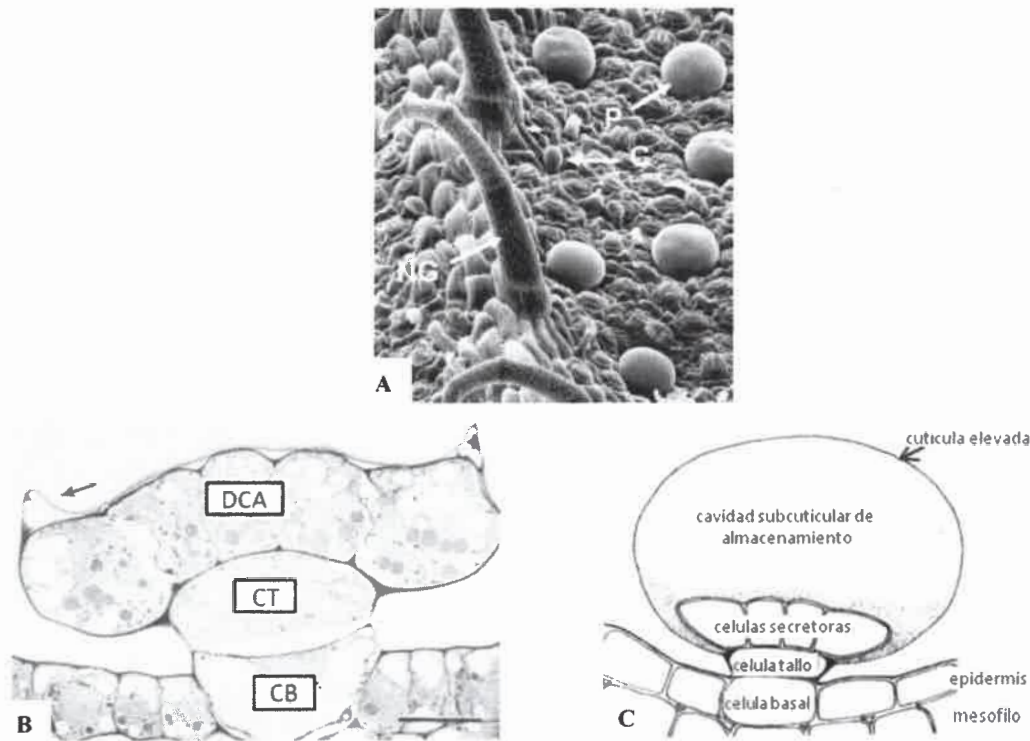


Fig. 1.5. Tricomas glandulares de tipo peltado. A.- Microscopia electrónica de barrido de la superficie de una hoja de *M. piperita* L.; P = tricoma glandular de tipo peltado, C = tricoma glandular de tipo capitado, NG = pelos no glandulares (Croteau y col., 2005). B.- Sección transversal observada con microscopio electrónico de transmisión; DCA = disco celular apical, CT = célula tallo, CB = célula basal; barra 10µm. C.- Esquema que ilustra la ubicación de esta estructura epidérmica y la expansión de la cutícula debida a la secreción de monoterpenos (Turner y Croteau, 2004).

1.5. Síntesis de monoterpenos en *Mentha piperita* L.

El monoterpeno (-)-mentol es el componente característico principal de los AE de *M. piperita* (Croteau y col., 2005). Este es valorado por sus propiedades olfativas y gustativas (Schwab y col., 2008), así como también por sus propiedades antimicrobianas y su suave efecto anestésico (Bohlmann y Keeling, 2008). La vía biosintética de los monoterpenos en *M. piperita* ha sido exhaustivamente estudiada por más de dos décadas por Croteau y colaboradores. Sus investigaciones sirven como

modelo de caracterización genética, molecular y bioquímica de la vía de síntesis, razón por la cual *M. piperita* se considera una planta modelo en su género (Lange y Croteau, 1999; Turner y Croteau, 2004; Bohlmann y Keeling, 2008; Degenhardt y col., 2009).

En *M. piperita* la vía metabólica que produce monoterpenos como producto final involucra distintos compartimentos celulares. Ésta se originan con la formación de 2 isómeros de 5 átomos de carbono (C_5): el dimetilalil difosfato (DMADP) y el isopentil difosfato (IDP) que se forman en la vía plastidial del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEF) a partir de piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato (Fig. 1.6). A partir de éstos precursores y de la acción de la enzima geranil difosfato sintetasa (GDPS), una prenil transferasa de localización plastidial, se cataliza la condensación de IDP y DMADP para formar geranil difosfato (Turner y Croteau, 2004) (Fig. 1.6). Luego de la formación de estos esqueletos básicos, las moléculas sufren distintas modificaciones por acción de diversas oxidasas, reductasas, dehidrogenasas y distintas clases de transferasas, dando lugar a la gran diversidad de los terpenos actualmente conocidos (Bohlmann y Keeling, 2008).

El geranil difosfato formado sirve como sustrato para la síntesis del precursor universal de los monoterpenos, el (-)-(4*S*)-limoneno, a través de la enzima limoneno sintasa (LS), que cataliza la ciclación del geranil difosfato (Turner y col., 2000a). Dicho producto es hidroxilado de manera regio y estereo específica en posición C3 por la enzima (-)-(4*S*)-limoneno-3-hidroxilasa citocromo P450 (LH), ubicada en asociación con el retículo endoplasmático, para formar (-)-trans-isopiperitenol (Lupien y col., 1999; Haudenschild y col., 2000; Turner y Croteau, 2004).

El (-)-trans-isopiperitenol es oxidado por la (-)-trans-isopiperitenol deshidrogenasa (TPDH) para producir (-)-isopiperitenona (Fig. 1.6). Esta enzima, NAD^+ dependiente, es de localización mitocondrial (Turner y Croteau, 2004). Sucesivamente, el doble enlace endocíclico ($\Delta^{1,2}$) de la (-)-isopiperitenona es reducido de manera regio y estereo específica, a (+)-*cis*-isopulegona por la (-)-isopiperitenona reductasa $NADPH$ dependiente (IPR), de localización citosólica (Ringer y col., 2003). Esta molécula, a su vez sufre una isomerización de doble enlace $\Delta^{8,9}$ a $\Delta^{4,8}$ a través de la (+)-*cis*-isopulegona isomerasa (IPI) dando lugar a la formación de (+)-pulegona (Turner y Croteau, 2004; Bohlmann y Keeling, 2008). Luego, la enzima (+)-pulegona reductasa $NADPH$ dependiente (PR), localizada en el citosol, cataliza la reducción del doble enlace $\Delta^{4,8}$ de la (+)-pulegona para producir una mezcla 70:30 de (-)-mentona y (+)-isomentona (Ringer y col., 2003).

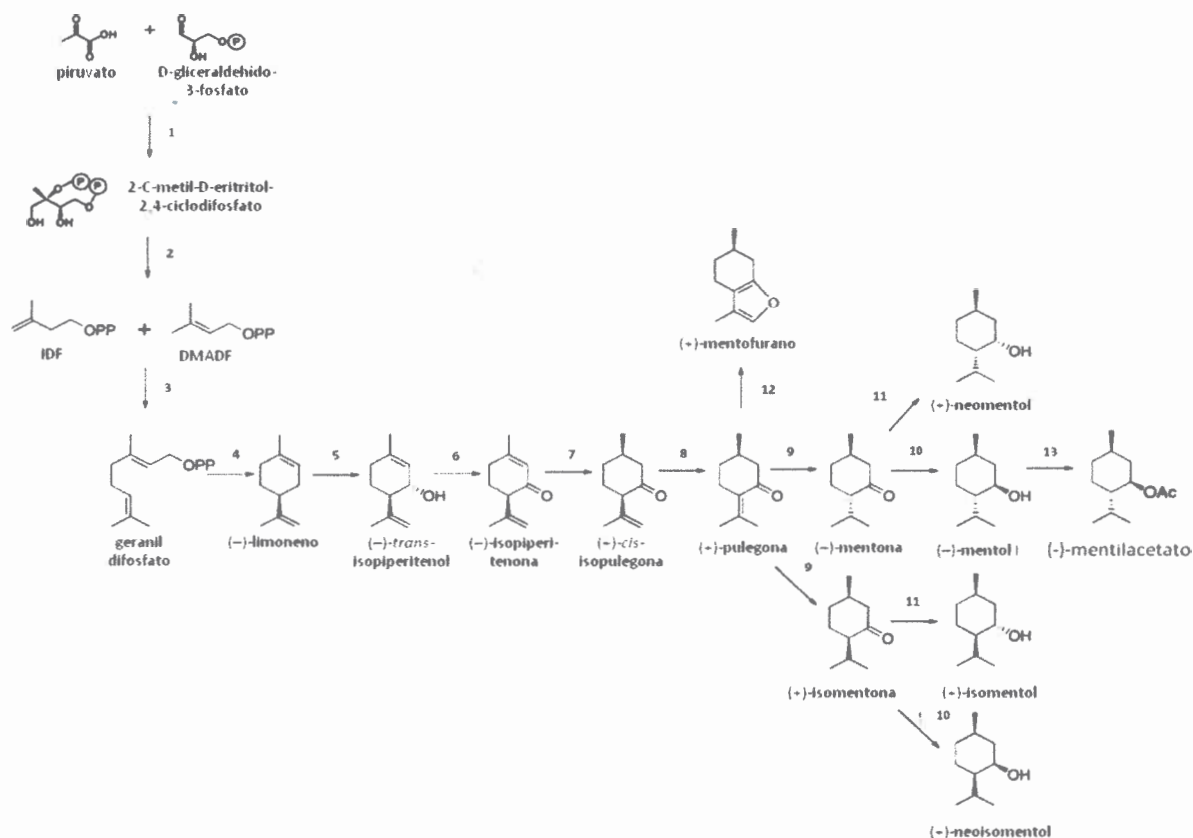


Fig. 1.6. Vía biosintética de monoterpenos de *M. piperita*. Las enzimas responsables son: 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (1); isoprenil difosfato sintasa (2); geranil difosfato sintasa (3); (-)-limoneno sintasa (4); (-)-limoneno-3-hidroxilasa (5); (-)-trans-isopiperitenol deshidrogenasa (6); (-)-isopiperitenona reductasa (7); (+)-cis-isopulegona isomerasa (8); (+)-pulegona reductasa (9); (-)-mentona:(-)-(3*R*)-mentol-reductasa (10); (-)-mentona:(+)-(3*S*)-neomentol reductasa (11); (+)-mentofurano sintasa (12); (-) (3*R*)-mentol-acetil-transferasa (13) (Mahmoud y Croteau, 2001; Davis y col., 2005).

En los últimos años, se ha puesto mayor énfasis en el estudio de la reducción de (-)-mentona que da origen a (-)-(3*R*)-mentol. Se han podido identificar dos reductasas responsables de la producción de todos los diastereoisómeros: una (-)-mentona(-)-(3*R*)-mentol reductasa (MMR) que produce principalmente un 95% de (-)-(3*R*)-mentol, a partir de (-)-mentona, y un 87% (+)-(3*R*)-neoisomentol, a partir de (+)-isomentona; y una (-)-mentona(+)-(3*S*)-neomentol reductasa (MNR) que produce principalmente un 94% de (+)-(3*S*)-neomentol a partir de (-)-mentona, y un 86% de (+)-(3*S*)-isomentol, a partir de (+)-isomentona. Ambas reductasas son NADPH dependientes, de localización citosólica y difieren en la esteoquímica de la reducción de los respectivos isómeros de mentona (Davis y col., 2005).

La acumulación de mentol en la región subcuticular de los tricomas glandulares peltados puede ser reducida por acción de dos enzimas: la mentofurano sintasa citocromo P450 dependiente (MFS), que se encuentre asociada al retículo endoplásmico y que cicla las cadenas laterales del anillo aromático presente en la (+)-pulegona, para producir (+)-mentofurano (Mahmoud y Croteau, 2001) (Fig. 5); y la (-)-(3R)-mentol acetil transferasa (MAT) que transfiere un grupo acetato al grupo oxidrilo presente en posición del (-)-(3R)-mentol para producir (-)-(3R)-mentilacetato (Lange y Croteau, 1999). Esto produce una disminución general de la presencia de mentol en el conjunto de aceites esenciales extraíbles de las plantas de menta lo cual reduce el valor y calidad del mismo.

La producción de monoterpenos ocurre mayormente en los 12-20 días de edad de maduración foliar, mientras que la enzima que produce mentol se activa a partir de los 20-25 días (Turner y col., 2000b). Se considera que el *turnover* de estos componentes, incluyendo la pérdida por evaporación desde el espacio de almacenamiento, juega un rol menor en la determinación de la composición y rendimiento de los AE (Gershenzon y col., 2000). Estos resultados, sumados a la falta de evidencias del control de la vía enzimática por modulación alostérica o covalente (Croteau, 1987; Wise y Croteau, 1999), sugieren que la composición y el rendimiento de los aceites esenciales refleja una cinética consecuente de los niveles de biosíntesis enzimática presentes, a su vez determinado por la regulación a nivel de transcripción, traducción y recambio proteolítico de dichas enzimas (McConkey y col., 2000).

Como consecuencia de este proceso, en nuestro laboratorio hemos encontrado en hojas completamente maduras crecidas en invernáculo y en medio agarizado como soporte los siguientes como monoterpenos mayoritarios: pulegona (41%), mentol (30%), mentona (11%), mentofuranona (11%), terpineol (4%), mentilacetato (2%) y mentofurano (1%).



Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos



Capítulo 2: Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

La inoculación de plantas de *Mentha* con cepas PGPR beneficia el desarrollo vegetal a través del incremento del rendimiento de aceites esenciales, así como la producción de biomasa, lo que permite un adecuado manejo sustentable de los cultivos.

2.2. Objetivo general.

El propósito de nuestra investigación está orientado a estudiar los distintos aspectos de la inoculación con microorganismos PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) en cultivos de plantas aromáticas y medicinales.

2.3. Objetivos específicos.

1. *Identificar los principales compuestos orgánicos volátiles emitidos por las rizobacterias y evaluar su rol sobre el desarrollo vegetal.*
2. *Aislar y caracterizar bacterias benéficas de la rizósfera de plantas aromáticas.*
3. *Establecer los principales mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.*
4. *Evaluar los efectos de la inoculación con distintos PGPR sobre aspectos relacionados al crecimiento vegetal tales como: biomasa, producción de aceite esencial y desarrollo de pelos glandulares.*



Capítulo 3

Materiales y Métodos



Capítulo 3: Materiales y Métodos.**3.1. Microorganismos.****3.1.1. Cepas utilizadas.**

En la Tabla 3.1 se describen las cepas rizobacterianas empleadas en los distintos estudios abordados.

CEPA	FUENTE/REFERENCIA
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Kodiak*Gustafson, Inc., Plano, TX.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Van Peer y col, 1991.
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Bagdasarian y Timmis, 1981
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Dobereiner y Day, 1975
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
SJ01	Tesis Doctoral
SJ04	Tesis Doctoral
SJ7b	Tesis Doctoral
SJ08	Tesis Doctoral
SJ09	Tesis Doctoral
SJ10	Tesis Doctoral
SJ11	Tesis Doctoral
SJ12	Tesis Doctoral
SJ13	Tesis Doctoral
SJ16	Tesis Doctoral
SJ17	Tesis Doctoral
SJ18	Tesis Doctoral
SJ20	Tesis Doctoral
SJ21	Tesis Doctoral
SJ22	Tesis Doctoral
SJ24	Tesis Doctoral
SJ25	Tesis Doctoral
SJ27	Tesis Doctoral
SJ28	Tesis Doctoral
SJ29	Tesis Doctoral
SJ30	Tesis Doctoral
SJ31	Tesis Doctoral
SJ32	Tesis Doctoral
SJ33	Tesis Doctoral
SJ34	Tesis Doctoral
SJ35	Tesis Doctoral
SJ36	Tesis Doctoral
SJ37	Tesis Doctoral
SJ38	Tesis Doctoral
SJ39	Tesis Doctoral
SJ40	Tesis Doctoral
SJ41	Tesis Doctoral
SJ42	Tesis Doctoral
SJ44	Tesis Doctoral
SJ45	Tesis Doctoral
SJ46	Tesis Doctoral
SJ47	Tesis Doctoral
SJ48	Tesis Doctoral

Tabla 3.1. Cepas empleadas.

3.1.2. Medio de conservación.

La conservación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante congelamiento de cultivos en los medios apropiados. Las cepas en fase exponencial tardía, fueron congeladas en microtubos adicionados con glicerol estéril a concentración final de 20%.

3.1.3. Condiciones de crecimiento.

Las cepas *B. subtilis* GB03, *A. brasilense* Sp7 y *E. coli* DH5a fueron cultivadas en el medio líquido LB (Anexo I: Medios de cultivos), y las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron cultivadas en medio King B (Anexo I: Medios de cultivos). Se dejaron crecer en un baño agitador a 30°C y 200 rpm durante 24-48 hs.

3.2. Material vegetal.

Para las distintas experiencias se utilizaron plantas procedentes de una plantación comercial de *Mentha piperita* L de la Región de Villa Dolores, Córdoba.

3.2.1. Cultivo in vitro – Micropropagación de menta.

Se utilizaron explantes consistentes en estacas uninodales, con dos yemas opuestas o extremos apicales, Se desinfectaron con una solución de lavandina comercial (55,5 g/l de cloro activo) al 17% durante 15 min y luego fueron lavadas 3 veces con H₂O bidestilada estéril. Se inocularon en medio Murashige y Skoog (MS) modificado (Anexo I: Medios de cultivos) (Riquelme y col., 1991) suplementado con ácido indolbutírico (IBA) a una concentración final de 0,66 mg/l, y se dejaron crecer en condiciones de luz, temperatura y humedad relativa controladas. A partir de estas plántulas se obtuvieron los explantes utilizados en los sucesivos tratamientos, removiendo asépticamente las yemas terminales de los brotes obtenidos.

3.3. Bioensayos de compuestos orgánicos volátiles.

Se utilizaron placas de Petri (90 x 15 mm) tabicadas en el centro; en un sector se colocó el medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias empleadas, Hoagland adicionado con sacarosa al 3% (Anexo I: Medios de cultivo), y en el otro sector se colocó medio de cultivo para el crecimiento de la planta, MS modificado (Anexo I: Medios de cultivo) (Riquelme y col., 1991), previamente autoclavados. En el sector con medio MS modificado se colocó un explante de menta estéril con al menos un nódulo

apical; y en el otro lado, separado por el tabique, se colocaron 20 µl de inóculo de cada una de las cepas a evaluar (Tabla 3.1). De esta forma no existió contacto físico entre la planta y la rizobacteria. Las cepas empleadas fueron previamente cultivadas en medio LB, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua destilada estéril hasta alcanzar una DO_{600nm} aproximadamente de 1. Se incluyó en el ensayo la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r. Como control negativo se inoculó dicho sector sólo con agua destilada estéril. Se sellaron las cápsulas de Petri con Parafilm® M. De este modo, los explantes de menta fueron expuestos a VOCs producidos por microorganismos PGPR y cultivados bajo condiciones de luz, temperatura y humedad relativa controladas. Al cabo de 30 días se registraron los datos de biomasa y la parte aérea se empleó para la extracción de los correspondientes aceites esenciales.

3.4. Extracción de aceites esenciales.

El material vegetal a analizar fue pesado y colocado en un balón con 50 ml de agua destilada. Como estándar interno se utilizó dodecalactona (0,1 µg/50 µl de etanol) por no estar presente en los aceites esenciales, ni tener un tiempo de retención similar a los compuestos mayoritarios analizados en el extracto. El aceite esencial se extrajo por arrastre con vapor de agua en un equipo Clevenger modificado, durante aproximadamente 14 min. El material obtenido de la destilación se particionó con 15 ml de cloruro de metileno y luego el solvente fue evaporado bajo presión reducida a 40°C. El material obtenido fue inyectado en el cromatógrafo gaseoso (GC) para cuantificar los componentes mayoritarios (limoneno, terpineol, mentona, mentofurano, mentol, mentilacetato, mentofuranona y pulegona) (Scavroni y col., 2005).

3.5. Cromatografía gaseosa.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un equipo Perkin-Elmer Clarus 600. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del horno fue programada desde 60°C los primeros 3 min, a 240°C incrementando 4°C/min; la temperatura del inyector y del detector FID fue de 250°C, se utilizó nitrógeno a un flujo constante de 0,9 ml/min. Se utilizó la columna cromatográfica DB-5 (30 m x 0,25 µm). La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con compuestos estándares puros (Banchio y col., 2008). De esta forma se determinó cualitativa y cuantitativamente la presencia de monoterpenos en los extractos obtenidos en los distintos tratamientos.

3.6. Aislamiento y caracterización de bacterias de suelo rizosféricas de plantas de menta.

A los fines de determinar la presencia de *Pseudomonas* fluorescentes en la rizósfera de nuestra planta de estudio, se trabajó con suelo rizosférico adherido a raíces de plantas de menta procedentes de una plantación comercial (San José) de la región de Villa Dolores, Córdoba. Se eligió este tipo de rizobacterias ya que la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* WCS417r es la que mejor efecto presentó en el análisis de biomasa y aceites esenciales correspondiente al Capítulo 4. Siguiendo la metodología de Mehnaz y colaboradores (2009), se sometieron las raíces de plantas de *Mentha piperita* a agitación por 15 min en tampón fosfato pH7 y luego se realizaron diluciones sucesivas. Se espatularon 100 µl de cada dilución en medio Agar Nutritivo (Britania®) y en medio King B (Anexo I: Medios de cultivos) (King y col., 1954). Al cabo de 48 hs se realizó el recuento de las mismas y se generó una colección de cepas nativas a partir de las placas de King B en base a la fluorescencia que presentaron las colonias expuestas a iluminación UV.

3.6.1. Análisis y caracterización fenotípica.

Según referencias, en el género *Pseudomonas* se conocen 3 especies fluorescentes: *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*. Con el objetivo de identificar las especies a las cuales pertenecen las cepas aisladas, se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes, utilizando como cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO I y *Pseudomonas fluorescens* WCS417r y comparando los resultados obtenidos (Lysenko 1961; Stanier y col., 1966; Palleroni, 2005). Las cepas se mantuvieron en medio King B a 30°C y se realizaron las siguientes pruebas:

- ⌘ Observación de la morfología de la colonia.
- ⌘ Determinación del Gram, según test KOH. Se mezcló una ansada de las cepas estudiadas, con una solución KOH al 3% (p/v). En caso de positividad se observó la formación de un hilo mucoso, lo que resulta en una bacteria Gram negativa (Urzí y col., 2001). *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo. *Bacillus subtilis* GB03 fue utilizado como control negativo.
- ⌘ Actividad oxidasa. Se resuspendió un disco de N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilenediamina (Kit Britania®) en un cultivo fresco de las cepas de interés y se observó la oxidación del mismo a través de la aparición de color rosa. *Pseudomonas*

fluorescens WCS417r fue utilizada como control positivo. *Escherichia coli* DH5a fue utilizado como control negativo.

- ✿ Producción de pigmentos. Se cultivaron las cepas en medio King A (Anexo I: Medios de cultivo) (King y col., 1954) por 48 hs a 30°C y se observó la formación de un halo de pigmentación alrededor de la colonia. *Pseudomonas aeruginosa* PAOI fue utilizado como control positivo.
- ✿ Color de fluorescencia. Se cultivaron las cepas estudiadas en medio King B (Anexo I: Medios de cultivo) (King y col., 1954) por 48 hs a 30°C y luego se observó el color de la fluorescencia emitida bajo iluminación UV.
- ✿ Tolerancia a temperatura. Se cultivaron las cepas nativas en medio LB líquido y se mantuvieron a 4°C por 15 días. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo. Lo mismo se realizó a 42°C pero se mantuvieron en baño maría por 48 hs. *Pseudomonas aeruginosa* PAO I fue utilizada como control positivo.
- ✿ Tolerancia a elevadas concentraciones de NaCl. Se cultivaron las cepas de estudio en medio LB (Anexo I: Medios de cultivo) con una concentración de NaCl de 5% y 6,5%, a 30°C por 15 días.
- ✿ Hidrólisis de Tween® 80. Se cultivaron las cepas de interés en medio Tween 80 Agar (Anexo I: Medios de cultivo) por 7 días a 30°C y se observó la aparición de precipitado blanco alrededor de las colonias. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo (Sierra, 1957).
- ✿ Hidrólisis del almidón. Se cultivaron las cepas de interés en medio *Starch* Agar (Anexo I: Medios de cultivo) (Gordon y Mihm 1956) por 48 hs a 30°C. Luego se cubrieron las placas con Lugol por 1 hs. La positividad está dada por la formación de un halo de clarificación alrededor de la colonia. *Bacillus subtilis* GB03 fue utilizado como control positivo.
- ✿ Hidrólisis de la caseína. Se cultivaron las cepas de estudio en medio *Skim Milk* Agar (Anexo I: Medios de cultivo) por 48 hs a 30°C. En caso de positividad se observó la formación de un halo de clarificación alrededor de la colonia. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo (Salisbury y Lykos, 1972).
- ✿ Licuefacción de la gelatina. Se cultivaron las cepas nativas en medio *Gelatin* Agar (Anexo I: Medios de cultivo) a 30°C. Luego de 48 hs de incubación se cubrieron las placas por 3 hs con una solución stock de ácido tricloroacético 35% (p/v) en agua

deionizada. La positividad está dada por la aparición de un halo de clarificación alrededor de la colonia. *Pseudomonas aeruginosa* PAO I fue utilizado como control positivo (Medina y Baresi 2007).

✿ Producción de lecitinasa. Se cultivaron las cepas de estudio en medio *Egg-Yolk Agar* (Anexo I: Medios de cultivo) a 30°C por 48 hs. La positividad está dada por la presencia de un halo de clarificación alrededor de la colonia. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo (Sneath, 1956).

3.6.2. Análisis y caracterización genotípica.

3.6.2.1. Extracción de ADN genómico.

A partir de 2 ml de un cultivo en fase estacionaria se realizó la extracción de ADN genómico mediante el uso del *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La presencia de ADN genómico fue verificado por electroforesis en geles de agarosa al 1%, conteniendo *buffer* TAE 1X y bromuro de etidio. Luego se visualizaron con transiluminador UV.

3.6.2.2. Análisis del polimorfismo de la secuencia del gen *ARNr 16S* mediante ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*).

Al fin de agrupar las cepas fluorescentes aisladas de rizósfera de cultivos de *M. piperita* y luego poder identificarlas, se analizó el polimorfismo de las secuencias de *DNAr 16S* mediante el corte del mismo con enzimas de restricción (ARDRA). Utilizando diversas enzimas de restricción que reconozcan sitios de cortes distintos, se pueden indirectamente revelar pequeñas diferencias en la secuencia de dicho gen, o sea nos permite identificar cierta diversidad en la secuencia del gen *ARNr 16S* (Achouak y col., 2000; Wu y col., 2009; Mehri y col., 2011).

3.6.2.2.1. Amplificación del gen *ARNr 16S*.

En un primer momento, se amplificó el gen *ARNr 16S* utilizando como cebadores rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') y fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Weisburg y col., 1991). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo:

Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM c/u
fD1	1 μM
rD1	1 μM
Taq polimerasa	1 U
ADN	4 μl

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

1 ciclo de:

95°C 5 min

35 ciclos de:

95°C 1 min

61°C 1 min

72°C 2 min

1 ciclo de :

72°C 10 min

El tamaño de los productos de amplificación fue verificado por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, conteniendo *buffer* TAE 1X y bromuro de etidio. Luego se visualizaron con transiluminador UV.

3.6.2.2.2. Digestión de los fragmentos amplificados del gen *ARNr 16S*.

Los productos, de aproximadamente 1500 pb, obtenidos de la amplificación de dicho gen fueron digeridos con las enzimas de restricción *MspI*, *Hinf I*, *HaeIII* y *AluI* (Fermentas, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) (Achouak y col., 2000; Wu y col., 2009; Mehri y col., 2011; Nievas y col., 2012). Las enzimas de restricción *HinfI* y *MspI* generan cortes cohesivos en las siguientes secuencias de ADN: *HinfI* 5' G↓ANTC 3', 3' CTNA↑G 5' y *MspI*, 5' C↓CGG 3', 3' GCC↑C 5', mientras que para *AluI*, 5' AGC↓T 3', 3' TC↑GA 5' y *HaeIII*, 5' GG↓CC 3', 3' CC↑GG 5' los cortes generados sobre el ADN presentan la característica de ser romos.

Se siguieron las indicaciones del fabricante, con el siguiente contenido de reacción:

Amplificado	10 μ l
H ₂ O	18 μ l
Buffer 10X	2 μ l
Enzima	1 μ l

Se dejaron incubar a 37°C, *overnight* (O/N). Los productos digeridos fueron separados por electroforesis en geles al 3% de agarosa, realizado en tampón TAE 1X y bromuro de etidio, a 60V por los primeros 15 min y luego a 90V por los restantes 75 min. Luego se visualizaron y fotografiaron bajo transiluminador UV.

3.6.2.3. Amplificación de secuencias repetidas a lo largo del genoma.

La diversidad intraespecífica de la población nativa de *Pseudomonas* fluorescentes de cultivos de *M. piperita* fue determinada a través de la amplificación de secuencias ERIC (*Enterobacterial Repetitive Integenic Consensus*) (Wolska y Szweda, 2008) y BOX (Scortichini y col., 2005; Wolska y col., 2011; Parejko y col., 2012) repetidas a lo largo del genoma (Vyas y col., 2009).

3.6.2.3.1. ERIC-PCR fingerprint.

La reacción de PCR fue llevada a cabo según el protocolo descrito por Nievas y colaboradores (2012) para rizobacterias. Se utilizaron los *primers* E1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y E2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGACGG-3') (Versalovic y col, 1994). En un volumen final de 20 μ l se incorporaron:

Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM c/u
E1	0,5 μ M
E2	0,5 μ M
Taq polimerasa	1,5 U
ADN	2 μ l

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

1 ciclo de:

95°C 5 min

35 ciclos de:

94°C 1 min

52°C 1 min

65°C 8 min

1 ciclo de :

68°C 16 min

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles al 1,2% de agarosa, conteniendo *buffer* TAE 1X y bromuro de etidio. Luego se visualizaron y fotografiaron bajo luz UV.

3.6.2.3.2. **BOX-PCR fingerprint.**

La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando el *primer* BOX1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3') (Versalovic y col., 1994). En un volumen final de reacción de 20µl se incluyeron (Marques y col., 2008; Proudly y col., 2008; Fothergill y col., 2010; Loaces y col., 2011; Wolska y col., 2011):

Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM c/u
Primer BOXA1R	2 µM
Taq polimerasa	1,5 U
ADN	2 µl

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas (Marques y col., 2008; Proudly y col., 2008; Fothergill y col., 2010; Loaces y col., 2011; Wolska y col., 2011):

1 ciclo de:

95°C 5 min

35 ciclos de:

94°C 1 min

57°C 1 min

65°C 8 min

1 ciclo de :

65°C 15 min

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles al 2% de agarosa conteniendo tampón TAE 1X y bromuro de etidio, a 60 V por los primeros 30 min y a 90 V por las restantes 2 hs. Luego fueron visualizados y fotografiados en transiluminador UV.

3.6.2.4. Análisis de los datos genotípicos.

Las imágenes obtenidas de las distintas electroforesis se analizaron de forma manual. A partir de ellos se obtuvieron matrices binarias correspondientes a la presencia/ausencia, en cada muestra, de los marcadores obtenidos en las amplificaciones. Estas matrices fueron analizadas con el programa InfoGen versión 2011 (Universidad Nacional de Córdoba), para calcular los datos de distancia y construir los dendrogramas correspondientes.

3.6.2.5. Análisis de las secuencias del gen *ARNr 16S* de cepas nativas aisladas de rizósfera de menta.

Al fin de determinar la posición y las distancias filogenéticas entra las distintas cepas fluorescentes aisladas de rizósfera de cultivos de *M. piperita*, se realizó el correspondiente análisis de las secuencias del gen *ARNr 16S*. La secuencia de nucleótidos de los productos purificados de PCR fue determinada por el laboratorio MACROGEN Service Center (Seúl, Corea). Para ello fueron empleados los siguientes cebadores universales: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') (Lane, 1991).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron analizadas utilizando el programa BLAST (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI]; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul y col., 1997) a los fines de determinar las identidades de las cepas bajo estudio. Las secuencias de cepas de referencia de diferentes especies del género *Pseudomonas* se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos del gen del *ARNr 16S* depositadas en *GenBank* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y fueron utilizadas para fines comparativos (Anzai y col., 2000). Los alineamientos múltiples de dichas secuencias fueron realizados empleando el programa ClustalW (Higgins y col., 1994).

Los análisis filogenéticos, construcción, manipulación y visualización de los árboles filogenéticos fueron conducidos empleando las secuencias alineadas a través del

programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Se utilizó el algoritmo de *Neighbor Joining* (Saitou y Nei, 1987) de acuerdo al modelo de 2-parámetros de Kimura (Kimura, 1980). La topología de los árboles fue analizada empleando el estadístico *bootstrap* y los valores obtenidos fueron expresados como un porcentaje de 1000 replicaciones.

Las secuencias de nucleótidos del gen *ARNr 16S* de cepas nativas aisladas de rizósfera de menta obtenidas en el presente trabajo fueron publicadas en la base de datos *GenBank* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para obtener el correspondiente número de acceso.

3.7. Determinación de los principales mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.

Se realizó la caracterización de las siguientes actividades de promoción del crecimiento vegetal:

- ▣ producción de mVOCs, se estudió el efecto que pueden ejercer la de las cepas nativas en la biomasa de plantas de *Mentha piperita* micropropagadas. Para los ensayos, se utilizaron placas de Petri tabicadas a fin de evitar el contacto entre la planta y las rizobacterias nativas, como descrito anteriormente. Al cabo de 30 días se analizaron: longitud y peso seco de la raíz, longitud y peso fresco del tallo, número de nudos, ramificaciones, número de hojas y número de pelos glandulares.
- ▣ producción de sideróforos, en medio CAS Agar (Anexo I: Medios de cultivo) (Milagres y col., 1999; Schwyn y Neilands 1987). Se distribuyó en mitad de la placa medio M9 (Anexo I: Medios de cultivo) y en la otra mitad el medio CAS Agar, para evitar posibles falsos positivos dados por la pigmentación que presentan las cepas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes. *Sinorhizobium meliloti* RM1021 fue utilizado como control negativo.
- ▣ solubilización de fosfato, en medio Pikovskaya Agar (Anexo I: Medios de cultivo) (Naik y col., 2008), realizando un inóculo puntual de las cepas analizadas. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r fue utilizada como control positivo.
- ▣ producción de ácido indolacético (AIA), se realizó en medio LBTD4 Agar (Anexo I: Medios de cultivo). Se recubrieron las placas con filtros de nitrocelulosa y se dejaron crecer las cepas hasta alcanzar fase estacionaria. Al cabo de dicho período se incubó el filtro con el reactivo de Salkowsky (Anexo I: Medios de cultivo) por 1 hs. La respuesta positiva se presenta como un halo rojo en el filtro alrededor de la zona de

crecimiento bacteriano. *Azospirillum brasilense* Sp7 fue utilizado como control positivo (Bric y col., 1991).

■ biocontrol de *Alternaria alternata* RC21 (Oviedo y col., 2009) a través de la producción de mVOCs según el método de Fernando y colaboradores (2005).

- * *Inoculo bacteriano*. Las cepas fluorescentes aisladas se dejaron crecer en medio MMF (Anexo I: Medios de cultivo) hasta alcanzar la fase estacionaria, luego fueron lavadas y diluidas en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración final de 10^9 cel/ml. 100 μ l de la suspensión fueron espatulados en una placa con Hoagland Agar (Anexo I: Medios de cultivo) adicionado con 3% de sacarosa y se dejaron crecer por 48 hs a 30°C. Como control negativo se espatuló la placa con 100 μ l de agua estéril.
- * *Inoculo fúngico*. La cepa de *A. alternata* RC21 se dejó crecer en medio PDA (Britania®) por 7 días. Al cabo de dicho período, un disco de 5 mm de diámetro de la superficie de agar fue inoculado en placas de PDA estériles.
- * *Exposición a VOCs*. Las bases de las placas de Petri con medio de cultivo Hoagland y PDA, se pusieron una en contra de la otra y se sellaron. De esta forma, *A. alternata* RC21 fue expuesta a los VOCs producidos por las cepas fluorescentes nativas. Al cabo de 4 días de crecimiento se midió el diámetro de crecimiento fúngico.

3.8. Análisis químico del conjunto de mVOCs producidos por *Pseudomonas* fluorescentes.

Se realizó la caracterización de los principales mVOCs emitidos por las cepas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes nativas aisladas de rizósfera de menta según la metodología de Lee y colaboradores (2012). Las cepas utilizadas fueron seleccionadas por el incremento presentado en la producción de AE en plantas de menta micropropagadas y por su actividad en el control biológico del crecimiento vegetativo de *A. alternata* RC21 (Capítulo 6). Como control positivo del sistema fue incluida la cepa *B. subtilis* GB03, ya que es una bacteria PGPR que posee la caracterización completa de los VOCs emitidos (Frag y col., 2006). Como control negativo se incluyó la cepa de referencia *E. coli* DH5a y las cepas nativas SJ20 y SJ31 ya que son cepas fluorescentes nativas que no poseen actividad PGPR; además de realizarse la detección de VOCs por parte del medio de cultivo. Las cepas empleadas fueron previamente cultivadas en medio Hoagland (Anexo I: Medios de cultivos) adicionado con un 0,4%

de TSB (Britania®) y mantenidas en agitación por 48 hs. La captura de dichos compuestos se realizó con fibras SPME con un centro de 50/30µm de espesor de divinilbenzeno/carboxeno recubierto con polidimetilsiloxano como material de adsorción (DVB/CAR-PDMS) (Supelco®). La recolección de los VOCs se efectuó en agitación a 40°C por 30 min. Para la identificación de dichos compuestos, las fibras fueron desadsorbidas en el inyector de un cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

3.8.1. Cromatografía gaseosa.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un equipo Perkin-Elmer Clarus 600 equipado con una columna DB5 de 60 m de longitud x 0,25 µm de espesor. La corrida cromatográfica tiene una duración total de 25 minutos. La temperatura del puerto de inyección fue mantenida a 210°C por 1 min, en modo *splitless* con un flujo constante de He de 1 ml/min. Las fibras se mantuvieron en el puerto por 10 min para permitir la limpieza total de las mismas. La temperatura inicial del horno fue programada a 33°C con rampas de 10°C/min hasta alcanzar los 180°C y rampas de 40°C/min hasta alcanzar la temperatura de 220°C, que se mantuvo por 5 min. La ionización de los analitos se realizó con ionizador electrónico que operó a 70eV con una fuente a 200°C y con el cuadrupolo a 150°C. Se realizó un escaneo continuo de los fragmentos con relación m/z de 40 a 500. La identificación inicial se efectuó comparando la relación m/z de los principales fragmentos obtenidos a partir de los analitos y los presentes en la base de datos NIST, considerando aquellos compuestos que presentaban un índice de similitud (SI) mayor a 800. De esta forma se determinó cualitativa la presencia de VOCs.

3.9. Bioensayos de plantas inoculadas con cepas nativas.

Se utilizaron placas de Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo MS modificado con una concentración de agar al 0,5 %, previamente autoclavado, para el crecimiento del material vegetal y las bacterias. El medio de cultivo estéril se inoculó con *Pseudomonas* fluorescentes nativas a una concentración de 10⁶ cel/ml y luego de solidificarse, se colocó un explante de menta estéril con al menos un nódulo apical. Las cepas empleadas fueron previamente cultivadas en medio MMF (Anexo I: Medios de cultivos), centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua destilada estéril. Se incluyó en el ensayo la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r. Como control negativo se

inoculó sólo con agua destilada estéril. Se sellaron las cápsulas de Petri con Parafilm M®. De este modo, los explantes de menta fueron expuestos a la acción PGPR de los microorganismos. Las placas fueron mantenidas por 30 días bajo condiciones de luz, temperatura y humedad relativa controladas. Al cabo de 30 días se registraron los datos de biomasa y la parte aérea se empleó para la extracción de los correspondientes aceites esenciales.

3.10. Recuento y análisis de tricomas glandulares foliares.

Se recolectaron hojas del tercer nudo de plantas de menta micropropagadas inoculadas con cepas fluorescentes nativas. Las hojas de los diferentes tratamientos fueron clarificadas utilizando una mezcla de partes iguales de una solución de hipoclorito de sodio al 5% y de hidróxido de potasio al 2%. El material permaneció sumergido en la solución aproximadamente 48 hs. Al cabo de este período, las mismas fueron lavadas 5 veces con agua corriente y coloreadas con safranina por 20 s, nuevamente lavadas y montadas en un portaobjeto sobre glicerina diluida al 10%. Posteriormente, sobre las mismas se colocó el cubreobjeto que fue sellado pincelando con esmalte acrílico en su contorno.

Los preparados semipermanentes obtenidos fueron observados con un microscopio Zeiss Standard 16 y fotografiados con un microscopio trinocular Zeiss Axiostar plus, equipado con cámara de captura digital de imagen TS View de 5.0 mega pixels. Se tomaron tres micrografías de la cara adaxial de las hojas con un aumento 10X, dos periféricas y una central. Cada ensayo se realizó por triplicado. El recuento de tricomas glandulares se realizó a partir de las micrografías obtenidas en áreas de 1mm^2 .


3.11. Análisis estadísticos.

Las comparaciones entre los distintos tratamientos se efectuaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Por cumplir con los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza, como test a posteriori se aplicó el test LSD Fischer de comparaciones múltiples, a nivel de probabilidad $p \leq 0,05$. Cuando fue requerido los datos de los diferentes ensayos fueron sometidos a un test estadístico multivariado de componentes principales. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat versión 2011 (Universidad Nacional de Córdoba).



Capítulo 4

***Resultados y Discusión:
Influencia de mVOCs de cepas de
referencia sobre el crecimiento vegetal de
plantas de menta.***



Capítulo 4 - Resultados y Discusión:

Influencia de mVOCs de cepas de referencia sobre el crecimiento vegetal de plantas de menta.

Transcurridos 30 días de la exposición de explantes de menta a VOCs producidos por las distintas cepas de referencias (Tabla 3.1), se observó un crecimiento bacteriano puntual, formando una gran colonia. No existió contacto físico entre éstas y las plántulas de *M. piperita* situadas en el sector opuesto de la placa (Fig. 4.1).

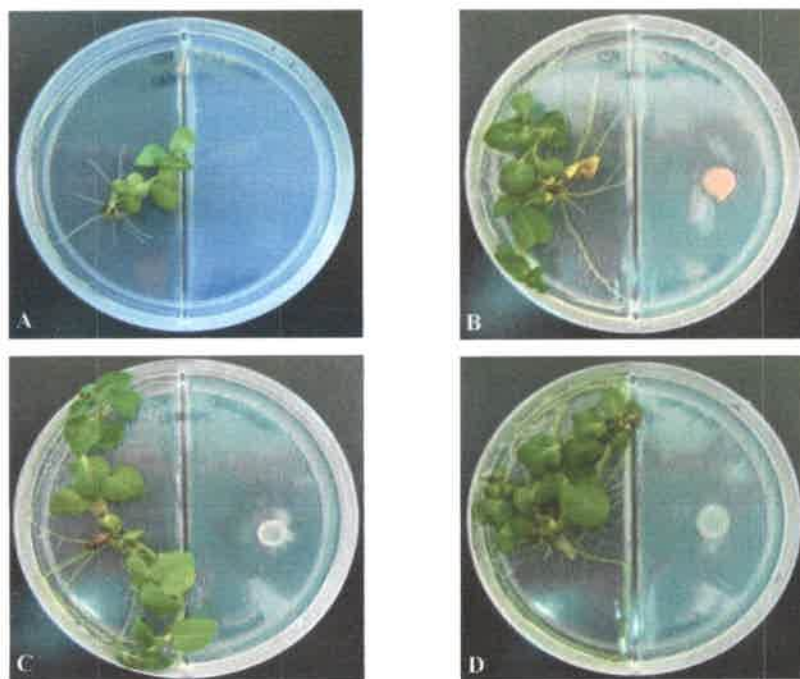


Fig. 4.1. Placas tabicadas obtenidas en los tres tratamientos de plantas de *M. piperita* con las cepas de referencia. A.- Control negativo; B.- *Azospirillum brasilense* Sp7; C.- *Bacillus subtilis* GB03; D.- *Pseudomonas fluorescens* WCS417r.

4.1. Influencia de mVOCs sobre la biomasa de plantas de menta.

Los efectos de los compuestos orgánicos volátiles bacterianos generados sobre el desarrollo de plantas de menta difirió entre las 3 cepas PGPR de referencia evaluadas (Santoro y col., 2011). Se observó que GB03 y WCS417r producen un mayor efecto de promoción del crecimiento vegetal, provocando un incremento significativo a nivel de raíz, tallo y hoja. El peso seco y la longitud de las raíces fueron 300% y 30% superiores, con respecto a los controles en plantas expuestas a volátiles de *P. fluorescens* y *B. subtilis* respectivamente (Fig. 4.2. A). En estos mismos tratamientos, el peso

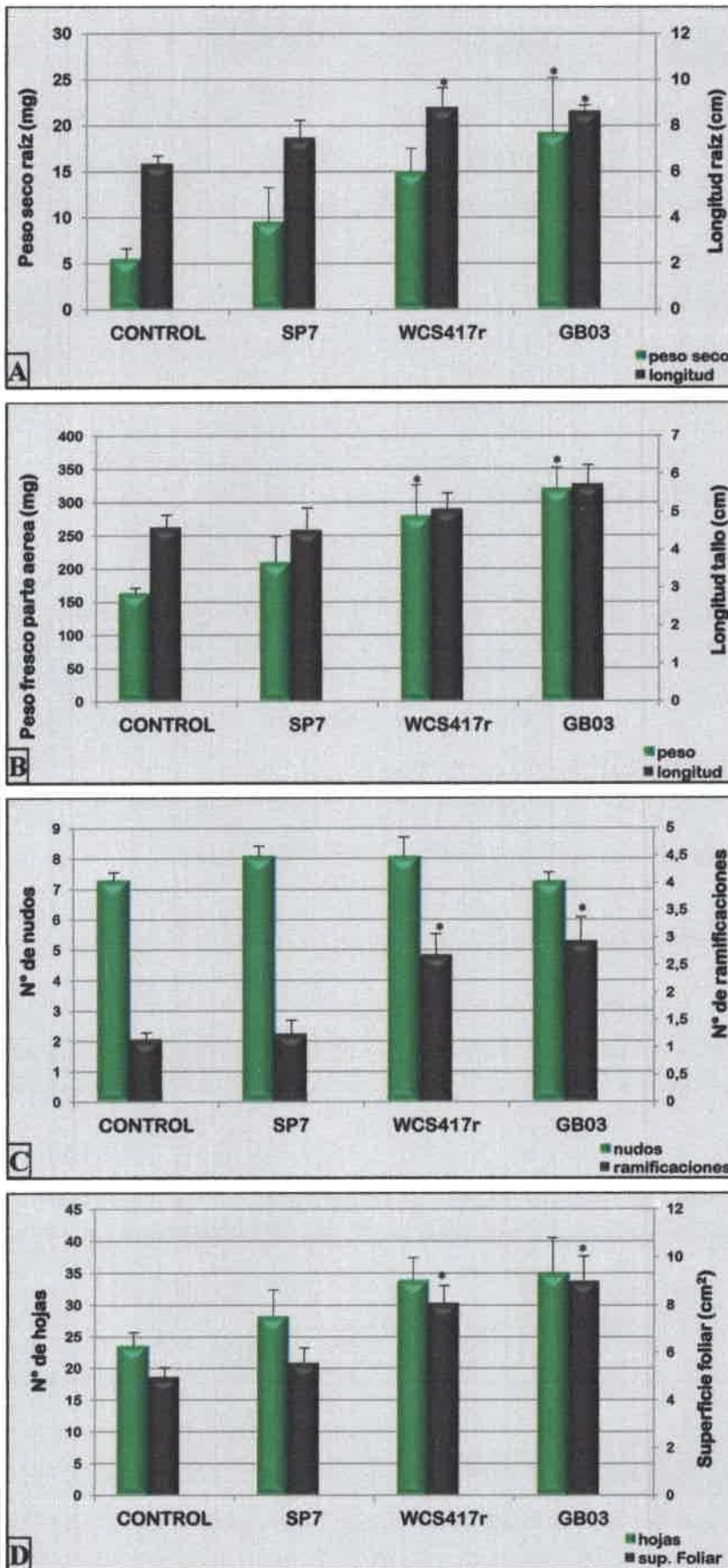


Fig. 4.2. Efecto generado sobre el crecimiento vegetal por la exposición a VOCs producidos por bacterias PGPR de referencia. Datos referentes a raíz (A), tallo (B-C) y hojas (B, D) de plantas de menta micropropagadas.

* = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 4 repeticiones independientes, con 10 ($n=10$) réplicas por cada una.

fresco aéreo incrementó aproximadamente entre 90-70% respectivamente (Fig. 4.2. B). Este aumento del peso puede ser producido por la combinación del aumento del tamaño de las hojas y del número de ramificaciones, que se vieron duplicados (Fig. 4.2. C-D). Estos resultados indican que los efectos PGPR generados por *P. fluorescens* WCS417r sobre la biomasa vegetal podrían estar mediados en parte, por la emisión de mVOCs.

Los efectos observados confirman los resultados obtenidos anteriormente, en los cuales compuestos volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03 también demostraron estimular el desarrollo vegetal de plantas de albahaca, incrementando la superficie foliar, el peso fresco del tallo, así como longitud y peso seco de raíces (Banchio y col., 2009). Estos efectos causados en algunos parámetros de crecimiento vegetal fueron explicados por ensayos realizados por Zhang y colaboradores (2007), en los cuales identificaron alrededor de 600 genes de plantas de *A. thaliana* cuya expresión se vio modificada cuando se encontraron expuestas a mVOCs de *B. subtilis* GB03. Entre ellos se incluyeron genes asociados a la estructura de la pared celular que favorecen la expansión y reducen la rigidez de la misma, así como genes involucrados en el metabolismo y el transporte de auxina. Este último lleva a una acumulación de esta fitohormona a nivel de raíz y primordios de raíces laterales, favoreciendo así el desarrollo y la expansión del tejido radicular, lo que aumenta la superficie de intercambio con el suelo, llevando finalmente a una mayor absorción de nutrientes. El transporte de la auxina producida a nivel de hoja hacia los tejidos radiculares, disminuye la concentración foliar de la misma, lo cual favorece la elongación y diferenciación celular y, por ende, la expansión foliar (Boerjan y col., 1995; Zažimalová y col., 1995; Winicur y col., 1998). Este mecanismo podría explicar la promoción del crecimiento mediada por VOCs producidos por *B. subtilis* GB03 y *P. fluorescens* WCS417r observada en nuestros ensayos con respecto al peso seco de raíz, peso fresco del tallo y superficie foliar de las plantas de *M. piperita*.

Sin embargo, VOCs emitidos por *A. brasilense* Sp7 no produjeron ningún efecto sobre el crecimiento vegetal de plantas de menta micropropagadas. Esto sugiere que el efecto PGPR que Sp7 produce en diferentes cultivos (Molla y col., 2001; Rothballer y col., 2003), está mediado por la producción de compuestos solubles, tales fitohormonas (auxinas, giberelinas y citicininas) y la fijación de nitrógeno, que son los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal registrados en dicha especie (Ortiz-Castro y col., 2008).

4.2. Influencia de mVOCs sobre la producción de AE de plantas de menta.

Se estudiaron alrededor de 30 compuestos presentes en todos los tratamientos, incluyendo el control. Sólo se encontraron diferencias significativas en los terpenos mayoritarios (Fig. 4.3). Se observó que solo la exposición a mVOCs de *P. fluorescens* WCS417r produjo un aumento de alrededor del 90% en la cantidad de AE totales (Fig. 4.3. A). En relación a los compuestos mayoritarios, en este mismo tratamiento, se registró un incremento del 25% en el contenido de mentofurano (Fig. 4.3. B), de 15 veces en el contenido de mentona y de 3 veces en el contenido de pulegona, con respecto al control (Fig. 4.3. C). El aumento del rendimiento total de AE en respuesta a los volátiles bacterianos, no se debe a un incremento de la biomasa vegetal, dado que el rendimiento es un valor que se obtiene de la relación entre el volumen de AE extraído por gramo de peso fresco de la parte aérea de la planta. Por lo tanto, sugerimos que esta respuesta puede deberse a una estimulación en la síntesis de monoterpenos, sin llegar a incrementar directamente la concentración de este último. En base a los resultados obtenidos, podemos inferir que hay una acumulación a nivel de pulegona y mentona, precursores de mentol. El aumento a nivel de mentofurano es también una consecuencia probable del incremento de la pulegona, ya que éste es también un producto de la ruta biosintética que tiene como precursor dicho compuesto (Lange y Croteau 1999; Turner y Croteau 2004).

mVOCs producidos por *A. brasilense* Sp7 provocaron una reducción del 20% en la cantidad de mentol y mentofurano con respecto a los demás tratamientos y las plantas control. Por otra parte, Sp7 presentó un aumento en la cantidad de mentona de 13 veces mayor al contenido del control, lo que demuestra, también, una acumulación de dicho precursor de la vía biosintética del mentol.

La acumulación de los monoterpenos precursores podría deberse a que los tricomas glandulares de plantas micropropagadas a 30 días de crecimiento, no han llegado a la maduración total, ya que McConkey y colaboradores (2000), reportaron que la enzima (-)-mentona reductasa es la última en activarse, para reducir mentona a mentol.

mVOCs producidos por *B. subtilis* GB03 no produjeron variaciones estadísticamente significativas en la cantidad de AE ($p \geq 0,05$) a pesar del efecto positivo presentado en la biomasa. Cabe mencionar que tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje relativo de los componentes mayoritarios de los tratamientos con respecto al control ($p \geq 0,05$) (Tabla 4.1).

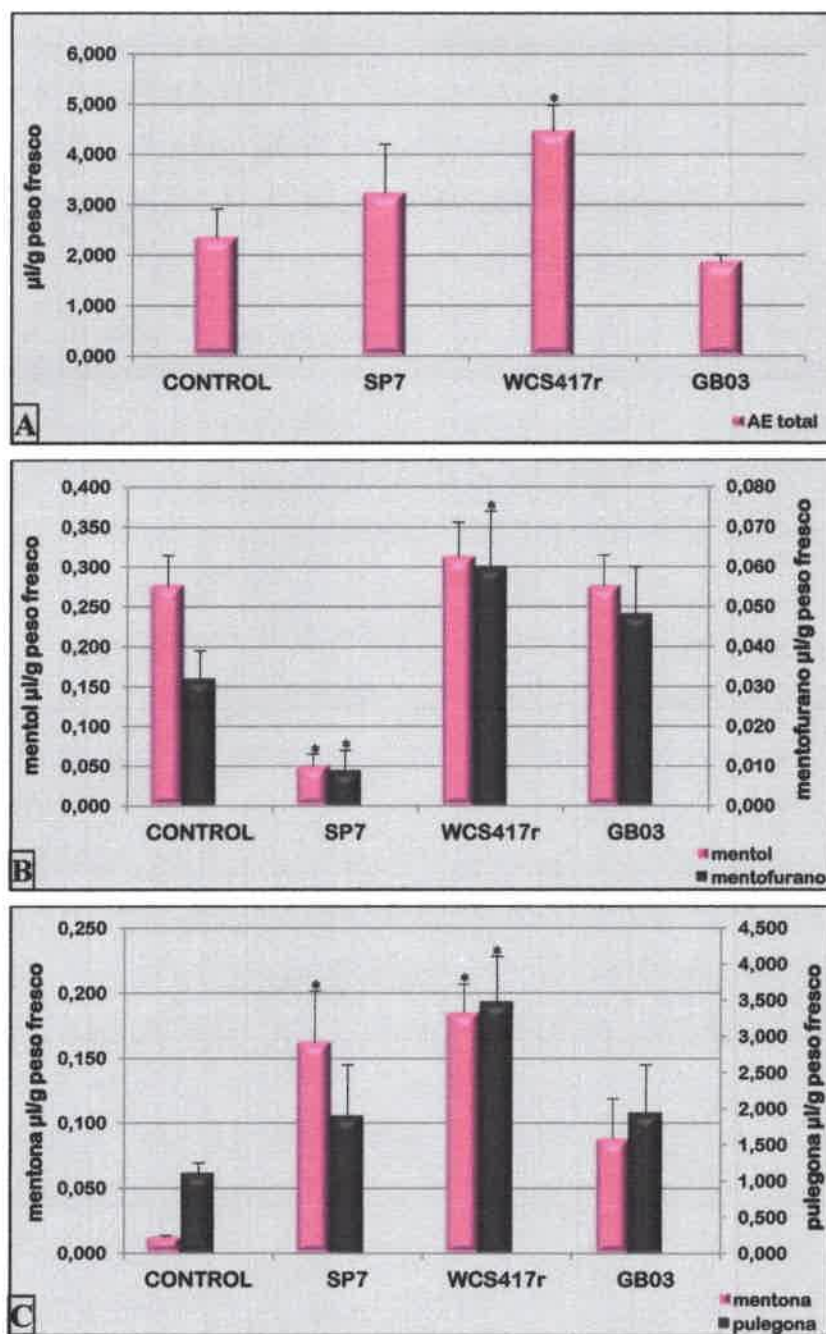


Fig. 4.3. Efecto de la exposición a VOCs producidos por bacterias PGPR de referencia sobre el contenido de AE totales (A), de mentol y mentofurano (B) y de mentona y pulegona (C) en plantas de menta micropropagadas. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 4 repeticiones independientes, con 10 replicas ($n=10$) por cada uno.

A diferencia de los efectos producidos por mVOCs de GB03 en estos ensayos, Banchio y colaboradores (2009) encontraron un aumento en el contenido total y componentes mayoritarios de AE en plantas de albahaca. Con respecto a plantas aromáticas inoculadas directamente sobre raíz, ensayos realizados en orégano con *P. fluorescens* y *A. brasilense*, registraron un incremento en el contenido total de AE y una variación en el porcentaje relativo de los componentes mayoritarios (Banchio y col., 2008; Banchio y col., 2009; Banchio y col., 2010). Estos resultados indican que el

proceso de promoción del crecimiento vegetal es especie-específico de la planta y de la bacteria participantes de la interacción.

	LIMONENO	TERPINEOL	MENTONA	MENTOFURANO	MENTOL	PULEGONA
CONTROL	3,65 ± 1,84	2,98 ± 0,27	1,65 ± 0,68	1,16 ± 0,09	9,53 ± 2,8	45,29 ± 9,91
Sp7	2,72 ± 0,21	3,43 ± 0,64	2,92 ± 1,05	0,81 ± 0,25	5,90 ± 2,07	56,48 ± 9,53
GB03	2,53 ± 0,93	2,72 ± 0,33	2,59 ± 1,13	1,39 ± 0,35	11,3 ± 2,89	50,71 ± 9,92
WCS417r	1,66 ± 0,2	2,6 ± 0,13	2,23 ± 0,78	1,44 ± 0,31	6,11 ± 1,89	59,95 ± 7,7

Tabla 4.1. Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios analizados luego de la exposición de plantas de menta a mVOCs emitidos por cepas de referencia. LSD Fischer, $p \geq 0,05$.

En relación a la composición de los AE, en los perfiles cromatográficos de los 3 tratamientos, se evidenciaron 3 compuestos no presentes en el control, que corresponden a los tiempos de retención 12,8 min (G), 27,6 min (V) y 28,30 min (W) (Tabla 4.2). Al mismo tiempo, plantas expuestas a VOCs producidos por *P. fluorescens* WCS417r presentaron otro compuesto suplementario, no encontrado en los demás casos de estudio ni en el control, que corresponde al tiempo de retención 22,0 min (σ). Sin embargo, en explantes tratados con VOCs emitidos por *A. brasilense* Sp7 no se observó la presencia de los compuestos correspondientes a los tiempos de retención 12,5 min (F), 14,5 min (I) y 14,8 (J), que si se encuentran en los perfiles de AE del control y los demás tratamientos (Tabla 4.2). Esto podría indicar que la exposición a VOCs producidos por las cepas de referencia no solo varía el contenido de los monoterpenos mayoritarios, sino que también es capaz de alterar el conjunto de terpenos presentes en la parte aérea de las plantas analizadas, si bien su porcentaje relativo es bajo.

Es de amplio conocimiento que la biosíntesis de terpenos, siendo metabolitos secundarios, depende directamente del metabolismo primario, es decir de la fotosíntesis y de las vías oxidativas suplementarias de productos carbonados. Giri (2003) ha demostrado que la tasa fotosintética de plantas inoculadas con bacterias PGPR aumenta debido al mejor estatus nutricional presentado por las mismas. Por ende, factores que aumenten o mejoren el metabolismo primario, llevan a un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Shulka y col., 1992). En ensayos de *A. thaliana* expuesta a VOCs emitidos por *B. subtilis* GB03, han sido identificados dos compuestos volátiles con actividad biológica, 3-hidroxi-2-butanona (acetoina) y 2R,3R-butanediol, (Farag y col., 2006). Como ha sido discutido en el Capítulo 1, estos compuestos son capaces de regular la homeostasis de auxina, aumentar la tasa fotosintética y mejorar la absorción

de hierro, mejorando de este modo el estatus nutricional de la planta, que resulta en una mayor disponibilidad de sustratos para la síntesis de monoterpenos (Harrewijn y col., 2001; Zhan y col., 2007; 2008a, 2009).

T.R.	NOMBRE	CONTROL	Sp7	GB03	WCS417r
6,80	A				
7,10	B				
8,00	C				
12,00	D				
12,30	E				
12,50	F				
12,80	G				
13,40	LIMONENO				
14,20	H				
14,50	I				
14,80	J				
15,10	K				
15,30	L				
16,00	M				
18,00	TERPINEOL				
18,40	MENTONA				
18,90	MENTOFURANO				
19,20	MENTOL				
21,60	PULEGONA				
22,00	σ				
22,50	N				
23,00	MENTILACETATO				
23,50	O				
23,70	P				
24,00	Q				
24,40	R				
24,70	S				
25,00	T				
26,60	U				
27,60	V				
28,30	W				
28,50	X				
28,80	Y				
29,00	Z				
29,50	MENTOFURANONA				
	NUMERO TOTAL DE COMPUESTOS	31	31	32	35


Tabla 4.2. Compuestos analizados y sus respectivos tiempos de retención en el perfil cromatográfico de los aceites esenciales de plantas de *M. piperita* expuestos a VOCs producidos por bacterias de referencia. Las celdas rellenas indican la presencia del compuesto relativo a ese tiempo de retención.

Se conoce que los terpenos actúan estabilizando físicamente las membranas de los tilacoides o bloqueando especies de oxígeno reactivo como el ozono que puede llevar a la degradación de la misma (Pichersky y Gershenzon, 2002). Otra función ampliamente documentada de los terpenos es la de actuar como elementos de defensa frente a los fitófagos (Wittsotck y Gershenzon, 2002; Banchio y col., 2007) y patógenos (Hammerschmidt y Nicholson, 1999), gracias a sus conocidas propiedades antimicrobianas (Sangwan y col., 2001; Soković y col., 2009; Sharafi y col., 2010; Zheljaskov y col., 2010). Podría considerarse que el aumento de la síntesis de los componentes principales de los AE registrados es debido a una respuesta defensiva del vegetal frente a la colonización de microorganismos. Ha sido bien registrado que la biosíntesis de metabolitos secundarios puede ser desencadenada por ciertos factores de estrés. Las plantas producen un gran número de este tipo de metabolitos con distintas funciones dependiendo del contexto ecológico. Varios compuestos isoterpenoides son tóxicos y pueden servir como línea de defensa contra microbios patógenos, insectos y distintos animales herbívoros (Wittsotck y Gershenzon, 2002). Análogamente, la síntesis de monoterpenos está inducida por la alimentación de herbívoros en *Minthostachys mollis* (Banchio y col., 2007) y otras especies de plantas, a fin de proteger las hojas dañadas frente a futuros ataques (Harrewijn y col., 2001). Algunos terpenos volátiles son capaces también, de repeler organismos dañinos y/o atraer polinizadores o insectos que son predadores naturales de algunos fitófagos (Pichersky y Gershenzon, 2002; Pare y col., 2005).



Capítulo 5

***Resultados y Discusión:
Aislamiento y caracterización de bacterias
benéficas de suelo rizosférico de plantas
de menta.***



Capítulo 5 - Resultados y Discusión:

Aislamiento y caracterización de bacterias benéficas de suelo rizosférico de plantas de menta.

Siguiendo la metodología de Mehnaz y colaboradores (2009), se generó una colección de cepas nativas. Se realizó un recuento total de $3,05 \times 10^7$ cel/g de suelo rizosférico, de las cuales sólo $4,7 \times 10^5$ cel/g de suelo presentaron el fenotipo fluorescente (1,54%). Se aislaron un total de 50 cepas denominadas con las letras SJ y los números del 1 al 48, las cuales fueron caracterizadas fenotípica y genotípicamente.

5.1. Análisis y caracterización fenotípica.

El análisis fue realizado sobre el total de la colección de cepas obtenidas a partir del aislamiento inicial. A medida que se realizaron los test se fueron excluyendo de la caracterización aquellas cepas que no presentaban resultados coincidentes con los esperados, según bibliografía para las especies de interés (Tabla 5.1).

En base a los resultados obtenidos 33 cepas nativas (66%) fueron agrupadas con *Pseudomonas putida*, sólo una (SJ34) encontró similitud con *Pseudomonas fluorescens* WCS417r y ninguna se agrupó con *Pseudomonas aeruginosa* PAO I (Fig. 5.1). El remanente 28% de los aislamientos no encontró agrupamiento con las especies analizadas, por lo tanto fueron excluidas. Cabe destacar que luego del aislamiento inicial se realizó una selección por promoción del crecimiento mediado por mVOCs (Capítulo 6) y las cepas SJ04, SJ46, SJ7b y SJ8, si bien no presentaron las características fenotípicas esperadas, no fueron excluidas de la caracterización por presentar un efecto positivo sobre la biomasa de plantas de menta micropropagadas.

No se encuentran en bibliografía trabajos que reporten sobre aislamientos de cepas nativas a partir de suelo rizosférico de plantas aromáticas. Se encontró un número de bacterias por gramo de suelo similar a los encontrados en rizosferas de otras plantas a pesar de la presunción de la presencia de AE en los exudados radicales y el consiguiente efecto tóxico de los mismos sobre células vivas (Chen y col., 2004; Bogino y col., 2013). Se han recolectado exudados radicales de plantas de *M. piperita* micropropagadas a fin de determinar la presencia de monoterpenos. Luego del análisis a través GC-MS no se registraron AE, demostrando que las raíces de menta cultivadas *in vitro* no liberan estos terpenos a la rizósfera.



	GRAM	CATALASA	OXIDASA	FLUOR. UV	KING A	KING B	4°C	42°C	NaCl 5%	NaCl 6,5%	HID. ALMIDÓN HID. TWEEN 80	GELATINA	HID. CASEINA	LECTINASA
SJ1	-	+	+	verde	-	verde	-	+/-	+	-	-	-	-	-
SJ2	+	+	+	nd	nd	marrón	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ3	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ4	-	+	-	+	-	-	+	+/-	-	+	-	-	-	-
SJ5a	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ5b	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ6	-	+	-	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ7a	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ7b	-	+	+	-	naranja	naranja	+	-	+	-	+	-	+	-
SJ8	-	+	+	-	-	naranja	+/-	-	+	-	-	-	-	-
SJ9	-	+	+	celeste	-	verde	-	+/-	+	+	-	-	-	-
SJ10	-	+	+	verde	-	verde	-	+/-	+	+	-	-	-	-
SJ11	-	+	+	verde	-	verde	-	+/-	+	-	-	-	-	-
SJ12	-	+	+	celeste	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
SJ13	-	+	+	celeste	-	verde	-	+/-	+	+	-	-	-	-
SJ14	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ15	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ16	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ17	-	+	+	verde	-	verde	-	+	+	-	-	-	-	-
SJ18	-	+	+	verde	-	verde	-	+	+	-	-	-	-	-
SJ19	+	+	nd	nd	-	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ20	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ21	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ22	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ23	-	+	+	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ24	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ25	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ26	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ27	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ28	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ29	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ30	-	+	+	celeste	-	verde	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ31	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ32	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ33	-	+	+	verde	nd	-	-	nd	+	-	-	-	-	-
SJ34	-	+	nd	verde	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
SJ35	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ36	-	+	+	celeste	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ37	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ38	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ39	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ40	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ41	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ42	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ43	+	+	nd	-	-	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SJ44	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	+	-	-	-	-
SJ45	-	+	+	verde	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	-
SJ46	-	+	-	-	nd	-	+	nd	+	-	-	-	-	-
SJ47	-	+	+	verde	-	verde	-	-	+	-	-	-	-	-
SJ48	-	+	+	verde	-	verde	-	+/-	+	-	-	-	-	-
PAO I	-	+	+	verde	azul	verde	-	++	+	+	+	+	+	+
WCS417r	-	+	+	verde	-	verde	+	-	+	-	+	-	+	+

Tabla 5.1. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sobre los aislamientos nativos. Las pruebas se realizaron por duplicado, con dos replicas (N=2) cada una.

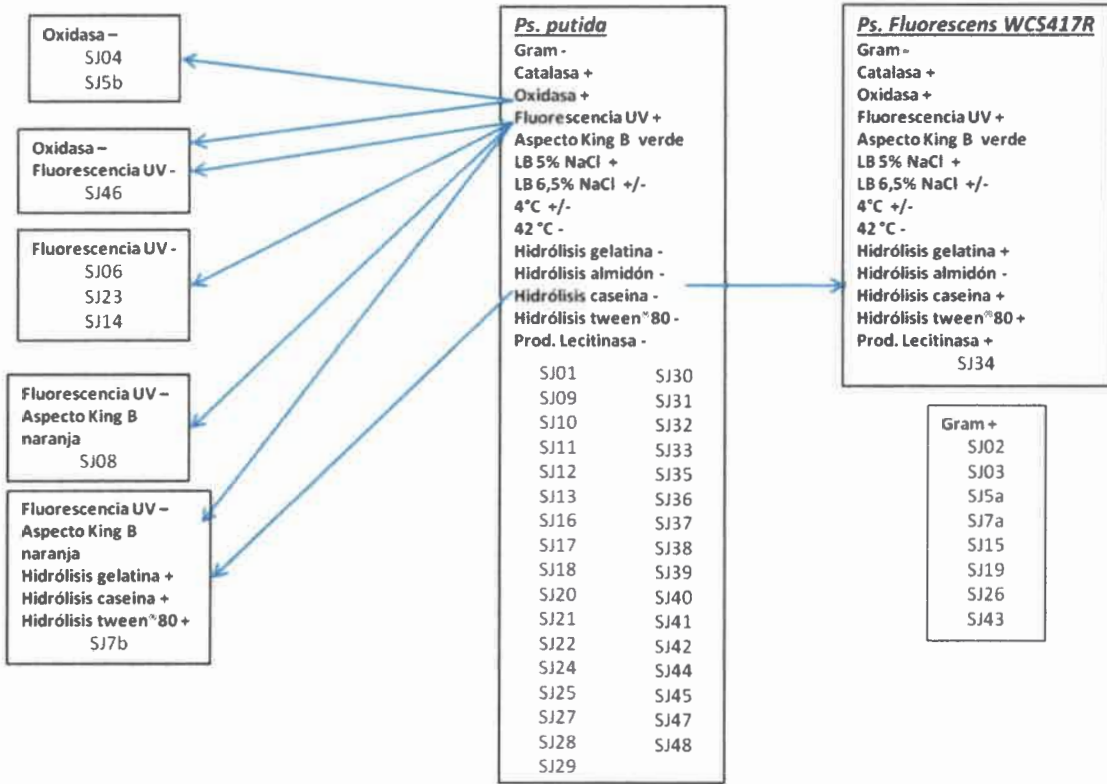


Fig. 5.1. Agrupación obtenida a partir de los aislamientos nativos y las cepas de referencia *P. fluorescens* y *P. putida* en base a la caracterización fenotípica. Los recuadros reúnen las características, que según referencia corresponde a *P. putida* y *P. fluorescens*. Los recuadros laterales evidencian las diferencias presentadas con respecto a éstas.

5.2. Análisis y caracterización genotípica.

Al fin de agrupar las cepas fluorescentes aisladas de rizósfera de cultivos de *M. piperita* y luego poder identificarlas, se aplicaron las técnicas ARDRA, ERIC-PCR y BOX-PCR. Se utilizaron 38 aislamientos de cepas nativas fluorescentes aisladas de rizósfera obtenida de plantas de *M. piperita*. Además, se incorporaron en este trabajo 2 cepas de referencia del género *Pseudomonas*: WCS417r (*Pseudomonas fluorescens*) y KT2440 (*Pseudomonas putida*) representantes de los fenotipos mayormente presentes en la colección de cepas nativas aisladas.

5.2.1. Análisis del polimorfismo de la secuencia del gen *ARNr 16S* mediante ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis).

La amplificación del gen *ARNr 16S* de todas las cepas bajo estudio, ya sean nativas o de referencia, se obtuvo por PCR utilizando los primers fD1 y rD1 respectivamente (Weisburg y col., 1991). Antes de continuar con el análisis se verificó

la presencia en todas las muestras de una única banda de aproximadamente 1400 pb en el producto de PCR.

Posteriormente, los amplicones fueron incubados con las endonucleasas *AluI*, *MspI*, *HinfI* y *HaeIII*. Éstas se seleccionaron en base a estudios previos que indican que las mismas presentan un alto número de sitios de reconocimiento, con el objetivo de poder obtener un mayor grado de discriminación entre diferentes cepas del género *Pseudomonas* (Achouak y col., 2000; Wu y col., 2009; Mehri y col., 2011, Nievas y col., 2012).

Las Fig. 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 muestran la obtención y resolución de los fragmentos de ADN generados con las distintas endonucleasas. Se obtuvieron entre 5 y 7 bandas por amplificado, que dieron lugar a los patrones o perfiles de restricción de cada cepa en particular.

De las cuatro endonucleasas empleadas la enzima *AluI* fue la que reveló mayor grado de polimorfismo (Tabla 5.2), permitiendo identificar 6 patrones de restricción diferentes (A-F). Este dato coincide con los encontrados por Achouak y col. (2000), en los cuales la enzima *AluI* les permitió diferenciar mejor entre los perfiles de *P. corrugata*, *P. brassicacearum* y *P. thivervalensis*. Las restantes enzimas empleadas generaron 4 (*HinfI* y *HaeIII*) y 2 (*MspI*) patrones de restricción sobre el amplicón de cada cepa (Tabla 5.2). Solo la enzima *MspI* no logró generar perfiles distintos para las 2 especies de *Pseudomonas* fluorescentes de referencia utilizadas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Mehri y colaboradores (2011) en los cuales la enzima *MspI* no logró generar más de 2 perfiles y las enzimas *HinfI* y *HaeIII* generaron 4 perfiles, respectivamente, para las cepas de *Pseudomonas* fluorescentes estudiadas a partir de muestras ambientales.

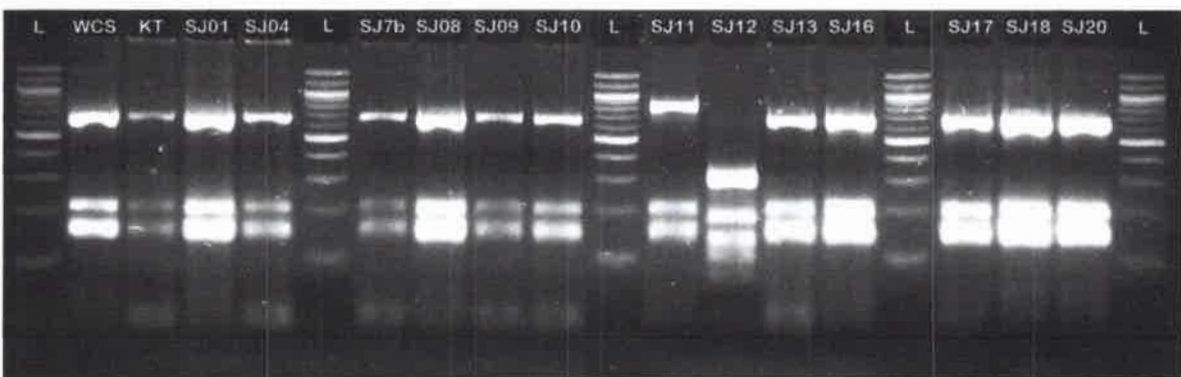


Fig. 5.2. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción *HaeIII* del gen *ARNr 16S* de cepas fluorescentes nativas. L: *Ladder* 100 pb .

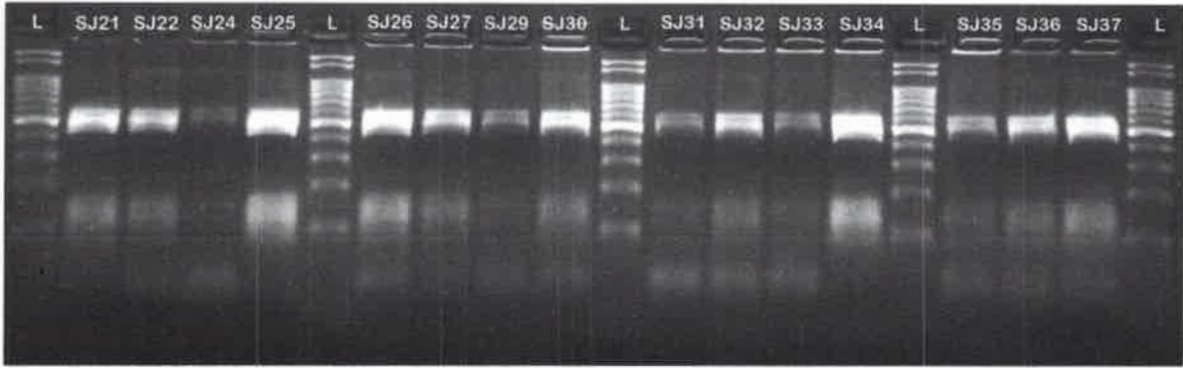


Fig. 5.3. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción *MspI* del gen *ARNr 16S* de cepas fluorescentes nativas. L: *Ladder* 100 pb .

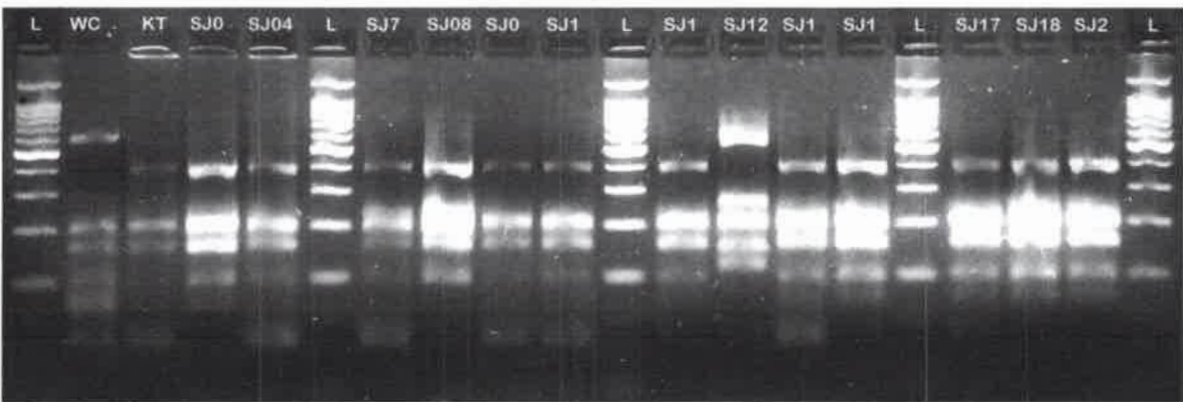


Fig. 5.4. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción *AluI* del gen *ARNr 16S* de cepas fluorescentes nativas. L: *Ladder* 100 pb .

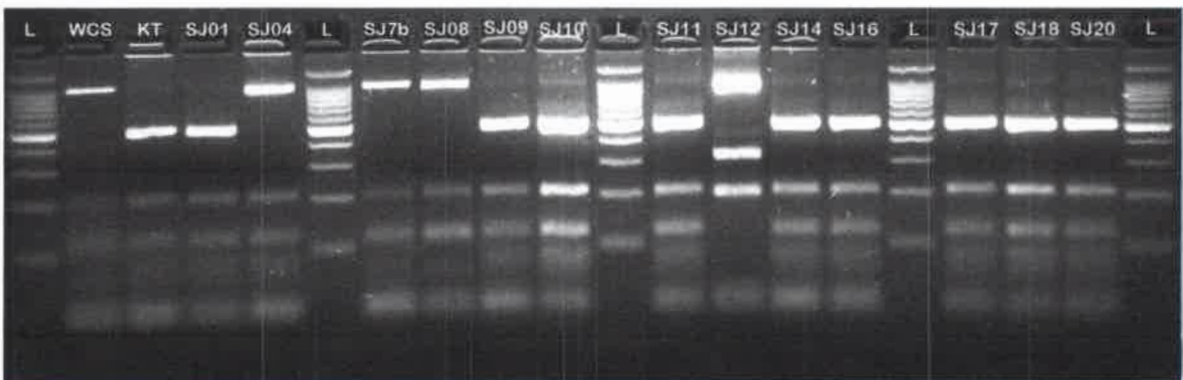


Fig. 5.5. RFLP obtenido utilizando la endonucleasa de restricción *HinfI* del gen *ARNr 16S* de cepas fluorescentes nativas. L: *Ladder* 100 pb .

Los perfiles resultantes del tratamiento de los productos de amplificación con cada endonucleasa se combinaron en un único patrón, obteniéndose así un genotipo general de ARDRA para cada cepa, identificados con números en la tabla 5.2. La combinación de todos los patrones de restricción resultó en 15 genotipos diferentes, con

predominancia de los genotipos 1, 2 y 3. El genotipo 1 fue el más frecuente incluyendo 16 aislamientos, 4 cepas compartieron el genotipo 2 y 3 cepas compartieron el genotipo 3 incluyendo la cepa de referencia *P. putida* KT2440. Los restantes genotipos fueron compartidos por 2 cepas (4-8) o sólo se presenta en una única cepa (9-15), esto incluye la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r.

Cepas	Genotipo RFLPs ARNr16S	Perfiles de restricción			
		HinfI	MspI	HaeIII	AluI
SJ01	2	A	B	B	B
SJ04	6	B	A	A	C
SJ7b	6	B	A	A	C
SJ08	7	B	B	B	D
SJ09	3	A	A	A	C
SJ10	3	A	A	A	C
SJ11	10	A	B	D	B
SJ12	15	D	B	C	E
SJ13	1	A	A	A	A
SJ16	2	A	B	B	B
SJ17	4	A	A	B	A
SJ18	2	A	B	B	B
SJ20	2	A	B	B	B
SJ21	13	C	B	B	A
SJ22	1	A	A	A	A
SJ24	1	A	A	A	A
SJ25	9	A	B	A	A
SJ27	1	A	A	A	A
SJ28	4	A	A	B	A
SJ29	1	A	A	A	A
SJ30	1	A	A	A	A
SJ31	1	A	A	A	A
SJ32	1	A	A	A	A
SJ33	1	A	A	A	A
SJ34	11	B	B	B	B
SJ35	1	A	A	A	A
SJ36	1	A	A	A	A
SJ37	1	A	A	A	A
SJ38	14	C	A	A	A
SJ39	8	C	B	B	B
SJ40	8	C	B	B	B
SJ41	5	A	B	B	A
SJ42	1	A	A	A	A
SJ44	5	A	B	B	A
SJ45	1	A	A	A	A
SJ46	7	B	B	B	D
SJ47	1	A	A	A	A
SJ48	1	A	A	A	A
WCS417r	12	B	A	B	F
KT2440	3	A	A	A	C

Tabla 5.2. RFLP general del gen *ARNr 16S* de cepas de referencia y nativas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas fluorescences*.

Los patrones de bandeo generados con el análisis de restricción fueron utilizados para la construcción de una matriz binaria bidimensional siguiendo un sistema de

puntuación binario, es decir 1 indica presencia de banda y 0 ausencia de la misma. Posteriormente, esta matriz fue analizada con el programa Infogen, versión 2011. De la descripción de los marcadores generados por las cuatro enzimas utilizadas (Fig. 5.6) se puede deducir que de las 40 muestras, 25 se encuentran repetidas, o sea que el perfil generado se puede observar en más de una muestra. Sucesivamente, se combinaron los patrones obtenidos generando 40 marcadores moleculares, de los cuales 7 representan bandas monomórficas, o sea bandas que son únicas para la muestra que las presente, respecto a las otras incluidas en dicho análisis. Las mismas se observaron en los perfiles generados por *MspI*, *HinfI* y *AluI*, mientras que la enzima *HaeIII* presentó sólo bandas polimórficas.

<u>Descripción de datos de marcadores</u>						
<u>Resumen</u>		<u>Datos</u>	<u>Resumen por Enzimas</u>			
			<u>Enzimas</u>	<u>BP</u>	<u>HM</u>	<u>BT</u>
Muestras		40	<u>HAE</u>	11	0	11
Muestras Duplicadas		25	<u>MSP</u>	7	2	9
Bandas (número)		40	<u>ALU</u>	8	2	10
Bandas monomórficas		7	<u>HINF</u>	7	3	10
Bandas polimórficas (%)	82,50		<u>Total</u>	33	7	40
Enzimas		4				

Fig. 5.6. Descripción de los marcadores genotípicos obtenidos a través del análisis ARDRA.

Con el objeto de determinar las proximidades o similitudes genéticas entre las distintas cepas, en función del método molecular empleado, se construyó un dendrograma de genotipos de ARDRA. Este tipo de construcción es una de representación gráfica que permite la ilustración de las agrupaciones derivadas de la aplicación de un algoritmo de *clustering* (en este caso, encadenamiento simple más conocido como UPGMA) que permite identificar las cercanías o distancias entre los objetos de estudio. De este modo, se estableció la distancia entre los diferentes genotipos obtenidos mediante la aplicación del modelo Jaccard, alcanzando una correlación cofenética de 0,952 y contruyendo el correspondiente dendrograma (Fig. 5.7).

A partir del dendrograma se pudo determinar que:

- La mayor parte de los genotipos presentaron aproximadamente un 50% de similitud.
- A partir de un 50% de similitud se formaron en 2 grandes grupos: el grupo A, el cual se constituyó con un total de 25 cepas e incluyó los genotipos 12, 4, 14, 1, 3 y 6,

conteniendo las cepas de referencia *P. fluorescens* WCS417r y *P. putida* KT2440; y el grupo B, el cual se compuso de las restantes 14 cepas e incluyó los genotipos 6, 11, 7, 9, 8, 13, 10, 5 y 2.

Análisis de conglomerados
Promedio (Average linkage)
 Distancia: (Jaccard (sqrt(1-S)))
 Correlación cofenética= 0,952
 Variables estandarizadas

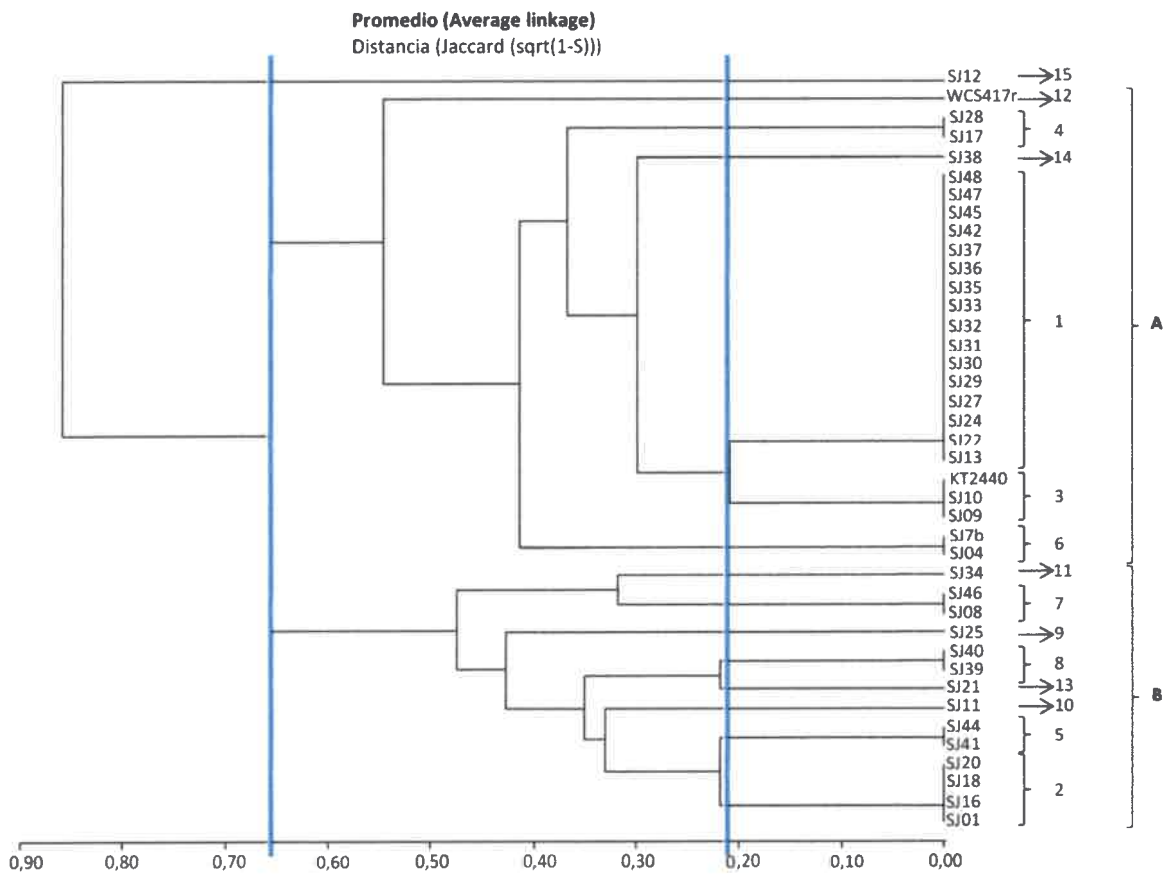


Fig. 5.7. Dendrograma obtenido a partir de los patrones de RFLP del gen *ARNr 16S* de cepas referencia y nativas pertenientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes.

- En el grupo A, el genotipo 1 se mostró altamente relacionado, con un 80% de similitud, al genotipo 3 que incluyó la cepa de referencia *P. putida* KT2440.
- En el grupo B, los genotipos que más se relacionaron son el genotipo 8 con el 13 y el genotipo 5 con el 2, que presentaron un 80% de similitud entre ellos.

Comparando la agrupación del mencionado dendrograma con las agrupaciones obtenidas en el correspondiente análisis fenotípico presentado anteriormente (Fig. 5.1) se puede concluir que:

- El genotipo de ARDRA obtenido para las cepas SJ09 y SJ10 coincidieron en un 100% con la cepa de referencia *P. putida* KT2440 y, más importante aún, se agruparon a un alto porcentaje de similitud (80%) con el genotipo mayoritario (Genotipo 1), que representó un total de aproximadamente el 50% de las cepas bajo estudio. Estos resultados concuerdan con los datos fenotípicos obtenidos anteriormente y confirmaron una alta correlación entre *P. putida* y la población de *Pseudomonas* fluorescentes procedentes de rizósfera de menta.
- Las cepas pertenecientes al genotipo 7 (SJ46 y SJ08), mostraron buena correlación en cuanto a los análisis fenotípico y genotípico, marcando su diferencia con *P. putida* KT2440.
- Las cepas pertenecientes al genotipo 4 (SJ17 y SJ28) y 14 (SJ38) también mostraron una buena correlación entre los 2 tipos de análisis, formando agrupación con la cepa de referencia *P. putida* KT2440 a un 60% y 70 % de similitud respectivamente.
- Las cepas pertenecientes al genotipo 6 (SJ04 y SJ7b), que en el análisis fenotípico presentaron alguna diferencia con *P. putida*, se agruparon con ésta a un 60% de similitud.
- Las cepas pertenecientes a los genotipos 10 (SJ11), 2 (SJ20, SJ18, SJ16 y SJ01), 13 (SJ21), 9 (SJ25), 8 (SJ39 y SJ40) y 5 (SJ41 y SJ44) que coincidieron en el análisis fenotípico con la cepa de referencia *P. putida* KT2440, mostraron una baja similitud (35%) mediante el análisis genotípico ARDRA.
- La cepa perteneciente al genotipo 11 (SJ34), que en el análisis fenotípico se asoció a la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r, presentó en este análisis genotípico muy baja similitud (35%).
- La cepa perteneciente al genotipo 15 (SJ12) presentó el genotipo más divergente del resto, considerando que se agrupó a un 15% de similitud a pesar de que sus propiedades fenotípicas fueron coincidentes con la cepa de referencia *P. putida*.

Cabe destacar que los análisis mencionados se han llevado a cabo con cepas que fueron aisladas a partir de un cultivo previo en placas de King B. Esta metodología nos permite analizar sólo las especies cultivables que, como es de amplio conocimiento, representan el sólo el 1% de los microorganismos totales presentes en el suelo. Por lo

cual la diversidad resultante de los estudios abordados se encuentra limitada a dicha condición.

La aplicación de la técnica ARDRA ha sido exitosamente utilizada para el estudio de modificaciones en las poblaciones de distintas especies pertenecientes al género *Pseudomonas* asociadas a diversas plantaciones, como consecuencia del empleo de distintos manejos de cultivo (Achouak y col., 2000), así como la aplicación de pesticidas y otros químicos (Viti y Giovannetti, 2005; Braun y col., 2006; Wang y col., 2008; Wu y col., 2009). Este tipo de técnica también ha sido empleada para el análisis de la estructura de las comunidades de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a distintos tipos de rizósfera o en diversos contextos ambientales (Prosser, 2002; Mehri y col., 2011; Nievas y col., 2012).

Las discrepancias observadas en nuestros estudios entre el análisis fenotípico y genotípico son de esperarse, ya que en el primero se observa una respuesta bioquímica correspondiente a ciertas actividades metabólicas, que pueden ser compartidas por distintas especies dentro de un mismo género. Por lo cual, se deduce que por sí sola no nos permite analizar a fondo la similitud o distancia filogenética de las cepas analizadas. Los estudios fenotípicos han demostrado ser una herramienta muy valiosa en el pasado, sin embargo hoy han sido ampliamente superados, pero no inhabilitados, por el avance de las técnicas moleculares, que se ponen como objetivo poder superar las dificultades encontradas en las técnicas tradicionales de clasificación microbiológica. Por lo tanto, a pesar de las diferencias observadas entre los análisis fenotípicos y genotípicos realizados en este estudio, podemos decir que aproximadamente un 60% aislamientos presentaron un 60% de similitud con *P. putida* KT2440 y la mayor parte de éstos, o sea un 50% de los aislamientos fueron un 80% similares a la cepa de referencia antes mencionada, confirmándose como la principal especie fluorescente presente en la rizósfera de menta.

A pesar de los antecedentes mencionados, en los cuales han sido exitosamente aplicadas las técnicas hasta ahora presentadas, los resultados generados sólo a partir de un análisis fenotípico y genotípico de tipo ARDRA demuestran una vez más lo poco profundo y especulador que puede resultar en análisis basado sólo en estas técnicas. Se han llevado a cabo muchos estudios moleculares a fin de determinar la gran heterogeneidad de las especies de *Pseudomonas* fluorescentes presentes en entornos ambientales y hospitalarios. Varios autores comparan los estudios que generalmente se realizan sobre secuencias del gen *ARNr 16S*, ya sea ARDRA o a través de la

secuenciación del mismo, con otros estudios de amplificaciones de secuencias repetidas a lo largo del genoma, como BOX y ERIC (Naik y col., 2008; Mehri y col., 2011). Sus resultados demuestran que el gen *ARNr16S* es altamente conservado, lo que dificulta separar entre sí a través de la generación de patrones a las distintas especies de *Pseudomonas*, llevando a una incorrecta identificación de las mismas (Grimont, 2002; Rangel-Castro y col., 2002; Gomila y col., 2007; Mehri y col., 2011). Es por ello que la utilización en conjunto con las otras técnicas de generación de perfiles característicos puede ayudar a discriminar entre cepas pertenecientes a especies altamente relacionadas dentro del género, incluyendo en el análisis, secuencias presentes en todo el genoma y no sólo en un gen en particular. Algunos de estos autores proponen también, que la serotipificación de la pioverdina producida puede ayudar a una mejor ubicación sistemática de las especies analizadas dentro de este gran grupo (Meyer y col., 2007; Mehri y col., 2011).

5.2.2. ERIC-PCR fingerprint.

Para analizar con mayor profundidad la diversidad intragénica de cepas de *Pseudomonas* spp. se utilizaron cebadores ERIC a fin de abordar el estudio de secuencias repetidas presentes a lo largo de todo genoma bacteriano.

La reacción de PCR se llevó a cabo según lo descrito por Nieves y colaboradores (2012) para rizobacterias. Con la utilización de los cebadores E1 y E2, sólo 38 cepas amplificaron en modo correcto con las condiciones aplicadas en los ciclos de PCR. Las muestras SJ32 y SJ35 no presentaron un bandeo que pudiera ser analizado. Los perfiles de bandeo característicos obtenidos para cada cepa estuvieron compuestos por un número de bandas comprendido entre 5 y 17, y un tamaño para cada una de ellas de alrededor de 100 pb a 1700 pb. En la figura 5.8 se pueden observar la resolución del bandeo obtenido para algunas cepas.

De la misma manera que para el análisis de RFLP-*ARNr 16S* realizado previamente, a partir del perfil de bandeo obtenido se construyó una matriz binaria en dos dimensiones siguiendo también, un sistema de puntuación binario, es decir, 1 indica presencia de banda y 0 ausencia de banda. El análisis de dicha matriz permitió la construcción de un dendrograma, a partir de los cuales fue posible evaluar, en función de los marcadores ERIC generados, la semejanza genética de las cepas fluorescentes aisladas a partir de suelo rizósferico proveniente de una plantación de *M. piperita*.

Con este tipo de amplificación, se obtuvieron un total de 67 marcadores moleculares, que representaron sólo bandas polimórficas, de las cuales dos presentaron un perfil duplicado entre las muestras utilizadas, es decir, el mismo tipo de matriz binaria. De este modo, resultó que un total de 35 muestras presentaron un perfil único con respecto a las demás, y que 3 muestras fueron duplicadas, es decir tuvieron un 100% de similitud. En la figura 5.9 se encuentra la descriptiva de los marcadores generados.

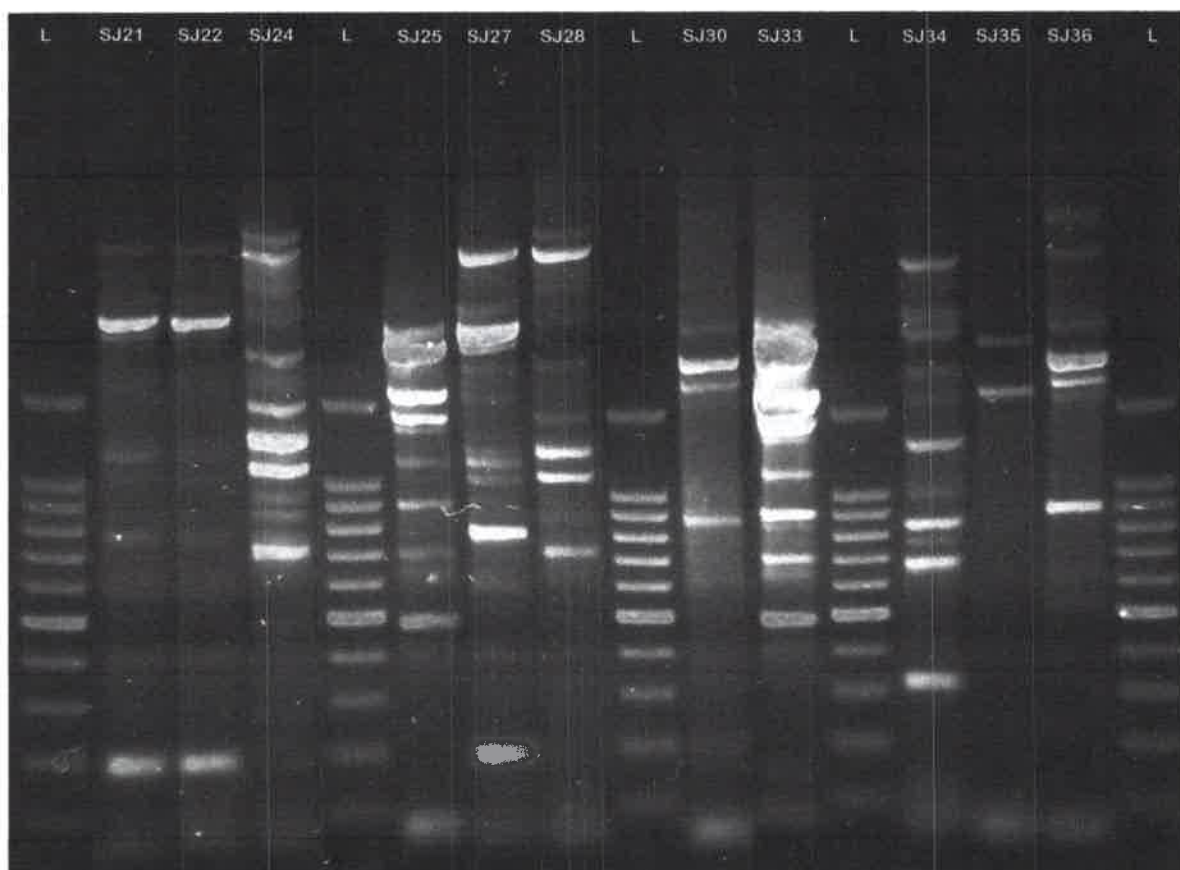


Fig. 5.8. ERIC-fingerprint obtenido a partir de diferentes cepas aisladas de rizósfera de plantas de menta. L: Ladder 100 pb.

<u>Descripción de datos de marcadores</u>	
Resumen	Datos
Muestras	38,00
Muestras Duplicadas	3,00
Bandas (número)	67,00
Patrón bandas duplicadas	2,00
Bandas monomórficas	0,00
Bandas polimórficas (%)	100,00

Fig. 5.9. Descripción de datos de marcadores obtenidos por ERIC-PCR.

El cálculo de las similitudes entre las distintas cepas de estudio se realizó mediante la aplicación del modelo de *Simple Matching*, con un índice de correlación cofenética de 0,778. El dendrograma obtenido a partir de la comparación de los perfiles moleculares muestra una considerable complejidad que dificulta en primera instancia la realización de un análisis detallado (Fig. 5.10). A diferencia del análisis por RFLP presentado anteriormente, se observó que los principales conglomerados o agrupamientos entre cepas ocurren a distancias genéticas relativamente grandes (o a similitudes bajas), probablemente debido al mayor número de marcadores y a su localización en la totalidad el genoma. Además no se observó un patrón de agrupamiento que unifique un alto número de cepas.

Análisis de conglomerados

Promedio (Average linkage)
 Distancia: (Simple Matching (sqrt(1-S)))
 Correlación cofenética= 0,778
 Variables estandarizadas

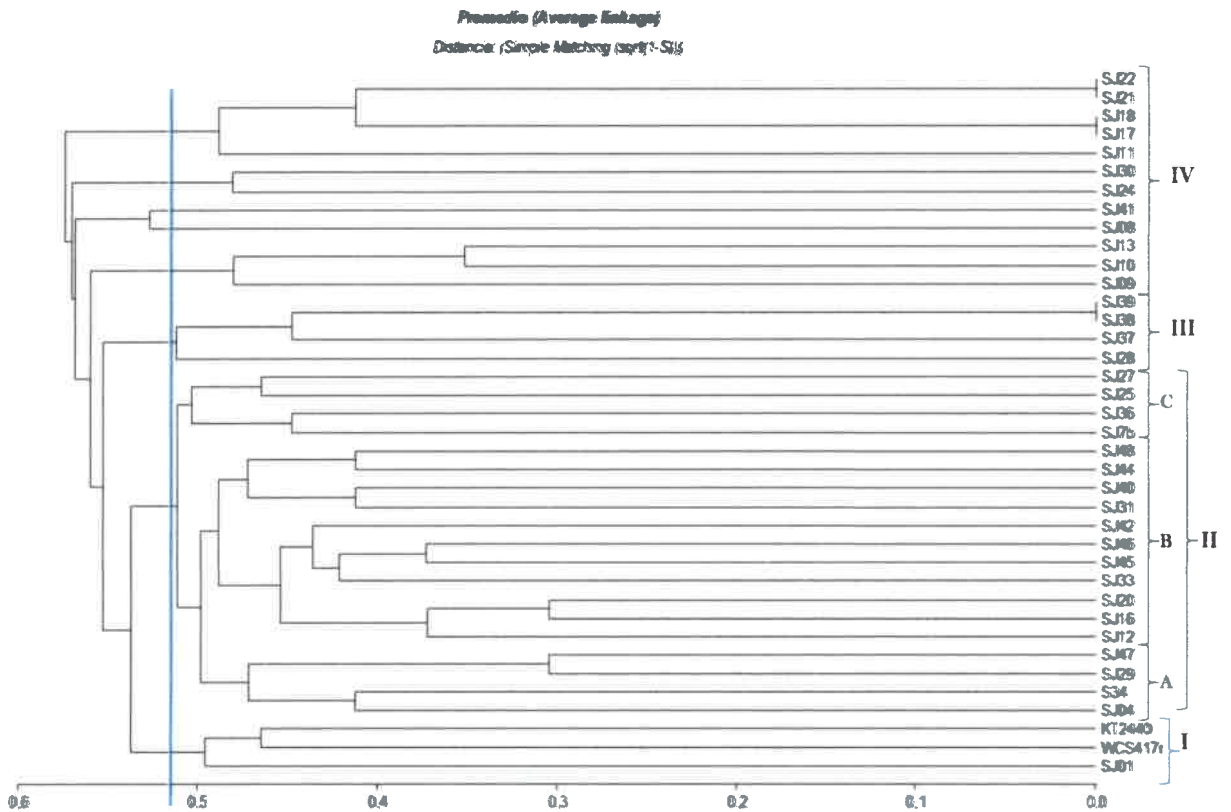


Fig. 5.10. Dendrograma obtenido con los perfiles ERIC de cada una de las cepas fluorescentes de referencia y nativas aisladas de rizósfera de menta.

A partir del dendrograma realizado se pudo determinar que:

- Todas las cepas analizadas en este estudio presentaron un 45 % de similitud entre ellas.
- A un 50 % de similitud se pudo observar la formación de 4 grupos, denominados con números romanos (I – IV).
- El grupo I se formó con las cepas de referencia *P. fluorescens* WCS417r y *P. putida* KT2440 que se separaron de la cepa SJ01 manteniendo un 55% de similitud entre ellas.
- El grupo II se relacionó más estrechamente con las cepas de referencia. Éste se formó incluyendo el mayor número de cepas, 19 de las 40 analizadas y dividiéndose en 3 subgrupos (A, B y C).
- Las cepas mayormente relacionadas dentro de este gran grupo son la SJ16 y SJ20 con un 70% de similitud, que a su vez se agruparon con la cepa SJ12 a un 65% de similitud. Las cepas SJ45 y SJ46 presentaron un 65% de similitud entre ellas. Todas estas cepas se encontraron a su vez formando el subgrupo B a un 50% de similitud con las cepas SJ33, SJ42, SJ31, SJ40, SJ44 y SJ48.
- Dentro del mismo grupo, las cepas JS29 y SJ47 también presentaron un 70% de similitud y se encontraron agrupadas con las cepas SJ04 y SJ34 a un 55% de similitud formando el subgrupo A.
- Las demás cepas de este grupo, SJ27 con SJ25 y SJ36 con SJ04 presentaron un 55% de similitud respectivamente, formando el subgrupo C.
- Las cepas SJ38 y SJ39 presentaron un 100% de similitud y formaron con las cepas SJ37 y SJ28 el grupo III, que se formó a un 55% de similitud.
- Las restantes cepas analizadas formaron el grupo IV presentando con respecto a las anteriormente mencionadas, entre un 40 y un 50% de similitud.
- Dentro del grupo IV se destacan SJ20 con SJ21 y SJ17 con SJ18 que presentaron un 100% de similitud entre ellas. Las cepas SJ10 con SJ13 se mostraron relacionadas con un 65% de similitud y se agrupan a la cepa SJ09 a un 50% de distancia.

Este tipo de análisis no nos permitió discriminar entre las dos especies de *Pseudomonas* fluorescentes ya que las cepas utilizadas como referencia *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* WCS417r presentaron un 50% de similitud, que coincide mayormente con la similitud presentada entre todas las cepas bajo estudio.

Los estudios basados en amplificaciones de tipo ERIC fueron exitosamente utilizados en muestras de suelo para analizar la diversidad dentro de las cepas

identificadas, luego de la secuenciación del gen *ARNr 16S*, como *P. corrugata* (Achouak y col., 2000); dando una idea real de la complejidad de la especie. Resultados similares fueron observados por Selvakumar y colaboradores (2009) que demostraron la variedad del género *Pseudomonas* en muestras de suelo montañoso de clima frío, revelando una división de las cepas aisladas a un 50% de similitud. Otros autores como Wolska y Szwedra (2008) y Vyas y colaboradores (2009) demostraron la utilidad del estudio basado en amplificaciones de secuencias ERIC para confirmar la pluralidad presente en el grupo de *Pseudomonas* fluorescentes y en particular de la especie *P. aeruginosa*, en los cuales se observó un agrupamiento de las cepas bajo estudio a un porcentaje de similitud de alrededor de un 50%. Estos resultados son relevantes considerando que, al igual que en el presente estudio, se evaluó la diversidad presentada dentro de una misma especie y se muestran comparables y coincidentes en cuanto a los porcentajes de similitud presentados dentro del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes analizadas.

5.2.3. BOX-PCR fingerprint.

Para estudiar aún más la diversidad entre las cepas analizadas, se realizó la amplificación de secuencias BOX repetidas a lo largo del genoma. La reacción de PCR fue puesta a punto en el laboratorio. Con el cebador BOXA1R empleado, se pudo lograr un patrón de bandeo en 39 cepas de las 40 utilizadas, ya que la muestra SJ25 no logró generar un bandeo posible de análisis. Se obtuvieron perfiles de bandeo característicos para cada cepa, compuestos por un número de 8 a un máximo de 20 bandas y un tamaño de alrededor de 250 pb a 2000 pb. En la figura 5.11 se pueden observar la resolución de los perfiles obtenidos para algunas cepas.

Del mismo modo que para el análisis de los marcadores ERIC, se construyó una matriz bidimensional binaria que se analizó en el *software* InfoGen versión 2011. Con las condiciones de amplificación utilizadas se generaron un total de 104 marcadores, que representaron sólo bandas polimórficas; de éstas 14 generaron un perfil duplicado, es decir que presentaron la misma matriz a lo largo de las muestras analizadas. De esta manera, se obtuvieron un total de 33 muestras con perfil único y 6 muestras con perfil duplicado, o sea un 100% de similitud. En la figura 5.12 se encuentra la descriptiva de los marcadores generados.

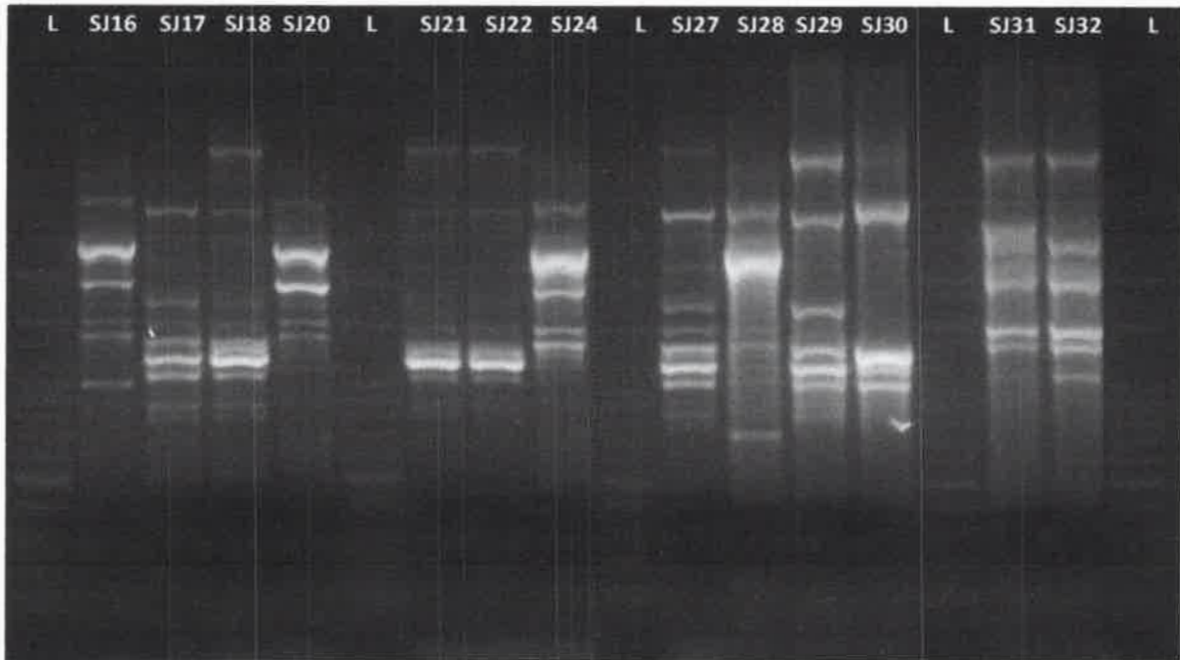


Fig. 5.11. BOX-fingerprint obtenido a partir de las diferentes cepas aisladas de rizósfera de plantas de menta. L: Ladder 50 pb.

<u>Descripción de datos de marcadores</u>	
Resumen	Datos
Muestras	39,00
Muestras Duplicadas	6,00
Bandas (número)	104,00
Patrón bandas duplicadas	14,00
Bandas monomórficas	0,00
Bandas polimórficas (%)	100,00

Fig. 5.12. Descripción de datos de marcadores obtenidos por BOX-PCR.

Se calcularon las distancias entre las diferentes muestras a través de la aplicación del modelo *Simple Matching*, con un índice de correlación cofenética de 0,901. De igual forma que para los marcadores ERIC, se construyó el correspondiente dendrograma utilizando los marcadores moleculares BOX obtenidos (Fig. 5.13). En general, se puede decir que los marcadores BOX generaron agrupaciones más grandes, es decir, se observó un mayor índice de similitud entre las cepas utilizadas en el estudio, hecho que ayuda a la observación de los resultados obtenidos.

A partir del dendrograma realizado se pudo determinar que:

- ✱ Todas las cepas compartieron aproximadamente un 48% de similitud entre ellas, con excepción de la cepa SJ01 que se separó del resto.
- ✱ A un 50% de similitud se observó la formación de un solo gran grupo.

- ✱ El grupo 1 unió el mayor número de cepas (29) dentro del cual se observó la formación de 5 subgrupos, denominados con las letras A-E.
- ✱ El subgrupo A fue el más grande, se formó con 16 cepas, incluyendo a la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r, que compartió un 55% de similitud con las restantes. En este mismo subgrupo se destacaron cepas que presentaron un 100% de similitud entre ellas: SJ09, SJ10 con SJ13; SJ38 con SJ39 y SJ31 con SJ32.

Análisis de conglomerados
Promedio (Average linkage)
 Distancia: (Simple Matching (sqrt(1-S)))
 Correlación cofenética= 0,901
 Variables estandarizadas

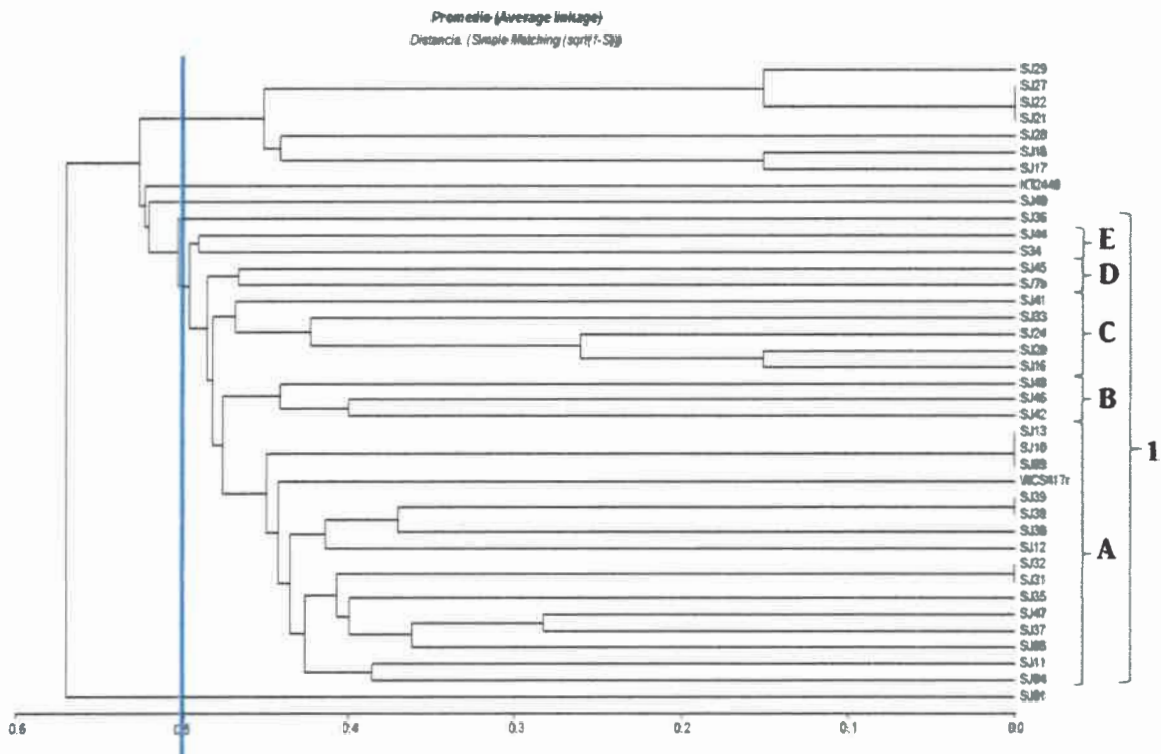


Fig. 5.13. Dendrograma obtenido con los perfiles BOX de cada una de las cepas fluorescentes de referencia y nativas aisladas obtenidas a partir de rizósfera de menta.

- ✱ En el subgrupo C se destacó la cercanía observada entre las cepas SJ20 y SJ16 que se agrupan a un 85% de similitud. Éstas se encontraron mayormente relacionadas con la cepa SJ24 a un 70 % de similitud.
- ✱ De las restantes cepas analizadas se enfatizaron la cepa de referencia *P. putida* KT2440 que no encontró agrupación con ninguna otra cepa, las cepas SJ21, SJ22 y SJ27

que presentaron un 100% de similitud entre ellas y que a su vez se agruparon con la cepa SJ29 a un 85% de similitud, así como también se destacaron las cepas SJ17 y SJ18 que presentaron un 85% de similitud.

Este tipo de análisis no produjo agrupamientos de alta similitud entre las cepas nativas y la cepa de referencia *P. putida* KT2440. Por el contrario, se detectó un mayor índice de similitud de éstas con la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r, formando el grupo más grande.

Estos datos coincidieron con los obtenidos por Naik y colaboradores (2008) y Selvakumar y colaboradores (2009) en los cuales se observaron agrupamientos al 50 % de similitud entre cepas perteneciente al grupo de *Pseudomonas* psicrotolerantes (Selvakumar y col., 2009), así como entre las cepas pertenecientes al grupo *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de rizósfera de banana (Naik y col., 2008). Sin embargo, otros autores observaron la formación de grupos a similitudes más bajas en *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de muestras ambientales (Mehri y col., 2011), en *Pseudomonas* con actividad biocontroladora (Parejko y col., 2012) y en *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato (Vyas y col., 2009). Naik y colaboradores (2008), como también Mehri y colaboradores (2011) concluyeron que esta metodología de estudio de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes es capaz de evidenciar exitosamente pequeñas diferencias entre cepas de la misma especie, hipótesis que se confirmó sucesivamente con el análisis de secuencias del gen *ARNr 16S*, validando la pertenencia al grupo de estudio esperado y la cercanía filogenética de las mismas.

Comparando los resultados obtenidos en los análisis de rep-PCR se puede decir que los marcadores ERIC permitieron discriminar mejor las cepas bajo estudio. Éstos generaron un menor número de marcadores moleculares que permitieron diferenciar mejor entre las cepas fluorescentes nativas aisladas, con respecto a un análisis de tipo BOX que generó un mayor número de marcadores, dificultando el análisis y obteniéndose un mayor grado de agrupación, o sea mayor similitud. Esto se puede explicar observando que a un 80% de similitud en el dendrograma ERIC se observó la formación de 35 grupos y la formación de 30 grupos en el dendrograma BOX. Por lo cual, si el objetivo del análisis es estudiar en detalle las diferencias entre las cepas, se puede decir que un análisis de tipo ERIC-PCR es más apropiado para evidenciar diferencias muy finas en el genoma de las cepas fluorescentes muestreadas. Sin embargo, si el objetivo del estudio es agrupar cepas sin importar diferencias pequeñas en el genoma de las mismas, se puede decir que un análisis de tipo BOX nos permite

descartarlas y formar agrupaciones más grandes. Esto se manifestó advirtiendo que el cebador BOX produjo un mayor número de perfiles duplicados (6), es decir cepas que son iguales, que los cebadores ERIC (3).

Actualmente existen pocos estudios sobre la comparación entre ampliificaciones de tipo BOX y ERIC sobre las mismas cepas de estudio. Sin embargo, Selvakumar y colaboradores (2009) encontraron que ambas metodologías generaron resultados aptos para diferenciar cepas de *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato psicrotolerantes, observando, a diferencia de nuestros resultados, un menor número de bandas en secuencias BOX que ERIC. Del mismo modo, Vyas y colaboradores (2009) generaron un único dendrograma a partir de la amplificación de secuencias repetidas BOX y ERIC obteniendo índices de similitud mucho más bajos entre *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato que los obtenidos en este trabajo. Así mismo, Wolska y colaboradores (2011) demostraron que para diferenciar cepas de *P. aeruginosa*, ambas herramientas de rep-PCR presentaron el mismo poder de discriminación, demostrando que esta gran especie de cepas patógenas presentó una gran homogeneidad dentro del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes, a diferencia de *P. putida* y *P. fluorescens* que manifestaron una gran heterogeneidad intraespecífica. Coincidentemente, el presente trabajo confirmó tal heterogeneidad cuando se emplearon los análisis moleculares de BOX y ERIC y sólo algunos agrupamientos se mantuvieron en ambos casos, como por ejemplo la cercanía entre las cepas SJ09, SJ10 y SJ13; SJ16 y SJ20; SJ17 y SJ18; SJ21 y SJ22; SJ38 y SJ39. De la misma manera, las cepas de referencia *P. fluorescens* y *P. putida* presentaron una similitud del 55% en el análisis basado en amplificación de secuencias ERIC, mientras que la similitud fue del 45% en el análisis de tipo BOX.

Como conclusión general de la aplicación de las 3 técnicas de análisis genotípico se puede decir que:

■ No se pudo diferenciar con éxito entre estas dos grandes especies de *Pseudomonas* fluorescentes utilizadas como referencia, ya que en los análisis de tipo ARDRA se observó un alto grado de similitud entre la mayor parte de las cepas nativas y la cepa de referencia *P. putida* KT2440 y en los resultados obtenidos con un estudio de rep-PCR, ambas cepas de referencia, *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* WCS417r presentaron una similitud muy baja (40%-50%) con casi todas las cepas de estudio.

■ Solo la cepa SJ12 se aleja de las restantes a un 15% de similitud en un análisis ARDRA mientras que se agrupa con las otras a mayores similitudes en los análisis rep-PCR.

■ Las cepas SJ09, SJ10 con SJ13; SJ16 con SJ20 y SJ31 con SJ32 están altamente relacionadas en los 3 tipos de análisis moleculares realizados.


■ Las cepas SJ17 con SJ18; SJ21 con SJ22 y SJ38 con SJ39 presentaron un mayor grado de similitud en el análisis de rep-PCR comparado a su baja similitudes por análisis de tipo ARDRA.

Cabe destacar que, comparando las 3 metodologías moleculares empleadas, el estudio de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el *ARNr 16S* es de utilidad para propósitos taxonómicos debido a que presenta poca variación a nivel evolutivo y el producto del gen es universalmente esencial y funcionalmente conservado. Sin embargo, este análisis no puede por sí solo reflejar de una manera adecuada las relaciones de los genomas de los microorganismos bajo estudio. En este sentido, varios estudios indican la presencia de más de una copia del gen en algunos genomas bacterianos (Van Berkum y col., 1999; Amann y col., 2000). Por otro lado, existe evidencia de recombinación genética y transferencia horizontal de genes ribosomales en ciertas bacterias, no sólo entre genomas relacionados, sino también a nivel intergénico (Wang y Zhang, 2000). A pesar de esto, en la mayoría de los casos, la ubicación de las bacterias a nivel filogenético deriva del análisis de la secuencia de ese gen (*ARNr 16S*), considerándose uno de los caracteres más utilizados en taxonomía hasta el momento. La misma se realiza por homología de la secuencia del gen *ARNr 16S* de cepas en estudio con las ya depositadas en las bases de datos de acceso público. Por lo tanto, aunque el género analizado presente cierto grado de diversidad intrínseco, es mejor considerar los genotipos formados en base a estudios ARDRA para futuros análisis de diversidad y filogenia, considerando que nos permite identificar pequeñas diferencias en la secuencia de dicho gen en un total de 1400 pb. Si bien los cortes enzimáticos presentaron un cierto grado de frecuencia, solo nos permitieron mostrar diferencias pequeñas en las secuencias de las cepas estudiadas, por lo cual es posible que la diversidad sea aún mayor y no pueda demostrarse con este estudio. Aunque los análisis de amplificación de secuencias BOX y ERIC nos permitieron profundizar sobre la diversidad intrínseca presente en las especies analizadas, no pueden ser utilizados para determinar una adecuada identificación y análisis filogenético (Achouak y col., 2000; Naik y col., 2008; Mehri y col., 2011; Parejko y col., 2012).



Capítulo 6

*Resultados y Discusión:
Mecanismos directos e indirectos de
promoción del crecimiento vegetal.*



Capítulo 6 - Resultados y Discusión:

Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.

En base a los resultados obtenidos y presentados en los capítulos 4 y 5, se determinaron las posibles actividades de promoción del crecimiento de las cepas nativas aisladas de rizósfera de menta y de la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r.

6.1. Bioensayos de compuestos orgánicos volátiles microbianos (mVOCs).

Se determinó el efecto generado por los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bacterianos producidos por las cepas mencionadas anteriormente en dos condiciones: (i) expuestos a plantas de *M. piperita*, sobre la biomasa y producción de aceites esenciales; (ii) expuestos a fitopatógenos.

6.1.1. Efecto de VOCs bacterianos sobre biomasa y producción de aceites esenciales en plantas de menta.

Se estudiaron los efectos de los mVOCs producidos por las distintas cepas fluorescentes nativas sobre la biomasa y la síntesis de los aceites esenciales de *M. piperita*. Transcurridos los 30 días de incubación, se observó que no existió contacto físico entre las cepas bajo estudio y las plántulas de *M. piperita*, denotándose un crecimiento puntual bacteriano, por lo cual las plantas pudieron ser cosechadas y analizadas.

En relación a los parámetros de biomasa, se observó que la exposición a VOCs de bacterias nativas presentó un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) sólo en el peso fresco de la parte aérea, que es de 3 a 4,5 veces mayor con respecto al control (Fig. 6.1). Estos tratamientos fueron seleccionados para el análisis del contenido de aceites esenciales. Con respecto a los demás parámetros analizados (Tabla 6.1), la exposición de plantas de menta a mVOCs no generan variaciones significativas con respecto al control ($p > 0,05$).

Los mVOCs emitidos por las cepas nativas analizadas no produjeron un aumento en la biomasa de menta comparable al que mostró la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* WCS417r en los ensayos presentados en el capítulo 4, en relación a los parámetros de longitud de raíz y número de ramificaciones. Por otro lado, mostraron una respuesta similar a nivel de peso seco de raíz, número de nudos y número de hojas (Santoro y col., 2011).

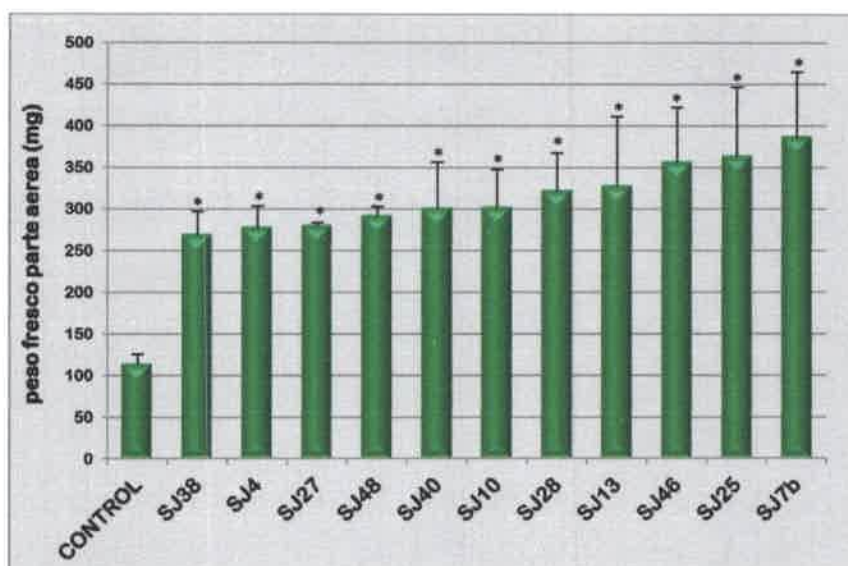


Fig. 6.1. Efecto de la exposición a mVOCs producidos por bacterias nativas sobre plantas de menta micropropagadas. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 4 repeticiones independientes con 5 réplicas ($n=5$) por cada uno.

	longitud raíz	peso seco raíz	longitud tallo	número nudos	ramificaciones	número hojas
control	5,36 ± 1,20 ^a	2,21 ± 0,40 ^a	4,02 ± 0,39 ^{ab}	6,38 ± 0,19 ^a	1,07 ± 0,15 ^a	19,19 ± 1,62 ^a
SJ01	7,62 ± 1,25 ^{ab}	4,89 ± 1,95 ^{abc}	4,45 ± 0,31 ^{abc}	7,29 ± 0,49 ^{ab}	1,25 ± 0,14 ^a	23,23 ± 2,40 ^a
SJ04	9,17 ± 1,25 ^{ab}	3,34 ± 0,57 ^{ab}	4,78 ± 0,39 ^{abc}	7,89 ± 0,45 ^{ab}	1,80 ± 0,64 ^a	29,23 ± 3,71 ^a
SJ7b	8,66 ± 0,98 ^{ab}	3,70 ± 0,60 ^{ab}	5,18 ± 0,17 ^c	8,48 ± 1,05 ^b	2,40 ± 1,20 ^a	49,87 ± 20,21 ^b
SJ08	7,37 ± 1,11 ^{ab}	3,37 ± 0,60 ^{ab}	4,60 ± 0,04 ^{abc}	7 ± 0,58 ^{ab}	1,15 ± 0,08 ^a	25,44 ± 1,89 ^a
SJ10	7,05 ± 1,50 ^{ab}	3,01 ± 0,65 ^{ab}	4,83 ± 0,31 ^{abc}	7,44 ± 0,39 ^{ab}	1,38 ± 0,39 ^a	29,52 ± 2,90 ^a
SJ13	7,77 ± 1,96 ^{ab}	3,31 ± 0,19 ^{ab}	4,84 ± 0,18 ^{abc}	7,81 ± 0,45 ^{ab}	1,56 ± 0,51 ^a	27,88 ± 5,10 ^a
SJ22	8,19 ± 1,57 ^{ab}	3,95 ± 0,93 ^{abc}	4,52 ± 0,20 ^{abc}	7,77 ± 0,81 ^{ab}	0,95 ± 0,05 ^a	25,40 ± 2,22 ^a
SJ24	9,92 ± 1,92 ^b	2,56 ± 0,49 ^{ab}	4,80 ± 0,70 ^{abc}	7,53 ± 0,68 ^{ab}	1,75 ± 0,60 ^a	30,56 ± 7,15 ^a
SJ25	9,16 ± 1,35 ^{ab}	4,01 ± 0,77 ^{abc}	5,01 ± 0,30 ^{abc}	7,60 ± 0,32 ^{ab}	2,20 ± 0,41 ^a	32,41 ± 6,34 ^a
SJ27	9,15 ± 1,67 ^{ab}	4,57 ± 1,02 ^{abc}	4,64 ± 0,41 ^{abc}	7,66 ± 0,20 ^{ab}	1,40 ± 0,28 ^a	27,17 ± 0,52 ^a
SJ28	10,05 ± 2,89 ^b	7,69 ± 3,54 ^c	5,37 ± 0,43 ^c	8,45 ± 0,52 ^b	2 ± 0,71 ^a	32,20 ± 7,71 ^a
SJ31	7,66 ± 1,49 ^{ab}	5,12 ± 1,33 ^{abc}	5,21 ± 0,51 ^c	8,15 ± 0,30 ^b	2,20 ± 0,57 ^a	31,10 ± 3,87 ^a
SJ33	6,61 ± 0,80 ^{ab}	3,53 ± 0,48 ^{ab}	5,15 ± 0,21 ^c	7,40 ± 0,72 ^{ab}	1,53 ± 0,35 ^a	28,35 ± 2,71 ^a
SJ36	8,75 ± 1,73 ^{ab}	3,55 ± 0,74 ^{ab}	4,83 ± 0,41 ^{abc}	7 ± 0,20 ^{ab}	1,44 ± 0,16 ^a	22,94 ± 1,23 ^a
SJ38	9,50 ± 0,77 ^b	4,45 ± 1,06 ^{abc}	5,28 ± 0,19 ^c	8,11 ± 0,31 ^b	1,77 ± 0,36 ^a	27,69 ± 2,52 ^a
SJ40	9,13 ± 1,94 ^{ab}	6,01 ± 2,66 ^{bc}	4,92 ± 0,31 ^{abc}	7,60 ± 0,88 ^{ab}	2,23 ± 0,93 ^a	28,75 ± 4,63 ^a
SJ41	6,55 ± 0,85 ^{ab}	3,60 ± 0,83 ^{ab}	3,98 ± 0,19 ^a	7,68 ± 0,39 ^{ab}	0,93 ± 0,39 ^a	22,85 ± 3,05 ^a
SJ44	7,76 ± 0,89 ^{ab}	4,21 ± 0,79 ^{abc}	4,77 ± 0,42 ^{abc}	7,30 ± 0,28 ^{ab}	1,23 ± 0,39 ^a	23,86 ± 1,19 ^a
SJ45	9,37 ± 1,08 ^{ab}	3,79 ± 0,33 ^{abc}	4,99 ± 0,13 ^{abc}	7,86 ± 0,59 ^{ab}	1,16 ± 0,10 ^a	26,19 ± 2,94 ^a
SJ46	8,06 ± 0,60 ^{ab}	3,94 ± 0,70 ^{abc}	5,21 ± 0,34 ^c	8,22 ± 0,68 ^b	1,93 ± 0,40 ^a	32,69 ± 4,16 ^a
SJ48	8,23 ± 1,06 ^{ab}	4,75 ± 1,10 ^{abc}	5,06 ± 0,50 ^{bc}	8,03 ± 0,28 ^b	1,41 ± 0,21 ^a	26,44 ± 0,58 ^a

Tabla 6.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de *M. piperita* expuestas a VOCs producidos por cepas nativas ($p > 0,05$). Se realizaron 4 repeticiones independientes con 5 réplicas ($N=5$) por cada uno.

Sucesivamente, se realizó el estudio cualitativo y cuantitativo de los AE producidos por los distintos tratamientos. Éstos fueron extraídos y analizados en su composición de monoterpenos mayoritarios, es decir en la presencia de: limoneno, terpineol, mentona, mentofurano, mentol, pulegona, mentilacetato y mentofuranona. Los tiempos de retención correspondientes a cada componente fueron confirmados a través de estándares. Los datos referentes al análisis se presentan en la figura 6.2.

En la figura 6.2. A se puede observar que solo las plantas expuestas a mVOCs producidos por SJ25 y SJ27 presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido total de AE con respecto al control (plantas expuestas a agua destilada), manifestando así un aumento del 86% y del 57% respectivamente. Estos resultados coincidieron con los encontrados anteriormente en nuestro laboratorio, con respecto a la influencia de los mVOCs de la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r sobre plantas de *M. piperita* micropropagadas (Santoro y col., 2011).

En relación a los componentes mayoritarios, se observa un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en el contenido de limoneno (Fig. 6.2. B) de aproximadamente 2 veces mayor en las plantas expuestas a mVOCs de las cepas SJ04, SJ28 y SJ7b, mientras que el aumento es de alrededor de 4 veces en las plantas expuestas a VOCs emitidos por la cepa SJ48. Esto no se observó en los ensayos anteriormente realizados con las cepas de referencia *P. fluorescens* WCS417r, *B. subtilis* GB03 y *A. brasilense* Sp7, en los cuales el contenido de limoneno no se ve alterado luego de la exposición de plantas de menta a mVOCs sintetizados por de dichas cepas (Santoro y col., 2011).

El contenido de mentona (Fig. 6.2. B) mostró una respuesta variable según el tratamiento, sin presentar diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Las plantas expuestas a los mVOCs producidos por la cepa SJ48 registraron una disminución del 45% con respecto al control, mientras que las plantas expuestas a mVOCs emitidos por las cepas SJ13, SJ25, SJ27, SJ7b y SJ04 incrementaron el contenido del mismo en un 31%, 36%, 50%, 77% y 100% respectivamente. Estas observaciones no coincidieron con los resultados encontrados anteriormente en nuestro laboratorio, en los que el componente mentona presentaba un aumento significativo luego de la exposición de plantas de menta micropropagadas a mVOCs de las cepas *P. fluorescens* WCS417r y *A. brasilense* Sp7 (Santoro y col., 2011).

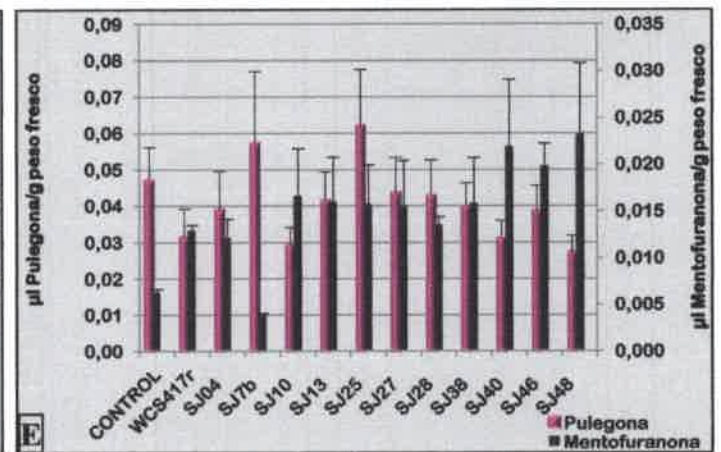
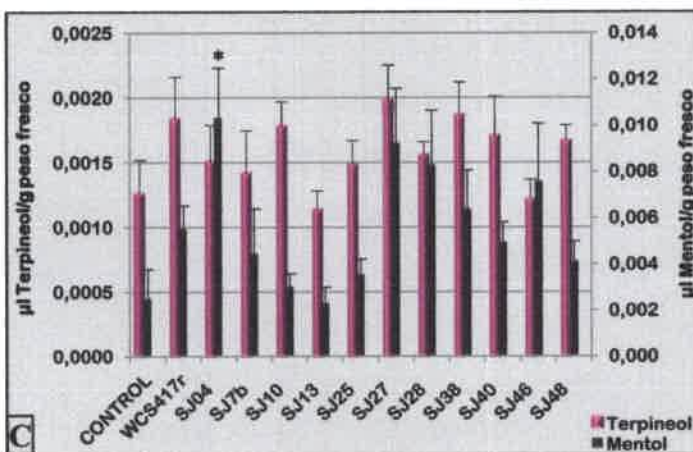
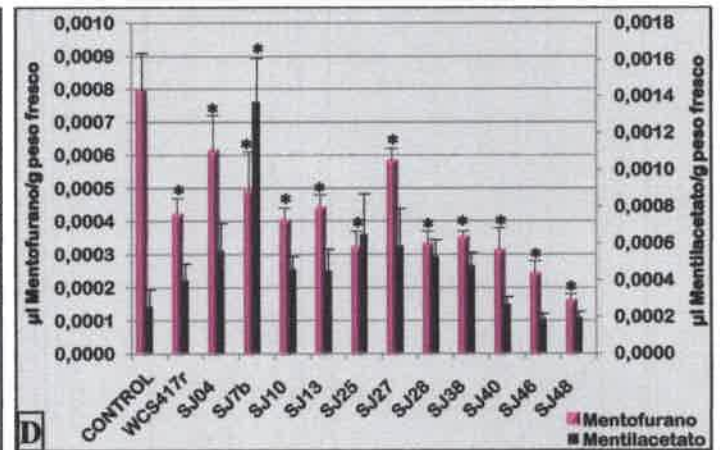
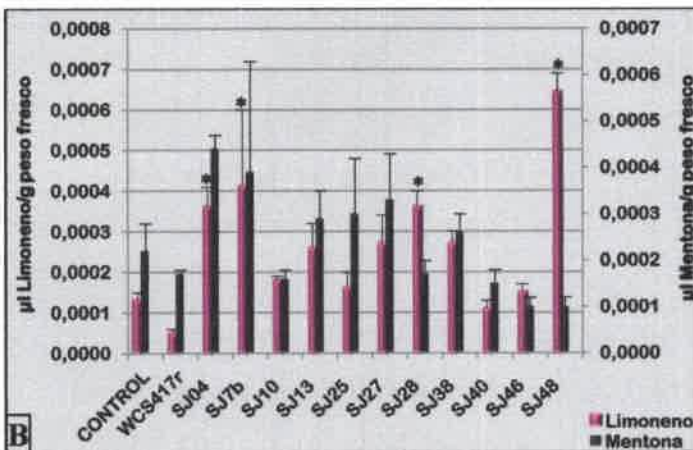
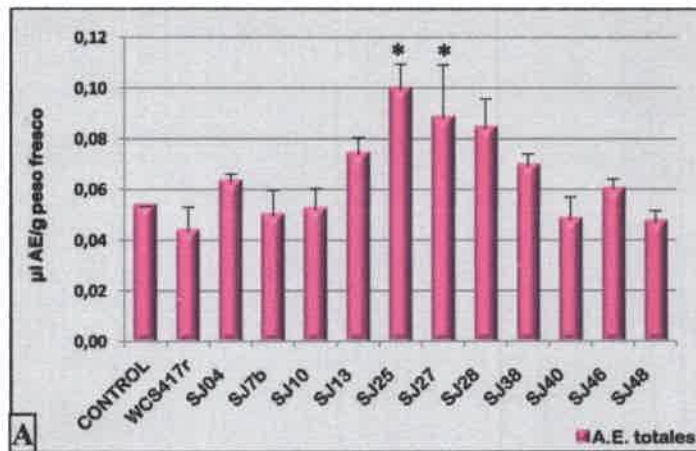


Fig. 6.2. Efecto de la exposición a mVOCs producidos por bacterias fluorescentes nativas sobre la producción total aceites esenciales y sus componentes mayoritarios en plantas de menta micropropagadas. A.- AE totales; B.- limoneno y mentona; C.- terpineol y mentol; D.- mentofurano y mentilacetato; E.- pulegona y mentofuranona. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 4 repeticiones independientes, con 5 ($n = 5$) réplicas por cada una.

El contenido de mentol (Fig. 6.2. C) presentó un incremento significativo en las plantas expuestas a SJ04 de 3 veces con respecto al control ($p \leq 0,05$). El compuesto

mentofurano (Fig. 6.2. D) registró una disminución significativa en todas las muestras con respecto al control, llegando en la muestra SJ48 hasta un valor de 20% del contenido presentado por las plantas expuestas a agua destilada. Estos resultados no se observaron en los ensayos anteriores luego de la exposición a mVOCs de cepas de referencia (Santoro y col., 2011), ya que el monoterpeno mentol no presentó diferencias significativas, mientras que por otro lado, el compuesto mentofurano presentó un aumento considerable luego de la exposición a mVOCs producidos por la cepa *P. fluorescens* WCS417r.

Por último, el contenido de mentilacetato (Fig. 6.2. D) presentó un incremento significativo hasta de 4 veces el contenido del tratamiento en las plantas expuestas a mVOCs de SJ7b. El contenido de terpineol (Fig. 6.2. C), pulegona y de mentofuranona (Fig. 6.2. E) no presentaron variaciones significativas, luego de la exposición a mVOCs de las cepas nativas aisladas ($p > 0,05$).

En base a los resultados obtenidos se puede deducir que existe un aumento en el contenido de los monoterpenos que dan valor al aceite esencial de menta sólo en plantas de menta expuestas a VOCs emitidos por la cepa SJ04, donde el aumento en el contenido de mentol es acompañado por un aumento en el contenido de mentona, componentes (Gupta y col., 2002). En dicho tratamiento, la reducción presentada en el contenido de mentofurano es importante ya que es una alternativa bioquímica a partir de pulegona y por lo tanto, un componente no deseado en el conjunto de AE (Lange y Croteau, 1999; Turner y Croteau, 2004). La acumulación a nivel de limoneno presentado por algunas muestras indicarían que los aceites esenciales estarían en vía de maduración, ya que las enzimas involucradas en las últimas transformaciones, que llevan a la formación de los productos con mayor valor económico, se activan alrededor de los 30 días de maduración (McConkey y col., 2000). Sugerimos, entonces que los mVOCs producidos por algunas cepas fluorescentes nativas aisladas estimulan la síntesis de monoterpenos en plantas de menta.

Como se ha discutido en los resultados presentados en el capítulo 4, se considera que el aumento observado en la producción de metabolitos secundarios depende directamente de una mejora en el estatus nutricional de las plantas luego de la inoculación con bacterias PGPR y por ende del metabolismo primario (Shulka y col., 1992; Giri, 2003; Farag y col., 2006) De esta manera, la planta dispone de una mayor cantidad de sustratos para su crecimiento y síntesis de metabolitos secundarios, como lo son los monoterpenos (Zhang y col., 2007; Zhang y col., 2008a; Zhang y col., 2009).

También podría considerarse que el aumento registrado en la síntesis de los componentes principales de los AE, como efecto de la inoculación directa en plantas aromáticas, puede ser debido a una respuesta defensiva del vegetal frente a la colonización de microorganismos, debido a sus conocidas propiedades antimicrobianas (Hammerschmidt y Nicholson, 1999; Sangwan y col, 2001; Wittsotck y Gershenzon, 2002). Estudios realizados por Radruppa y colaboradores (2010) demuestran que plantas de *A. thaliana* expuestas a acetoina, un compuesto presente en el conjunto de mVOCs producidos por *B. subtilis* GB03 (Farag y col., 2006), inducen una respuesta sistémica mediada por las vías dependientes del ácido salicílico y del etileno. Por consiguiente, se puede deducir que aunque no haya contacto con el microorganismo PGPR, el aumento en la producción de AE esté mediado por la estimulación de una respuesta sistémica inducida, o sea un perfeccionamiento de la capacidad defensiva de la planta contra un amplio espectro de patógenos y plagas.

Los efectos obtenidos en plantas de *M. piperita* micropropagadas expuestas a mVOCs producidos por cepas fluorescentes nativas se resumen en el esquema presentado en la figura 6.3.

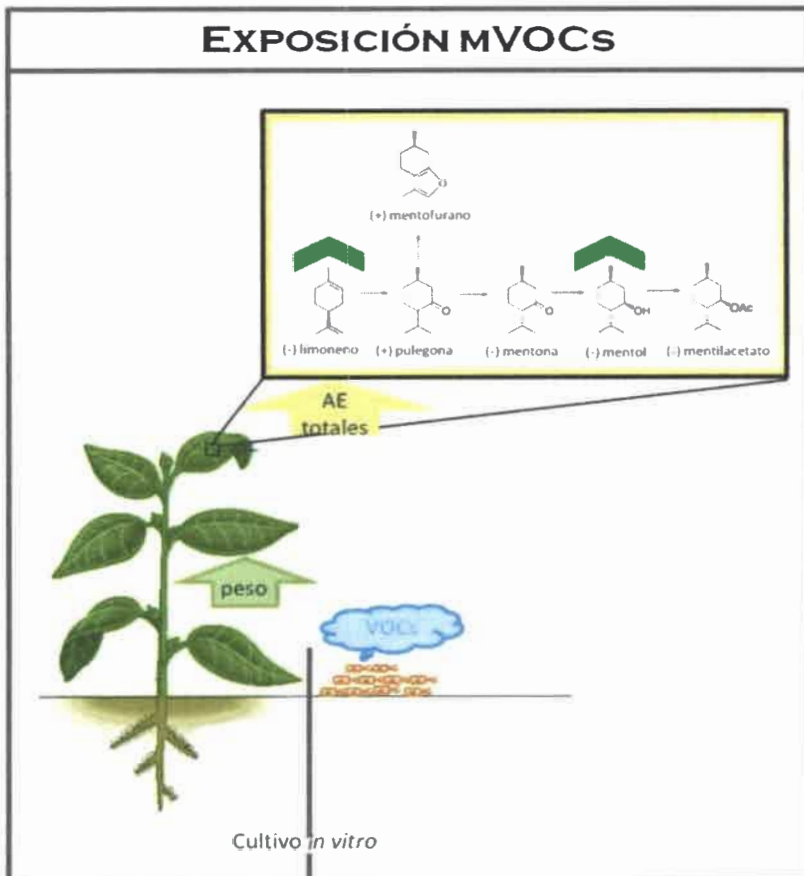


Fig. 6.3. Esquema representativo de los principales efectos PGPR encontrados por exposición de plantas de *M. piperita* a mVOCs producidos por cepas fluorescentes nativas.

6.1.2. Biocontrol de fitopatógenos.

Los efectos generados por la exposición de inóculos de *A. alternata* RC21 a mVOCs producidos por cepas nativas fueron divergentes entre las distintas cepas. El crecimiento vegetativo fúngico presentó una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) de hasta un 70% de diámetro en relación al control, sólo en algunas de las cepas evaluadas (Fig. 6.4). Como se observa en el gráfico, la cepa *B. subtilis* GB03 no presentó actividad biocontroladora mediada por la producción de mVOCs frente al fitopatógeno de estudio.

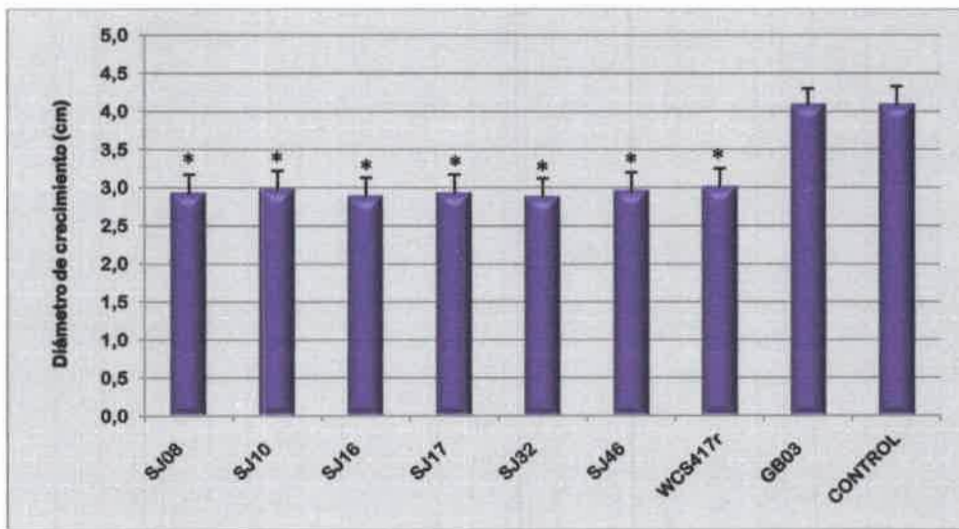


Fig. 6.4. Diámetro de crecimiento fúngico de la cepa de *A. alternata* RC21 en exposición a VOCs producidos por cepas de referencia y aisladas de rizósfera de menta. Las pruebas se realizaron por duplicado, con 3 repeticiones (N=3) por cada uno.

El fenotipo biocontrolador mediado por la producción de mVOCs es característico de cepas pertenecientes al género de *Pseudomonas*, como ha sido demostrado en ensayos realizados con hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cúbense* (Ting y col., 2011), *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernando y col., 2005; Kai y col., 2009), *Rhizoctonia solani* (Kai y col., 2006), *Neurospora crassa* (Vespermann y col., 2007) y *Fusarium solani* (Kai y col., 2009). También ha sido descrito en cepas pertenecientes al género *Burkholderia*, muy cercano filogenéticamente al género estudiado, cuya función ha sido atribuida al compuesto 2-nonanona capaz de demostrar actividad fungistática contra *A. alternata*, entre otros fitopatógenos (Groenhagen y col., 2013). Estos mismos autores explican que el efecto es de antagonismo directo, ya sea por disminución del crecimiento vegetativo de las hifas fúngicas y en algunos casos

según el fitopatógenos analizado, también por disminución de la producción de esporas. Si bien el mecanismo de acción a través del cual los mVOCs ejercen una actividad biocontroladora no se ha sido esclarecido.

6.2. Bioensayos de otras actividades PGPR.

Como se observa en la tabla 6.4, el 80% de los aislamientos presentó el fenotipo solubilizador de fosfato, el 25% el fenotipo productor de sideróforos y el 37,5% el fenotipo productor de AIA.

Estos datos son concordantes con los encontrados por otros grupos de investigación en aislamientos nativos de soja (Cattelan y col., 1999), tomate (Mahalakshmi y Reetha 2009), arroz (Sunish Kumar y col., 2005; Naik y col., 2008) y caña de azúcar (Mehnaz y col., 2009), donde cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* reafirmaron el fenotipo solubilizador de fosfato, productor de sideróforos y productor de AIA.

Estos podrían ser mecanismos que ayuden a la interacción planta-microorganismo cuando se encuentran en contacto directo, como ocurre en el hábitat natural, así como también la producción de VOCs puede producir un efecto positivo sobre el crecimiento de plantas de *M. piperita*. La promoción del crecimiento de la planta huésped inoculada con una rizobacteria PGPR es, normalmente, debido a una combinación de varios mecanismos (Lucy y col., 2004; Van Loon, 2007).

	SI01	SI04	SI7b	SI08	SI09	SI10	SI11	SI12	SI13	SI14	SI16	SI17	SI18	SI20	SI21	SI22	SI24	SI25	SI27	SI28	SI29	SI30	SI31	SI32	SI33	SI34	SI35	SI36	SI37	SI38	SI39	SI40	SI41	SI42	SI44	SI45	SI46	SI47	SI48	WC5417r	
SOLUBILIZACIÓN FOSFATO	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PRODUCCIÓN SIDEROFOROS	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PRODUCCIÓN AIA	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 6.2. Actividades PGPR determinadas en las cepas nativas aisladas de rizósfera de plantas de menta. Las pruebas se realizaron por duplicado, con dos repeticiones (N=2) por cada uno.

Cabe aclarar que si bien las cepas SJ28 y SJ45 presentaron fenotipo positivo para las 3 actividades PGPR testeadas, no fueron incluidas en los sucesivos ensayos de inoculación a pesar de presentarse como buenas promotoras del crecimiento. Los ensayos de inoculación directa que se presentan en el capítulo 7 fueron realizados con el

fin de confirmar la promoción vegetal en plantas de *M. piperita* mediada por producción de VOCs, mecanismo en el cual las cepas antes mencionadas, no presentaron resultados relevantes. Además, se utilizó como soporte un medio rico en fosfato y hierro, por lo cual el fenotipo solubilizador de fosfato y productor de sideróforos no participarían en el mecanismo de promoción.

6.4. Análisis filogenético de cepas con actividad PGPR aisladas de rizósfera de cultivos de menta.

Para determinar la identidad y la posición filogenética de las cepas nativas aisladas de rizósfera de menta se realizó el análisis de las secuencias de nucleótidos del gen *ARNr 16S*. El estudio de dicho gen es uno de los caracteres más utilizados en taxonomía hasta el momento debido a que presenta poca variación a nivel evolutivo y su producto es esencial y funcionalmente conservado.

Para este tipo de análisis, las cepas fueron seleccionadas en base a las actividades de promoción del crecimiento vegetal manifestadas en los ensayos presentados anteriormente. Las cepas escogidas fueron:

- SJ04, SJ13, SJ25 y SJ48 debido a su marcada capacidad para promover el crecimiento vegetal y producción de AE de plantas de menta a través de la producción de VOCs;
- SJ28 y SJ45 debido a sus actividades PGPR de producción de sideróforos, AIA y solubilización de fosfato;
- SJ08, SJ16, SJ17, SJ32, SJ45 y SJ46 debido a la efectividad de su actividad de biocontrol del crecimiento de *A. alternata* RC21 mediada por la producción de VOCs;
- SJ7b gracias a su actividad de PGPR sobre la biomasa de plantas de menta mediada por producción de VOCs;
- SJ31 fue seleccionada ya que en los análisis de *clustering* genotípico BOX y ARDRA demostró un 100% de similitud con la cepa SJ32, que presentó actividad PGPR;
- SJ01 fue seleccionada porque reveló un 100% de similitud genética en el análisis ARDRA con la cepa SJ16 que demostró actividad PGPR y porque presentó baja similitud con las otras cepas en el análisis genotípico BOX.

Cultivos frescos de las cepas seleccionadas fueron enviados a MacroGen Inc., Corea a los fines de secuenciar el gen *ARNr 16S*. Las secuencias obtenidas fueron procesadas utilizando el software BLAST, el cual determina el alineamiento y cálculo

del porcentaje de identidad de las secuencias bajo estudio con las presentes en la base de datos (Altschul y col., 1997). La base de datos utilizada fue *GenBank* (NCBI) dada su gran magnitud.

Tal como esperábamos, todas las cepas nativas analizadas procedentes de rizósfera de *M. piperita* mostraron identidad dentro del género *Pseudomonas*. Éstas tuvieron elevados porcentajes de identidad de la secuencia de nucleótidos del gen *ARNr 16S* con bacterias identificadas como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas* sp. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.3.

Estudios previos demuestran que dos cepas son consideradas pertenecientes a la misma especie cuando presentan al menos un 99% de identidad en la secuencia del gen estudiado (Achouak y col., 2000). Por lo cual la identificación alcanzada en el análisis BLAST es aceptada ya que presentan porcentajes de identidad adecuados.

Las cepas SJ13 con SJ48, así como las cepas SJ17 con SJ25 obtuvieron la misma identidad pero con un porcentaje distinto de cobertura de la secuencia de nucleótidos analizada. Se debe considerar además, que el análisis genotípico mediante ERIC y BOX, técnicas que profundizan sobre la diversidad existente dentro de una determinada especie, revelan que estas cepas comparten porcentajes de similitudes muy bajos entre ellas. Por las razones mencionadas, podría considerarse que se trate cepas pertenecientes a la misma especie pero distintas entre sí.

CEPA	NRO. ACCESO	IDENTIDAD		
		ALINEAMIENTO	HOMOLOGÍA	COBERTURA
SJ01	KF312466.1	<i>P. putida</i> C-G-PDA3 – HM755498.1	99%	100%
SJ04	KF312467.1	<i>P. putida</i> GM6 – DQ133506.1	99%	99%
SJ7b	KF312468.1	<i>P. fluorescens</i> MazP22 – JX885768.1	99%	99%
SJ08	KF312469.1	<i>Pseudomonas</i> sp.P97.38 – DQ453823.1	99%	100%
SJ13	KF312470.1	<i>P. putida</i> NBRC102090 – AB681701.1	99%	99%
SJ16	KF312471.1	<i>P. putida</i> S18 – AY741157.1	99%	99%
SJ17	KF312472.1	<i>Pseudomonas</i> sp. MKP213 – KC013979.1	99%	100%
SJ25	KF312473.1	<i>Pseudomonas</i> sp. MKP213 – KC013979.1	99%	97%
SJ28	KF312474.1	<i>P. putida</i> 1599 – JN679860.1	99%	100%
SJ31	KF312475.1	<i>Pseudomonas</i> sp. MKP213 – KC013979.1	99%	99%
SJ32	KF312476.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ONBA-17 – DQ079062.1	99%	99%
SJ45	KF312477.1	<i>Pseudomonas</i> sp. m4(2012) – JX675235.1	99%	97%
SJ46	KF312478.1	<i>Ps. fluorescens</i> Pf29A – DQ473439.1	99%	99%
SJ48	KF312479.1	<i>P. putida</i> NBRC102090 – AB681701.1	99%	97%

Tabla 6.3. Datos relativos al análisis realizado con software BLAST sobre las secuencias del gen *ARNr 16S* de cepas nativas de rizósfera de menta.

Con la finalidad de determinar la distancia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre las cepas fluorescentes aisladas de rizósfera de menta y las principales especies del género *Pseudomonas*, se construyó un árbol filogenético (Fig. 6.5).

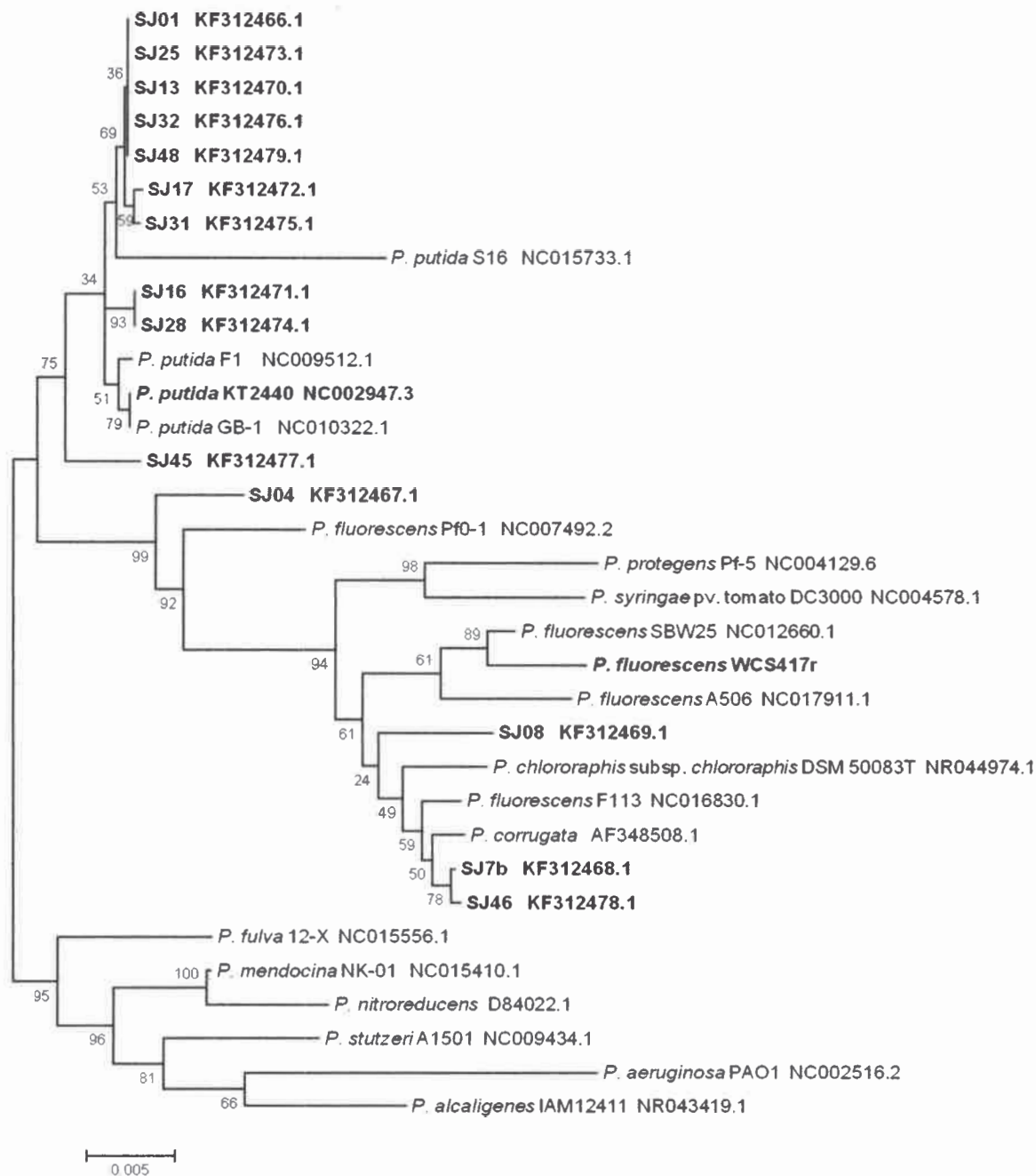


Fig. 6.5. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen *ARNr 16S* de cepas nativas y de referencia perteneciente al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes. A nivel de las ramas se muestran los valores de *bootstrap* expresados como un porcentaje de 1000 replicaciones. La barra representa la sustitución de 5 nucleótido cada 1000. Junto a la denominación de cada cepa se encuentran los números de acceso a las secuencias depositadas en *GenBank*.

El árbol filogenético obtenido muestra la formación de 2 grupos principales: el primero se formó con cepas representantes de las especies *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae*, *P. chlororaphis* y *P. corrugata*; el segundo grupo se formó con cepas representantes de las demás especies de *Pseudomonas* consideradas, tales como *P. fulva*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* y *P. alcaligenes*. Interesantemente, dentro del primer grupo se puede observar la distribución de las cepas nativas aisladas de rizósfera de menta en 2 subgrupos caracterizados por su pertenencia a las especies *P. putida* y *P. fluorescens*.

La mayor parte de las cepas nativas secuenciadas confirmó su relación filogenética con la especie *P. putida*. Las cepas más íntimamente relacionadas con ésta son SJ16 y SJ28, seguidas por SJ01, SJ13, SJ17, SJ25, SJ31, SJ32, y SJ48. La cepa SJ45 manifestó una cierta distancia dentro de este gran grupo. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante los análisis de agrupación genotípicos y fenotípicos realizados previamente. Estos resultados en conjunto demuestran que las bacterias fluorescentes aisladas de rizósfera de menta están mayormente relacionadas con la especie *P. putida*.

Las restantes 4 cepas secuenciadas se agruparon dentro del *cluster* principalmente representado por cepas pertenecientes a *P. fluorescens*, mostrando mayor distancia filogenética con la especie *P. putida* y corroborando lo observado en las caracterizaciones fenotípica y genotípica. En este grupo, la cepa SJ04 presentó una localización filogenética intermedia entre el grupo representado por *P. putida* y el grupo representado por *P. fluorescens*. No obstante dicho posicionamiento, SJ04 evidenció una mayor relación filogenética con *P. fluorescens* a pesar de que su identificación por BLAST mostró elevada identidad con *P. putida*. Asimismo, las cepas SJ7b y SJ46 se muestran más relacionadas filogenéticamente con la especie *P. corrugata* que con la especie *P. fluorescens*, dato confirmado por el análisis BLAST. El grupo formado por las cepas mencionadas se encuentra relacionado con la cepa SJ08, que a su vez, encontró relación filogenética con las especies *P. fluorescens* y *P. chlororaphis*.

En conclusión, todas las cepas estudiadas se agruparon dentro del grupo formado por las especies fluorescentes del género *Pseudomonas* y confirmaron las similitudes presentadas en los análisis fenotípicos y genotípicos realizados anteriormente, sobresaliendo de este modo *P. putida* como la especie mayormente representada en rizósfera de menta.

6.4. Análisis químico del conjunto de mVOCs producidos por cepas nativas con actividad promotora del crecimiento vegetal.

Se determinó la identidad química del conjunto de VOCs producidos por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de rizósfera de menta utilizando la técnica de SPME asociada a cromatografía gaseosa y espectrometría de masas.

Las cepas fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos en la determinación de las actividades PGPR mediadas por VOCs referente al capítulo 6. Las cepas analizadas fueron:

- SJ04, SJ25 y SJ48, escogidas a razón del aumento presentado en la producción de AE, más específicamente de AE totales, limoneno y mentol.
- SJ16 y SJ32, elegidas por demostrar actividad de biocontrol hacia la cepa fitopatógena *A. alternata* RC21.
- *P. fluorescens* WCS417r, incluida como cepa de referencia del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes y capaz de presentar una evidente actividad PGPR cuando sus VOCs son expuestos a plantas de menta.
- *B. subtilis* GB03, incluida como control positivo de la técnica utilizada, ya que posee una caracterización exhaustiva de sus VOCs utilizando la misma metodología.
- *E. coli* DH5a, elegido como control negativo, ya que se trata de una cepa de referencia sin actividad PGPR y no presente en el ambiente suelo.
- SJ20 y SJ31, elegidos como control negativo al tratarse de cepas fluorescentes nativas procedentes del mismo origen, sin capacidad PGPR mediadas por VOCs y con una tasa metabólica comparable a las cepas de interés.
- Perfil cromatográfico control a partir del solo medio de cultivo, sin crecimiento bacteriano, para poder identificar la presencia de posibles compuestos volátiles en el sistema de identificación seleccionado.

Los VOCs fueron capturados en fibras SPME expuestas en el *headspace* de los cultivos de las cepas bajo estudio en fase estacionaria, mantenidos en agitación, a 40°C por 30 min. Luego las mismas fueron desadsorbidas en el puerto de inyección del GC-MS. Los perfiles obtenidos de muestran en las figuras 6.6, 6.7 y 6.8.

Los controles han sido utilizados a fin de convalidar la técnica. En base a los perfiles cromatográficos obtenidos para las cepas bajo estudio se consideraron solo los picos correspondientes a los compuestos químicos que no coincidieron con los presentes en la corrida control del medio de cultivo. El perfil cromatográfico de los mVOCs

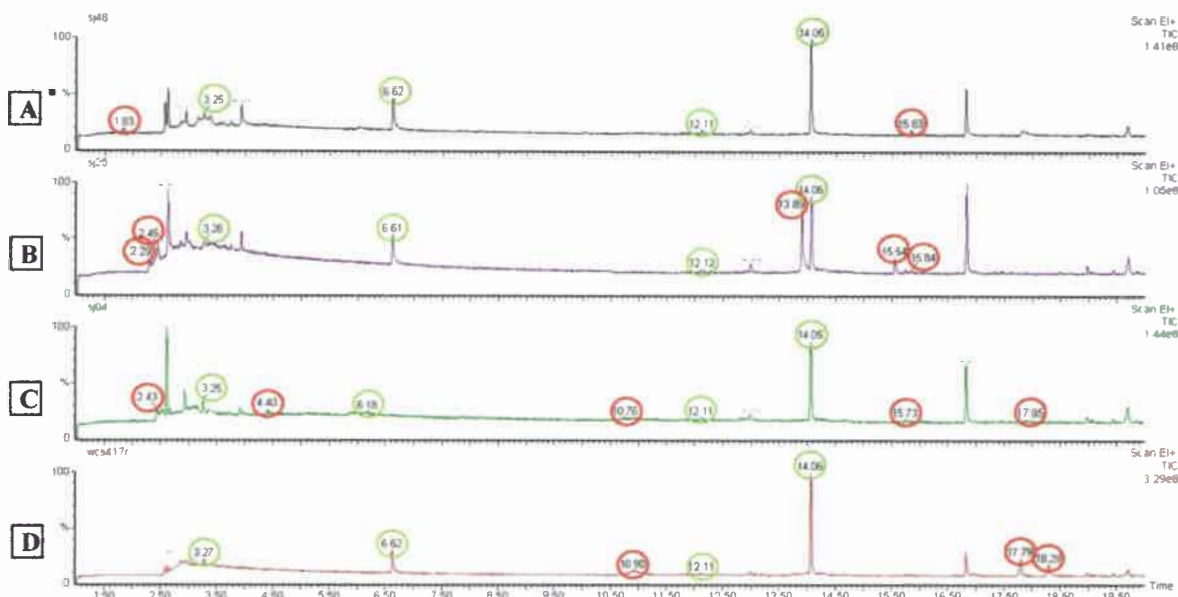


Fig. 6.6. Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por cepas de referencia y nativas aisladas de rizósfera de menta que presentaron un aumento en la producción de AE. **A.-** SJ48. **B.-** SJ25. **C.-** SJ04. **D.-** WCS417r.

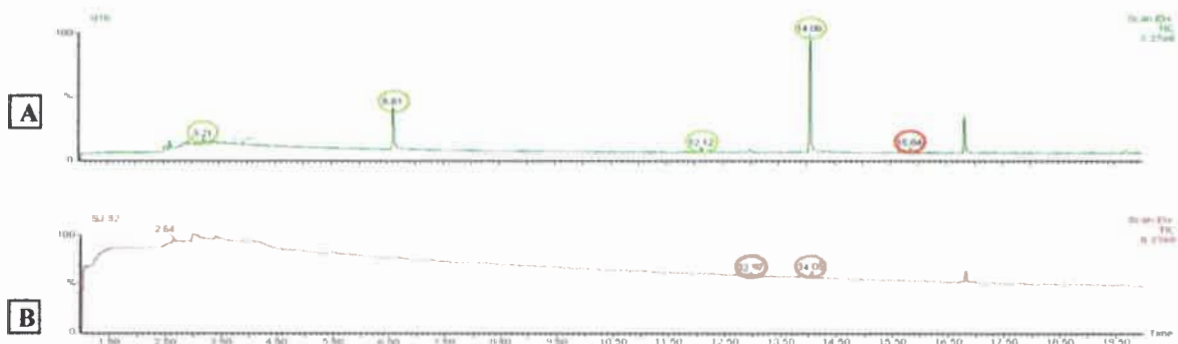


Fig. 6.7. Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por las cepas nativas aisladas de rizósfera de menta con actividad de biocontrol. **A.-** SJ16. **B.-** SJ32.

producidos por la cepa *B. subtilis* GB03 confirmó la metodología de extracción ya que se logró comprobar la presencia de los compuestos mayoritarios caracterizados previamente por el grupo de Farag y colaboradores (2006). En la figura 6.8. A (círculos celestes) pueden observarse las señales químicas correspondientes a acetoina (T.R 6,05) y 2,3-butanediol (T.R. 7,73) que fueron correctamente identificados a través de espectrometría de masas (Fig. II.1 y II.2, Anexo II: Identificación de mVOCs).

En base a las comparaciones correspondientes de los perfiles cromatográficos presentados por las cepas bajo estudio con los respectivos controles negativos (cepas DH5α, SJ20 y SJ31), se pudieron reconocer dos grupos de señales químicas: las

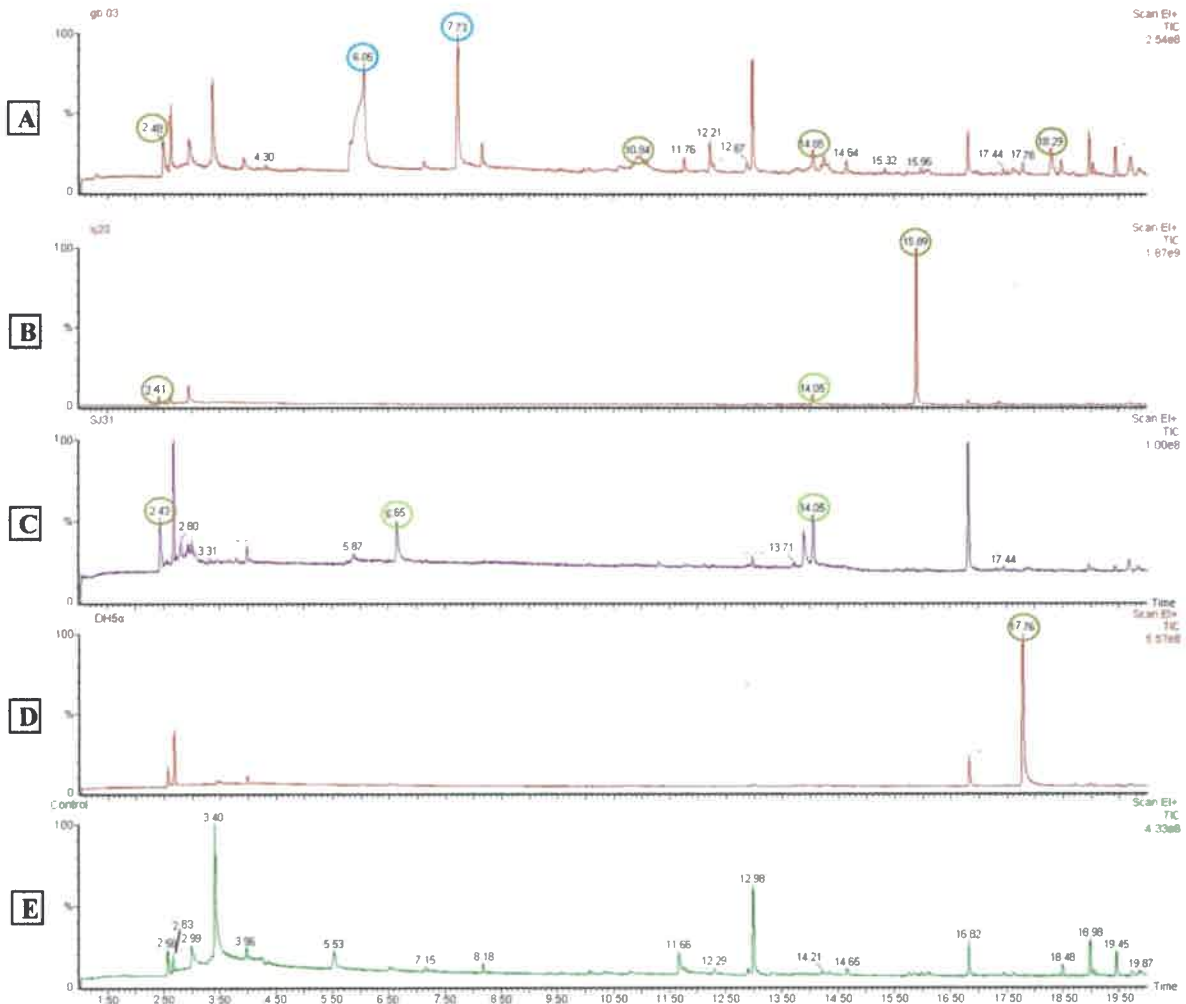


Fig. 6.8. Perfiles cromatográficos de VOCs producidos por las cepas utilizadas como control. **A.-** GB03, control positivo. **B.-** SJ20 y **C.-** SJ31, controles negativos de actividad PGPR. **D.-** DH5 α , control negativo. **E.-** Control de VOCs del medio de cultivo.

estuvieron presentadas sólo en las cepas del género *Pseudomonas*, marcadas en verde en las figuras 6.6-6.8; y las que fueron reconocidas como típicas del perfil de cada cepa de interés analizada, marcadas en rojo en las figuras 6.6 y 6.7. Estas señales químicas fueron identificadas comparando los tiempos de retención y los perfiles de fragmentación obtenidos en el espectrómetro de masa con los presentes en la librería NIST. Se consideró que la identificación fue apropiada en aquellos compuestos que presentaron un índice de similitud (SI) mayor a 800 y entre éstos se eligió el de índice más alto. Algunas cepas utilizadas como control negativo presentaron señales químicas que coincidieron con las reconocidas como típicas de las cepas analizadas (Fig 6.6-6.8, marcadas en marrón). Interesantemente, se puede deducir que estos compuestos volátiles por sí solos no son capaces de generar efectos de promoción del crecimiento en

plantas de menta micropropagadas, ya que están presentes en las cepas utilizadas como control negativo de las actividades de promoción vegetal.

En la tabla 6.4 se muestran las señales químicas correspondientes a los compuestos volátiles característicos del grupo de *Pseudomonas* nativas analizado (Fig. 6.6-6.8 círculos verdes).

T.R. (min)	IDENTIFICACIÓN	FIGURA
3,27	Etanotiol ó tiobismetano	II.3. (ANEXO II)
6,62	dimetil-disulfide	II.4. (ANEXO II)
12,12	(sin identificación)	
14,06	1-undeceno	II.5. (ANEXO II)

Tabla 6.4. Tiempos de retención e identificación correspondiente a los compuestos volátiles típicos de las cepas del género *Pseudomonas* analizadas.

La identificación de las señales químicas correspondientes a los compuestos volátiles típicos de cada cepa estudiada que poseen actividad PGPR fue dificultosa, por presentar SI muy bajos. Esto puede ser debido a la falta de caracterización previa de los compuestos encontrados y por lo tanto no presentes en librerías de identificación, o debido a la baja concentración de los mismos en las muestras analizadas. A pesar de los problemas encontrados, algunos compuestos pudieron ser identificados apropiadamente.

En relación a las señales químicas correspondientes a compuestos característicos de cada cepa analizada se puede exponer que:

- el perfil cromatográfico de la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r se caracterizó por la presencia de los compuestos correspondientes a los tiempos de retención: 10,90; 17,79 y 18,29 (Fig 6.6, círculos rojos).

- el perfil cromatográfico de la cepa nativa SJ04 se caracterizó por la presencia de los compuestos correspondientes a los tiempos de retención: 2,43; 4,40; 6,08; 10,76 y 17,95 (Fig. 6.6, círculos rojos).

- el perfil cromatográfico característico de la cepa SJ25 se presenta en la tabla 6.5, ya que 2 señales químicas pudieron ser adecuadamente identificada (Fig. 6.6, círculos rojos).

T.R. (min)	IDENTIFICACIÓN	FIGURA
2,29	(sin identificación)	
2,45	(identificación no lógica)	
4,40	(sin identificación)	
13,89	octanonitrilo	II.6. (ANEXO II)
15,54	2-isononenal	II.7. (ANEXO II)

Tabla 6.5. Tiempos de retención e identificación correspondiente a los compuestos volátiles característicos de la cepa SJ25.

■ el perfil cromatográfico de la cepa SJ48 se caracterizó por la presencia de los compuestos correspondientes a los tiempos de retención: 1,83; 3,17; 6,05; 15,83 y 17,95 (Fig. 6.6, círculos rojos).

■ el perfil cromatográfico de la cepa nativa SJ16 se caracterizó por la presencia del compuesto correspondiente al tiempo de retención 15,84 (Fig. 6.7, círculos rojos).

■ el perfil cromatográfico de la cepa nativa SJ32 se caracterizó por la presencia del compuesto correspondiente al tiempo de retención 12,97 (Fig. 6.7, círculos rojos).

En línea general, se puede decir que en el análisis de identificación de mVOCs de las cepas rizosféricas fluorescentes perteneciente al género *Pseudomonas* estudiadas pudieron ser identificados compuestos característicos del grupo aislado y en particular, de alguna de ellas. Además, se encontró una mayor variedad y concentración en la emisión de compuestos volátiles de las cepas que promueven el crecimiento y producción de AE de plantas de menta (Fig. 6.6) con respecto a la emisión de mVOCs presentado por las cepas con actividad de biocontrol (Fig. 6.7). Estudios realizados en los últimos años demostraron la presencia de los compuestos identificadas en las muestras analizadas en VOCs emitidos por bacterias de distintos orígenes. El dimetil disulfuro se registró en emisiones de rizobacterias pertenecientes al género *Burkholderia* y demostró su capacidad de promover del crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Groenhagen y col., 2013). También se lo encontró aunque en menor concentración, en cepas de *Paenibacillus polymyxa*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. El mismo grupo de investigación registró el compuesto 1-undeceno en mVOCs de las mismas especies anteriormente mencionadas, no pudiéndole atribuir a una función promotora del crecimiento (Farag y col., 2006; Park y col., 2013; Song y Ryu, 2013). Los compuestos sulfurados son abundantes en el conjunto de mVOCs producidos por

microorganismos, en particular el dimetil disulfuro es un compuesto volátil producido por una gran variedad de bacterias tanto marinas como de suelo y puede dimerizar y oxidarse en el aire formando el dimetil trisulfuro (Schulz y Dickschant, 2007). En relación a la identificación de señales químicas como 1-undeceno y 2-isononenal, podemos decir que los compuestos de 9 átomos de carbono saturados con distintos niveles de oxidación, así como los compuestos con distintos niveles de saturación de 10 a 16 átomos de carbono han sido ampliamente descritos en un gran número de géneros bacterianas, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*. A estos tipo de compuesto se les ha atribuido funciones directas de promoción del crecimiento vegetal, principalmente en relación con *A. thaliana*, y funciones indirectas de biocontrol frente a varios fitopatógenos (Fernando y col., 2005; Groenhagen y col., 2013; Park y col., 2013; Song y Ryu, 2013). Además, se puede mencionar que los compuestos nitrogenados, como el octanitrilo, han sido también encontrados como componentes de VOCs microbianos (Schulz y Dickschant, 2007).

Cabe destacar que una menor diversidad química en el conjunto de VOCs no representa una menor actividad de la cepa que los produce. Estudios previos han demostrado que en algunos casos no es solamente un compuesto el responsable de la actividad PGPR estudiada, sino que se presenta un sinergismo entre más de uno los compuestos volátiles que componen la emisión. Si bien se ha atribuido generalmente, la función principal a los compuestos mayoritarios, ha podido comprobarse con el uso de estándares que para generar un mayor efecto de promoción del crecimiento, éste necesita encontrarse en el conjunto completo de mVOCs que caracterizan esa determinada cepa (Fernando y col., 2005; Farag y col., 2006; Radruppa y col., 2010; Groenhagen y col., 2013).

Acorde la identificación de la composición total de la emisión de VOCs característico de cada cepa PGPR analizada presentó dificultades, se puede concluir que el conjunto de señales químicas encontradas es único para cada una de ellas, aunque algunos compuestos volátiles estén presentes en más de una de las cepas aisladas. Estos resultados son muy interesantes si consideramos que se trata de bacterias que están íntimamente relacionadas entre sí, ya sea fenotípicamente como genotípicamente, además de haber sufrido una presión selectiva comparable al provenir de un mismo lugar de origen (Tabla 6.6).

CEPA	ANÁLISIS GENOTÍPICO				ANÁLISIS FENOTÍPICO
	ARDRA	ERIC	BOX	AFILIACIÓN	
SJ4	A1	E2	B1	<i>P. putida</i>	Grupo externo
SJ16	A2	E2	B1	<i>P. putida</i>	Grupo <i>P. putida</i>
SJ20	A2	E2	B1	--	Grupo <i>P. putida</i>
SJ25	A2	E5	B5	<i>P. putida</i>	Grupo <i>P. putida</i>
SJ31	A1	E2	B1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Grupo <i>P. putida</i>
SJ32	A1	--	B1	<i>P. putida</i>	Grupo <i>P. putida</i>
SJ48	A1	E2	B1	<i>P. putida</i>	Grupo <i>P. putida</i>
WCS417r	A3	E1	B1	<i>P. fluorescens</i>	Grupo <i>P. fluorescens</i>


Tabla 6.6. Características genotípicas y fenotípicas de las cepas nativas cuyos mVOCs han sido analizados.

Desde el punto de vista funcional, los efectos generados por cada conjunto de mVOCs analizado no fueron los mismos. Todas las bacterias estudiadas presentaron una actividad promotora del crecimiento vegetal con resultados distintos. Las cepas SJ16 y SJ32, cuyos mVOCs han demostrado actividad biocontroladora, no presentaron una mejora evidente de la biomasa y producción de AE. Del mismo modo, se observó que las cepas SJ04, SJ25 y SJ48 cuyos VOCs demostraron actividad PGPR directa sobre plantas de menta, no presentaron una actividad de biocontrol destacada. Profundizando más aún, se puede decir que el aumento en la producción de AE generado por cada una de ellas fue variable. SJ25 fue capaz de aumentar la producción de AE totales, SJ04 fue capaz de aumentar la producción del monoterpeno mentol y SJ48 fue capaz de aumentar la producción del monoterpeno limoneno. Entonces, se puede concluir que los conjuntos de volátiles obtenidos para las cepas nativas analizadas fueron distintos entre sí y generaron, a su vez, distintos efectos en plantas de menta micropropagadas.



Capítulo 7

*Resultados y Discusión:
Bioensayos de inoculación directa en
plantas de menta con *Pseudomonas*
fluorescentes nativas.*



Capítulo 7 - Resultados y Discusión:

Bioensayos de inoculación directa en plantas de menta con *Pseudomonas* fluorescentes nativas.

Se realizaron ensayos de inoculación directa en el medio de cultivo de plantas de *M. piperita* micropropagadas. Las cepas fueron escogidas en base al aumento en la producción de AE mediado por mVOCs. Las cepas seleccionadas (SJ04, SJ25, SJ48 y WCS417r) fueron inoculadas por inclusión en el medio de cultivo de crecimiento vegetal a una concentración de 10^5 UFC/placa.

7.1. Influencia de la inoculación directa sobre la biomasa de plantas de menta.

Al cabo de 30 días de crecimiento se cosecharon las plantas y se registraron los siguientes parámetros: longitud y peso seco de raíz, longitud y peso fresco de la parte aérea, número de nudos, ramificaciones, hojas y tricomas glandulares. Los resultados estadísticamente significativos fueron graficados en la figura 7.1. Los datos relativos a los restantes parámetros analizados se presentan en la figura 7.1.

TRATAMIENTOS	LONGITUD RAÍZ (cm)	LONGITUD TALLO (cm)	PESO FRESCO PARTE AÉREA (mg)	NÚMERO NUDOS	NÚMERO RAMIFICACIONES
CONTROL	2,05 ± 0,36	5,15 ± 0,50	233,33 ± 56,24	8,25 ± 0,75	0,25 ± 0,25
WCS417r	2,24 ± 0,36	5,34 ± 0,52	322,91 ± 40,69	7,78 ± 0,46	1,11 ± 0,31
SJ04	0,98 ± 0,11	4,16 ± 0,22	270,30 ± 46,23	7,25 ± 0,25	0,75 ± 0,25
SJ25	1,87 ± 0,39	4,69 ± 0,51	220,53 ± 30,04	7,43 ± 0,57	0,57 ± 0,20
SJ48	1,74 ± 0,24	5,40 ± 0,44	281,54 ± 24,90	7,90 ± 0,28	0,50 ± 0,17

Tabla 7.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de menta inoculadas con cepas PGPR nativas ($p \geq 0,05$). Se realizaron 5 réplicas por cada una ($N = 2$).

En respuesta a la inoculación directa de plantas de menta, se produjeron diferencias estadísticamente significativas en parámetros como peso fresco de la raíz, número de hojas y número de tricomas glandulares (Fig. 7.1). La estimulación del crecimiento en relación a los parámetros de biomasa a nivel de raíz y de hoja podría atribuirse a que existe una mayor cercanía de las bacterias a la raíz, en consecuencia de la inclusión de las mismas al medio de cultivo vegetal, por lo cual pueden intercambiarse compuestos que estimulen el crecimiento vegetal con mayor facilidad. Los efectos producidos, por la inoculación con rizobacterias benéficas, en general, está ocasionado entre distintos factores, por la producción de hormonas como auxinas y

citocininas, que incrementan la división y elongación celular, la expansión de los tejidos y la iniciación de raíces laterales. De este modo se incrementa la superficie de intercambio con el suelo, lo que resulta en una mayor la permeabilidad de membrana, mejorando la absorción de nutrientes, disponibilidad de fosfato y/o de nitratos (Kloepper, 1993; Zhang y col., 2007). En los ensayos realizados en placas tabicadas, se observó que mVOCs son capaces de incrementar la biomasa de la parte aérea, el mismo no estuvo mediado por un aumento en el número de hojas, (Fig. 6.1). En este tipo de ensayo no se presentó una estimulación de la biomasa radicular.

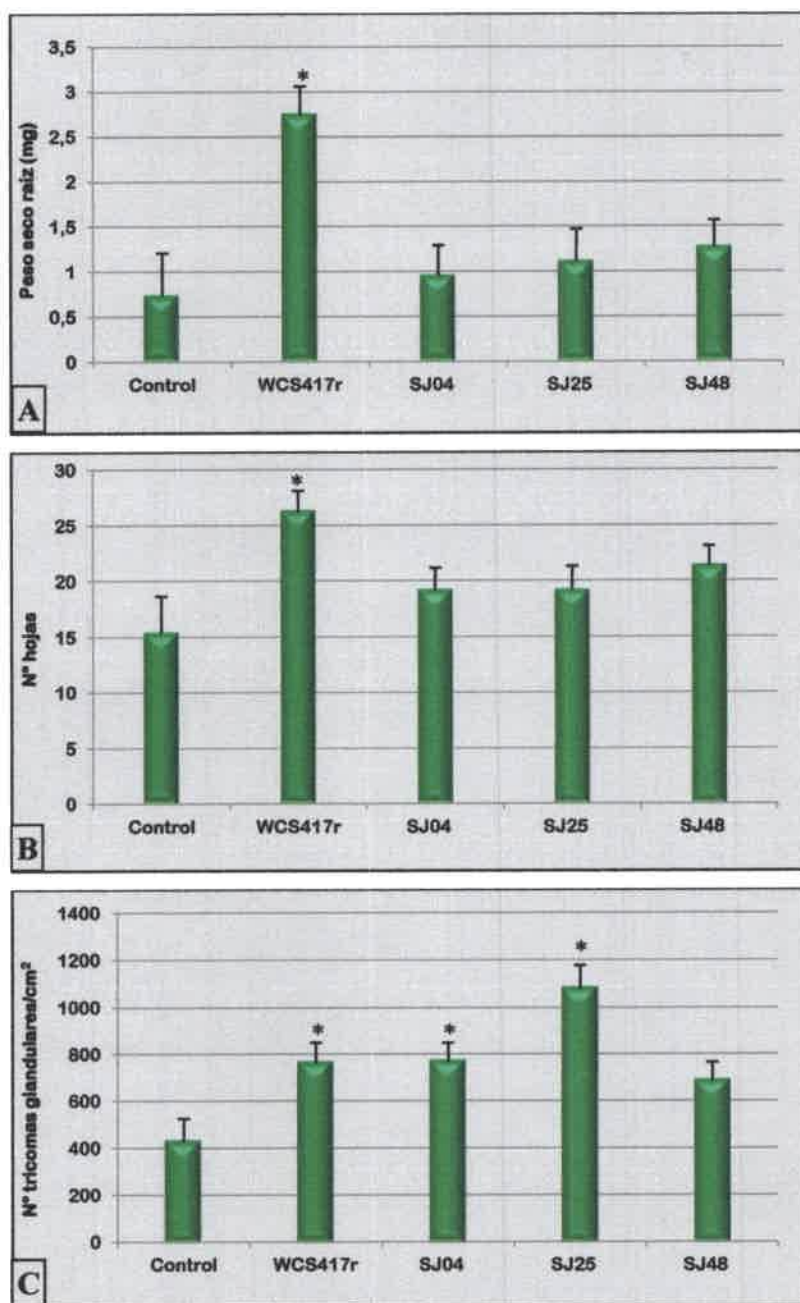


Fig. 7.1. Efecto de la inoculación de bacterias fluorescentes aisladas de rizósfera de menta sobre parametros de crecimiento vegetal de plantas de menta micropropagadas. A.- Peso seco de la raíz; B.- Número de hojas; C.- Número de tricomas glandulares. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 5 réplicas por cada una (N = 2).

En relación al número de tricomas glandulares se observa una diferencia significativa entre los tratamientos realizados, mostrando un incremento de 2,5 veces en plantas inoculadas con la cepa SJ25. Estos datos no pueden ser corroborados con los de plantas expuestas a mVOCs en placas tabicadas ya que es un parámetro que no fue analizado.

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo ensayos de la inoculación directa con cepas PGPR en otras plantas aromáticas, observándose un incremento de biomasa vegetal. Ensayos llevados a cabo en orégano (*Origanum × majoricum*) inoculadas con *P. fluorescens*, *B. subtilis* y *A. brasilense* han mostrado un incremento similar en el peso fresco del tallo y en el peso seco de la raíz (Banchio y col., 2010). Efectos similares han sido registrados en plantas de mejorana (*Origanum majorana*) (Banchio y col., 2008) y de *Tagetes minuta* (Cappellari y col., 2013) inoculadas con *P. fluorescens*, incrementando también el número de hojas y el número de raíces secundarias. De igual modo, ha sido observado también en ensayos a campo, una promoción del crecimiento en plantas de frambuesa (*Rubus idaeus*) inoculadas con dos cepas de *B. subtilis*, M3 y OSU-142 (Orhan y col., 2006), así como en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* cv. bluecrop) inoculadas con *P. fluorescens* Pf 5 (De Silva y col., 2000) y en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) inoculadas con *B. subtilis* 101 y *A. brasilense* Sp245, este último, presentando también un incremento en la longitud del tallo y número de nudos (Felici y col., 2008).

Por lo tanto, hasta el momento es escasa la bibliografía de estudios sobre la comprobación de efectos de promoción del crecimiento vegetal en respuesta a la exposición de plantas de menta a mVOCs y a la inoculación directa con bacterias promotoras del crecimiento. Ensayos realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la inoculación directa de plantas de albahaca con *B. subtilis* GB03 favorece el incremento del desarrollo vegetal mientras que la emisión de mVOCs beneficia la producción de AE (Banchio y col., 2008; Banchio y col., 2009; Banchio y col., 2010).

La promoción del crecimiento observada en cultivos de importancia agronómica, como consecuencia de la inoculación con bacterias PGPR, puede resultar de un aumento en la producción bacteriana de hormonas vegetales, de la permeabilidad de membrana o de la disponibilidad de minerales como fosfato, hierro y/o de nitratos (Kloepper, 1993). En ausencia de contacto entre las bacterias promotoras y las plantas de estudio, sólo pequeños compuestos volátiles pueden desencadenar las respuestas de la planta. En base a la metodología empleada y las características del medio de cultivo, se puede deducir

que de los mecanismos PGPR evaluados anteriormente (Fig. 6.1), solamente la producción de AIA bacteriana podría estar involucrada como mecanismo potencial adicional a la producción de mVOCs, al no existir limitaciones en el medio de cultivo con respecto al contenido de hierro y de fósforo. Esto es interesante ya que posiblemente exista otro mecanismo que sumado a la producción de mVOCs logren influir sobre el desarrollo vegetal. De las cepas seleccionadas solamente SJ48 es capaz de producir AIA y curiosamente, esta bacteria no presenta una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los parámetros analizados (Pilet y Saugy 1987; Dobbelaere y col., 1999; Patten y Glick, 2002).

Una mejor perspectiva se obtendría detectando la región de ingreso de los mVOCs a la planta, es decir si ocurre a través de la raíz, medio de soporte natural de las bacterias rizosféricas, o directamente a través de los estomas foliares. Se han realizados distintos ensayos para poner a punto la concentración de agar en el medio de cultivo vegetal para inoculación por inclusión, ya que placas con un contenido de agar normal para el medio de cultivo MS (0,7%) no se observaban diferencias en la biomasa de las plantas controles y los tratamientos. Este efecto pone en evidencia algún tipo de impedimento en la difusión de los VOCs a través del medio de cultivo. A medida que la concentración de agar disminuye el efecto es más evidente, mejorando la difusión de los mismos y, por lo tanto, el contacto con la superficie vegetal.

7.2. Influencia de la inoculación directa sobre la producción de AE de plantas de menta.

Sucesivamente, se realizó una caracterización de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales producidos en los distintos tratamientos. Los datos obtenidos de la extracción y sucesivo análisis se muestran en la figura 7.2.

En relación al contenido total de los AE, podemos decir que se obtuvo una diferencia significativa con respecto al control, sólo en plantas inoculadas con la cepa de referencia *P. fluorescens* WSC417r y la cepa nativa SJ04, mostrando un incremento del 187% y 115% respectivamente (Fig. 7.2. A). Estos mismos tratamientos registraron también un mayor número de tricomas glandulares (Fig. 7.1. C), lugar donde se produce la biosíntesis de AE. Los resultados obtenidos coincidieron con los encontrados en los ensayos presentados en el capítulo 4 realizados cepas promotora del crecimiento de referencia pertenecientes a distintos géneros, en los cuales el tratamiento con *P. fluorescens* WCS417r aumentó el contenido de AE totales (Fig. 6.2. A).

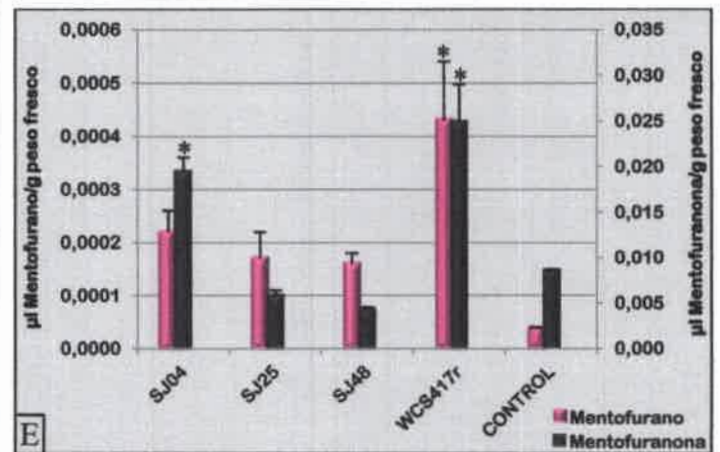
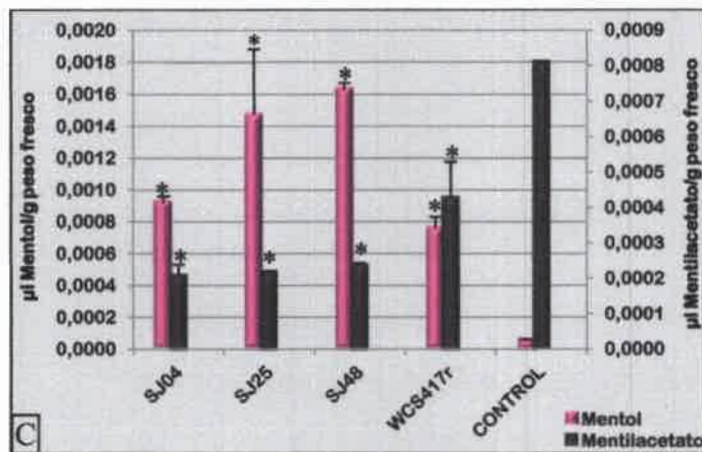
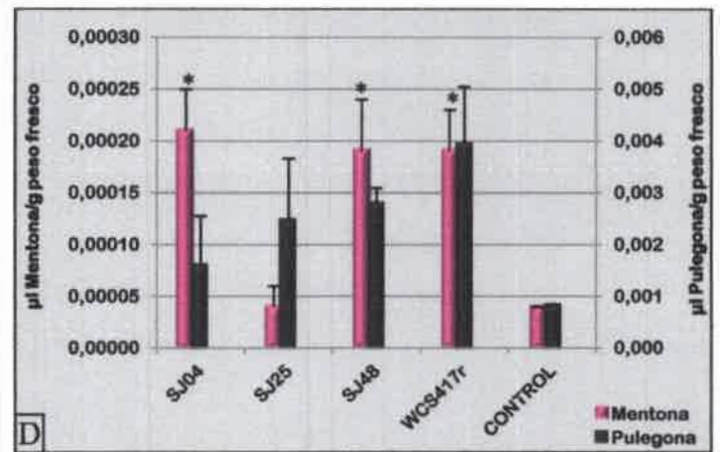
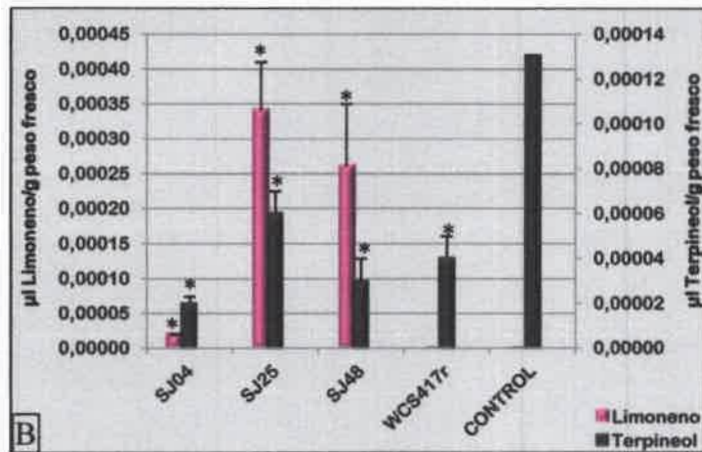
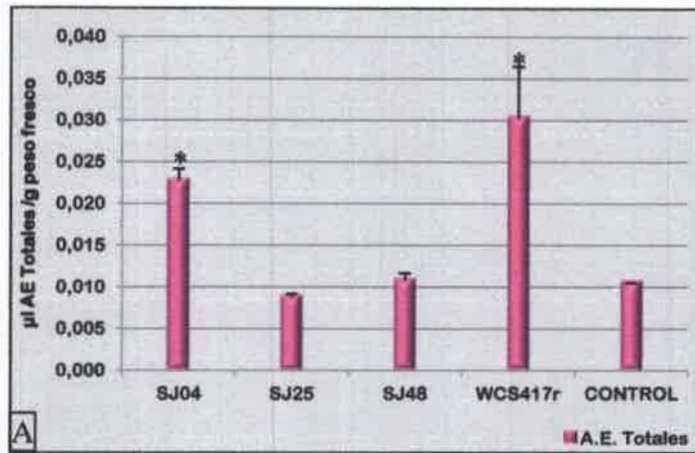


Fig. 7.2. Efecto de la inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas sobre la producción total aceites esenciales y sus componentes mayoritarios en plantas de menta micropropagadas. A.- AE totales; B.- limoneno y terpineol; C.- mentol y mentilacetato; D.- mentona y pulegona; E.- mentofurano y mentofuranona. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p \leq 0,05$). Se realizaron 5 réplicas por cada una (N = 2).

Con respecto a los componentes mayoritarios, en el contenido de limoneno se observó un aumento estadísticamente significativo en los tratamientos SJ04, SJ25 y SJ48 con respecto al control y al tratamiento *P. fluorescens* WCS417r, ya que no

presentaron un contenido del mismo detectable a través de la metodología seleccionada (Fig. 7.2. B). Estos resultados confirman el aumento en el contenido de dicho monoterpeno obtenido en el tratamiento de plantas de menta con mVOCs producidos por las mismas cepas nativas. La falta de contenido de limoneno en la parte aérea de los tratamientos control y *P. fluorescens* WCS417r no fue observado anteriormente (Fig. 6.2 B). Esto puede ser debido a la baja cantidad de AE totales presentes en las plantas control, lo cual no se aplicaría para el tratamiento con la cepa de referencia, para ello se puede inducir que el limoneno producido por estas plantas estaría íntegramente dirigido a la producción de los productos finales de la vía biosintética y no alcanzaría a acumularse a niveles detectables por el sistema.

En la figura 7.2. B se puede observar también que el contenido de terpineol se redujo en todos los tratamientos con respecto al control, mostrando una disminución hasta un valor del 85% en las plantas inoculadas con la cepa SJ04. Esta reducción en el contenido de dicho monoterpeno no fue observada anteriormente en los ensayos de producción de mVOCs realizados en placas tabicadas (Fig. 6.2. C).

En relación al contenido de los monoterpenos que dan valor a los aceites esenciales, se observó un aumento en el contenido de mentona (Fig. 7.2. D) y mentol (Fig. 7.2. C) de hasta aproximadamente 4 veces y 25 veces respectivamente con respecto al control, en los tratamientos SJ04, SJ48 y *P. fluorescens* WCS417r. El tratamiento SJ25 sólo presentó aumento en el contenido de mentol con respecto al control. En los ensayos realizados anteriormente con las mismas cepas en plantas de menta expuestas a mVOCs no se observó aumento en el contenido de mentona (Fig. 6.2. B), pero el tratamiento con SJ04 confirmó el aumento en el contenido de mentol, si bien el mismo nivel de incremento no fue el mismo (Fig. 6.2. C).

En relación al contenido de los monoterpenos que representan una desviación en la vía biosintética del mentol (Fig. 1.6), como mentilacetato, mentofurano y mentofuranona, podemos decir que se presentó solo una reducción en el contenido de mentilacetato en todos los tratamiento hasta alcanzar un valor de 75% con respecto al contenido de las plantas control (Fig. 7.2. C). Del mismo modo, el contenido de mentofuranona mostró un incremento en los tratamientos con SJ04 y *P. fluorescens* WCS417r del 125% y 188%, respectivamente. Mientras que el contenido de mentofurano aumentó de 10 veces sólo en las plantas inoculadas con la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r. Los datos obtenidos no muestran similitud con los ensayos realizados anteriormente en placas tabicadas de evaluación de la producción de

AE en plantas de mentas expuestas a mVOCs (capítulo 6), en los cuales no se observaron variaciones estadísticamente significativa en el contenido de mentilacetato y mentofuranona, sin embargo si se observó una disminución en el contenido de mentofurano (Fig. 6.2 C y D). Curiosamente, en el mismo tipo de ensayo realizado con distintas cepas de referencia presentado en el capítulo 4, la exposición de plantas de menta a mVOCs producidos por la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r presentó un aumento en el contenido de mentofurano.

En la tabla 7.2 se muestran los datos de porcentajes relativos de los componentes mayoritarios. En línea general, se puede decir que las variaciones observadas en el contenido de terpineol, mentol y mentilacetato están acompañadas también por una variación en la composición general de los AE.

El tratamiento con SJ04 presenta una diferencia estadísticamente significativa sólo en el contenido de terpineol y mentilacetato, que disminuyen sus porcentajes en relación al total de los AE presentes. Esta disminución no está acompañada por un aumento significativo en ningún monoterpeno de interés, por lo cual se puede deducir que los monoterpenos restantes aumentan proporcionalmente su contenido (Fig. 1.6).

CEPAS	LIMONENO	TERPINEOL	MENTONA	MENTOFURANO	MENTOL	PULEGONA	MENTIL ACETATO	MENTOFURANA NONA
SJ04	0,09%	0,1% *	0,90%	1,01%	4,09%	7,02%	0,94% *	85,85%
SJ25	2,97%	0,73% *	0,84%	1,85%	13,53% *	20,46%	2,02% *	57,60%
SJ48	2,31%	0,3% *	1,84%	1,51%	13,03% *	26,59%	2,28%	52,14%
WCS417r	0,00%	0,23% *	0,56%	1,83%	2,86%	23,04%	1,36% *	70,12%
CONTROL	1,08%	1,23%	0,58%	0,90%	4,16%	15,17%	4,51%	72,37%

Tabla 7.2. Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios analizados en plantas de menta micropropagadas inoculadas con las cepas de referencia y nativas pertenecientes al género *Pseudomonas*. * = diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. LSD Fischer, $p \leq 0,05$. Se realizaron 5 réplicas por cada una (N = 2).

Sin embargo, los tratamientos con SJ25 y *P. fluorescens* WCS417r variaron su composición de AE disminuyendo la presencia de terpineol y mentilacetato y aumentando a su vez la concentración de mentol en los mismos. Por lo cual se deduce que hay una estimulación de la producción de este monoterpeno. Del mismo modo, el tratamiento con SJ48, mostró una disminución en el contenido de terpineol y por otro lado, un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje relativo del monoterpeno mentol (Tabla 7.2). Interesantemente, los tratamientos con las cepas SJ04, SJ25 y SJ48 manifestaron una disminución estadísticamente no significativa, en el

porcentaje relativo de mentofuranona. Este monoterpeno representa un componente poco deseado en los AE de menta, por lo que se puede inferir que existiría una estimulación de la vía biosintética dirigida hacia la producción de los monoterpenos de interés, como lo es el mentol.

En conclusión, se puede decir que sólo las cepas SJ25 y SJ48 produjeron un efecto deseable a nivel de síntesis de AE en plantas inoculadas, ya que se obtuvo una cantidad relativamente alta de mentol y mentona, sin aumentar la presencia y en algunos casos reduciendo, la presencia de monoterpenos indeseados, como mentilacetato, mentofurano y mentofuranona. El tratamiento *P. fluorescens* WCS417r si bien aumenta la producción de AE totales y algunos de los componentes mayoritarios, gran parte de este aumento es debido a una mayor presencia en la composición final de productos indeseados, como lo es el compuesto mentofuranona. Ante todo lo expuesto anteriormente, se puede inferir que el incremento presentado en la producción de AE indicaría una inducción en los niveles biosintéticos de terpenos.

Los datos adquiridos mediante la inoculación directa con cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* de plantas de *M. piperita*, confirmaron los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio utilizando el mismo tratamiento en otras plantas aromáticas. La inoculación directa de plantas de *Tagetes minuta* (Cappellari y col., 2013) y de *Origanum x majoricum* (Banchio y col., 2010) con *P. fluorescens* produce un aumento tanto a nivel de la producción de AE totales, como de algunos de sus componentes mayoritarios. En otros grupos de investigación ha sido observado también un aumento en el contenido de AE en plantas de *Mentha arvensis* (Gupta y col., 2002), de orégano (Khaosaad y col., 2006) y de albahaca (*Ocimum basilicum*) inoculadas directamente con micorrizas, reportando este último trabajo, además, un aumento en el número tricomas glandulares (Copetta y col., 2006). Sin embargo, se conoce que el efecto PGPR, ejercido por micorrizas, es mediado por una extensión del sistema radicular de la planta, mejorando la absorción de nutrientes y la asimilación de fosfatos orgánicos (Bouwmeester y col., 2007).

En relación a los mecanismos que actúan en los tratamientos mediados por inoculación directa de bacterias PGPR de planta de menta, se puede suponer que influirían la producción y liberación de fitohormonas, sumado al reciente mecanismo descubierto de producción de mVOCs por parte de las mismas. Como mencionado anteriormente, solo la cepa SJ48 es capaz de producir AIA. Por lo tanto podemos inferir que ambos mecanismos podrían participar en la estimulación de la síntesis de

monoterpenos, aunque todavía no ha sido esclarecida la influencia de las fitohormonas sobre dicha vía metabólica.

7.3. Análisis multivariado de componentes principales.

A fin de relacionar los tratamientos realizados con los parámetros de promoción del crecimiento vegetal entre sí, se realizó un análisis multivariado de componentes principales, el primero con relación a los datos de biomasa vegetal y el segundo relativo a los datos de producción de AE.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, explica la estructura de varianza y covarianza mediante combinaciones lineales de las variables del sistema, reduciendo así el volumen de información. El ACP construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (CP1), la segunda varianza más grande es el segundo eje (CP2). Las componentes principales dependen solamente de la matriz de covarianza de las variables originales y su desarrollo no necesita un modelo estadístico para explicar la estructura probabilística de los errores, pero si puede suponerse una distribución multinormal de la población. Si las componentes derivan de normales multivariadas, son independientes y se interpretan en base a elipsoides de densidad constante (Di Renzo y col., 2001; Balzarini 2003). Este tipo de análisis permite así graficar una observación en planos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y co-variabilidad subyacente. Por lo tanto, se utiliza a fin de hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos, ordenarlas por importancia y/o identificar asociaciones entre observaciones, entre variables o entre variables y observaciones.

En la figura 7.3 se puede observar el gráfico resultante del análisis de correlación entre variables de biomasa medidas en plantas de *M. piperita* inoculadas con cepas nativas y la capacidad de las mismas de producir AIA. En este sentido, se plantearon como observaciones o casos los tratamientos realizados con su respectiva identificación, y como variables los datos respectivos a los parámetros de biomasa vegetal medidos luego de la inoculación y la capacidad microbiana productora de AIA.

El gráfico obtenido explica satisfactoriamente las variables analizadas, ya que las componentes principales generadas explican el 92% de la variabilidad presente en

los datos analizados. En el mismo, se pudo observar que las cepas SJ25 y SJ04 presentaron una mayor producción tanto de AIA como de tricomas glandulares, así como las cepas SJ48 y *P. fluorescens* WCS417r presentaron una mayor estimulación de la parte radicular y la parte aérea.

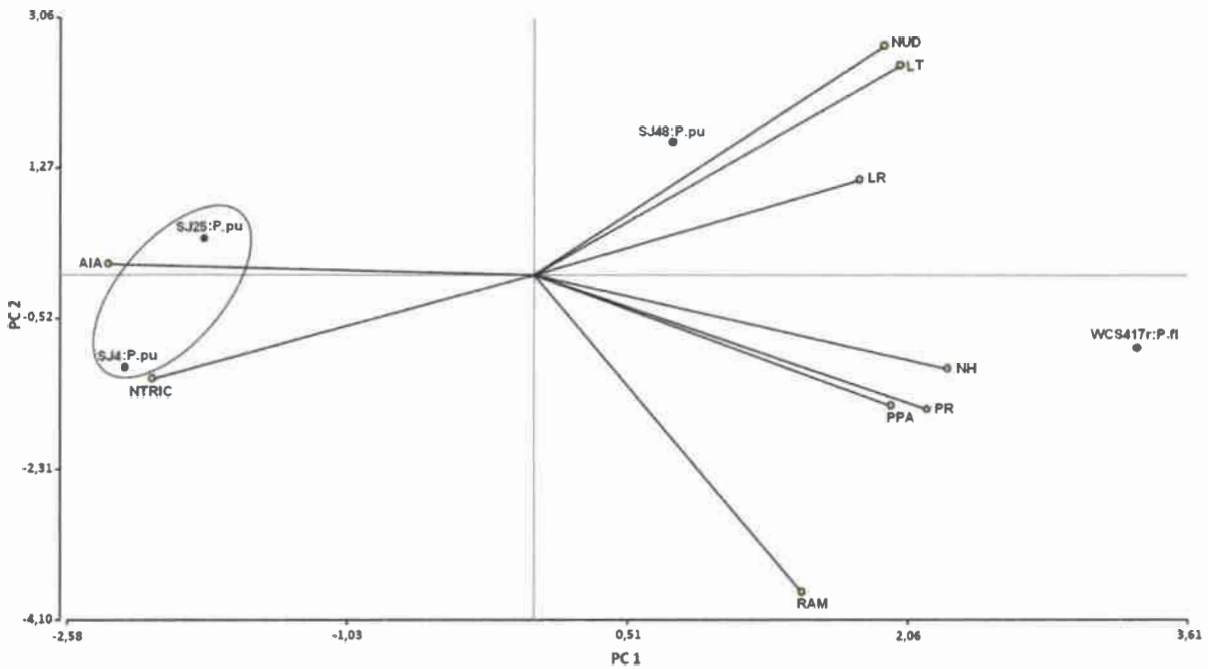


Fig. 7.3. ACP realizado con parámetros de biomasa vegetal de plantas de menta micropropagadas obtenidos por inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas. P.pu: *P. putida*; P.fl.: *P. fluorescens*; AIA: producción de AIA; NTRIC: número de tricomas; NUD: número de nudos; LT: longitud del tallo; LR: longitud de la raíz; NH: número de hojas; PR: peso seco de la raíz; PPA: peso fresco de la parte aérea; RAM: número de ramificaciones. El ACP fue obtenido utilizando el software InfoStat versión 2.0.

Con respecto al análisis de correlación entre variables estudiadas, esta es positiva cuando dibujan un ángulo agudo, mientras que es negativa si el ángulo dibujado es obtuso. Sorprendentemente, se observó que la producción bacteriana de AIA no se encuentra relacionada con los parámetros radiculares analizados como longitud y peso radicular, si bien existen numerosos estudios que han demostrado que la producción de auxinas por parte de rizobacterias, así como la adición exógena, aumentan y estimula el desarrollo radicular de distintos tipos de plantas. Sin embargo, el gráfico mostró que los parámetros de peso y longitud aérea están íntimamente correlacionados entre sí. Del mismo modo, el peso fresco de la parte aérea se encontró más íntimamente relacionado al número de hojas y ramificaciones que al número de nudos y longitud del tallo. Así

mismo, se observó que el número de ramificaciones no se relaciona con el número de nudos y la longitud del tallo. Adicionalmente, se pudo observar que existe una fuerte correlación entre la longitud del tallo y la longitud de la raíz así como entre el peso fresco de la parte aérea y el peso seco radicular, indicando que la biomasa radicular y aérea se hallan balanceadas y proporcionadas en el desarrollo vegetal.

Sucesivamente, se realizó un ACP relativo a los resultados obtenidos de producción de AE. En el mismo se plantearon como observaciones o casos los tratamientos con su respectiva identificación y como variables los datos respectivos al contenido de AE totales y componentes mayoritarios, así como la capacidad microbiana productora de AIA. Las componentes principales generadas con el análisis aplicado explican el 86% de la variabilidad de los datos analizados (Fig. 7.4).

En la figura 7.4 se puede observar que las cepas SJ25 y SJ48 presentaron una mayor producción de AIA y de mentol, así como la cepa SJ04 se distribuyó como mayor productora de mentona y la cepa *P. fluorescens* WCS417r como estimuladora principalmente del contenido de AE totales y de los componentes principales que representan una derivación de la vía de producción del mentol.

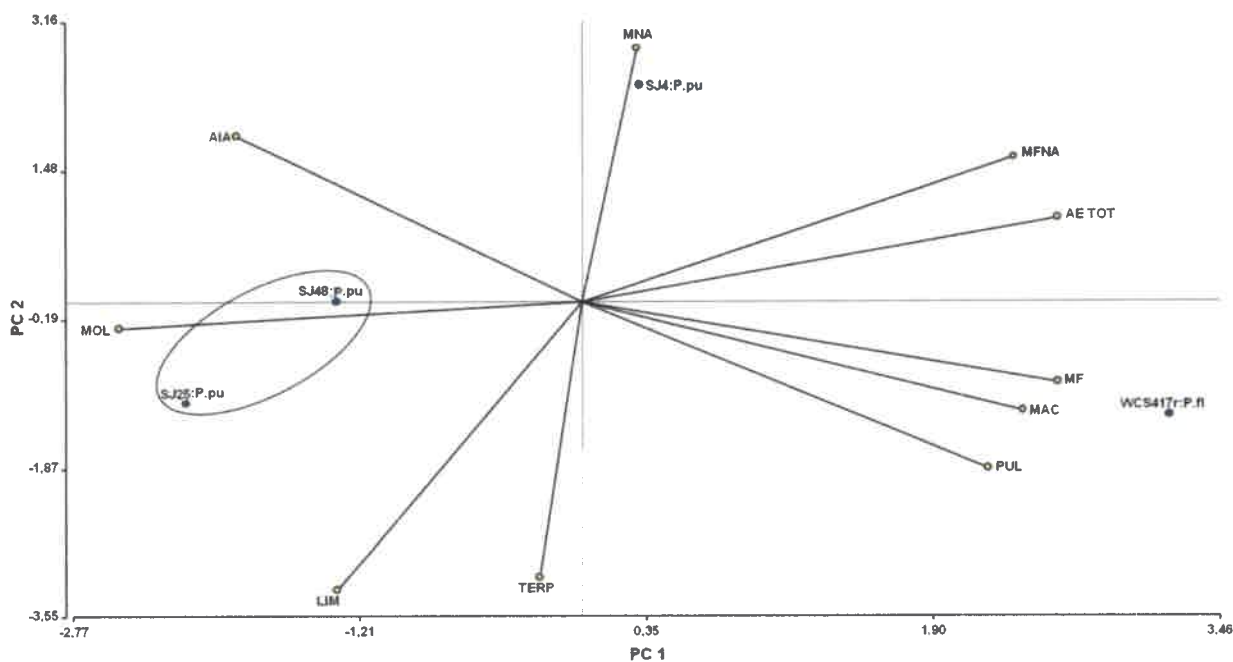


Fig. 7.4. ACP realizado con parámetros de producción de AE en plantas de menta micropropagadas obtenidos por inoculación directa con bacterias fluorescentes nativas. P.pu: *P. putida*; P.fl: *P. fluorescens*; AIA: producción de AIA; LIM: limoneno; TERP: terpineol; MNA: mentona; MOL: mentol; PUL: pulegona; MAC: mentil acetato; MF: mentofurano; MFNA: mentofuranona; AE TOT: AE totales. El ACP fue obtenido utilizando el software InfoStat versión 2.0.

Además, se pudo determinar el tipo de relación entre las variables analizadas, a través de la observación de los ángulos dibujados por las mismas. De este modo, se estableció que existe una fuerte correlación entre la producción bacteriana de AIA y la presencia de altos contenidos de los compuestos mentona y mentol. Igualmente, se comprobó que si bien los contenidos de estos componentes principales están correlacionados positivamente entre sí, ésta no es muy fuerte ya que el ángulo que presentan es cercano al 90°. Esta situación puede explicarse, en función de que la enzima responsable de la producción de mentol se encuentra regulada temporalmente por la maduración de los tricomas, y no sólo por la presencia de su precursor biosintético, es decir mentona. Se evidenció también, que existe una leve correlación entre la producción de AIA y el contenido de limoneno, que es el primer monoterpeneo de la vía. En conclusión, se puede interpretar que la producción microbiana de AIA estimularía los primeros y los últimos pasos de la vía biosintética del mentol.

Por el contrario, podemos observar que las variables antes mencionadas no presentan alguna correlación con el rendimiento total de AE, es decir que no influyen principalmente en el contenido total de monoterpeneos de las plantas de menta micropropagadas inoculadas. Es importante destacar que esta última variable se encuentra íntimamente relacionada con el contenido de mentofuranona, mentofurano, mentilacetato y pulegona, que son los componentes mayoritarios, la suma de éstos representa el 60% de los AE totales. De la misma manera, se infiere que el contenido de mentol encontró una correlación negativa (ángulos obtusos) con respecto al contenido de mentilacetato, mentofurano y mentofuranona, demostrando que la presencia de éstos últimos reduce el contenido del monoterpeneo mentol en el total de AE producidos. Igualmente, se deduce que el contenido de mentofurano, mentofuranona y mentona encontraron una correlación positiva con el contenido de pulegona, que representa el precursor de los mismos.

En general, se puede concluir que la síntesis rizobacteriana de auxinas como AIA afectaría positivamente la producción de AE, aumentando el número de tricomas glandulares y mejorando la producción de los mismo, principalmente a nivel de los primeros y últimos pasos de la vía biosintética. Deberían realizarse ulteriores estudios sobre la transducción de la señal a nivel vegetal que conlleva a un aumento de la síntesis de AE en plantas de menta.

Los resultados obtenidos en plantas de *M. piperita* micropropagadas inoculadas con cepas fluorescentes nativas se resumen en el esquema presentado en la figura 7.5.

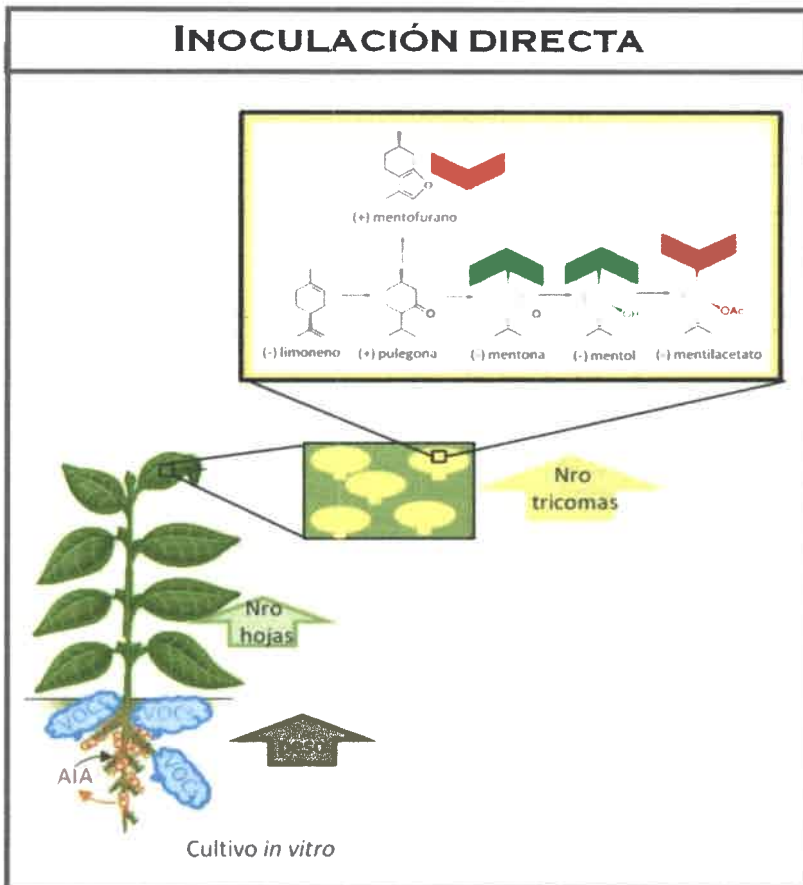


Fig. 7.5. Esquema representativo de los principales efectos PGPR encontrados por inoculación directa de plantas de *M. piperita* con cepas fluorescentes nativas.



Capítulo 8

Conclusiones



Capítulo 8: Conclusiones.

En base a los resultados obtenidos podemos finalmente concluir que:

Objetivo específico 1: *Identificar los principales compuestos orgánicos volátiles emitidos por las rizobacterias y evaluar su rol sobre el desarrollo vegetal.*

- ☞ El efecto en la promoción del crecimiento de VOCs emitidos por una determinada especie bacteriana no presentó el mismo efecto o el mismo grado de respuesta en ensayos realizados con plantas de menta, determinando que la respuesta es especie-específica de la interacción bacteria-planta.
- ☞ mVOCs producidos por la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r produjeron un efecto positivo en el desarrollo vegetal, a nivel radicular y foliar, así como también en la composición de los AE de plantas de *M. piperita* micropropagadas. En ellas se observó tanto un aumento en el contenido de AE totales como así también en sus componentes mayoritarios mentona, pulegona y mentofurano, sugiriendo que existe una acumulación de monoterpenos precursores del mentol, producto final de la vía biosintética.
- ☞ mVOCs de *B. subtilis* GB03 no produjeron ningún efecto en el contenido de aceites esenciales de plantas de *M. piperita*, a pesar del efecto positivo presentado a nivel de biomasa, aumentando tanto en la superficie radicular como foliar.
- ☞ mVOCs emitidos por *A. brasilense* Sp7 no produjeron efectos a nivel de biomasa de plantas de menta, pero sí a nivel de la producción de AE, aumentando el contenido de mentona y disminuyendo el contenido de mentol y mentofurano.
- ☞ El género *Pseudomonas* produce mVOCs característicos, que no se observaron en los controles realizados con *E. coli* DH5α y *B. subtilis* GB03.
- ☞ El conjunto de VOCs que se obtuvo de las bacterias pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes analizadas es específico para cada una de ellas.
- ☞ Algunos compuestos presentes en la emisión de mVOCs de cepas fluorescentes nativas y de referencia se definieron como típicos del género *Pseudomonas*, y se identificaron como etanotiol, dimetil disulfide y 1-undeceno.
- ☞ Otros componentes del conjunto de mVOCs emitidos por las cepas nativas de identificaron como típicos para cada una de ellas, entre los cuales se identificaron el compuesto octanonitrilo y 2-isononenal para la cepa SJ25.

Objetivo específico 2: Aislar y caracterizar bacterias benéficas de la rizósfera de plantas aromáticas.

- ☞ En base a la caracterización fenotípica y genotípica de tipo ARDRA, aproximadamente el 60% de las cepas nativas aisladas de suelo rizosférico de cultivares de *M. piperita* de Traslasierra se agruparon con *P. putida* KT2440.
- ☞ Los análisis de diversidad intraespecífica de tipo de rep-PCR marcaron una gran heterogeneidad dentro de este grupo.
- ☞ El análisis de tipo BOX-PCR fue más apropiado para evidenciar diferencias más finas en el genoma de las cepas fluorescentes aisladas de rizósfera de *M. piperita*. BOX-PCR generó un mayor número de marcadores moleculares, hecho que permitió diferenciar mejor entre las cepas fluorescentes nativas aisladas, produciendo un mayor grado de agrupación y una mayor similitud entre ellas.
- ☞ A partir del análisis de las secuencias de nucleótidos de tipo BLAST del gen *ARNr 16S* se determinó que las cepas fluorescentes nativas analizadas encuentran identidad dentro del género *Pseudomonas*, confirmando la metodología de aislamiento de las mismas.
- ☞ *P. putida* se confirmó como la principal especie fluorescente presente en la rizósfera de plantas de menta, resultado validado a través del análisis de la secuencia de nucleótidos de tipo BLAST del gen *ARNr 16S* y de la construcción del árbol filogenético de las cepas nativas aisladas.
- ☞ Solo la cepa SJ7b encontró identidad con la especie *P. fluorescens*, dato concordante con los análisis fenotípicos y genotípicos realizados.
- ☞ Si bien las cepas SJ04, SJ08 y SJ46 encontraron identidad como *Pseudomonas* sp, mostraron mayor cercanía filogenética con *P. fluorescens* respecto a *P. putida*, estos resultados son concordantes con los análisis fenotípicos y genotípicos realizados.

Objetivo específico 3: Establecer los principales mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal.

- ☞ Las cepas nativas aisladas presentaron capacidad solubilizadora de fosfato y productora de sideróforos, representando mecanismos que podrían ayudar al crecimiento de las plantas en épocas de escasa presencia de nutrientes en el medio, fósforo y hierro respectivamente.

- ☞ Las cepas nativas aisladas también exhibieron actividad productora de AIA, representando uno de los mecanismos de acción de promoción directa del crecimiento vegetal en condiciones naturales.
- ☞ El efecto en la promoción del crecimiento de mVOCs emitidos por algunas cepas pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes no presentó el mismo efecto o el mismo grado de respuesta con respecto a las demás, determinando que la respuesta no solamente es especie-específica de la interacción bacteria-planta o fitopatógeno-bacteria PGPR, sino que depende en mayor grado de la cepa utilizada.
- ☞ mVOCs producidos por las cepas nativas SJ16 y SJ32 presentaron una destacada capacidad biocontroladora del fitopatógeno *A. alternata* RC21, disminuyendo hasta un 70% el diámetro de su crecimiento.
- ☞ La producción de mVOCs de las cepas nativas aisladas presentaron un efecto positivo en la biomasa de plantas de menta micropropagadas, aumentando el peso de la parte aérea.
- ☞ La exposición de plantas de menta micropropagadas a VOCs emitidos por estas mismas bacterias fluorescentes nativas produjeron un aumento en el contenido de aceites esenciales totales (SJ25 y SJ27) y de los compuestos mayoritarios limoneno (SJ04, SJ7b, SJ28 y SJ48) y mentol (SJ04).
- ☞ El conjunto de mVOCs sintetizados por el resto de las cepas nativas aisladas (SJ10, SJ38, SJ40 y SJ46) no produjeron ningún efecto en el contenido de aceites esenciales de plantas de *M. piperita*, a pesar del efecto positivo producido a nivel de peso fresco de la parte aérea.
- ☞ Los mVOCs producidos por la cepa de referencia *P. fluorescens* WCS417r causaron un menor efecto en la estimulación de la producción de aceites esenciales con respecto a las *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de rizósfera de menta.

Objetivo específico 4: *Evaluar los efectos de la inoculación con distintos PGPR sobre aspectos relacionados al crecimiento vegetal tales como: biomasa, producción de aceite esencial y desarrollo de pelos glandulares.*

- ☞ La concentración de agar en el medio de cultivo vegetal dificultó la difusión de los VOCs cuando las bacterias se encuentran inoculadas en el mismo, disminuyendo el efecto PGPR generado a través de este mecanismo.

- ☛ La inoculación directa de las cepas PGPR en el medio de cultivo de plantas de menta no produjo los mismos resultados que la sola exposición a los VOCs producidos por las mismas.
- ☛ La inoculación directa con las cepas fluorescentes promotoras del crecimiento vegetal ya sea de referencia como nativas, generó un aumento en la biomasa radicular y foliar, aumentando el peso seco de la raíz y el número de hojas.
- ☛ Cepas fluorescentes inoculadas en el medio de cultivo vegetal fueron capaces de aumentar el número de tricomas glandulares presentes en hojas de menta micropropagadas por milímetro cuadrado de la superficie foliar.
- ☛ La inoculación directa de plantas de menta con las cepas nativas SJ25 y SJ48 pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de mejorar la composición de AE producidos, aumentando el contenido y el porcentaje relativo de mentol y mentona, disminuyendo al mismo tiempo la presencia de los monoterpenos no deseados.
- ☛ El análisis multivariado de componentes principales demostró que la producción de AIA por parte de las cepas nativas estudiadas, se encuentra íntimamente relacionada con el número de tricomas glandulares y el contenido de mentol y mentona en la composición general de AE de menta luego de la inoculación de plantas de *M. piperita* con las mismas.



Capítulo 9

Perspectivas



Capítulo 9: Perspectivas futuras.

El trabajo realizado deja planteadas numerosas preguntas de carácter básico sobre los mecanismos a través de los cuales las bacterias promueven el crecimiento de las plantas de *M. piperita*, utilizado en este caso como planta aromática modelo. Entre los aspectos a elucidar se considera necesario:

- ⊕ Esclarecer la región de ingreso de los compuestos orgánicos volátiles microbianos a las plantas de menta, es decir si esto ocurre a través de la raíz o directamente de hoja mediante los estomas.
- ⊕ Estudiar el efecto de inoculación directa en suelo de filtrados de VOCs producidos por cepas nativas fluorescentes con actividad de promoción del crecimiento, a fin de poder evitar las dificultades encontradas en cultivos *in vitro*, y así lograr analizar la influencia de VOCs en condiciones naturales sobre el metabolismo vegetal.
- ⊕ Determinar la influencia de VOCs producidos por cepas nativas sobre la actividad enzimática de la vía de biosíntesis de monoterpenos.
- ⊕ Analizar los posibles mecanismos de transducción de señal desencadenados en la planta cuando ésta se encuentra en contacto con VOCs bacterianos que producen un aumento de la síntesis de monoterpenos.



Capítulo 10

Bibliografía



Capítulo 10: Bibliografía

- Achouak W., Thiery J.M., Rouband P., Heulin T.** 2000. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 11-19.
- Alberghini S., Battisti A., Squartini A.** 2008. Monitoring a genetically modified *Pseudomonas* sp. released on pine leaves reveals concerted successional patterns of the bacterial phyllospheric community. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 415-422.
- Ali N.J., Kessel D., Miller R.F.** 1995. Bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Genitourin. Med.* 71(2): 73-77.
- Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C.I.** 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals Bot.* 97: 883-893.
- Alonso J.** 1998. *Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas*. ISIS, Madrid.
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amann G., Stetter K.O., Llobet-Brossa E., Amann R., Anton J.** 2000. Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. *Extremophiles* 4(6): 373-376.
- Amelunxen F., Wahlig T., Arbeiter H.** 1969. Über den Nachweis des ätherischen öls in isolierten Drüsenhaaren und Drüsenhäutchen von *Mentha piperita* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 61: 68-72.
- Anzai Y., Kim H., Park J-P., Wakabayashi H., Oyaizu H.** 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589.
- Anzuay M.S., Frola O., Angelini J.G., Ludueña L.M., Fabra A., Taurian T.** 2013. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis* 60(2): 143-154.
- Ascensão L. y Pais M.S.** 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann. Bot.* 81: 263-271.

- Babalola, O.O.** 2010a. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32(11): 1559-1570.
- Babalola O.O.** 2010b. Ethylene quantification in three rhizobacterial isolates from *Striga hermonthica*-infested maize and sorghum. *Egypt. J. Biol.* 12: 1-5.
- Bagdasarian M. y Timmis K.N.** 1981. *Host: vector system for gene cloning in Pseudomonas*. In W. Goebel y P. H. Hofschneider (ed.), Current topics of microbiology and immunology. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 47-67.
- Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M.** 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9: 26-32.
- Balzarini M.** 2003. Aplicaciones del análisis estadístico multivariado. Material teórico. Maestría en estadística aplicada, Universidad Nacional de Córdoba.
- Banchio E., Bogino P.C., Santoro M., Torres L., Zygadlo J., Giordano W.** 2010. Systemic induction of monoterpene biosynthesis in *Origanum × majoricum* by soil bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 58(1): 650-654.
- Banchio E., Bogino P.C., Zygadlo J., Giordano W.** 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 36(10): 766-771.
- Banchio E., Valladares G., Zygadlo J., Bogino P., Rinaudi L., Giordano W.** 2007. Changes in essential oil composition and volatile emission of *Minthostachys mollis*, induced by feeding punctures of *Liriomyza huidobrensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 68-74.
- Banchio E., Xie X., Zhang H., Paré P.W.** 2009. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.* 57(2): 653-657.
- Barriuso J., Ramos Solano B., Santamaría C., Daza A., Gutiérrez Mañero F.J.** 2008. Effect of inoculation with putative PGPR isolated from *Pinus* sp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *J. Appl. Microbiol.* 105(5): 1298-1309.
- Bhattacharyya, P.N. y Jha D.K.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Boller T., Eberl L. Weisskopf L.** 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 13(11): 3047-3058.

- Boerjan W., Cervera M.T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Onckelen H.V., Montagu M.V., Inze D.** 1995. Superroot, a Recessive Mutation in *Arabidopsis*, Confers Auxin Overproduction. *Plant Cell* 7(9): 1405-1419.
- Bogino P., Abod A., Nievas F., Giordano W.** 2013. Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the Alfalfa rhizosphere. *PlosOne* 8(11): e79614.
- Bohlmann J. y Keeling C.I.** 2008. Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54(4): 656-669.
- Bosco M., Lumini E., Normand P.** 1996. PCR-RFLP direct fingerprinting of uncultured *Frankia* microsymbiont from *Dryas drummondii* nodules. *Ann. Microbiol. Enzim.* 46: 115-123.
- Bouwmeester H.J., Roux C., Lopez-Raez J.A., Becard G.** 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* 12: 224-230.
- Braun B., Böckelmann U., Grohmann E., Szewzyk U.** 2006. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with *in situ* and culture-dependent methods. *Appl. Soil Ecol.* 31: 267-279.
- Brick J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E.** 1991. Rapid insitu assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Bruneton J.** 1991. *Elementos de Fitoquímica.* Acribia.
- Cappellari L.R., Santoro M.V., Nievas F., Giordano W. Banchio E.** 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.* 70: 16-22.
- Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J.** 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 1670-1680.
- Chen F., Ro D-K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E., Tholl D.** 2004. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiol.* 135: 1956-1966.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C., Lugtenberg B.J.J.** 2000. Root colonization is essential for biocontrol of tomato foot and root rot by the phenazine-1-carboxamide-producing bacterium

- Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1340-1345.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I., Vainstein A.** 2011. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. *Environ. Microbiol. Rep.* 3: 698-704.
- Collado M.A., Di Lascio M., Scandaliaris J., Ahmed M.** 2003. Características del mercado de plantas aromáticas. *Avance Agroind.* 24(4): 33-35.
- Copetta A., Lingua G., Berta G.** 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 16: 485-494.
- Crews T.E. y Peoples M.B.** 2004. Legume versus sources of nitrogen: ecological tradeoff and human needs. *Agr. Ecosys. & Environ.* 102: 279-297.
- Croteau R.** 1987. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87: 929-954.
- Croteau R.B., Davis E.M., Ringer K.L., Wildung M.R.** 2005. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92: 562-577.
- Davis E.M., Ringer K.L., McConkey M.E., Croteau R.** 2005. Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant Physiol.* 137(3): 873-881.
- De Silva A., Patterson K., Rothrock C., Moore J.** 2000. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. *Hortscience* 35(7): 1228-1230.
- De Vos P. y De Ley J.** 1983. Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 33: 487-509.
- De Vos P., Goor M., Gillis M., De Ley J.** 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 35: 169-184.
- De Vos P., Van Landschoot A., Segers P., y col.** 1989. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by desoxyribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 39: 35-49.

- Degenhardt J., Köllner T.G., Gershenzon J.** 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem.* 70: 1621-1637.
- Di Renzo J.A., Casanoves F., Gonzalez L.A., Tablada E.M., Díaz M.P., Robledo C.W., Balzarini M.G.** 2001. Estadística para las ciencias agropecuarias. Cuarta Edición. Editorial Triunfar, Córdoba, Argentina.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande Broek A., Vanderleyde J.** 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 155-164.
- Dobereiner J. y Day J.** 1975. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En W. E. Newton and C. J. Nyman (Ed.), *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press, Pullman. pp. 518-538.
- Dunkel M., Schmidt U., Struck S., Berger L., Gruening B., Hossbach J. y col.** 2009. SuperScent-a database of flavors and scents. *Nucl. Acids Res.* 37: 291-294.
- Effmert U., Kalderás J., Warnke R., Piechulla B.** 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.* 38: 665-703.
- Farag M.A., Ryu C-M., Sumner L.W., Paré P.W.** 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochem.* 67: 2262-2268.
- Farag M.A., Zhang H., Ryu C-M.** 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39: 1007-1018.
- Felici C., Vettori L., Giraldi E., Forino L., Toffanin A., Tagliasacchi A., Nuti M.** 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Appl. Soil Ecol.* 40: 260-270.
- Fernando D.W., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A., Savchuk S.** 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37: 955-964.
- Foster, R.C.** 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fert. Soils* 6: 189-203.
- Fothergill J.L., White J., Foweraker J.E., Walshaw M.J., Ledson M.J., Mahenthiralingam E., Craig Winstanley C.** 2010. Impact of *Pseudomonas*

- aeruginosa* genomic instability on the application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2053-2059.
- Fuchs R., Schäfer M., Geoffroy V., Jean-Marie Meyer J-M.** 2001. Siderotyping – A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 31-57.
- Gershenzon J., McConkey M., Croteau R.** 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint (*Mentha piperita* L). *Plant Physiol.* 122: 205-213.
- Giri B., Kapoor R., Mukerji K.G.** 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol. Fertil. Soils* 38: 170-175.
- Glick B.R.** 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1-15.
- Gomila M., Ramirez A., Lalucat J.** 2007. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(12): 3787-3797.
- Gordon R.E y Mihm J.M.** 1956. A comparative study of some strains received as *Nocardia*. *J. Bacteriol.* 73(1): 15-27.
- Grimont P.A.D.** 2002. Risque bactériologique: repérage des souches. *C. R. Biologies* 325: 901-906.
- Groenhagen U., Baumgartner R., Bailly A., Gardiner A., Eberl L., Schulz S., Weisskopf L.** 2013. Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *J. Chem. Ecol.* 39: 892-906.
- Günther E.** 1948. *The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in plants production analysis.* Krieger Publishing: New York, USA.
- Gupta M.L., Prasad A., Ram M., Kumar S.** 2002. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technol.* 81: 77-79.
- Hammerschmidt R. y Nicholson R.** 1999. A survey of plant defense responses to pathogens. In: Agrawal A., Tuzun S., Bent E. (eds.). *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture.* St Paul, Minnesota, APS Press, pp. 55-57.

- Han S.H., Lee S.J., Moon J.H., Park K.H., Yang K.Y., y col.** 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 924-930.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harrewijn P., van Oosten A.M., Piron P.G.M.** 2001. Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. *Ann Bot.* 90(2): 299-300.
- Haudenschield C., Schalk M., Karp F., Croteau R.** 2000. Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 127-136.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I.** 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60(4): 579-598.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Hiltner L.** 1904. Über neuerer erfahrung und problem auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtung der grundung und brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft* 98: 59-78.
- Hoagland D.R. y Arnon D.I.** 1938. The water-culture method for growing plants without soil. In *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ.* Berkeley, CA, pp. 347-353.
- Hu H.B., Xu Y.Q., Chen F., Zhang X.H., Hur B.K.** 2005. Isolation and characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* strain that produces both phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 86-90.
- Johnsen K., Enger O., Jacobsen C.S., Thirup L., Torsvik V.** 1999. Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1786-1788.

- Kai M., Effmert U., Berg G., Piechulla B.** 2006. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187: 351-360.
- Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B.** 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biot.* 81: 1001-1012.
- Kai M. y Piechulla B.** 2009. Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles--an effect of CO₂? *FEBS Lett.* 583(21): 3473-3477.
- Keel C., Weller D.M., Natsch A., Défago G., Cook R.J., Thomashow L.S.** 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 552-563.
- Khaosaad T., Vierheilig H., Nell M., Zitterl-Eglseer K., Novak J.** 2006. Arbuscular mycorrhiza alters the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16: 443-446.
- Kimura M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- King E.O., Ward M.K., Randey D.E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kloepper J.W.** 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In *Soil Microbial Ecologys Applications in Agricultural and Environmental Management Metting*; Marcel Dekker, New York. pp. 255-274.
- Kloepper J.W. y Schroth M.N.** 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bact.* Vol. 2. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, pp. 879-882.
- Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E.M., Lifshitz R.** 1991. *The Rhizosphere and Plant Growth*. Keister, K.L. & Cregan, P.B. (Ed). Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 315-326.
- Laguerre G., Rigottier-Gois L., Lemanceau P.** 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Mol Ecol.* 3(5): 479-487.

- Lane D.J.** 1991. *16S/23S rRNA sequencing*. En: E. Stackebrandt y M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. JohnWiley & Sons, New York, pp. 115-175.
- Lange B.M. y Croteau R.** 1999. Genetic engineering of essential oil production in mint. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 139-144.
- Lange B.M., Wildung M.R., Stauber E.J., Sanchez C., Pouchnik D., Croteau R.** 2000. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2934-2939.
- Lawrence B. M.** 2007. *Mint: The Genus Mentha*. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Lee B., Farag M.A., Park H.B., Kloepper J.W., Lee S.H., Ryu C-M.** 2012. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PlosONE* 7(11): e48744.
- Lisa A.T., Garrido M.N., Domenech C.E.** 1984. *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase and cholinesterase induced by choline and its metabolic derivatives may contain a similar anionic peripheral site. *Mol. Cell. Biochem.* 63: 113-118.
- Loaces I., Ferrando L., Scavino A.F.** 2011. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb. Ecol.* 61(3): 606-618.
- Lucy M., Reed E., Glick B.R.** 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 86: 1-25.
- Lugtenberg B. y Kamilova F.** 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Lupien S., Karp F., Wildung M., Croteau R.** 1999. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from Mint (*Mentha*) species: cDNA isolation characterization and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 368: 181-192.
- Luria S.E. y Burrous J.W.** 1955. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74: 461-476.
- Lysenko O.** 1961. *Pseudomonas* - an attempt at a general classification. *J. Gen. Microbiol.* 25: 379-408.
- Mahalaksami S. y Reetha D.** 2009. Assessment of plant growth promoting activities of bacterial isolates from the rhizosphere of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Rec. Res. Sci. Technol.* 1(1): 26-29.

- Mahmoud S.S y Croteau R.B.** 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(15): 8915-8920.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.** 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp 68.
- Marques A.S.A., Marchaisson A., Gardan L., Samson R.** 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. *Genet. Mol. Biol.* 31: 106-115.
- Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M.J., Phillips G., Thomashow L.S.** 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183: 6454-6465.
- Mazzola M., Funnell D.L., Raaijmakers J.M.** 2004. Wheat cultivar specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microb. Ecol.* 48: 338-348.
- McCaskill D., Gershenzon J., Croteau R.** 1992. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* 187: 445-454.
- McConkey M.E., Gershenzon J., Croteau R.B.** 2000. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 122(1): 215-224.
- McNear Jr. D.H.** 2013. The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nat. Educ. Knowl.* 4(3): 1.
- McSpadden Gardener B.B., Schroeder K.L., Kalloger S.E., Raaijmakers J.M., Thomashow L.S., Weller D.M.** 2000. Genotypic and phenotypic diversity of phlD-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1939-1946.
- Medina P. y Baresi L.** 2007. Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. *J. Microbiol. Meth.* 69: 391-393.
- Mehnaz S., Weselowski B., Aftab F., Zahid S., Lazarovits G., Iqbal J.** 2009. Isolation, characterization and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Can. J. Microbiol.* 55: 1007-1011.

- Mehri I., Turki Y., Chair M., Chérif H., Hassen A., Meyer J.M., Gtari M. 2011. Genetic and functional heterogeneities among fluorescent *Pseudomonas* isolated from environmental samples. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57(2): 101-114.
- Meyer J.M. y Abdallah M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Meyer J.M., Gruffaz C., Tulkki T., Izard D. 2007. Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(11): 2543-2556.
- Milagres A.M.F., Machuca A., Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of Chrome Azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.* 37: 1-6.
- Molla A.H., Shamsuddin Z.H., Halimi M.S., Morziah M., Puteh A.B. 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biol. Biochem.* 33: 457-463.
- Muleta D., Assefal F., Granhall U. 2007. In vitro antagonism of rhizobacteria isolated from *Coffea arabica* L against emerging fungal coffee pathogens. *Eng. Life Sci.* 7(6): 577-586.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Naik P.R., Raman G., Narayanan K.B., Sakthivel N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol.* 8: 230-244.
- Nawrath T., Mgode G.F., Weetjens B., Kaufmann S.H.E., Schulz S. 2012. The volatiles of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and related bacteria. *Beilstein J. Org. Chem.* 8: 290-299.
- Naznin H.A., Kimura M., Miyazawa M., Hyakumachi M. 2013. Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes Environ.* 28(1): 42-49.
- Neilands J.B. 1973. *Microbial iron transport compounds (siderochromes)*. In: Eichorn, G.L., ed. *Inorganic Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam. pp. 167-202.

- Nievas F., Bogino P., Nocelli N., Giordano W. 2012. Genotypic analysis of isolated penaut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. *Appl. Soil Ecol.* 53: 74-82.
- Orhan E., Esitken A., Ercisli S., Turan M., Sahin F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111(1): 38-43.
- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4(8): 701-712.
- Ortiz-Castro R., Valencia-Cantero E., López-Bucio J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav.* 3: 263-265.
- Oviedo M.S., Ramirez M.L., Barros G.G., Chulze S.N. 2009. Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1186-1192.
- Owen S.M., Clark S., Pompe M., Semple K.T. 2007. Biogenic volatile organic compounds as potential carbon sources for microbial communities in soil from the rhizosphere of *Populus tremula*. *FEMS Microbiol. Lett.* 268: 34-39.
- Palleroni N.J. 1984. Genus *Pseudomonas* Migula. In: Krieg NR, Hot JG (eds) Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol I. The Williams y Wilkins Co., Baltimore, MD. pp 141-199.
- Palleroni N.J. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 231-251.
- Palleroni N.J. 2005. Genus *Pseudomonas*. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (Ed.). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology 2a ed. Volume 2*. Springer, New York. pp. 323-379.
- Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopolou R., Doudoroff M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 23: 333-339.
- Paré P.W., Farag M.A., Krishnamachari V., Zhang H., Ryu C.M., Kloepper J.W. 2005. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynth. Res.* 85(2): 149-159.
- Parejko J.A., Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., Weller D.M., Thomashow L.S. 2012. Population structure and diversity of phenazine-1-carboxylic acid producing

- fluorescent *Pseudomonas* spp. from dryland cereal fields of central Washington State (USA). *Microb. Ecol.* 64(1): 226-241.
- Park H.B., Lee B., Kloepper J.W., Ryu C-M.** 2013. One shot-two pathogens blocked. Exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal. Behav.* 8: e24619.
- Patten C.L. y Glick B.R.** 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Picard C. y Bosco M.** 2008. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften* 95(1): 1-16.
- Pichersky E. y Gershenzon J.** 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(3): 237-243.
- Pilet P-E. y Saugy M.** 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. *Plant Physiol.* 83: 33-38.
- Prosser J.I.** 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244: 9-17.
- Proudy I., Bouglé D., Leclercq R., Vergnaud M.** 2008. Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping. *J. Appl. Microbiol.* 105(2): 550-558.
- Radruppa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W., Bais H.P.** 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Comm. Integr. Biol.* 3(2): 130-138.
- Rameshkumar N., Ayyadurai N., Kayalvizhi N., Gunasekaran P.** 2012. Genotypic and phenotypic diversity of PGPR fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(1): 13-24.
- Ramette A., Moenne-Loccoz Y., Défago G.** 2001. Polymorphism of the polyketide synthase gene *phlD* in biocontrol fluorescent pseudomonads producing 2,4-diacetylphloroglucinol and comparison of *phlD* with plant polyketide synthases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 639-652.

- Rangel-Castro J.I., Levenfors J.J., Danell E.** 2002. Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Can. J. Microbiol.* 48(8): 739-748.
- Riquelme C., Guiñazú M.E., Tizio R.** 1991. Preacondicionamiento y aclimatación, en condiciones de invernáculo, de plantas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton* 52(1): 73-82.
- Ringer K.L., McConkey M.E., Davis E.M., Rushing G.W., Croteau R.** 2003. Monoterpene double-bond reductases of the (-)-menthol biosynthetic pathway: isolation and characterization of cDNAs encoding (-)-isopiperitenone reductase and (+)-pulegone reductase of peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* 418(1): 80-92.
- Römling U., Wingender J., Müller H., Tümmler B.** 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6): 1734-1738.
- Rothballer M., Schmid M., Hartmann A.** 2003. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* 34: 261-279.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Paré P.W.** 2004. Bacterial volatiles trigger induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-1026.
- Ryu C.M., Farag M.A., Paré P.W., Kloepper J.W.** 2005. Invisible signals from the underground: bacterial volatiles elicit plant growth promotion and induce systemic resistance. *Plant Pathol.* 21(1): 7-12.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., Kloepper J.W.** 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4927-4932.
- Saharan B.S. y Nehra V.** 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 2011: 1-30.
- Saitou N. y Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Ev.* 4: 406-425.
- Salisbury W.A. y Lykos J.J.** 1972. Hydrolysis of casein: a differential aid for the identification of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Path.* 25: 1083-1085.
- Sánchez E., García D., Carballo C., Crespo M.** 1996. Estudio farmacognóstico de *Mentha piperita* L (toronjil de menta). *Rev. Cub. Plantas Med.* 1(3): 40-45.

- Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S.** 2001. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant J.* 27: 1-12.
- Santoro M.V., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E.** 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol. Biochem.* 49: 177-1082.
- Scavroni J., Fernandes Boaro C.S., Mayo Marquez M.O., Ferreira L.C.** 2005. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) grown with biosolid. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 345-352.
- Schulz S. y Dickschat J.S.** 2007. Bacterial Volatiles: The Smell of Small Organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24: 814-842.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E.** 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 54: 712-732.
- Schwyn B. y Neilands J.B.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
- Scortichini M., Rossi M.P., Loreti S., Bosco A., Fiori M., Jackson R. W., Stead D. E., Aspin A., Marchesi U., Zini M., Janse J.D.** 2005. *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*, the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathol.* 95: 1316-1324.
- Selvakumar G., Piyush J., Mishra P.K., Bisht J.K., Gupta H.S.** 2009. Mountain aspect influences the genetic clustering of rhizospheric psychrotolerant phosphate solubilizing *Pseudomonads* in the Uttarakhand Himalayas. *Curr. Microbiol.* 50: 432-438.
- Sharafi M.S., Rasooli I., Owlia P., Taghizadeh M., Astaneh S.D.A.** 2010. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacogn Mag.* 6(23): 147-153.
- Shulka A., Abad Farooqi A.H., Shukla Y.N., Sharma S.** 1992. Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. *Plant Growth Regul.* 11: 165-171.
- Sierra G.** 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 15-22.

- Sneath P.H.A.** 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microb.* 15: 70-98.
- Soković M.D., Vukojević J., Marin P.D., Brkić D.D., Vajs V., van Griensven L.J.L.D.** 2009. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14(1): 238-249.
- Song G.C. y Ryu C-M.** 2013. Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in Cucumber under open field conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 9803-9819.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M.** 1966. The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- Sunish Kumar R., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A.V., Venkateswarlu Y., Prakash O., Sakthivel N.** 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broadspectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.* 98: 145-154.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tan S., Yanga C., Meia X., Shenb S., Raza W., Shena Q., Xu Y.** 2013. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Appl. Soil Ecol.* 64: 15-22.
- Tanase A.M., Trasca C., Vassu T., Olteanu A., Pelinescu D., Csutak O., Robertina I., Stoica I.** 2009. Phylogenetic analysis on 16S ribosomal DNA of *Pseudomonas* strains from oil polluted soil. *Rom. Biotechnol. Lett.* 14 (6): 4779-4785.
- Teintze M., Hossain M.B., Barnes C.L., Leong J., Van der Helm D.** 1981. Structure of ferripseudobactin, a siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.* 20: 6446-6457.
- Thirup L., Johnsen K., Winding A.** 2001. Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and *Actinomycetes* on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide Imazalil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1147-1153.
- Ting A.S.Y., Mah S.W., Tee C.S.** 2011. Detection of potential volatile inhibitory compounds produced by endobacteria with biocontrol properties towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 229-235.

- Turner G.W y Croteau R.** 2004. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase and pulegone reductase. *Plant Physiol.* 136: 4215-4227.
- Turner G.W., Gershenzon J., Croteau R.B.** 2000a. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 124: 655-663.
- Turner G.W., Gershenzon J., Croteau R.B.** 2000b. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 124: 665-679.
- Urzi C., Brusetti L., Salamone P., Sorlini C., Stackebrandt E., Daffonchio D.** 2001. Biodiversity of *Geodermatophilaceae* isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin. *Environ. Microb.* 3(7): 471-479.
- Van Berkum P., Ruihua F., Campbell T.A., Eardly B.D.** 1999. *Some issues of relevance in the taxonomy of rhizobia*. In E. Martinez and G. Hernandez (ed.). Highlights of nitrogen fixation research. Plenum Publishing Corp., New York. pp. 267-270.
- van Elsas J.D., Duarte G.E., Rosado A.S., Smalla K.** 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *J. Microbiol. Methods* 32: 133-154.
- Van Loon L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- Van Peer R., Niemann G.N., Schippers B.** 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt in carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathol.* 81: 728-734.
- Versalovic J.S.M., de Bruijn F.J., Lupski J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* 5: 25-40.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Vespermann A., Kai M., Piechulla B.** 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5639-5641.
- Viti C. y Giovannetti L.** 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Appl. Soil Ecol.* 28: 101-112.

- Vyas P., Rahi P., Gulati A. 2009. Stress tolerance and genetic variability of phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas* from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Microb. Ecol.* 58(2): 425-434.
- Walker S.T., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiol.* 132: 44-51.
- Wang M.C., Liu Y.H., Wang Q., Gong M., Hua X.M., Pang Y.J., Hu S.J., Yang Y.H. 2008. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 40: 778-788.
- Wang Y. y Zhang Z. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiol.* 146: 2845-2854.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Winicur Z.M., Zhang G.F., Staehelin L.A. 1998. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 117(2): 501-513.
- Wise M.L. y Croteau R. 1999. Monoterpene biosynthesis. In D.E. Cane (ed). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids, Vol 2*. Elsevier Science, Oxford, pp. 97-153.
- Wittstock U. y Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 300-307.
- Wolska K., Kot B., Jakubczak A., Rymuza K. 2011. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49(4): 734-738.
- Wolska K. y Szwedka P. 2008. A Comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Pol. J. Microbiol.* 57: 157-163.
- Wu M., Zhang X., Zhang H., Zhang Y, Li X., Zhou Q., Zhang C. 2009. Soil *Pseudomonas* community structure and its antagonism towards *Rhizoctonia solani* under the stress of acetochlor. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83(3): 313-317.
- Zažimalová E., Opatrný Z., Březinová A., Eder J. 1995. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content. *J. Exp. Bot.* 46(9): 1205-1213.

- Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Crimson M., y col. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 839-851.
- Zhang H., Xie X., Kim M.S., Korniyev D.A., Holaday S., Paré P.W. 2008a. Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant J.* 56: 264-273.
- Zhang H., Kim M.S., Sun Y., Dowd S.E., Shi H., Paré P.W. 2008b. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 737-744.
- Zhang H., Sun Y., Xie X., Kim M.S., Dowd S.E., Paré P.W. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 58(4): 568-577.
- Zheljazkov V.D., Cantrell C.L., Astatkie T, Hristov A. 2010. Yield, content, and composition of Peppermint and Spearmints as a function of harvesting time and drying. *J Agric. Food Chem.* 58: 11400-11407.



Anexo I

Medios de cultivo.



Anexo I: Medios de Cultivo.**Medio Luria Bertani (LB)** (Luria y Burrous, 1955).

NaCl	5g
Extracto de levadura	5g
Tripteina	10g
Agua destilada	csp 1000ml

Medio King B (King y col., 1954).

Peptona	20g
Glicerol	10ml
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,5g
Agar	15g
Agua destilada	csp 1000ml
Ajustar pH 7,2 ± 0,2.	

Medio Murashige-Skoog modificado (MS).**Macronutrientes** (Murashige y Skoog, 1962):

NH ₄ NO ₃	1650mg
KNO ₃	1900mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370mg
KH ₂ PO ₄	170mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440mg
Na ₂ EDTA	37,3mg
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8mg

Micronutrientes (Murashige y Skoog, 1962):

H ₃ BO ₃	6,2mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	15,17mg
ZnSO ₄ x 4H ₂ O	6,98mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25mg
CuSO ₄ x H ₂ O	0,016mg
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025mg
IK	0,83 mg

Vitaminas:

Myo-inositol	100mg
Tiamina-ClH	0,1mg
Piridoxina-ClH	0,5mg
Acido nicotínico	0,5mg
Glicina	2mg

Hormonas:

Acido naftalen acético (ANA)	0,01mg
------------------------------	--------

Otros compuestos:

Biotina	0,01mg
Sacarosa	30 g
Agar	7 g
Agua bidestilada	csp 1000ml
Ajustar pH 5,6-5,8.	

Medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938).

CaCl ₂ 1M	1ml
KCl 1M	1ml
MgSO ₄ 1M	400µl
KH ₂ PO ₄ 1M	200 µl
FeCl ₃ 1M	200 µl
KNO ₃ 1M	500µl
Micronutrientes	200µl
Agar	1,5g
Agua destilada	csp 1000ml

Micronutrientes:

H ₃ BO ₃	283mg
MnCl ₂	181mg
ZnCl ₂ o ZnSO ₄	11mg
CuSO ₄	5mg

Na ₂ SO ₄	2,5mg
Agua destilada	csp 100ml

Medio King A (King y col., 1954).

Peptona de gelatina	20g
Glicerol	10ml
MgCl ₂	1,4g
K ₂ SO ₄	10g
Agar	15g
Agua destilada	csp 1000ml
Ajustar pH 7,2 ± 0,2.	

Tween 80 Agar (Sierra 1957).

Agar Nutritivo	31g
Tween® 80	1%
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,1%
Agua destilada	csp 1000ml

Esterilizar en autoclave y antes agregar el Tween®80 antes de plaquear.

Starch Agar (Gordon y Mihm 1956).

Peptona	5g
Extracto de carne	3g
Almidón soluble	2g
Agar	15g
Agua destilada	csp 1000ml

Ajustar pH 7,2 ± 0,2.

Disolver hasta ebullición, luego agregar almidón y calentar por 3-4 minutos hasta obtener su disolución. Enfriar y esterilizar. Revelar con Lugol.

Lugol

Iodo	1g
IK	2g
Agua destilada	csp 300ml

Skim Milk Agar (Salisbury y Lykos 1972).

- | | |
|---------------------|-----------|
| 1. Leche descremada | 10g |
| Agua destilada | csp 100ml |
| 2. Agar | 2g |
| Agua destilada | csp 100ml |

Autoclavar las dos soluciones por separado. Luego calentarlas a 45°C, mezclar y distribuir en placas de Petri.

Gelatin Agar (Medina y Baresi 2007).

- | | |
|-------------------------|------------|
| Tryptic Soy Agar | 40g |
| Gelatina bacteriológica | 16g |
| Agua destilada | csp 1000ml |

Egg-yolk Agar (Sneath 1956).

- | | |
|--|------------|
| Agar Nutritivo | 31g |
| 250ml solución fisiológica + 1 yema de huevo | 100ml |
| Agua destilada | csp 1000ml |

Medio CAS Agar (Schwyn y Neilands, 1987).

- | | |
|------------------|-----------|
| Pipes buffer | 30,24g |
| Triptofano 1% | 3ml |
| Triptona | 160mg |
| Agar | 15g |
| Agua bidestilada | csp 750ml |

pH = 6,8.

Autoclavar y agregar estas soluciones estériles:

- | | |
|--|-------|
| MM9 (10X) | 100ml |
| CAS (10X) | 100ml |
| Glucosa 20% | 10ml |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O 1M | 2ml |
| CaCl ₂ 1M | 0,1ml |

Las soluciones se esterilizan por filtración, con filtro 0,4µm.

MM9 (10X).

- | | |
|----------------------------------|-----|
| Na ₂ HPO ₄ | 60g |
|----------------------------------|-----|

KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5g
NH ₄ Cl	1g
Agua bidestilada	csp 1000ml

CAS (10X).

Cromo Azurol S	60,5mg	(1)
FeCl ₃ x 6H ₂ O (1mM, 10mM HCl)	10ml	(2)
HTMDA	72,9mg	(3)
Agua bidestilada	csp 100ml	

Disolver la solución (1) en agua, luego agregar la solución (2). Disolver la solución (3) en agua y luego agregar a las primeras dos soluciones. Autoclavar.

La positividad está dada por la aparición de un halo anaranjado alrededor de la colonia.

Medio M9 (Maniatis y col., 1982).**Base mineral.**

Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5g
NH ₄ Cl	1g
Agua bidestilada	csp 500ml

Agar.

Agar	15g
Agua bidestilada	csp 500ml

Autoclavar. Cuando se enfrían (aprox. 60°C), se mezclan y se añaden las siguientes soluciones:

MgSO ₄ x 7H ₂ O (1M)	2ml
CaCl ₂ 1M	0,1ml
Glucosa 20%	20ml

Pikovskaya Agar (Naik y col., 2008).

Extracto de levadura	500g
Dextrosa	10g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	500mg

KCl	200mg
MgSO ₄ × 7H ₂ O	100mg
MnSO ₄ × H ₂ O	0,1mg
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,1mg
Agar	15g
Agua bidestilada	csp 1000ml

La positividad está dada por la aparición de un halo trasparente alrededor de la colonia.

Medio LBTD4 (Bric y col., 1991)

Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
Trypteina	10g
L-Triptofano	5mM
SDS	0,06%
Glicerol	1%
Agua destilada	csp 1000ml

Solución de Salkowski (Bric y col., 1991)

FeCl ₃ 0,5M	2%
HClO ₄	35%

Medio minimo con alto contenido de fosfato (MMF) (Lisa y col., 1984).

KH ₂ PO ₄	22mM
Na ₂ HPO ₄	17 mM
NaCl	8,5 mM
MgSO ₄	0,8 mM
Succinato de Sodio	20mM
NH ₄ Cl	20mM



Anexo II

*Identificación de
mVOCs.*



Anexo II – Identificación de mVOCs.

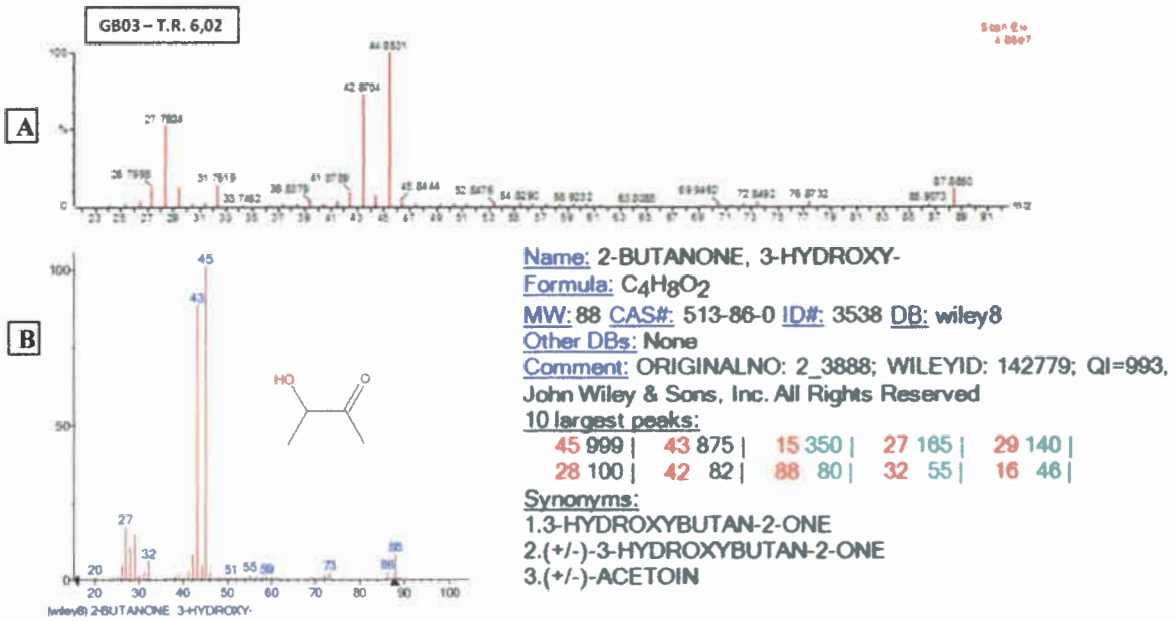


Fig. II.1. Identificación del compuesto acetoina (T.R. 6,02) presente en el conjunto de VOCs de la cepa GB03. **A.-** Perfil de fragmentación. **B.-** Identificación NIST.

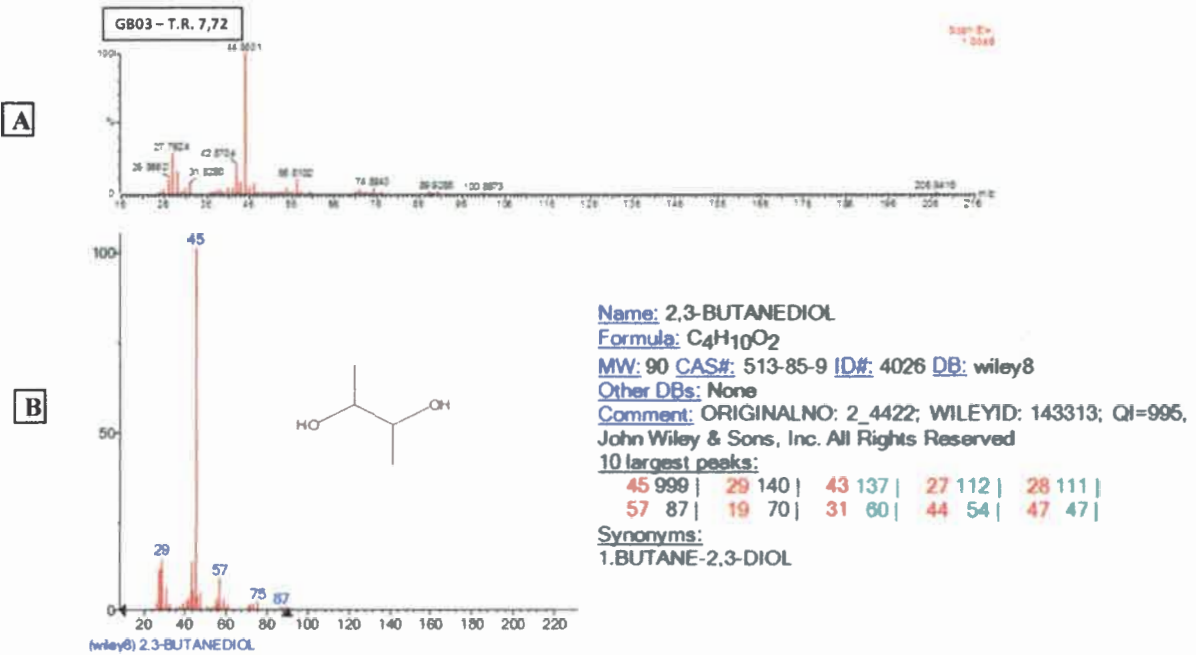


Fig. II.2. Identificación del compuesto 2,3-butanediol (T.R. 7,72) presente en el conjunto de VOCs de la cepa GB03. **A.-** Perfil de fragmentación. **B.-** Identificación NIST.

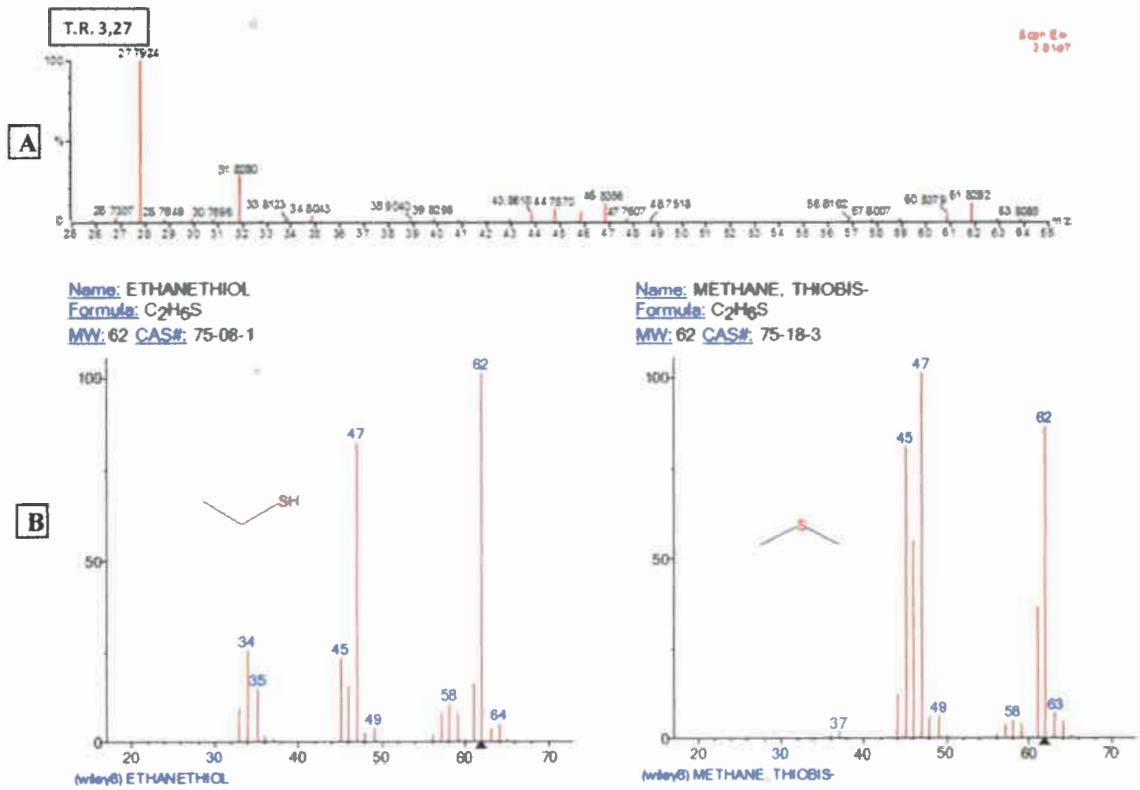


Fig. II.3. Identificación del compuesto volátil correspondiente al T.R. 3,27, típico del género *Pseudomonas*. A.- Perfil de fragmentación. B.- Identificación NIST.

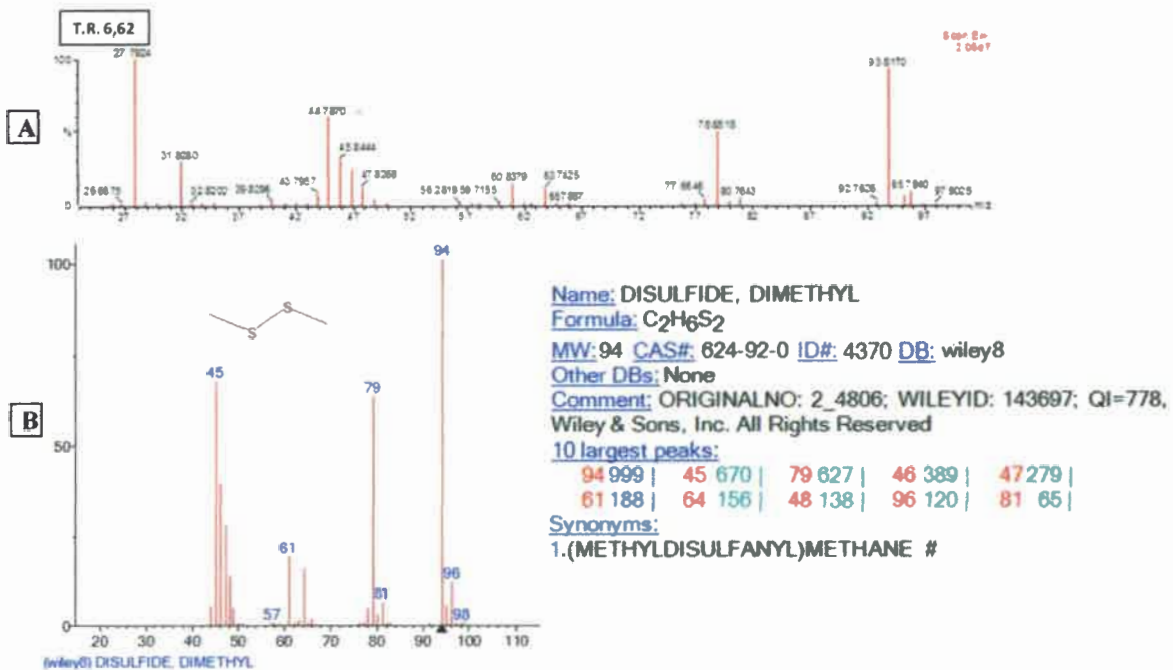


Fig. II.4. Identificación del compuesto volátil correspondiente al T.R. 6,62, típico del género *Pseudomonas*. A.- Perfil de fragmentación. B.- Identificación NIST.

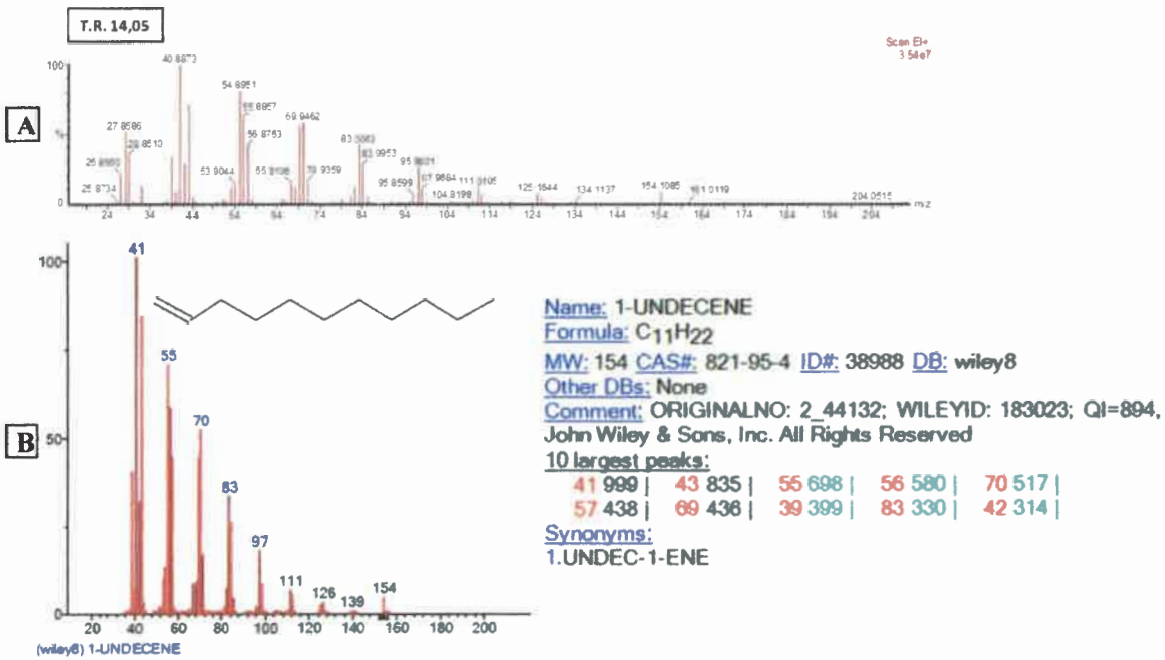


Fig. II.5. Identificación del compuesto volátil correspondiente al T.R. 14,05, típico del género *Pseudomonas*. A.- Perfil de fragmentación. B.- Identificación NIST.

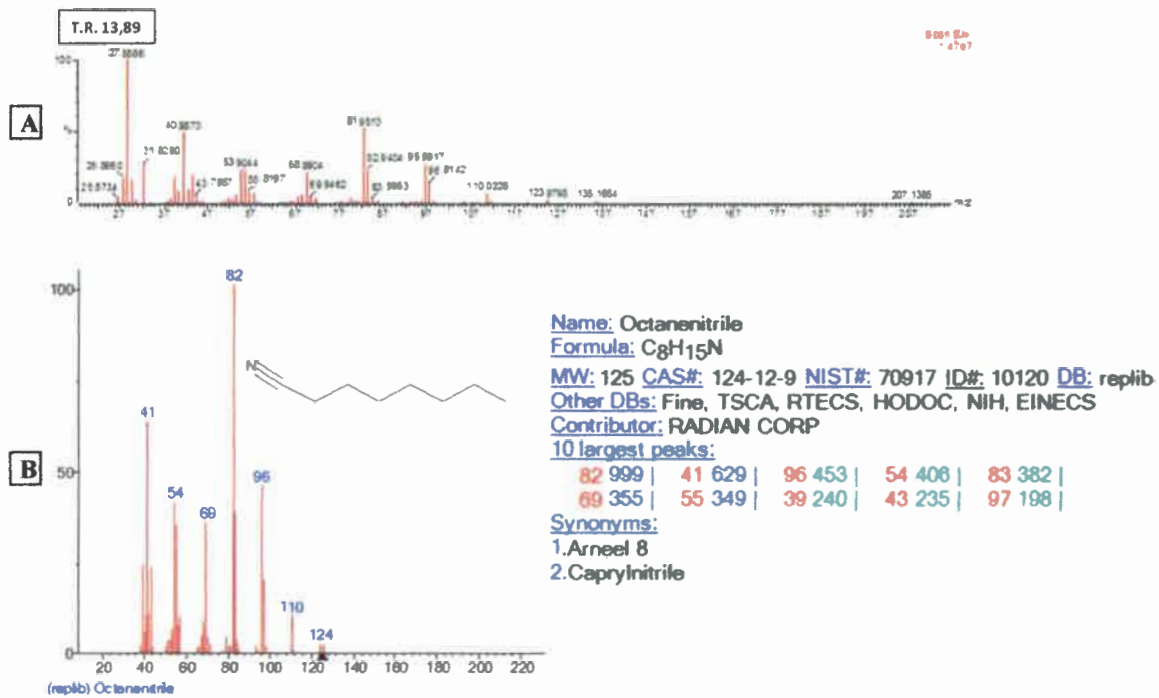


Fig. II.6. Identificación del compuesto volátil correspondiente al T.R. 13,89 típico de la cepa SJ25. A.- Perfil de fragmentación. B.- Identificación NIST.

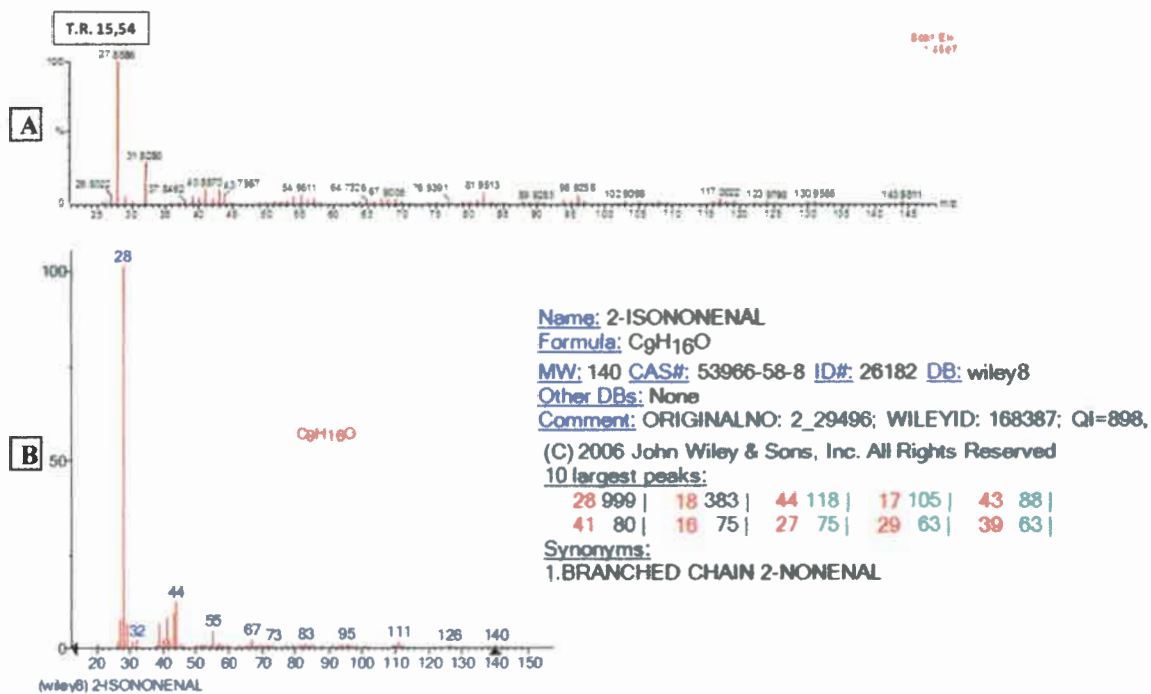


Fig. II.7. Identificación del compuesto volátil correspondiente al T.R. 15,54 típico de la cepa SJ25. **A.**- Perfil de fragmentación. **B.**- Identificación NIST.

73216

U.N.R.C.
Biblioteca Central



73216