

76699

DONACION

Don: Don. B. Amor

Autor: Cappellari, Lorena del Rosario

Exp:

Inv N: 76699



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Biológicas

**“INDUCCIÓN SISTÉMICA DE LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN *MENTHA PIPERITA* MEDIADA POR
RIZOBACTERIAS”**

Mic. Lorena del Rosario Cappellari

DIRECTORA: Dra. Erika Banchio



CO-DIRECTOR: Dr. Walter Fabián Giordano



Río Cuarto, Marzo de 2017

76699

MFR:
Clasif:
T. - 1129

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido: Dra. Marisa Rovera

Firma:



Lugar de Trabajo: U.N.R.C.

Aclaración: Marisa Rovera.

Nombre y Apellido: Dra. María Virginia Luna

Firma:



Lugar de Trabajo: U.N.R.C.

Aclaración: M. Virginia Luna.

Nombre y Apellido: Dr. José Manuel Meriles

Firma:



Lugar de Trabajo: U.N.C.

Aclaración: José Meriles

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha: Río Cuarto, 14 de Marzo de 2017

Calificación:

A mis Padres

*“Cuando quieres realmente una cosa,
todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla”*

Paulo Coelho

*“Nunca desistas de un sueño.
Solo trata de ver las señales que te lleven a él”*

Paulo Coelho

Agradecimientos

🇨🇺 *A la Dra. Erika Banchio, directora de mi tesis doctoral, por la oportunidad brindada y por su colaboración, predisposición y dedicación durante la realización de este trabajo. ¡Erika! que difícil fue el comienzo de este camino y que tan diferentes somos; pero el paso del tiempo nos dio una oportunidad, así hoy sos una de esas personas especiales con quien puedo compartir las buenas y no tan buenas cosas de la vida. ¡Te quiero mucho! ¡Gracias por todo!*

🇨🇺 *Al Dr. Walter Giordano por su gentileza y colaboración en la realización del presente trabajo; por permitirme ser parte de su laboratorio y darme la oportunidad de seguir formándome profesionalmente.*

🇨🇺 *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al ex Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, por brindarme el apoyo económico necesario para completar mi formación profesional.*

🇨🇺 *A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme brindado sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo. Por la calidad de la educación recibida durante mis carreras de grado y postgrado. Por una universidad pública, libre y gratuita siempre.*

🇨🇺 *A los miembros de la comisión asesora y tribunal de tesis Dra. Marisa Rovera, Dra. María Virginia Luna y Dr. José Manuel Meriles por los aportes realizados que enriquecieron este trabajo de tesis.*

🇨🇺 *A mis padres por ser mi sostén, por acompañarme en cada paso de mi vida y por brindarme siempre lo mejor de ustedes. Por enseñarme con el ejemplo a seguir siempre adelante a pesar de las adversidades que puedan presentarse; ambos son el*

mejor ejemplo de lucha y perseverancia. Gracias a la vida por la enorme oportunidad que tuvimos de volver a compartir momentos juntos. Desde lo más profundo de mi corazón hoy y siempre ¡Muchas Gracias! ¡Los Amo!

🏠 A mis tíos y a mis primos por acompañarme siempre a lo largo mi vida. En especial a Susana y Nati por sus palabras de aliento en cada momento y por impulsarme siempre a seguir adelante. ¡Los Quiero Mucho Familia!

🏠 A los que ya no están, Chochi, Natalina, Emilia, y Mario, pero que seguramente compartirían la finalización de esta etapa con una inmensa alegría. Gracias por todo lo que me han brindado y enseñado. ¡Por Siempre en mi Corazón!

🏠 A Estela, Aída, Isabel, Maky, Arnoldo, Ricardo, Sergio y Fede por su cálido afecto.

🏠 A mis amigas Betina y Belén por estar siempre a mi lado. Muchas gracias por esta hermosa amistad que me enorgullece compartir.

🏠 A mi amigo canino "Rex" por su incomparable compañía y su amor incondicional, por enseñarme que la felicidad puede encontrarse en las pequeñas cosas de la vida.

🏠 A la Dra. Mariana Renaudo y al Lic. Leonardo Chiri porque su ayuda profesional permitió transitar y culminar esta etapa.

🏠 A mis compañeros de los Laboratorios 10 y 11, a los que están y a los que ya se fueron: Pablo, Fiorela, Fernando, Maricel, Julio, Ayelén, Emiliano, Natalia, Julieta y Luciana, por su cálida compañía y su ayuda. Muchas gracias por lo que cada uno de ustedes dejó y sembró en mí.

🏠 A Fiorela y Pablo (Dr. Bogino) por brindarme siempre lo mejor de ustedes y no cambiar nunca. Por su apoyo constante, sus palabras de aliento, por

incentivarme siempre, por cada momento compartido. Porque con ustedes he reído hasta llorar y he llorado hasta reír. ¡Muchas Gracias Chicos! ¡Los Quiero Mucho!

 *A la Dra. Ana Luz Serra por sugerirme el Laboratorio 10.*

 *A Kelly, Vicky, Yani, Adri, Nati P., Flor P., Ana A., Orne, Sabri, Ceci, Mica, Sofé A., Sofé F. y Evange por su calidez y compañerismo.*

 *A las Dras. Herminda Reinoso y Claudia Travaglia por su colaboración en la realización de este trabajo.*

 *Al Dr. Julio Zygado, a la Dra. Marcela Palacio y al Mg. Damián Barrionuevo por los servicios prestados.*

 *A todos los miembros del Departamento de Biología Molecular que diariamente me alegraron con una cálida sonrisa y un saludo amable.*

 *A los técnicos Mariela Woelke, Miguel Bueno, Miguel Andrés, Leonardo Fantuzzi y Guido Galetto por su predisposición para colaborar ante cualquier pedido o solicitud.*

 *A las Dras. Tania Taurian y Paola Beassoni y a Stella Maris Dellacroce por su colaboración en la agilización de los trámites en la Secretaría de Postgrado.*

 *Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.*

 *Y a la Vida... que a su manera me ha dado tanto!!!*

RESUMEN

En la actualidad, la agricultura depende en gran medida del empleo de productos químicos sintéticos como fertilizantes, pesticidas y herbicidas para lograr altos rendimientos, sin tener en cuenta los efectos deletéreos de los mismos sobre el medio ambiente. La utilización de microorganismos para incrementar la disponibilidad y toma de nutrientes por parte de los cultivos y controlar organismos fitopatógenos e insectos herbívoros es una alternativa biotecnológica que resulta interesante.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la inoculación de las cepas *Pseudomonas simiae* WCS417r, *Pseudomonas putida* SJ04 y *Bacillus subtilis* GB03 y de la co-inoculación de las cepas WCS417r + SJ04 y GB03 + SJ04 sobre diferentes parámetros de crecimiento vegetal, contenido de clorofila, densidad de estomas y tricomas glandulares, producción de metabolitos secundarios como monoterpenos y compuestos fenólicos y sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de *Mentha piperita*.

Plantas tratadas con cepas PGPR, en comparación a plantas control, presentaron un incremento en la biomasa aérea y radical, en la superficie foliar, en la densidad de tricomas glandulares y estomas y significativos cambios en el contenido y emisión de monoterpenos y en la concentración de compuestos fenólicos. La magnitud de los cambios registrados dependió de la/s cepa/s inoculada/s. Plantas tratadas con la combinación *P. putida* SJ04 + *B. subtilis* GB03 presentaron el mayor desarrollo de la parte aérea. Plantas co-inoculadas con las cepas *P. simiae* WCS417r y *P. putida* SJ04 tuvieron un contenido total de aceites esenciales (AE) 6 veces superior que plantas no tratadas; mencionadas plantas presentaron la mayor tasa de emisión de monoterpenos.

Con el objetivo de determinar si la inoculación de rizobacterias y la aplicación exógena de las fitohormonas metil jasmonato (MeJA) o ácido salicílico (SA) tenían un efecto sinérgico sobre la producción de biomasa y de metabolitos secundarios, se aplicaron exógenamente las fitohormonas anteriormente citadas, a diferentes concentraciones, sobre plantas inoculadas y sin inocular. A los 7 y 14 días posteriores a la aplicación, se determinaron los efectos sobre diferentes parámetros de crecimiento vegetal, contenido total de AE y de los monoterpenos mayoritarios: limoneno, linalool, mentona mentol y pulegona, y sobre la densidad de tricomas glandulares y la concentración de compuestos fenólicos.

El derivado metilado del ácido jasmónico (JA) produjo una inhibición del crecimiento vegetal y contrarrestó los mecanismos de promoción del crecimiento

desencadenados por la inoculación de cepas PGPR; sin embargo produjo un considerable aumento en el contenido de AE y en la concentración de los monoterpenos mayoritarios. El MeJA también indujo la síntesis de compuestos fenólicos. El MeJA aplicado a una concentración 2 mM tuvo junto al tratamiento con rizobacterias un efecto sinérgico sobre la biosíntesis de terpenoides.

Mientras que el SA produjo un aumento del crecimiento vegetal y no afectó los mecanismos de promoción del crecimiento desencadenados por la inoculación de cepas PGPR. El tratamiento con SA estimuló la biosíntesis de AE en *M. piperita*, pero en un grado menor que el derivado metilado del JA. No existió un sinergismo entre las rizobacterias y el SA en la inducción de la síntesis de monoterpenos. La síntesis de compuestos fenólicos también fue inducida por el tratamiento con SA.

El conocimiento de factores que controlan o afectan la biosíntesis de metabolitos secundarios y la acumulación de monoterpenos permiten diseñar estrategias biotecnológicas para mejorar el cultivo y la productividad de plantas aromáticas y otros cultivos de interés agrícola, representando una alternativa al empleo de fertilizantes químicos y/o pesticidas de origen sintético.

ABSTRACT

Actually, the farming depends on the use of synthetic chemicals such as fertilizers, pesticides and herbicides to achieve high yields, without taking into account the deleterious effects on the environment. The use of microorganisms to increase the availability and nutrient uptake of crops and control phytopathogenic organisms and herbivorous insects is an interesting biotechnological alternative.

The effects of single inoculation of *Pseudomonas simiae* WCS417r, *Pseudomonas putida* SJ04, *Bacillus subtilis* GB03 or co-inoculation of WCS417r + SJ04, GB03 + SJ04 on plant growth parameters, chlorophyll content, trichome density, stomatal density, emission total VOCs and main monoterpene and content of secondary metabolites were evaluated in peppermint (*Mentha piperita*) seedlings.

The treated plants, in comparison with controls, showed increases in shoot biomass, root biomass, leaf area, trichome density, and stomatal density, and marked quantitative changes in monoterpene content and emission. The effects of PGPR inoculation on *M. piperita* growth and development varied depending on the experimental treatment. The co-inoculation of GB03 + SJ04 caused significant increases in shoot fresh weight. Monoterpene accumulation was ~6-fold higher in plants inoculated with *P. simiae* WCS417r, *P. putida* SJ04 than the control.

To determine if the inoculation of rhizobacteria and the exogenous application of phytohormones: methyl jasmonate (MeJA) or salicylic acid (SA) had a synergistic effect on the production of biomass and secondary metabolites, the phytohormones previously mentioned were exogenously applied at different concentrations, on inoculated and uninoculated plants. At 7 and 14 days after the treatment shoot biomass, essential oil yield, major essential oil components: limonene, linalool, menthol, menthone and pulegone, total phenolics content, and peltate glandular trichome density were evaluated.

MeJA treated plants exhibit a reduction in shoot biomass. The exogenous application of MeJA causes an increase on secondary metabolites content and the number of peltate trichomes in *M. Piperita*. The combined PGPR + MeJA 2 mM treatment exhibit an increases in total EO yield and marked quantitative changes in monoterpene content.

The SA caused increases in shoot fresh weight. Foliar application of SA increased monoterpene accumulation and concentration of phenolic compounds en *M. piperita*. There was no synergism between rhizobacteria and SA in the induction of terpenoids synthesis.

The knowledge of factors that control or affect secondary metabolite biosynthesis and the accumulation of monoterpenes allow the design of biotechnological strategies to improve the cultivation and productivity of aromatic plants and other crops of agricultural interest; it could be an alternative to the use of chemical fertilizers and/or pesticides of synthetic origin.

ÍNDICE GENERAL

Comisión Asesora - Defensa Oral y Pública - Jurado.....	Pág. i
Dedicatoria.....	Pág. ii
Agradecimientos.....	Pág. iii
Resumén.....	Pág. vi
Abstract.....	Pág. viii
Índice General.....	Pág. x
Índice de Figuras.....	Pág. xiv
Índice de Tablas.....	Pág. xvii
Abreviaturas y Siglas.....	Pág. xviii
Recursos financieros para la realización de la Tesis.....	Pág. xxi
Publicaciones derivadas de la Tesis.....	Pág. xxii
1. Introducción.....	Pág. 1
1.1. <i>Mentha x piperita</i> L.....	Pág. 3
1.2. Metabolismo secundario vegetal.....	Pág. 4
1.2.1. Aceites esenciales.....	Pág. 5
1.2.1.1. El aceite esencial de <i>M. piperita</i>	Pág. 6
1.2.1.1.1. Sitio de síntesis y almacenamiento de los aceites esenciales en <i>M.piperita</i>	Pág. 7
1.2.2. Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) vegetales.....	Pág. 9
1.2.3. Compuestos fenólicos.....	Pág. 10
1.2.3.1. Fenil alanina amonio liasa.....	Pág. 11
1.3. Fitohormonas.....	Pág. 12
1.3.1. Jasmonatos.....	Pág. 13
1.3.2. Ácido Salicílico.....	Pág. 14
1.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	Pág. 16
1.4.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por PGPR.....	Pág. 17
1.4.1.1. Mecanismos directos.....	Pág. 17
1.4.1.1.1. Fijación biológica del N ₂	Pág. 17
1.4.1.1.2. Solubilización de fosfatos.....	Pág. 18
1.4.1.1.3. Producción de sideróforos.....	Pág. 19
1.4.1.1.4. Producción de fitohormonas.....	Pág. 19

1.4.1.1.5. Regulación del nivel de etileno.....	Pág. 19
1.4.1.1.6. Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).....	Pág. 20
1.4.1.2. Mecanismos indirectos.....	Pág. 20
1.4.1.2.1. Mecanismos involucrados en el antagonismo microbiano en la rizósfera.....	Pág. 20
1.4.1.2.2. Resistencia Sistémica Inducida (ISR).....	Pág. 21
1.4.2. Géneros de PGPR.....	Pág. 23
1.4.2.1. <i>Pseudomonas</i> spp.....	Pág. 23
1.4.2.2. <i>Bacillus</i> spp.....	Pág. 24
2. Hipótesis y Objetivos.....	Pág. 26
2.1. Hipótesis de trabajo.....	Pág. 26
2.2. Objetivo general.....	Pág. 26
2.3. Objetivos específicos.....	Pág. 26
3. Materiales y Métodos.....	Pág. 27
3.1. Material vegetal.....	Pág. 27
3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	Pág. 27
3.2.1. Cepas bacterianas.....	Pág. 27
3.2.2. Conservación y mantenimiento de las cepas.....	Pág. 27
3.2.3. Condiciones de cultivo.....	Pág. 28
3.3. Ensayo de inoculación.....	Pág. 28
3.3.1. Inoculación y co-inoculación de plántulas.....	Pág. 28
3.3.2. Recolección de plantas y cuantificación de parámetros.....	Pág. 28
3.4. Ensayo con fitohormonas.....	Pág. 29
3.4.1. Aplicación exógena de MeJA y SA.....	Pág. 29
3.4.2. Recolección de plantas y cuantificación de parámetros.....	Pág. 30
3.5. Extracción y cuantificación de aceites esenciales.....	Pág. 31
3.5.1. Extracción de aceites esenciales.....	Pág. 31
3.5.2. Identificación de monoterpenos por cromatografía gaseosa.....	Pág. 31
3.5.3. Cuantificación de los AE.....	Pág. 32
3.6. Recolección y cuantificación de VOCs vegetales	Pág. 32

3.6.1. Recolección de VOCs vegetales.....	Pág. 32
3.6.2. Cuantificación de los VOCs emitidos.....	Pág. 34
3.7. Recuento de tricomas glandulares y de estomas.....	Pág. 35
3.8. Determinación del contenido de clorofila total y de clorofilas “a” y “b”.....	Pág. 35
3.9. Determinación del contenido de fenoles totales.....	Pág. 35
3.10. Determinación de la actividad enzimática de L-fenilalanina amonio liasa	Pág. 36
3.11. Pruebas de antagonismo “ <i>in vitro</i> ” de las cepas co-inoculadas.....	Pág. 36
3.11.1. Pruebas de inhibición en placa.....	Pág. 37
3.11.2. Determinación de la resistencia o susceptibilidad a antibióticos.....	Pág. 37
3.11.3. Ensayo de co-inoculación en medio de cultivo.....	Pág. 37
3.12. Seguimiento de las cepas bacterianas inoculadas y co-inoculadas.....	Pág. 38
3.13. Análisis estadístico.....	Pág. 38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Pág. 40
4.1. SECCIÓN I: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA - PGPR.....	Pág. 40
4.1.1. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre diferentes parámetros del crecimiento vegetal.....	Pág. 40
4.1.2. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el contenido de clorofila y el número de estomas.....	Pág. 45
4.1.3. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre el contenido de monoterpenos en <i>M. piperita</i>	Pág. 48
4.1.3.1. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la densidad de estructuras secretoras de AE.....	Pág. 54
4.1.4. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la emisión de VOCs.....	Pág. 57
4.1.5. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el contenido de compuestos fenólicos.....	Pág. 61
4.1.6. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la actividad de la enzima PAL en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 63
4.1.7. Pruebas de antagonismo “ <i>in vitro</i> ” de las cepas co-inoculadas.....	Pág. 64
4.1.7.1. Pruebas de inhibición en placa.....	Pág. 64
4.1.7.2. Ensayo de co-inoculación en medio de cultivo.....	Pág. 65
4.1.8. Seguimiento de las cepas bacterianas inoculadas y co-inoculadas.....	Pág. 66
4.2. SECCIÓN II: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-MeJA.....	Pág. 69

4.2.1. Efectos de la inoculación con rizobacterias y la aplicación exógena de MeJA sobre diferentes parámetros del crecimiento vegetal.....	Pág. 69
4.2.2. Efecto de la aplicación exógena de MeJA sobre el contenido y la composición del AE plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 73
4.2.2.1. Efecto del tratamiento con MeJA sobre la densidad de tricomas glandulares peltados y capitados en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 79
4.2.3. Efecto de la inoculación de cepas PGPR y la aplicación de exógena de MeJA sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 84
4.3. SECCIÓN III: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-SA.....	Pág. 86
4.3.1. Efectos de la inoculación con rizobacterias y la aplicación exógena de SA sobre el crecimiento de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 86
4.3.2. Efecto de la aplicación exógena de SA sobre el contenido y la composición del AE de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 89
4.3.2.1. Efecto del tratamiento con SA sobre la densidad de tricomas glandulares peltados y capitados en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 94
4.3.3. Efecto de la inoculación de cepas PGPR y la aplicación de exógena de SA sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 97
5. CONCLUSIONES.....	Pág. 99
5.1. Sección I: interacción planta aromática - PGPR.....	Pág. 99
5.2. Sección II: interacción planta aromática - PGPR - MeJA.....	Pág. 100
5.3. Sección III: interacción planta aromática - PGPR - SA.....	Pág. 101
5.4. Integración.....	Pág. 102
6. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 104
ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE TRABAJO.....	Pág. 130
ANEXO II: CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	Pág. 132
ANEXO III: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	Pág. 134

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1.1.</i> Hojas, tallo y flor de <i>M. piperita</i>	Pág. 4
<i>Fig. 1.2.</i> Estructura química de los principales monoterpenos constituyentes del AE de <i>M. piperita</i>	Pág. 7
<i>Fig. 1.3.</i> Microscopia electrónica de barrido de la superficie de una hoja de <i>M. piperita</i>	Pág. 8
<i>Fig. 1.4.</i> Micrografía electrónica de barrido de la superficie abaxial de hojas de <i>M. piperita</i>	Pág. 9
<i>Fig. 1.5.</i> Una visión integradora de las interacciones entre las plantas y el medio ambiente circundante mediadas por volátiles.....	Pág. 10
<i>Fig. 1.6.</i> Reacción catalizada por la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL).....	Pág. 12
<i>Fig. 1.7.</i> Estructura del ácido jasmónico (JA) y su éster metílico metil jasmonato (MeJA).....	Pág. 13
<i>Fig. 1.8.</i> Estructura química del ácido salicílico (SA).....	Pág. 15
<i>Fig. 1.9.</i> Beneficios para la planta que resultan de la interacción huésped - PGPR.....	Pág. 17
<i>Fig. 1.10.</i> Mecanismos de promoción del crecimiento por rizobacterias.....	Pág. 22
<i>Fig. 3.1.</i> Cromatograma GC/MS del AE de <i>M. piperita</i>	Pág. 32
<i>Fig. 3.2.</i> Sistema de recolección de VOCs.....	Pág. 33
<i>Fig. 3.3.</i> Cromatograma GC/MS de la mezcla de VOCs emitida por plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 34
<i>Fig. 4.1.1.</i> Plantas de <i>M. piperita</i> a los 30 días de ser inoculadas o co-inoculadas.....	Pág. 40
<i>Fig. 4.2.2.</i> Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el peso fresco y seco de la parte aérea de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 41
<i>Fig. 4.1.3.</i> Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal sobre el peso seco y la longitud de la raíz en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 42
<i>Fig. 4.1.4.</i> Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal sobre la densidad estomática (N°/mm^2) en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 47
<i>Fig. 4.1.5.</i> Concentración de AE en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 48
<i>Fig. 4.1.6.</i> Concentración de los monoterpenos limoneno, mentol y mentona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 49
<i>Fig. 4.1.7.</i> % relativos de los principales componentes del AE de <i>M. piperita</i> en plantas tratadas con cepas PGPR.....	Pág. 54
<i>Fig. 4.1.8.</i> Densidad de tricomas glandulares peltados en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 55
<i>Fig. 4.1.9.</i> Densidad de tricomas glandulares capitados en plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con rizobacterias.....	Pág. 55

Fig. 4.1.10. Microfotografías de la superficie foliar de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 56
Fig. 4.1.11. Emisión de VOCs (ng/h * g de peso fresco) en plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con rizobacterias.....	Pág. 57
Fig. 4.1.12. Emisión (ng emitidos/hs * g de peso fresco) de los monoterpenos mentona, mentol y pulegona de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 58
Fig. 4.1.13. % relativos de los principales monoterpenos emitidos por plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con cepas PGPR.....	Pág. 58
Fig. 4.1.14. Tasa de emisión total en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 59
Fig. 4.1.15. Tasa de emisión de los monoterpenos mentona, mentol y pulegona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 59
Fig. 4.1.16. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con cepas PGPR.....	Pág. 62
Fig. 4.1.17. Contenido de compuestos fenólicos en raíces de plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con rizobacterias.....	Pág. 62
Fig. 4.1.18. Actividad de la enzima PAL en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias..	Pág. 64
Fig. 4.1.19. Prueba de inhibición en placa en medio LB.....	Pág. 65
Fig. 4.1.20. Prueba de inhibición en placa en medio LB.....	Pág. 65
Fig. 4.1.21. Dinámica de WCS417r y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en medio LB.....	Pág. 66
Fig. 4.1.22. Dinámica de GB03 y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en medio LB.....	Pág. 66
Fig. 4.1.23. Dinámica de WCS417r y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en la rizósfera de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 67
Fig. 4.1.24. Dinámica de GB03 y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en la rizósfera de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 67
Fig. 4.2.1. Diferencia del peso fresco del tallo de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con MeJA con el correspondiente a plantas control.....	Pág. 70
Fig. 4.2.2. Concentración de AE en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM.....	Pág. 74
Fig. 4.2.3. Concentración del monoterpeno mentol en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas o co-inoculadas con cepas PGPR y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM.....	Pág. 76
Fig. 4.2.4. Concentración de pulegona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas o co-inoculadas con cepas PGPR y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM.....	Pág. 77
Fig. 4.2.5. Densidad (Nº/mm ²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara adaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM.....	Pág. 80
Fig. 4.2.6. Densidad (Nº/mm ²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara abaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM.....	Pág. 82
Fig. 4.2.7. Concentración de compuestos fenólicos en hojas de plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 85

inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 o 4 mM.....	
Fig. 4.3.1. Diferencia del peso fresco del tallo de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con SA con el correspondiente a plantas control.....	Pág. 87
Fig. 4.3.2. Concentración de AE en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM.....	Pág. 90
Fig. 4.3.3. Concentración de mentol en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM.....	Pág. 91
Fig. 4.3.4. Concentración de pulegona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM.....	Pág. 92
Fig. 4.3.5. Densidad (Nº/mm ²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara adaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con SA 1 o 2 mM.....	Pág. 94
Fig. 4.3.6. Densidad (Nº/mm ²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara abaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas con rizobacterias y/ tratadas con SA 1 o 2 mM.	Pág. 95
Fig. 4.3.7. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con SA.....	Pág. 98
Fig. 5.1. Gráfico de conglomerados.....	Pág. 103
Fig. II.1. Curva de calibración ácido gálico.....	Pág. 132
Fig. II.2. Curva de calibración ácido trans-cinámico.....	Pág. 132
Fig. II.3. Curva de calibración ácido bicinconinico.....	Pág. 133
Fig. III.1. Medio LB suplementado con Cm 100 µg/ml.....	Pág. 134
Fig. III.2. Medio LB suplementado con Pol 15 µg/ml.....	Pág. 134
Fig. III.3. Medio LB suplementado con Cm 120 µg/ml.....	Pág. 135
Fig. III.4. Medio LB suplementado con Km 150 µg/ml.....	Pág. 135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Tratamientos aplicados en los ensayos con fitohormonas.....	Pág. 30
Tabla 4.1.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con cepas PGPR.....	Pág. 42
Tabla 4.1.2. Contenido de clorofilas “a” y “b” y de clorofila total ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.....	Pág. 46
Tabla 4.1.3. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) de los monoterpenos pulegona y linalool en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y co-inoculadas con rizobacterias.....	Pág. 50
Tabla 4.2.1. Longitud del tallo (cm), N° de hojas y ramificaciones en plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con cepas PGPR y/o MeJA.....	Pág. 72
Tabla 4.2.2. Concentración de los monoterpenos: limoneno, linalool y mentona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y/o tratadas con MeJA 1, 2 y 4 mM.....	Pág. 78
Tabla 4.2.3. Densidad ($\text{N}^\circ/\text{mm}^2$) de tricomas glandulares capitados sobre las caras adaxial y abaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y/o tratadas con MeJA 1, 2 y 4 mM.....	Pág. 83
Tabla 4.3.1. Longitud del tallo (cm), N° de hojas y ramificaciones en plantas de <i>M. piperita</i> tratadas con cepas PGPR y/o SA.....	Pág. 88
Tabla 4.3.2. Concentración de los monoterpenos: limoneno, linalool y mentona en plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y/o tratadas con SA 1 y 2 mM.....	Pág. 93
Tabla 4.3.3. Densidad ($\text{N}^\circ/\text{mm}^2$) de tricomas glandulares capitados sobre las caras adaxial y abaxial de hojas de plantas de <i>M. piperita</i> inoculadas y/o tratadas con SA 1 y 2 mM.....	Pág. 96
Tabla 5.1. Resumen de los efectos de las PGPR sobre diferentes parámetros en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 100
Tabla 5.2. Resumen de los efectos de la inoculación con rizobacterias y el tratamiento con MeJA sobre diferentes parámetros en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 101
Tabla 5.3. Resumen de los efectos de la inoculación con rizobacterias y el tratamiento con SA sobre diferentes parámetros en plantas de <i>M. piperita</i>	Pág. 102

ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C: grados centígrados.

%: porcentaje.

% R: porcentaje(s) relativo(s).

µg: microgramo(s).

µl: microlitros(s).

µm: micrómetro(s).

ABA: ácido abscísico.

Abs: absorbancia.

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato.

AE: Aceite(s) Esencial(es).

AIA: ácido indol acético.

AMF: *Arbuscular Mycorrhizal Fungi*.

BRs: brasinoesteroides.

Cm: cloranfenicol.

cm: centímetro(s).

cm³: centímetro(s) cúbico(s).

c.s.p.: cantidad suficiente para.

E.C.: *Enzyme Commission*.

et. al.: y otros.

etc.: etcétera.

ET: etileno.

FBN: fijación biológica del nitrógeno.

Fig.: figura.

g: gramo(s).

GAs: giberelinas.

GC: cromatógrafo de gases.

GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Hs.: horas.

IAs: auxinas.

IPL: isocorismato piruvato liasa.

ICS: isocorismato sintasa.

ISR: *Induced Systemic Resistance*.
JA: ácido jasmónico.
JAs: jasmonatos.
Km: kanamicina.
LB: Luria Bertani.
M: molar.
m: metro(s).
MeJA: metil jasmonato.
MeSA: metil salicilato.
mg: miligramo(s).
min: minuto(s).
ml: mililitro(s).
mm²: milímetro(s) cuadrado(s).
mM: milimolar.
mVOCs: *microbial Volatile Organic Compounds*.
N°: número.
ng: nanogramo(s).
nm: nanómetro (s).
OPDA: ácido 12-oxo-fitodienoico.
PAL: *Phenylalanine ammonia lyase*.
PGPR: *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*.
Pol: polimixina.
PR: relacionadas a la patogénesis.
PVP: polivinilpirrolidon.
p/v: peso en volumen.
rpm: revoluciones por minuto.
SA: ácido salicílico.
SAG: forma glicosilada del ácido salicílico.
SAR: *Systemic Acquired Resistance*.
SDS: dodecilsulfato sódico.
spp: especies.
UFC: unidades formadoras de colonia.
UV: ultravioleta.

VOCs: *Volatile Organic Compounds*.

v/v: volumen en volumen.

Recursos financieros para la realización de la Tesis

■ Proyecto FONCYT PICT 2010-1866 (2011-2014). “*Inducción sistémica de la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas aromáticas mediada por rizobacterias*”. **Investigador Responsable:** Dra. Erika Banchio. **Subsidio Otorgado:** \$ 120.000.

■ Proyecto FONCYT PICT 2011-0965 (2011-2014). “*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*”. **Investigador Responsable:** Dr. Walter Giordano. **Subsidio Otorgado:** \$ 343.200.

■ Programa PPI, SECYT (U.N.R.C.) (2012-2014). Subsidio Res. 852/11. “*Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta*”. **Investigador Responsable:** Dr. Walter Giordano. **Subsidio Otorgado:** \$ 11.116.

■ Proyecto PIP 112-201101-00086 CONICET (2012-2014) (Subsidio Res. 1672/12.) “*Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta*”. **Investigador Responsable:** Dr. Walter Giordano. **Subsidio Otorgado:** \$ 300.000.

■ Proyecto FONCYT PICT 2014-0636 (2015-2018). “*Aspectos recíprocos en las interacciones microorganismos promotores del crecimiento vegetal-plantas aromáticas-insectos mediadas por metabolitos secundarios*”. *Investigador responsable:* Dra. Erika Banchio. **Subsidio Otorgado:** \$ 498.500.

■ Proyecto PIP 11220150100312CO CONICET (2015-2017). (Subsidio Res. 0111/16). “*Impacto de la actividad microbiana sobre la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola*”. **Investigador responsable:** Dr. Walter Giordano. **Subsidio Otorgado:** \$ 855.000.

■ Programa PPI, SECYT (UNRC), Prórroga 2015. Res. Rectoral 1230/14. “*Aspectos bioquímicos y moleculares de las interacciones bacteria-planta*”. **Investigador Responsable:** Dr. Walter Giordano.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, han derivado en la siguiente publicación:

■ **Cappellari, L.,** Santoro, M., Reinoso, H., Travaglia, C., Giordano, W. y Banchio, E. (2015). "Anatomical, morphological, and phytochemical effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on peppermint (*Mentha piperita*)". *Journal of Chemical Ecology* 41(2)149-158.

Y en las siguientes presentaciones a congresos:

■ **Cappellari, L.,** Giordano, W. y Banchio, E. (2013). "*Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and jasmonic acid application on growth parameters and essential oil (EO) production in Mentha piperita L.*". Comunicación libre (poster). 32nd New Phytologist Symposium. Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina. Del 20 al 22 de noviembre de 2013.

■ **Cappellari, L.,** Santoro, M., Giordano, W. y Banchio, E. (2014). "*PGPR enhancement chlorophyll content, trichome density, stomatal density and monoterpene accumulation in peppermint (Mentha x piperita L.)*". Comunicación libre (poster). PGPR Latinoamericana 2014. La Falda, Córdoba, Argentina. Del 21 al 26 de septiembre de 2014.

■ **Cappellari, L.,** Santoro, M., Giordano, W. y Banchio, E. (2015). "*Incremento en la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y la producción de compuestos fenólicos en Mentha x piperita L, como una respuesta a la inoculación con rizobacterias.*" Comunicación libre (poster). CAMAYA 2015. 3er Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Universidad Católica Argentina - Palermo, Buenos Aires, Argentina. Del 25 al 27 de noviembre de 2015.

■ **Cappellari, L.,** Chiappero, J., Giordano, W. y Banchio, E. (2016). "*The combination of plant growth promoting rhizobacteria and methyl jasmonate produce positive and synergetic effects on phytochemical and morphological changes in Mentha x piperita L.*" Comunicación libre (poster). 32nd Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology and 4th Congress of the Latin American Association of Chemical Ecology. 1st Joint Meeting ISCE/ALAEQ. Foz do Iguaçu, Brazil. Del 4 al 8 de julio de 2016.

Capítulo I
Introducción



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas incluyen una gran diversidad de especies vegetales cuya característica común es la producción de aceites esenciales (Güenther, 1948). Estos últimos son producidos y almacenados en pelos glandulares o tricomas y están formados por una compleja mezcla de metabolitos secundarios, principalmente por mono y sesquiterpenos volátiles, responsables del aroma característico de la especie vegetal que los produce (Langenheim, 1994; Harrewijn *et al.*, 2001). Las plantas aromáticas han sido utilizadas desde tiempos milenarios, tanto como aderezos, para mejorar el aroma y el sabor de alimentos y bebidas, como así también en la medicina natural (Berzins y Romagnoli, 2005; AACREA, 2006; Suárez, 2013).

A nivel mundial, las proyecciones indican que el mercado de plantas aromáticas, se encuentra en franca expansión, a una tasa de entre 4 y 6% anual (Berzins y Romagnoli, 2005; AACREA, 2006). El incremento en la demanda por este tipo de productos se debe a diversos factores como cambios en los hábitos de consumo, la tendencia hacia una vida más sana, etc. (AACREA, 2006). El consumo de plantas aromáticas en los países periféricos es mayormente doméstico, a diferencia de los países desarrollados, en los cuales el principal destino de estas especies es la industria (AACREA, 2006).

El cultivo de plantas aromáticas es una actividad productiva que en Argentina no alcanzó todavía un nivel de desarrollo acorde a las potencialidades que tiene nuestro país para la producción de las mismas (Collado *et al.*, 2003; Elechosa y Juárez, 2003). *Mentha piperita* representa uno de los principales cultivos de estas especies en Argentina, pero al igual que lo que sucede con otras especies aromáticas introducidas o exóticas, su producción no alcanza a cubrir la demanda del mercado interno (Berzins y Romagnoli, 2005; Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, 2008; Suárez, 2013). Sin embargo, al estudiar la evolución del cultivo de estas especies, a través de los años en el país, se observa que la superficie cultivada aumentó sustancialmente en las últimas décadas (Ministerio de Economía y Producción de la Nación, 2006; Jullien, 2007); lo cual se relaciona con un aumento de la demanda por estos productos, por parte de las industrias alimenticia, farmacéutica, cosmética y perfumística locales (Elechosa y Juárez, 2003). Destacándose la importancia que ha alcanzado esta actividad productiva para la economía de diferentes estratos sociales de la población. Sin embargo, lo expuesto anteriormente no guarda relación con los avances en investigación sobre la producción de plantas aromáticas.



En el caso particular de nuestra provincia, las plantas aromáticas y medicinales, son un componente destacado dentro de la flora autóctona (Lagrotteria y Toya, 1987). El Valle de Traslasierra, posee un clima ideal para el cultivo de estas especies y es la principal zona de producción y comercialización de las mismas; siendo el departamento de San Javier, el productor tradicional de la provincia (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, 2008).

Entre las principales problemáticas del cultivo de plantas aromáticas se encuentra el empleo de productos químicos en las plantaciones, con efectos nocivos para el ambiente y, en consecuencia, para la salud humana y animal (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, 2008). En la actualidad, la agricultura depende en gran medida del empleo de fertilizantes químicos y pesticidas y herbicidas sintéticos para lograr altos rendimientos, sin tener en cuenta los efectos de estos productos sobre el ciclo global del nitrógeno, la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales, el aumento de los niveles de algunos gases con efecto invernadero como el óxido nitroso (N_2O), etc. (Crews y Peoples, 2004; Vejan *et al.*, 2016). Se conoce que el uso excesivo de fertilizantes químicos, con el objetivo de incrementar la producción de los cultivos, condujo a un deterioro de la calidad de los suelos (Kumar *et al.*, 2016; Shaikh, *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, los consumidores de plantas aromáticas requieren cada vez más que se les garantice la seguridad e inocuidad de los productos; que estos sean sanos, naturales, que le brinden beneficios adicionales a la salud y que su producción no dañe al medio ambiente (AACREA, 2006).

Lo expuesto anteriormente expresa la necesidad de buscar nuevas estrategias que permitan incrementar la producción vegetal de manera eficiente, sin generar efectos indeseables sobre el ambiente, evitando así comprometer a nuestras generaciones futuras. Lo cual impulsa investigaciones sobre alternativas no convencionales como la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR (del inglés, *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*).

Se conoce que los microorganismos benéficos del suelo pueden promover el crecimiento vegetal e inducir un aumento de la capacidad defensiva de la planta brindándole protección contra un amplio espectro de patógenos microbianos e incluso insectos herbívoros (van Loon y Bakker, 2003; Vessey, 2003; Lucy *et al.*, 2004; van Loon, 2007). En este sentido, determinados agentes biológicos no patogénicos, son capaces de actuar como disparadores de la síntesis de enzimas claves involucradas en la biosíntesis de

metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2000), los cuales están claramente relacionados con los mecanismos defensivos de la planta contra patógenos (van Loon y Bakker, 2005; van Loon, 2007; Pieterse *et al.*, 2014).

La alternativa biotecnológica propuesta constituye un punto de partida interesante para incrementar la producción de plantas aromáticas, optimizando la producción de metabolitos secundarios, lo que podría conducir a un incremento en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales; proyectando en un futuro, transferir este tipo de innovación tecnológica a productores de plantas aromáticas, a fin de mejorar el rendimiento de la producción.

1.1. *Mentha x piperita* L

Mentha x piperita L es una planta aromática y medicinal, perteneciente a la familia *Lamiaceae*, conocida con los nombres vulgares de “menta inglesa”, “menta negra”, “toronjil de menta”, “peppermint”, etc., dependiendo de la región geográfica (Sánchez *et al.*, 1996). Esta hierba perenne es nativa de Inglaterra, pero en la actualidad, es cultivada en varias regiones templadas del mundo (McKay y Blumberg, 2006). Es un híbrido estéril natural obtenido del cruce de menta acuática (*Mentha aquatica* L) y hierbabuena (*Mentha spicata* L) (Croteau *et al.*, 2005). Dada su esterilidad se propaga de forma vegetativa, casi exclusivamente, a través de estolones, por esquejes obtenidos al dividir las matas jóvenes en primavera o también por división de rizomas durante el período de descanso vegetativo. *M. piperita* raramente produce semillas capaces de germinar (Aflatuni, 2005; Rita y Animesh, 2011).

Es una especie herbácea, vivaz, rizomatosa cuya altura oscila entre 30 y 90 cm. Presenta tallos erectos, cuadrangulares, muy ramificados, de color verdoso con tonalidades violáceas (Fig. 1.1.) que se originan a partir de un rizoma subterráneo del que brota un extenso sistema radicular. Las hojas son opuestas pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados, color verde oscuro en la cara superior y más claro en la inferior (Fig. 1.1.). Tanto las hojas como el tallo suelen ser ligeramente vellosos. Las flores se encuentran agrupadas en tirsoes densos, color púrpura y se localizan en posición terminal (Fig. 1.1.). Los estolones son de sección cuadrangular y crecen bajo y sobre la superficie del suelo en todas las direcciones, razón por la cual, esta hierba presenta una gran tendencia a ser invasora (Muñoz, 1996; Rita y Animesh, 2011).



Fig. 1.1. Hojas, tallo y flor de *M. piperita*.

M. piperita y otros miembros del género *Mentha* son principalmente cultivados por sus aceites esenciales, los cuales son empleados como aditivos por las industrias cosmética, alimenticia y farmacéutica en la elaboración de perfumes, productos utilizados en el cuidado de la higiene bucal, en la fabricación de golosinas, confituras, licores, té, insecticidas, fungicidas, antisépticos, medicamentos como jarabes y pastillas para la tos, etc. (Jullien, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Lubbe y Verpoorte, 2011; Coban y Baydar, 2016). A su vez, son tradicionalmente empleados en medicina folklórica en infusiones, por sus propiedades estimulantes, digestivas, carminativas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antihelmínticas, entre otras o en mezclas con “yerba mate” por sus características aromáticas (Bonzani *et al.*, 2007).

1.2. Metabolismo secundario vegetal

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos químicamente diversos y de bajo peso molecular como terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides, etc. (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009; Wink, 2009); por lo que las plantas, a diferencia de otros organismos, destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y energía, a la síntesis de metabolitos secundarios. Si bien se cree, hasta el momento, que estos compuestos no tienen una función directa en el desarrollo y crecimiento vegetal, los mismos tienen una relevante importancia ecológica, ya que permiten la comunicación de la planta con los diferentes componentes de su ecosistema, tanto con el medio físico como con otros organismos vivos, resultando así indispensables para su supervivencia (Iriti y Faoro, 2009; Mazid *et al.* 2011; Gandhi *et al.* 2015).

Los metabolitos secundarios juegan un rol destacado en la defensa de las plantas frente a situaciones de estrés tanto biótico como abiótico. Los mismos proveen protección a las plantas contra organismos patógenos y herbívoros y varios tipos de estreses abióticos como estrés hídrico, por altas y bajas temperaturas, por salinidad, por elevada y baja radiación UV, etc. Además, participan en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas y actúan como moléculas señal permitiendo la comunicación planta-planta. También están involucrados en el establecimiento de relaciones simbióticas con otros organismos y en la competencia por el espacio, la luz y los nutrientes con otras especies vegetales (alelopatía); algunos de estos compuestos son los responsables de otorgarle el color a flores y frutos (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003; Wink, 2009; Gandhi *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios varían entre las diferentes especies vegetales, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de una planta (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003; Wink, 2009). Estos compuestos químicos son utilizados por el hombre como agentes saborizantes, aromatizantes, insecticidas, colorantes, fármacos, en la elaboración y preservación de alimentos, etc. (Gandhi *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2015).

1.2.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas naturales, muy complejas de metabolitos secundarios vegetales como mono, di y sesquiterpenos y fenilpropanoides. Son líquidos oleosos, de aspecto límpido e incoloros o ligeramente amarillos, solubles en lípidos y solventes orgánicos. Debido a su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua (Lubbe y Verpoorte, 2011); dado que son un producto de destilación, se definen “esencias” y por eso se los llama “Aceites Esenciales” (Lawrence, 2007).

Los AE son los responsables del olor característico de las plantas y pueden ser sintetizados por los diferentes órganos de un vegetal como tallos, hojas, raíces, flores, semillas, frutos, etc. y son almacenados en células secretorias, cavidades, células epidérmicas o tricomas glandulares, dependiendo de la especie vegetal (Bakkali *et al.*, 2008). La composición química de los mismos puede variar cuali y cuantitativamente dependiendo de la genética, la fenología, el órgano y la edad de la planta, las condiciones ambientales y de cultivo, etc. (Ali *et al.*, 2015). El contenido total de AE de una planta es, en general, de un 3%.

En la naturaleza, los AE, juegan un rol importante en la defensa de las plantas contra bacterias y hongos fitopatógenos, virus y, también, contra herbívoros. Además,

participan en la atracción de dispersores de polen y semillas y desempeñan una función clave en las interacciones tritróficas (Bakkali *et al.*, 2008).

El hombre aprovecha las propiedades antisépticas, medicinales, la fragancia y el sabor de los mismos y los emplea en la preparación y conservación de alimentos y bebidas, en la elaboración de cosméticos y analgésicos, antimicrobianos, calmantes, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales, en aromaterapia, en la elaboración de repelentes de insectos, etc. (Bakkali *et al.*, 2008; Lubbe y Verpoorte, 2011).

1.2.1.1. El aceite esencial de *M. piperita*

La composición química del AE de *M. piperita* es muy compleja; entre sus constituyentes principales se encuentran los monoterpenos (Jullien, 2007). Estos últimos son una clase de terpenoides que se caracterizan por estar formados por dos unidades de isopreno (C10) y poseer diferentes grupos funcionales como alcohol, aldehído, cetona, éster, etc. (Bakkali *et al.*, 2008). Los monoterpenos pueden ser compuestos lipofílicos o hidrofílicos, volátiles o no volátiles, cíclicos o acíclicos, quirales o aquirales (Bohlmann y Keeling, 2008).

En el AE de *M. piperita*, los monoterpenos que se encuentran en mayor proporción son mentol, mentona y pulegona (Fig. 1.2.). Otros derivados del isopreno como limoneno, linalool, mentofurano, eucaliptol, mentil acetato, isomentol e isomentona (Fig. 1.2.), también se encuentran presente, pero a concentraciones más bajas (Aflatuni, 2005).

El monoterpeno mentol es el componente característico principal del AE de *M. piperita* (Croteau *et al.*, 2005). Este compuesto es valorado por sus características olfativas y gustativas (Schwab *et al.*, 2008) y, además, por sus propiedades antimicrobianas y su suave efecto anestésico (Bohlmann y Keeling, 2008).

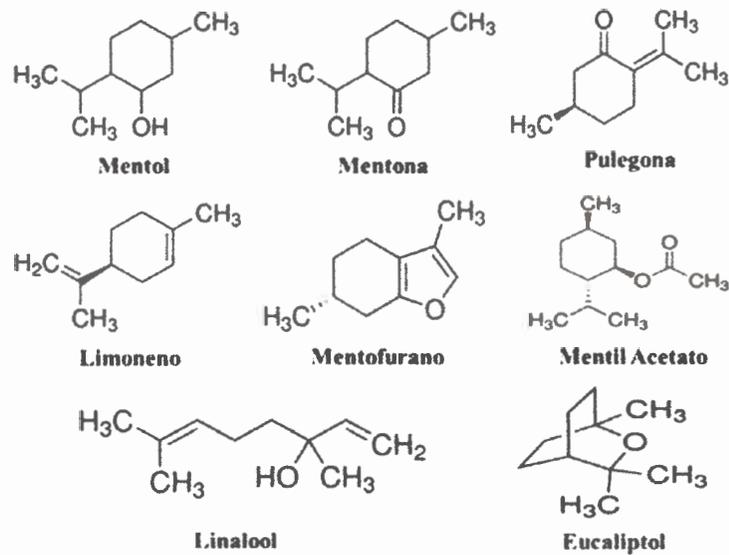


Fig. 1.2. Estructura química de los principales monoterpenos constituyentes del AE de *M. piperita*.

1.2.1.1.1. Sitio de síntesis y almacenamiento de los aceites esenciales en *M. piperita*

Los AE en *M. piperita* son producidos y almacenados en tricomas glandulares. Los cuales pueden ser definidos como pelos epidérmicos que contienen células especializadas para funciones metabólicas particulares, como lo son la biosíntesis y secreción de productos tales como terpenos, ácidos orgánicos, polisacáridos, entre otras sustancias (Gutiérrez-Alcalá *et al.*, 2005; Lange y Turner, 2013).

Principalmente, los AE en *M. piperita* y otras especies del género, son producidos y acumulados en tricomas glandulares del tipo peltado, situados sobre la superficie aérea de la planta, especialmente en las hojas, tanto en la superficie abaxial como adaxial (Fig. 1.3.A; Fig. 1.4.B) (Gershenzon *et al.*, 1989). Los mismos se caracterizan por presentar un grupo apical de ocho células secretoras, no fotosintéticas, radialmente distribuidas en un solo estrato, las cuales son sostenidas por una célula tallo y una célula basal. Alrededor de esta última, la cual se encuentra embebida en la epidermis, se dispone en forma radiada, una corona de 9-14 células epidérmicas (células peribasales), las cuales difieren ligeramente, en tamaño y forma, del resto de las células epidérmicas propiamente dichas. Las células secretoras están rodeadas por una importante envoltura cuticular, la cual acumula los AE en el espacio subyacente (Fig. 1.3.B) (Croteau *et al.*, 2005; Maffei *et al.*, 2007; Bonzani *et al.*, 2007; Glas *et al.*, 2012; Lange, 2015).

Los tipos celulares presentes en esta estructura altamente especializada, que no son fotosintéticos, expresan los genes codificantes de la maquinaria enzimática necesaria



para la producción de los componentes del AE; utilizando como precursor común moléculas de sacarosa importadas desde los tejidos fotosintéticos (McCaskill *et al.*, 1992; Lange y Croteau, 1999).

Además de los tricomas glandulares peltados, se encuentran sobre la superficie de tallos y hojas de *M. piperita*, otras estructuras secretoras denominadas tricomas glandulares capitados (Fig. 1.3.A; Fig. 1.4.A). Estos se caracterizan por ser de pequeño tamaño, ya que poseen una sola célula secretora, una célula tallo y una célula basal (Jullien, 2007). Su secreción consiste en una compleja mezcla de carbohidratos, lípidos, proteínas y pequeñas cantidades de monoterpenos. La misma es liberada hacia el exterior a través de los poros de la cutícula (Amelunxen *et al.*, 1969; Ascensao y Pais, 1998; Tissier, 2012).

Además, en la superficie aérea de *M. piperita* se encuentran estructuras simples, muy a menudo ramificadas, denominadas tricomas no glandulares, que pueden ser uni o pluricelulares (Fig. 1.3A; Fig. 1.4.A). Los mismos se caracterizan por no tener una función secretoria, pero funcionan como barreras físicas contra herbívoros, impidiendo su movimiento sobre la superficie vegetal. Además, participan en la regulación de la absorción de agua (Gutiérrez-Alcalá *et al.*, 2005; Boughton *et al.*, 2005).

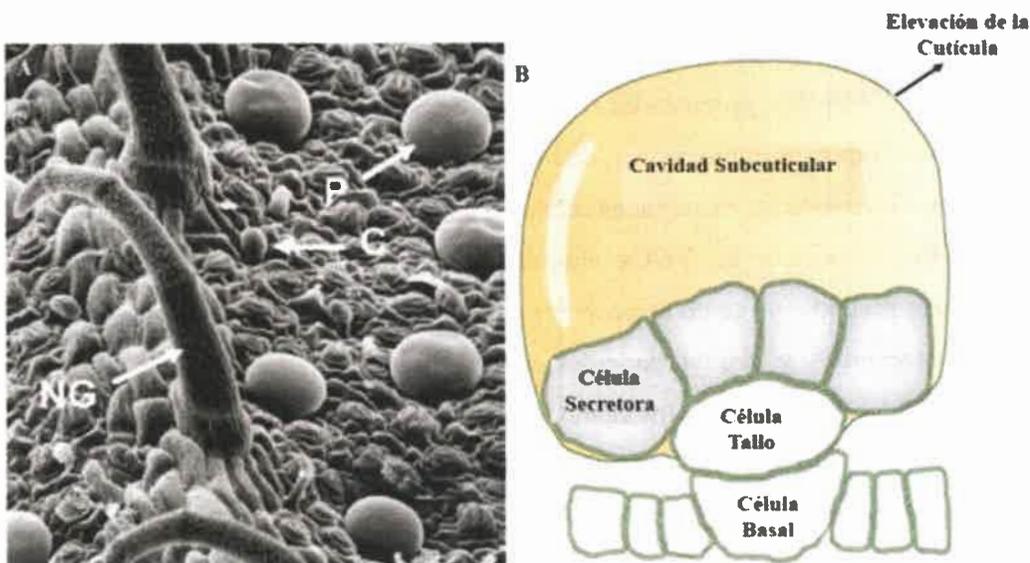


Fig. 1.3. A: Microscopía electrónica de barrido de la superficie de una hoja de *M. piperita*. P: tricoma glandular de tipo peltado, C: tricoma glandular de tipo capitado, NG: tricoma no glandular (Croteau *et al.*, 2005). **B:** Diagrama esquemático de un tricoma glandular peltado de una hoja de *M. piperita* el cual ilustra la ubicación de esta estructura epidérmica y la expansión de la cutícula debido a la secreción de los constituyentes del AE (Lange, 2015).

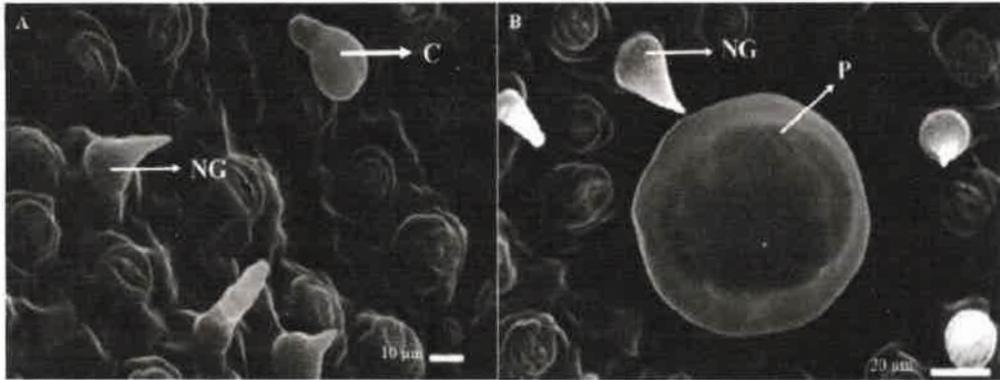


Fig. 1.4. Micrografía electrónica de barrido de la superficie abaxial de hojas de *M. piperita*. A: se observan un tricoma glandular capitado (C) y un tricoma no glandular (NG) entre predominantes estomas. B: se visualiza un tricoma glandular peltado (P) junto a un tricoma no glandular (NG) (Choi y Kim, 2013).

1.2.2. Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) vegetales

Los VOCs (del inglés, *Volatile Organic Compounds*) vegetales pueden ser definidos como aquellos metabolitos secundarios que las plantas liberan al entorno (Baldwin, 2010). Funcionan como un lenguaje que las plantas, organismos sésiles, emplean para su comunicación e interacción con el ambiente circundante (Dudareva *et al.*, 2006). Los VOCs pueden ser liberados por hojas, flores y frutos a la atmósfera y, también, por las raíces al suelo (Maffei, 2010); pero principalmente, se liberan a través de la superficie de las hojas y de los sitios de almacenamiento presentes en las mismas (Paré y Tumlinson, 1999). Sus propiedades físicas, tal como su bajo peso molecular y su elevada presión de vapor a temperatura ambiente, permiten que mencionados compuestos atraviesen libremente las membranas celulares y sean liberados al ambiente circundante.

En la mezcla de VOCs emitida se pueden identificar diferentes clases de metabolitos secundarios como terpenoides, volátiles de hoja verde, compuestos aromáticos como benzenoides y fenilpropanoides, compuestos derivados de aminoácidos como alcoholes, aldehídos y ésteres, los cuales se caracterizan por contener átomos de S y N, etc. (Dudareva *et al.*, 2013; Chalal *et al.*, 2015). En el caso particular de las plantas aromáticas, los compuestos emitidos son, principalmente, monoterpenos (Banchio *et al.*, 2005). La composición química de la mezcla de VOCs emitidos y su intensidad pueden dar información acerca del estado fisiológico y estrés de la planta (Dudareva *et al.*, 2006).

La biosíntesis de estos metabolitos depende de la disponibilidad de C, N y S, como así también, de la energía provista por el metabolismo primario (Dudareva *et al.*, 2013); por lo que las plantas liberan parte del carbono asimilado en la fotosíntesis en forma de VOCs (Bautista-Lozada *et al.*, 2012).



Las principales funciones de los VOCs incluyen la defensa de la planta contra organismos fitopatógenos y herbívoros y la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, proporcionando una ventaja reproductiva (Pichersky y Gershenzon, 2002; Dudareva *et al.*, 2006) (Fig. 1.5.). Los VOCs emitidos, como parte del sistema de defensa vegetal, pueden actuar directamente al repeler, intoxicar o disuadir a microorganismos patógenos y/o animales; o también, indirectamente, al atraer a los “enemigos” naturales del herbívoro atacante. Por lo cual es relevante la participación de los VOCs en las interacciones tritróficas. Además, los VOCs median la comunicación planta-planta, ya que los volátiles emitidos por una planta infectada por un fitopatógeno o atacada por un herbívoro, pueden inducir la expresión de genes relacionados con la defensa y la emisión de VOCs en plantas vecinas o en hojas sanas de la planta afectada. Ha sido reportado, que los VOCs vegetales participan, además, en la atracción de microorganismos benéficos y brindan protección a la planta contra diferentes tipos de estrés abiótico (Hassan *et al.*, 2015; Chalal *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2016).

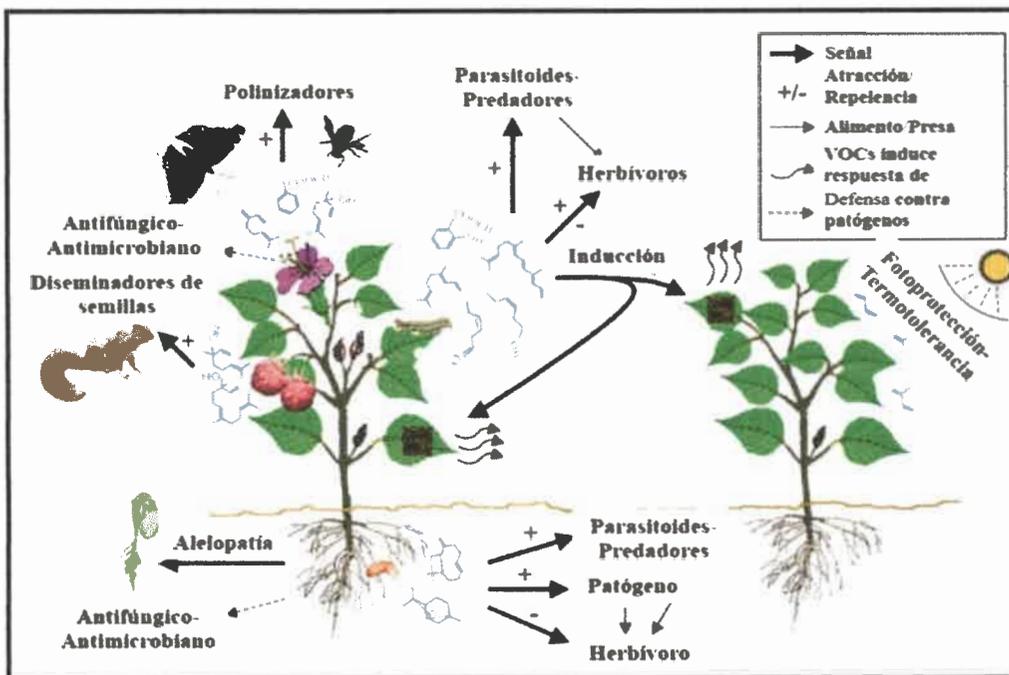


Fig. 1.5. Una visión integradora de las interacciones entre las plantas y el medio ambiente circundante mediadas por volátiles (Dudareva *et al.*, 2006).

1.2.3. Compuestos fenólicos

Todos los vegetales sintetizan un elevado número de compuestos fenólicos, los cuales se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos con una o varias funciones hidroxilo en su estructura química (Dai y Mumper, 2010; Mazid *et al.*, 2011).

Esta clase de compuestos presenta una importante diversidad química ya que se incluye, dentro de este grupo, desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina; además de compuestos como cumarinas, flavonoides, antocianinas, fenilpropanoides, quinonas, lignanos y varios alcaloides, entre otros (Wink y Schimmer, 2009; Dai y Mumper, 2010; Zhang y Liu, 2015).

Esta amplia clase de compuestos es de importancia tanto en la morfología como en la fisiología vegetal; ya que los mismos están involucrados en la defensa contra varios tipos de estreses abióticos como, por ejemplo, en la protección contra radiaciones UV, bajas y altas temperaturas, estrés hídrico y salino, etc. (Ryan *et al.*, 2002; Treutter, 2005). A su vez, participan en la respuesta de defensa de la planta por agresión de patógenos, parásitos o predadores (Skadhauge *et al.*, 1997; Treutter, 2005). Ecológicamente están involucrados en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas y juegan un rol crucial en las interacciones mutualistas microorganismo-planta, incluyendo la simbiosis leguminosa-rizobio (Sarkar y Shetty, 2013). También contribuyen a otorgarle color a flores y frutos y, estructuralmente, son los constituyentes de la pared celular (Treutter, 2005; Sarkar y Shetty, 2013).

Los mismos son valorados por sus propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, cardioprotectoras y por presentar efectos vasodilatadores (Balasundram *et al.*, 2006). Es de importancia el efecto de los mismos en la prevención de enfermedades asociadas a estrés oxidativo, razón por la cual ha aumentado el interés por el estudio de estos metabolitos secundarios (Dai y Mumper, 2010). Por sus propiedades antioxidantes son empleados en la preservación de los alimentos (Sarkar y Shetty, 2013).

El contenido de compuestos fenólicos en hojas de *M. piperita* representa, aproximadamente, un 20% del peso seco, del cual un 12% corresponde a flavonoides, tales como, eriocitrina, luteolina, ácido rosmarínico, ácido salvianólico B, narirutina, hesperidina; compuestos con propiedades antioxidantes, antidiabéticas y/o antitumorales (Krzyzanowska *et al.*, 2011; Kapp *et al.*, 2013; Figueroa-Pérez *et al.*, 2014; Riachi y De Maria, 2015).

1.2.3.1. Fenilalanina amonio liasa

Diferentes compuestos fenólicos como lignina, flavonoides, antocianinas, fitoalexinas, ácidos fenólicos, entre otros son derivados del aminoácido fenilalanina, a



través de la vía de los fenilpropanoides. La fenilalanina, al igual que otros aminoácidos aromáticos, procede de la vía del ácido shikímico (Cho y Lee, 2015).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL E.C.4.3.1.5) cataliza la primera reacción de la vía de los fenilpropanoides (Fig. 1.6.), la cual consiste en la desaminación no oxidativa del aminoácido L-fenilalanina para producir ácido *trans*-cinámico y un ión amonio libre (Cochrane *et al.*, 2004).

Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. La actividad de la enzima PAL es estimulada en diferentes procesos del desarrollo vegetal y, además, por una variedad de señales ambientales, incluyendo el ataque de organismos patógenos, heridas tisulares, radiación UV, exposición a metales pesados, bajas temperaturas y bajos niveles de nitrógeno, fosfato u otros iones (Zhang y Liu, 2015).

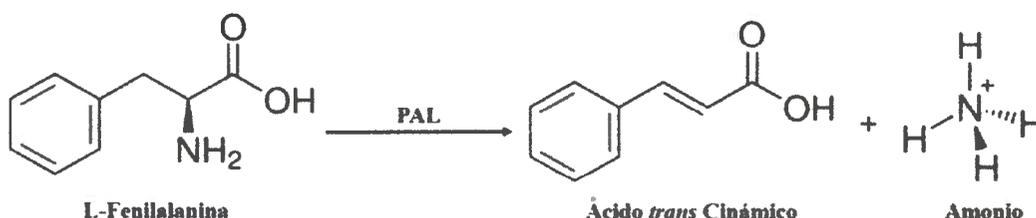


Fig. 1.6. Reacción catalizada por la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL).

1.3. Fitohormonas

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que actúan a distancia o en su sitio de síntesis, a bajas concentraciones (micromolar). Las mismas regulan esencialmente todos los procesos fisiológicos y del desarrollo durante el ciclo de vida de la planta y las vías de señalización involucradas en la respuesta a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Schmelz *et al.*, 2003; Bari y Jones, 2009; Piotrowska y Bajguz, 2011; Shigenaga *et al.*, 2016). Estos compuestos, estructuralmente diversos, incluyen al ácido abscísico (ABA), auxinas (IAAs), brasinoesteroides (BRs), citoquininas, giberelinas (GAs), etileno (ET), jasmonatos (JAs) y al ácido salicílico (SA) (Wang e Irving, 2011).

Tradicionalmente SA, JAs y ET se asocian con la defensa de la planta contra insectos y patógenos; mientras que GAs, IAAs, BRs y citoquininas se relacionan con procesos del desarrollo vegetal. En tanto que ABA, es la principal hormona vegetal, a la cual se involucra en la regulación de las respuestas frente a diversos tipos de estrés abiótico



(Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, se hace cada vez más evidente que todas las hormonas vegetales pueden tener directa y/o indirectamente efectos sobre múltiples procesos vegetales (Bari y Jones, 2009; Shigenaga *et al.*, 2016).

1.3.1. Jasmonatos

Los jasmonatos (JAs) son una clase de fitohormonas, ampliamente distribuida en el reino vegetal, que incluye al ácido jasmónico (JA), sus derivados y precursores (Abdala y Cenzano, 2006; Piotrowska y Bajguz, 2011). Entre ellos cabe mencionar su precursor el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), su éster metílico: metil jasmonato (MeJA), derivados hidroxilados, JA conjugado con aminoácidos como valina, leucina, tirosina e isoleucina y JA conjugado con glucosa, entre otros (Avanci *et al.*, 2010). Los JAs son moléculas lipídicas, producidas a partir del ácido α -linolénico (18:3), través de la vía de los octanoides (Westernack, 2014; Shigenaga *et al.*, 2016). Por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados, esta clase de compuestos, forma parte del grupo de las oxilipinas y posee homología estructural con prostaglandinas originadas, en animales, a partir de ácido araquidónico (20:4) (Abdala y Cenzano, 2006; Yuan y Zhang, 2015).

El JA es una ciclopentanona que posee una cadena lateral pentenilo insertada en el C7, un grupo acetilo unido al C3 y la presencia del grupo ceto en posición C6 (Piotrowska y Bajguz, 2011). Su éster metílico, MeJA, se origina por la adición de un grupo metilo en el carbono 1 (C1) (Noir *et al.*, 2013) (Fig. 1.7.).

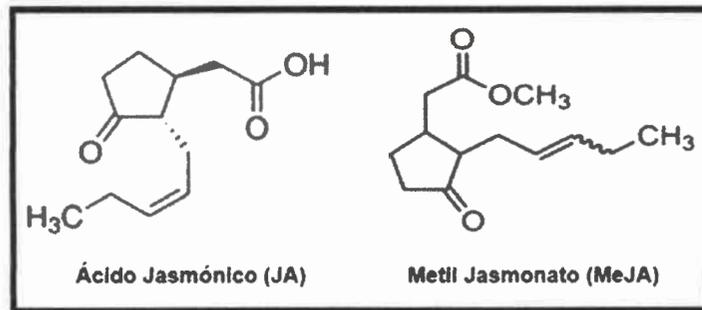


Fig. 1.7. Estructura del ácido jasmónico (JA) y su éster metílico metil jasmonato (MeJA).

Los JAs participan en las respuestas de las plantas a una gran variedad de estreses bióticos y abióticos (Liu *et al.*, 2015); como el ataque de insectos (Hu *et al.*, 2013), la infección por organismos patógenos necrotrofos (Yang y Xie, 2015), daño mecánico (Robson *et al.*, 2010), estrés por ozono (Westernack, 2014), radiación UV (Demkura *et al.*, 2010), estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas (Seo *et al.*, 2011; Westernack, 2014). Además, el JA y sus derivados participan en el control de diversos procesos del desarrollo

vegetal (Abdala y Cenzano, 2006; Wasternack, 2007) como crecimiento de la raíz (Cheng *et al.*, 2011), senescencia foliar (Jiang *et al.*, 2014), germinación de la semilla, formación del tubérculo, apertura estomática (Bari y Jones, 2009), enrollamiento de zarcillos (Abdala y Cenzano, 2006), formación de tricomas (Wasternack, 2014), maduración de frutos y desarrollo floral (Khan *et al.*, 2014). Los JAs, también, pueden ser emitidos en la mezcla de VOCs mediando la comunicación planta-planta (Baldwin *et al.*, 2006; Felton y Tumlinson, 2008). Por otro lado, se ha reportado que los JAs participan en la regulación de las interacciones benéficas microorganismo-planta; como las asociaciones con hongos micorrízicos arbusculares (AMF) y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Westernack, 2014). Además, el JA juegan un rol central en la regulación de resistencia sistémica inducida, ISR (del inglés, *Induced Systemic Resistance*); desencadena como respuesta a la herbivoría y por microorganismos benéficos (van Loon *et al.*, 1998; van Loon, 2007).

Los niveles de JAs encontrados en plantas intactas oscilan en el rango de 10 a 100 ng/g de peso fresco pero los mismos pueden ser incrementados significativamente bajo situaciones de estrés biótico y/o abiótico (Bari y Jones, 2009; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014). El incremento de los niveles de JAs conduce a una dramática reprogramación de la expresión de genes involucrados, por ejemplo, en la producción de metabolitos secundarios (Avanci *et al.*, 2010; Westernack, 2014), en la formación de la pared celular (Cheong y Choi, 2003) y también de la expresión de aquellos genes que codifican para proteínas de defensa y enzimas involucradas en la propia ruta de biosíntesis de JAs. Cabe aclarar que el contenido endógeno de JAs varía en función del tejido, el tipo celular y el estadio del desarrollo de la planta (Creelman y Mullet, 1997).

1.3.2. Ácido Salicílico

El ácido salicílico (SA) (o ácido 2-hidroxibenzoico) (Fig. 1.8.) forma parte del grupo de los compuestos fenólicos, anteriormente descrito, y se encuentra presente en plantas en cantidades de unos pocos $\mu\text{g/g}$ de peso fresco (Raskin, 1992). Esta fitohormona puede encontrarse en su forma libre o en forma glicosilada (SAG), metilada (MeSA), hidroxilada o conjugado con aminoácidos (Hara *et al.*, 2012). Varios de los derivados del SA no son compuestos activos como, por ejemplo, SAG y MeSA (Kumar, 2014), mientras que varias formas hidroxiladas son biológicamente activas (Rangel Sánchez *et al.*, 2010).

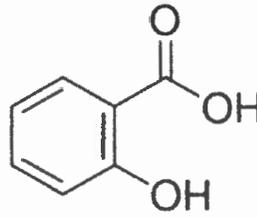


Fig. 1.8. Estructura química del ácido salicílico (SA).

El SA deriva del corismato, un producto de la vía del ácido shikímico, a través de dos vías, una de la cuales involucra la enzima PAL, anteriormente descrita; y la otra vía consta de dos reacciones catalizadas por las enzimas isocorismato sintasa (ICS), la cual convierte corismato a isocorismato y la isocorismato piruvato liasa (IPL) la cual cataliza la conversión de isocorismato a SA (Khan *et al.*, 2015; Shigenaga *et al.*, 2016). Durante la respuesta a patógenos, la planta preferencialmente emplea la vía del isocorismato para la síntesis de SA (Métraux *et al.*, 1990). Una vez formado el SA no solo se acumula en el sitio de infección, sino que lo hace sistémicamente, con el objetivo de proteger sitios no dañados (Verma *et al.*, 2016). Después de su síntesis, la mayor parte del SA producido es almacenada en forma de SAG, compuesto biológicamente inactivo. El mismo puede volver a SA a través de una reacción enzimática catalizada por la enzima SA β -glucosidasa. El derivado metilado (MeSA) también es inactivo, pero es volátil y puede difundir fácilmente a través de las membranas (Kumar, 2014). Este mecanismo ayuda a la planta a reducir la acumulación de SA de las células y, en consecuencia, sus efectos tóxicos (Cronje *et al.*, 2004).

Ha sido reportado que el SA participa en la regulación de varios procesos del crecimiento y desarrollo vegetal como metabolismo del N y la prolina, sistema de defensa antioxidante, movimiento estomático, floración, fotosíntesis, respiración, germinación de la semilla, establecimiento de la plántula, en el proceso de termogénesis, entre otros (Jordán y Casaretto, 2006; Miura y Tada, 2014; Shigenaga *et al.*, 2016). Además, el SA está involucrado en las respuestas de las plantas a varios tipos de estreses abióticos como la exposición a metales pesados, radiación UV, altas y bajas temperaturas, estrés hídrico y salino, etc. (Hara *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2015). A su vez, el SA juega un rol clave en la regulación de resistencia sistémica adquirida, SAR (del inglés, *Systemic Acquired Resistance*), producto de la interacción planta-patógeno. Esta fitohormona participa en la activación de varias respuestas de defensa; confiriendo inmunidad sistémica y local contra un importante número de patógenos biotróficos y hemi-biotróficos (Derksen *et al.*, 2013; Kumar, 2014; Kumar *et al.*, 2015).

Se ha determinado en plantas atacadas por patógenos, que son necesarios incrementos en los niveles de SA, para que se produzca un aumento en la expresión de genes relacionados con la defensa los cuales, por ejemplo, codifican para las proteínas relacionadas a la patogénesis o PR (Jordán y Casaretto, 2006).

1.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

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 vegetal, su edad, entre otros factores (Foster, 1998).

Las raíces vivas proveen una fuente de nutrientes para los organismos del suelo; los exudados radicales son compuestos químicos liberados por exudación, secreción o autólisis de raíces viejas. Estos contienen, en mayor proporción, compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y varios metabolitos secundarios; y también, compuestos de alto peso molecular como proteínas y polisacáridos, además de, iones inorgánicos, agua y electrones (Pérez-Montañaño *et al.*, 2014; Rasmann y Turlings, 2016). Ha sido estimado que entre un 20 y un 80% de los fotosintatos ingresan a la rizósfera como exudados radicales (Rasmann y Turlings, 2016), representando la mejor fuente de nutrientes disponible en el suelo; razón por la cual, la zona alrededor de las raíces es un hábitat de máxima actividad biológica. De las diferentes poblaciones microbianas presentes en esta zona del suelo, las bacterias son los microorganismos más abundantes, con una densidad de hasta 10^9 células por gramo de suelo (Nadeem *et al.*, 2013).

Las PGPR (del inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) son bacterias benéficas de vida libre del suelo que juegan un rol significativo en promover el crecimiento y desarrollo vegetal, al colonizar el sistema radicular; a través de diferentes mecanismos que pueden ser directos o indirectos (Fig. 1.10.) (Lucy *et al.*, 2004; Pérez Montañaño *et al.*, 2014; Shrivastava *et al.*, 2015).

Los beneficios para la planta que pueden resultar de la interacción huésped - PGPR incluyen incrementos en la tasa de germinación de las semillas, en el crecimiento de la raíz, en el área foliar, en el contenido de clorofila y proteínas, en la toma de nutrientes, en la actividad hidráulica, en la tolerancia al estrés abiótico, en la supresión de enfermedades causadas por microorganismos, en la longitud y peso del tallo y la raíz y una

disminución de la senescencia (Fig. 1.9.) (Yang *et al.*, 2009; Pérez Montaña *et al.*, 2014; Verbon y Liberman, 2016).

Estudios previos demuestran que la inoculación de PGPR incrementa la producción de diferentes clases de cultivos (Kloepper *et al.*, 1991; Glick, 2012). Sin embargo, hasta el momento, se registran escasos estudios sobre los efectos que producen este tipo de microorganismos sobre plantas aromáticas (Banchio *et al.*, 2008; Cappellari *et al.*, 2013; Santoro *et al.*, 2015).

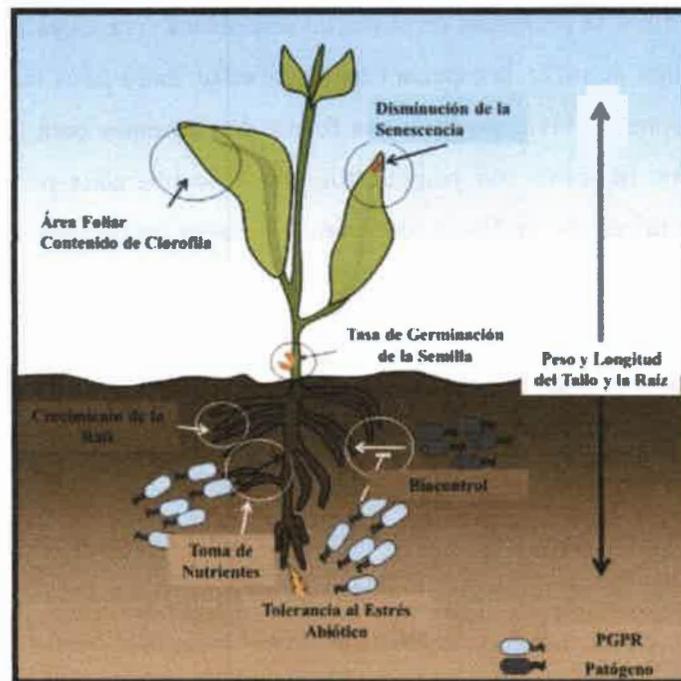


Fig. 1.9. Beneficios para la planta que resultan de la interacción huésped-PGPR (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

1.4.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por PGPR

Los mecanismos por los cuales las PGPR promueven el crecimiento vegetal dependen de cada interacción microorganismo-planta; por lo tanto es necesario determinar el efecto particular de una determinada cepa PGPR sobre la fisiología y el desarrollo de una especie vegetal en particular.

1.4.1.1. Mecanismos directos

1.4.1.1.1. Fijación biológica del N₂

A pesar de la abundancia de N₂ en la atmósfera (el N₂ representa más del 70% de los gases atmosféricos), el mismo no es aprovechable por las plantas, que deben utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo (NO₃⁻, NO₂⁻ y NH₃), en cantidades

insuficientes para soportar los cultivos intensivos. Considerando que el N es el principal nutriente requerido por la planta.

La fijación biológica del N₂ (FBN) consiste en la reducción del N₂ a NH₃ gracias al complejo enzimático nitrogenasa presente en algunos microorganismos denominados diazotrofos (Franche *et al.*, 2009). Se conocen dos grupos de microorganismos con capacidad de llevar a cabo el proceso de FBN: bacterias de vida libre y bacterias simbióticas de plantas superiores. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre incluyen a miembros de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, entre otros y, también, cianobacterias (Vessey, 2003; Saharan y Nehra, 2011).

En conclusión, la FBN representa una alternativa interesante, tanto desde el punto de vista ambiental como económico, al empleo de fertilizantes químicos (Ahemad y Kibret, 2014).

1.4.1.1.2. Solubilización de fosfatos

El P, luego del N, es el segundo macronutriente de importancia requerido por la planta; por lo que los bajos niveles de fosfato soluble en los suelos pueden limitar el crecimiento vegetal (Anzuay *et al.*, 2013; Ahemad y Kibret, 2014; Kumar *et al.*, 2016). Los suelos pueden tener grandes reservas de P total, pero las formas asimilables por las plantas, representan una pequeña proporción de ese total. La baja disponibilidad se debe a que la mayor parte del P del suelo se encuentra en formas insolubles y las plantas pueden solo absorber P en dos formas solubles: los iones monobásico (H₂PO₄⁻) y dibásico (HPO₄²⁻) (Vessey, 2003; Shrivastava *et al.*, 2015).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos son muy comunes en la rizósfera y secretan ácidos orgánicos de bajo peso molecular como ácido glucónico, 2-cetoglucónico, cítrico, láctico, succínico, etc. los cuales quelan cationes (Al, Fe, Ca, Mg) unidos a formas insolubles de fósforo convirtiéndolas en solubles, aprovechables por la planta (Rodríguez *et al.*, 2006; Anzuay *et al.*, 2013). Estas rizobacterias, además, pueden secretar enzimas tales como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas que liberan P soluble de compuestos orgánicos presentes en el suelo (Kumar *et al.*, 2016).

Se ha reportado que cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, entre otros, tienen la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles (Rodríguez *et al.*, 2006; Gupta y Kumar, 2017).

1.4.1.1.3. Producción de sideróforos

En el suelo el Fe no está disponible para asimilación directa por parte de los microorganismos o de las plantas, porque el Fe^{+3} , el cual predomina en la naturaleza, es muy poco soluble y en el suelo se encuentra en muy baja concentración para el óptimo crecimiento de los organismos vivos. Por esta razón, para sobrevivir los microorganismos del suelo sintetizan y secretan compuestos de bajo peso molecular de unión al hierro conocidos como sideróforos, como también, receptores capaces de unir el complejo Fe^{+3} -sideróforo (Siddiqui, 2005; Ahemad y Kibret, 2014).

Los sideróforos unen Fe^{+3} con alta afinidad, de esta manera aumentan la disponibilidad de Fe tanto para el propio microorganismo como para las plantas, que son capaces de reconocer el complejo sideróforo- Fe^{+3} de origen bacteriano (Glick, 2012; Beneduzi *et al.*, 2012).

Este mecanismo de promoción del crecimiento vegetal es muy común entre los miembros del género *Pseudomonas* (Hayat *et al.*, 2010).

1.4.1.1.4. Producción de fitohormonas

Muchas bacterias poseen la capacidad de producir y liberar al medio fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquininas. Cada bacteria en particular puede afectar el crecimiento vegetal, mediante la síntesis de uno o más de estos compuestos. Según lo reportado por Brown (1974) y Tien y col. (1979), el mecanismo de acción directo de las PGPR es, por excelencia, la producción de fitohormonas.

Cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Bacillus* poseen la capacidad de sintetizar y exportar diferentes clases de fitoreguladores, los cuales participan en diferentes procesos del desarrollo y crecimiento vegetal (Hayat *et al.*, 2010; Glick, 2012). Por ejemplo, ha sido reportado, que varias cepas PGPR son capaces de producir AIA (ácido indol acético) y ácido giberelico en el suelo rizosférico los cuales juegan un rol significativo en incrementar la superficie radical y el número de pelos radicales en varias especies vegetales (Shrivastava *et al.*, 2015).

1.4.1.1.5. Regulación del nivel de etileno

Ciertas cepas PGPR pueden promover el crecimiento vegetal, al disminuir los niveles de etileno en plantas, mediante la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-

carboxilato (ACC) deaminasa. Esta enzima cliva el ACC, el precursor inmediato del etileno; lo cual resulta en un marcado desarrollo radical (Glick *et al.*, 1998; Glick, 2012).

Ha sido reportado que cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Serratia*, entre otros exhiben actividad ACC deaminasa (Ahemad y Kibret, 2014).

1.4.1.1.6. Producción de compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos mVOCs (del inglés: *microbial Volatile Organic Compounds*) son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, principalmente derivados de reacciones de fermentación, tales como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, etc. (Naznin *et al.*, 2013). La promoción del crecimiento vegetal, por parte de estas sustancias, es un mecanismo identificado pero aún no completamente dilucidado (Ryu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012).

Últimamente ha sido reportado que los mVOCs, además, de estimular el crecimiento vegetal pueden inducir resistencia sistémica (ISR), incrementando la capacidad defensiva de la planta frente a organismos fitopatógenos (Banchio *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2011; Santoro *et al.*, 2016) y aumentar la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Liu y Zhang, 2015).

1.4.1.2. Mecanismos indirectos

Las PGPR pueden suprimir un amplio espectro de enfermedades virales, bacterianas, fúngicas y causadas por nematodos, a través de antagonismo microbiano o inducción de resistencia en la planta (van Loon y Bekker, 2003; van Loon, 2007), promocionando de esta manera el crecimiento vegetal de forma indirecta.

1.4.1.2.1. Mecanismos involucrados en el antagonismo microbiano en la rizósfera

 **Producción de sideróforos:** las PGPR puede prevenir la proliferación de hongos y de otros agentes patógenos mediante la producción de sideróforos. Estas moléculas quelan el Fe^{+3} en las inmediaciones de la raíz; por lo que la consiguiente falta de hierro impide la proliferación de patógenos en esta zona (Siddiqui, 2005). La producción de sideróforos es muy común entre los miembros del género *Pseudomonas* (Hayat *et al.*, 2010).

 **Producción de antibióticos y compuestos antifúngicos:** uno de los mecanismos más eficaces que las PGPR emplean para prevenir la proliferación de organismos fitopatógenos

es la síntesis de antibióticos (Shaikh, *et al.*, 2016). *P. fluorescens* y varias cepas del género *Bacillus* desempeñan un importante rol en la supresión de microorganismos patógenos mediante la secreción extracelular de metabolitos que resultan inhibitorios a bajas concentraciones (Fernando *et al.*, 2005).

Actividad lítica: varias cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal pueden producir enzimas hidrolíticas como quitinasas y β -1,3-glucanasas; las cuales participan en la degradación de la quitina y los glucanos de la pared celular fúngica, provocando la disrupción osmótica de la membrana celular (van Loon y Bekker, 2003). Otras enzimas hidrolíticas como celulasas, lipasas y proteasas están involucradas en la supresión de bacterias fitopatógenas (Babalola, 2010).

Competición por sustratos: la competencia entre microorganismos patógenos y saprófitos por materiales orgánicos liberados de las raíces, puede reducir el crecimiento y/o actividad de microorganismos patógenos (van Loon y Bakker, 2003). Este es un importante mecanismo biocontrolador empleado por los miembros del género *Pseudomonas* (Avis *et al.*, 2008).

Inhibición de enzimas o toxinas producidas por fitopatógenos: existen hongos patógenos que producen enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales degradan los polímeros presentes en las paredes celulares vegetales, facilitando la infección por la desintegración de la pared celular. Estas enzimas incluyen exo y endo poligalacturanosas, celulasas, entre otras. Las PGPR pueden reducir la actividad de estas enzimas fúngicas, lo cual se correlaciona con una reducción de la virulencia.

Producción de ácido cianhídrico: algunas cepas del género *Pseudomonas* poseen la capacidad de producir ácido cianhídrico (HCN), al cual ellas son resistentes. Este compuesto participa en la inhibición directa de los hongos, al inhibir la enzima citocromo C oxidasa terminal de la cadena respiratoria y al unirse a metaloenzimas (van Loon *et al.*, 1998).

1.4.1.2.2. Resistencia Sistémica Inducida

La interacción de bacterias no patógenas con la raíz de la planta, induce mecanismos de defensa en el huésped; lo cual provoca una reducción en la severidad o incidencia de las enfermedades causadas por fitopatógenos y/o de los ataques de organismos herbívoros; que se encuentran espacialmente separados del agente inductor (van Loon y Glick, 2004; Choudhary y Johri, 2009; Pérez-Montaña *et al.*, 2014).



Se ha reportado que cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum*, entre otros, poseen la capacidad de inducir mecanismos de defensa en plantas al igual que lo hacen organismos fitopatógenos o insectos herbívoros (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

Entre las respuestas de defensa inducidas por PGPR pueden citarse la acumulación de fitoalexinas, el reforzamiento de la pared celular, el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios, el incremento en la expresión de los genes que codifican para proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y de determinadas enzimas como PAL, peroxidasa, polifenoloxidasas, quitinasas, entre otras (van Loon, 2007).

La participación de las PGPR en la inducción de resistencia sistémica se relaciona con la producción por parte de estas bacterias no patógenas de elicitores, inductores o determinantes que activan las respuestas de defensa en las células vegetales (Jankiewicz y Koltonowicz, 2012). Entre los determinantes bacterianos capaces de inducir ISR se encuentran compuestos de la superficie celular bacteriana como flagelos y lipopolisacáridos (LPS), compuestos liberados por la bacteria al medio circundante como sideróforos, SA, antibióticos y VOCs emitidos por las rizobacterias (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

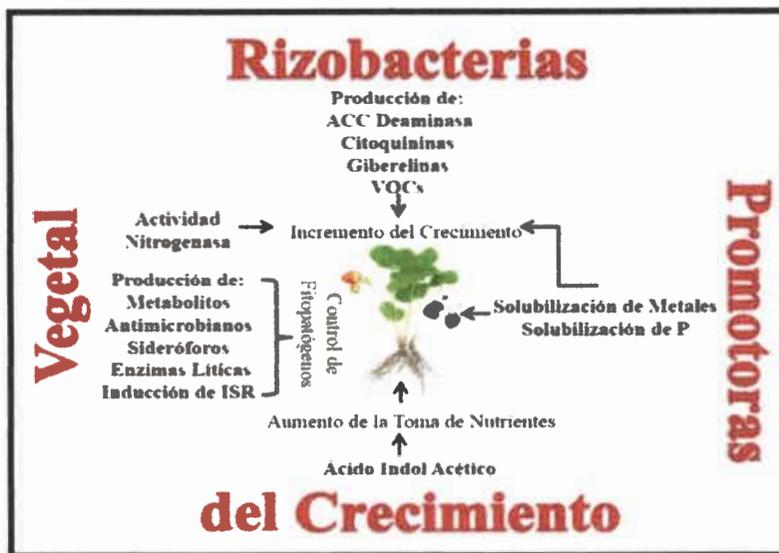


Fig. 1.10. Mecanismos de promoción del crecimiento por rizobacterias (Ahemad y Kibret, 2014).

1.4.2. Géneros de PGPR

Dentro de las PGPR encontramos bacterias pertenecientes a diferentes géneros como: *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, entre otros (Kloepper, 1993; van Loon, 2007; Vessey, 2003; Miransari, 2014; Shrivastava *et al.*, 2015).

1.4.2.1. *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más importantes y mejor estudiados debido a su amplia distribución en el ambiente y su fácil cultivo en condiciones de laboratorio. Son bacilos rectos o ligeramente curvos Gram (-), aerobios, móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares, oxidasa positivos, a veces, negativos, catalasa positivos. Estos microorganismos poseen requerimientos nutricionales simples y crecen bien en medios suplementados con sales minerales con una de una amplia gama de fuentes de C que pueden utilizar (Palleroni, 2005; Garrido-Sanz *et al.*, 2016).

Particularmente el grupo de las pseudomonas fluorescentes incluye especies de interés ambiental, capaces de promover el crecimiento vegetal (PGPR), degradar compuestos xenobióticos o generar fitopatologías y especies de interés médico, capaces de producir enfermedades en seres humanos y animales (Wu *et al.*, 2009). Tal como su nombre lo indica, estos microorganismos secretan pigmentos solubles fluorescentes de color amarillo verdoso llamados pioverdina (Meyer y Abdallah, 1978) o pseudobactina (Teintze y *et al.*, 1981), particularmente bajo déficit de Fe. Mencionados compuestos poseen acción siderófora favoreciendo al transporte de hierro (Neilands, 1973; Mehri *et al.*, 2011) y ligando algunas especies a su función patogénica (Fuchs *et al.*, 2001).

Las pseudomonas fluorescentes con capacidad PGPR, como *P. putida* y *P. fluorescens*, han logrado un incremento en la productividad de diferentes cultivos, como así también una reducción de las poblaciones de microorganismos patógenos, tanto bajo condiciones de campo como de invernadero (Loper, 1988; Bakker *et al.*, 1991). Uno de los mecanismos más importante, por el cual los miembros del género *Pseudomonas* promueven el crecimiento vegetal, es mediante la supresión de microorganismos patógenos (Raaijmakers *et al.*, 2002; Pieterse *et al.*, 2003; Garrido-Sanz *et al.* 2016). En varias cepas de este género la producción de metabolitos como antibióticos, sideróforos y HCN es el principal mecanismo involucrado en el control biológico (Weller y Thomashow, 1993; Fernando *et al.*, 2005; Miransari, 2014). Otros mecanismos implican la degradación de

factores de virulencia de los patógenos como enzimas y/o toxinas, la producción de enzimas extracelulares como quitinasas, glucanasas y la competición por nutrientes (Avis *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que algunas cepas del género *Pseudomonas*, que están íntimamente asociadas con la raíz, pueden inducir el mecanismo de resistencia sistémica contra diversos organismos fitopatógenos (Bakker *et al.*, 2007; Garrido-Sanz *et al.* 2016).

La estimulación del crecimiento vegetal por *Pseudomonas*, a través de mecanismos directos, se atribuye a la solubilización de fosfato, a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal como AIA, a la degradación de precursores del etileno en la raíz y/o a producción de VOCs (Vessey, 2003; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Santoro *et al.*, 2015; Pii *et al.*, 2015). De este modo, las cepas pertenecientes al grupo de las pseudomonas fluorescentes con capacidad PGPR ofrecen una alternativa atractiva como bioinoculantes y agentes de biocontrol (Palleroni, 2005).

1.3.2.2. *Bacillus spp.*

Los miembros del género *Bacillus* son bacilos Gram (+), aerobios o anaerobios facultativos, catalasa (+), inmóviles o móviles por flagelación peritrica. Capaces de formar endosporas, las cuales les permiten sobrevivir por períodos prolongados de tiempo bajo condiciones adversas. Al igual que las células vegetativas, las endosporas pueden ser aisladas de una amplia variedad de ambientes terrestres y acuáticos (Mols y Abbe, 2011; Hirooka, 2014). *B. subtilis* es una especie de este género, reconocida por su capacidad de promover el crecimiento vegetal; este microorganismo ha sido aislado de la rizósfera de una significativa cantidad de especies vegetales a una densidad de hasta 10^7 UFC/gramo de suelo (Antoun y Prévost, 2005). Además, de *B. subtilis* otras especies de este género son capaces de estimular el desarrollo vegetal como *B. polymyxa*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens* (Kumar *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento por cepas pertenecientes al género *Bacillus*, pueden citarse la solubilización y movilización de fosfatos, la producción de fitohormonas como citoquininas y giberelinas y la FBN (Vessey, 2003; Kumar *et al.*, 2012; Pii *et al.*, 2015). Sin embargo, este grupo de microorganismos posee un rol destacado en el control de organismos fitopatógenos; ya que son capaces de liberar metabolitos antifúngicos y antibióticos y sintetizar quitinasas, las cuales hidrolizan la pared celular fúngica (Choudhary y Johri, 2009; Fernando *et al.*, 2005). Además, los

miembros de este género junto con los del género *Pseudomonas* son las bacterias más estudiadas por inducir resistencia sistémica en una amplia variedad de especies vegetales (van Wees *et al.*, 2008).

Los VOCs emitidos por algunas especies de este género pueden promover el crecimiento vegetal e inducir ISR en una amplia variedad de especies vegetales (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Banchio *et al.*, 2009).

Capítulo II
Hipótesis y
Objetivos





2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo

“La inoculación de cepas PGPR en plantas de *Mentha x piperita* L produce un efecto benéfico sobre la producción de biomasa e induce la biosíntesis de metabolitos secundarios. El tratamiento conjunto de inoculación con rizobacterias y aplicación exógena de las fitohormonas MeJA o SA, produce un efecto sinérgico sobre el desarrollo y crecimiento vegetal y la biosíntesis de productos del metabolismo secundario.”

2.2. Objetivo general

Estudiar distintos aspectos de la inoculación con microorganismo promotores del crecimiento vegetal (PGPR) sobre la producción de biomasa y la biosíntesis de aceites esenciales y compuestos fenólicos en plantas de *Mentha x piperita* L. Indagar sobre la participación de las fitohormonas MeJA y SA en la biosíntesis de mencionados productos del metabolismo secundario vegetal.

2.3. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de clorofila, el contenido de aceites esenciales, la concentración de los monoterpenos principales, el contenido de fenoles totales, el número de pelos glandulares y estomas en plantas inoculadas con bacterias PGPR.
2. Estudiar cualitativa y cuantitativamente los aceites esenciales, fenoles totales y desarrollo de pelos glandulares en plantas aromáticas expuestas al ácido jasmónico y salicílico exógeno.
3. Evaluar la actividad enzimática de L-fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas inoculadas con rizobacterias.
4. Evaluar los efectos de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa y la emisión de VOCs. Determinar la supervivencia de las cepas inoculadas y co-inoculadas.

Capítulo III
Materiales y
Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para las distintas experiencias se utilizaron plantas de *M. piperita* procedentes de una plantación comercial de la región de Villa Dolores, Córdoba. Estacas uninodales de entre 5 y 7 cm de longitud, fueron cortadas de regiones en activo crecimiento y transferidas a tubos de ensayo conteniendo agua destilada estéril y 10 mg de hormona para enraizar “Parque” (ácido α -naftalénacético 0,3 g e inerte c.s.p. 100 g).

Una vez enraizadas, aproximadamente a los 7 días, las estacas fueron transferidas a macetas plásticas de 330 cm³ conteniendo vermiculita estéril (una plántula por maceta). Las macetas fueron colocadas en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), a 24-28°C y humedad controlada. Para regar fue empleado el medio salino Hoagland estéril (*Ver Anexo I*).

3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

3.2.1. Cepas bacterianas

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal:

 *Pseudomonas simiae* WCS417r (conocida anteriormente como *P. fluorescens* WCS417r) (Berendsen *et al.*, 2015; Wintermans *et al.*, 2016).

 *Pseudomonas putida* SJ04: cepa fluorescente aislada de suelo adherido a las raíces de plantas de *M. piperita*, procedentes de una plantación comercial en Villa Dolores, Córdoba. Esta cepa fue evaluada para determinar su capacidad de promoción del crecimiento vegetal, determinándose su habilidad para solubilizar fosfatos, producir sideróforos y AIA (GenBank KF312464.1; Santoro *et al.*, 2015; Santoro *et al.*, 2016).

 *Bacillus subtilis* GB03 (Kodiak® Gustafson, Inc, Plano, TX, Estados Unidos).

3.2.2. Conservación y mantenimiento de las cepas

Las cepas bacterianas fueron conservadas en *stocks* de glicerol a -80°C. Los *stocks* fueron preparados en esterilidad mediante la adición de 0.2 ml de glicerol estéril a 0.8 ml de un cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial tardía.



3.2.3. Condiciones de cultivo

Para los ensayos de inoculación, colonias bacterianas aisladas, crecidas sobre medio LB (Luria Bertani) agarificado (*Ver Anexo I*), fueron transferidas a Erlenmeyers de 100 ml conteniendo 25 ml de medio líquido LB. Las cepas se hicieron crecer hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, en un agitador a 30°C y 150 rpm.

3.3. Ensayo de inoculación

3.3.1. Inoculación y co-inoculación de plántulas

A los 7 días de ser transferidas a macetas, las plántulas fueron inoculadas y co-inoculadas con las cepas anteriormente citadas. Previa a la inoculación, las cepas cultivadas en medio LB hasta fase exponencial tardía, fueron centrifugadas, lavadas y re-suspendidas en solución fisiológica (CINa 0.9%) estéril, para obtener una suspensión bacteriana con una concentración final de 1×10^6 UFC/ml.

En los tratamientos de inoculación simple las plántulas fueron inoculadas con 1000 μ l de la suspensión bacteriana correspondiente (1×10^6 UFC/planta). Mientras que en los tratamientos de co-inoculación, las plántulas fueron inoculadas con 500 μ l de cada una de las suspensiones bacterianas correspondientes (5×10^5 UFC de cada cepa/planta). Las plantas control fueron inoculadas con 1000 μ l solución fisiológica estéril.

Las plantas fueron inoculadas con las siguientes cepas o combinaciones de cepas:

 *P. simiae* WCS417r

 *P. putida* SJ04

 *B. subtilis* GB03

 *P. simiae* WCS417r + *P. putida* SJ04

 *B. subtilis* GB03 + *P. putida* SJ04

Plántulas sin inocular fueron utilizadas como controles.

El ensayo se repitió 3 veces y en cada repetición se utilizaron 10 muestras de cada tratamiento.

3.3.2. Recolección de plantas y cuantificación de parámetros

A los 30 días de inoculadas, las plantas fueron cosechadas. El sistema radical fue lavado con abundante agua corriente para remover la vermiculita adherida, secado y separado de la parte aérea. Determinándose, posteriormente, el peso fresco de la parte

aérea y de las hojas, el peso seco de la raíz y de la parte aérea, el número de hojas y de nudos, la longitud del tallo y de la raíz.

La parte aérea fue reservada para la posterior determinación del número de tricomas glandulares y estomas, para cuantificar el contenido de AE, fenoles totales y clorofila y para analizar la actividad de la enzima PAL.

La superficie aérea foliar fue calculada utilizando el software ImageJ (programa desarrollado por los Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) sobre la base de imágenes digitales de las hojas, tal como fue descrito previamente (Turner *et al.*, 2000).

3.4. Ensayo con Fitohormonas

3.4.1. Aplicación exógena de MeJA y SA

A los 14 días de ser transferidas a macetas y a los 7 días posteriores a la inoculación, las plantas fueron esprayadas hasta punto de goteo, con soluciones de MeJA (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos) 1, 2 o 4 mM o soluciones de SA 1 o 2 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos), empleando un aspersor manual. Las concentraciones utilizadas fueron elegidas en base, a que a concentraciones más bajas no se observaron efectos sobre los parámetros a determinar y teniendo en cuenta la bibliografía disponible (Traw y Bergelson, 2003; Boughton *et al.*, 2005; War *et al.*, 2013). El SA aplicado a una concentración de 4 mM, produjo un efecto fitotóxico sobre las hojas, razón por la cual mencionada concentración de SA no fue incluida en este ensayo.

Para preparar las soluciones de MeJA 1, 2 y 4 mM se empleó como diluyente una solución al 1% de alcohol metílico; en tanto que para preparar las soluciones de SA se utilizó una solución de etanol al 1%. Las soluciones diluyentes fueron empleadas para esprayar las plantas del tratamiento control correspondiente. Plantas sin esprayar con solución diluyente no se diferenciaron significativamente ($p \geq 0.05$), en todas las variables evaluadas, de las expuestas a mencionadas soluciones; razón por la cual los controles no esprayados no se incluyen en los gráficos representativos de cada ensayo. Las plantas esprayadas con las soluciones de fitohormonas fueron separadas espacialmente de las plantas control, para evitar la influencia de la volatilización de las fitohormonas sobre los controles.

Plántulas sin inocular y sin tratar con fitoreguladores fueron utilizadas como controles. Plantas inoculadas pero no esprayadas con fitohormonas, también fueron empleadas como

controles debido a que se conocía, por ensayos realizados con anterioridad, el efecto de las rizobacterias sobre la producción de biomasa y de metabolitos secundarios. El ensayo se repitió 3 veces y en cada repetición se utilizaron 10 muestras de cada tratamiento.

Los tratamientos evaluados se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Tratamientos aplicados en los ensayos con fitohormonas

Tratamientos con MeJA		Tratamientos con SA	
Control			
MeJA 1 mM		SA 1 mM	
MeJA 2 mM		SA 2 mM	
MeJA 4 mM			
WCS417r			
WCS417r + MeJA 1 mM		WCS417r + SA 1 mM	
WCS417r + MeJA 2 mM		WCS417r + SA 2 mM	
WCS417r + MeJA 4 mM			
SJ04			
SJ04 + MeJA 1 mM		SJ04 + SA 1 mM	
SJ04 + MeJA 2 mM		SJ04 + SA 2 mM	
SJ04 + MeJA 4 mM			
GB03			
GB03 + MeJA 1 mM		GB03 + SA 1 mM	
GB03 + MeJA 2 mM		GB03 + SA 1 mM	
GB03 + MeJA 4 mM			
WCS417r + SJ04			
WCS417r + SJ04 + MeJA 1 mM		WCS417r + SJ04 + SA 1 mM	
WCS417r + SJ04 + MeJA 2 mM		WCS417r + SJ04 + SA 1 mM	
WCS417r + SJ04 + MeJA 4 mM			
GB03 + SJ04			
GB03 + SJ04 + MeJA 1 mM		GB03 + SJ04 + SA 1 mM	
GB03 + SJ04 + MeJA 2 mM		GB03 + SJ04 + SA 2 mM	
GB03 + SJ04 + MeJA 4 mM			

3.4.2. Recolección de plantas y cuantificación de parámetros

A los 7 y 14 días posteriores a la aplicación de las fitohormonas, se evaluaron los efectos de los tratamientos descritos anteriormente; utilizándose unidades experimentales distintas en cada tiempo. El sistema radicular fue separado de la parte aérea y descartado; mientras que la parte aérea fue reservada para calcular la densidad de tricomas glandulares

y para determinar diferentes parámetros de crecimiento vegetal y el contenido de AE, y fenoles totales. El ensayo se repitió 3 veces y en cada repetición se analizaron 10 muestras de cada tratamiento.

3.5. Extracción y cuantificación de AE

3.5.1. Extracción de AE

El material vegetal a analizar fue pesado y colocado en un balón de 100 ml junto con el estándar interno (1 μ l en 200 μ l de cloruro de metileno) y 50 ml de agua destilada. Como estándar interno se utilizó β -pinene, por no ser un constituyente del AE de la planta en estudio, ni tener un tiempo de retención similar a los compuestos presentes en el mismo.

El AE se extrajo por arrastre con vapor de agua, en un equipo Clevenger modificado por un tiempo de 20 minutos. El material obtenido de la destilación se particionó con 10 ml de cloruro de metileno y luego el solvente fue evaporado bajo presión reducida a 40°C. Posteriormente, el material obtenido fue inyectado en un cromatógrafo de gases (GC) (Banchio *et al.*, 2008).

3.5.2. Identificación de monoterpenos por cromatografía gaseosa

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un equipo Perkin-Elmer Clarus 600 acoplado a un detector de ionización de llama (FID) en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) de la Ciudad de Córdoba. Las condiciones de operación fueron las siguientes: la temperatura del horno fue programada desde 60°C los primeros tres minutos, hasta llegar a 240°C incrementando 4°C por minuto; la temperatura del inyector y del detector FID fueron de 250°C, se utilizó nitrógeno a un flujo constante de 0,9 ml/min. Se empleó la columna cromatográfica DB-5 (30 m \times 0,25 μ m).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con compuestos estándares puros (Banchio *et al.*, 2008) y sobre la base de un espectro de masa (Fig. 3.1.). De esta forma se determinó cualitativamente la presencia de los monoterpenos en los AE obtenidos de los diferentes tratamientos.

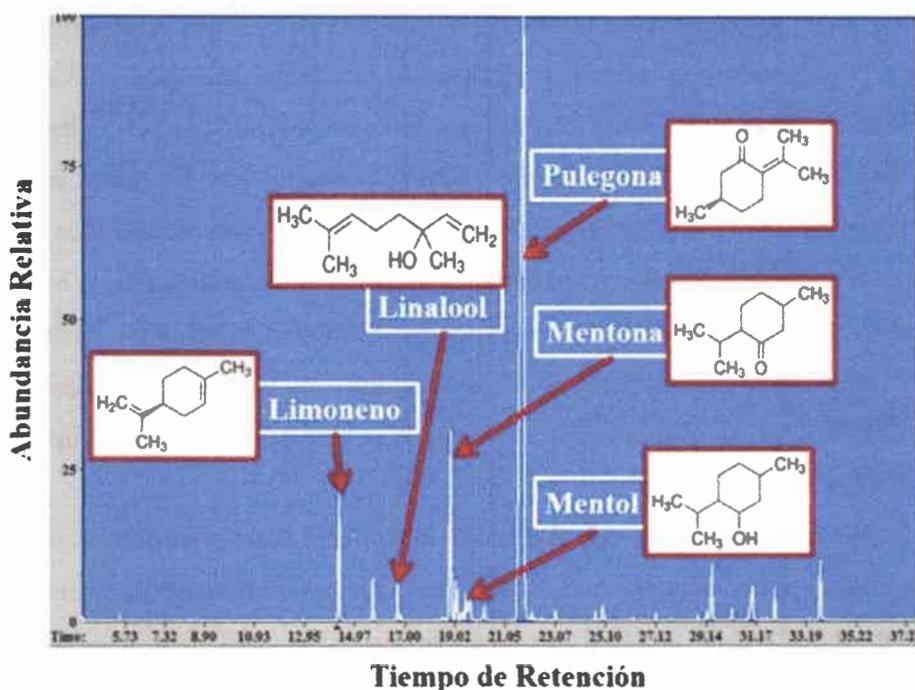


Fig. 3.1. Cromatograma GC/MS del AE de *M. piperita*.

3.5.3. Cuantificación de los AE

La concentración de los monoterpenos mayoritarios: limoneno, linalool, pulegona, mentona y mentol, como así también, la concentración total de AE fue calculada en relación al área correspondiente al estándar interno. Para determinar el contenido de AE totales se sumaron las áreas de todos los compuestos constituyentes del mismo. El rendimiento fue expresado en $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

Para la determinación del %R de los compuestos mayoritarios, fue considerado como el 100% la suma de las áreas de todos los compuestos presentes en la corrida cromatográfica (a excepción de la correspondiente al estándar interno); posteriormente, se relacionó el área de cada compuesto con este valor.

3.6. Recolección y cuantificación de VOCs vegetales

3.6.1. Recolección de VOCs vegetales

Las plantas fueron transferidas a una cámara de colección de volátiles (Fig. 3.2.), consistente en una bomba de vacío que generaba una corriente de aire de aproximadamente 300 ml/min, a través de una cámara de 1000 ml de volumen que cubría completamente la planta. La cámara tenía en un extremo una tapa en donde se ubicó la trampa de volátiles. Se colocó un cobertor rígido para impedir la entrada de compuestos que pudieran emanar



de la vermiculita, contenida en la maceta, a la cámara de volátiles. El aire proveniente de la cámara y absorbido por la bomba, pasaba por la trampa de volátiles, donde estos eran atrapados en filtros con 30 mg de (absorbente de terpenos) Super Q (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, USA). Los volátiles fueron colectados por dos horas; inmediatamente después, se retiró el filtro de Super Q, se extrajo los compuestos retenidos con 200 μ l de cloruro de metileno. Previa evaporación del solvente, el material obtenido se inyectó en un cromatógrafo de gases para su correspondiente análisis (ver punto 3.5.2) (Banchio *et al.*, 2005). Se utilizó α -pinene (1 μ g en 45 μ l de cloruro de metileno) como estándar interno; por no ser uno de los compuestos emitidos por la planta, ni tener un tiempo de retención similar a los mismos.

Se colectaron los volátiles emitidos por plantas control (no inoculadas con rizobacterias) y los emitidos por plantas inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. También se colectaron volátiles de una cámara vacía para identificar los compuestos presentes en el aire y no emitidos por la planta. A las plantas utilizadas se les colectó la parte aérea y se la reservó para la posterior extracción del AE. Los filtros fueron lavados previamente a su utilización con 5 ml de cloruro de metileno para remover impurezas.

La identificación de los monoterpenos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con compuestos estándares puros (Banchio *et al.*, 2005; Banchio *et al.*, 2008) y por espectrometría de masa (Fig. 3.3.). Determinándose así cualitativamente la presencia de los monoterpenos en el material recolectado en los distintos tratamientos.

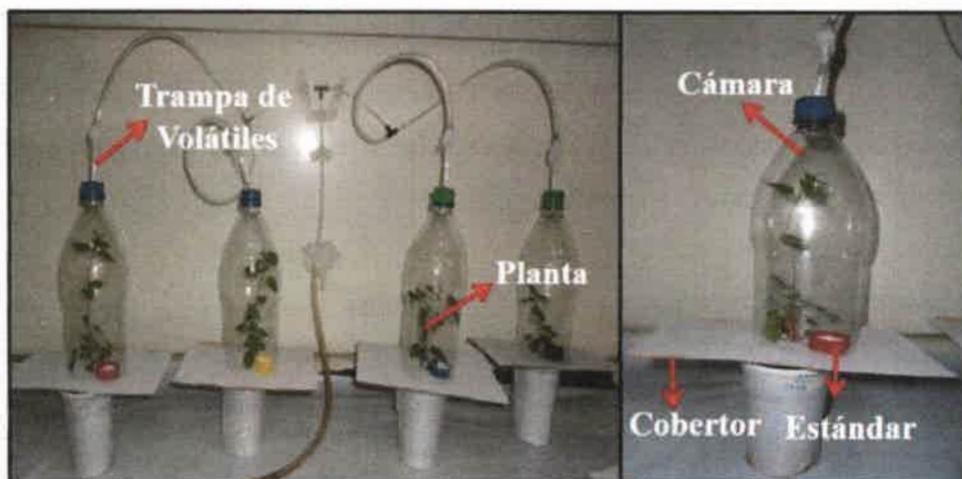


Fig. 3.2. Sistema de recolección de VOCs.

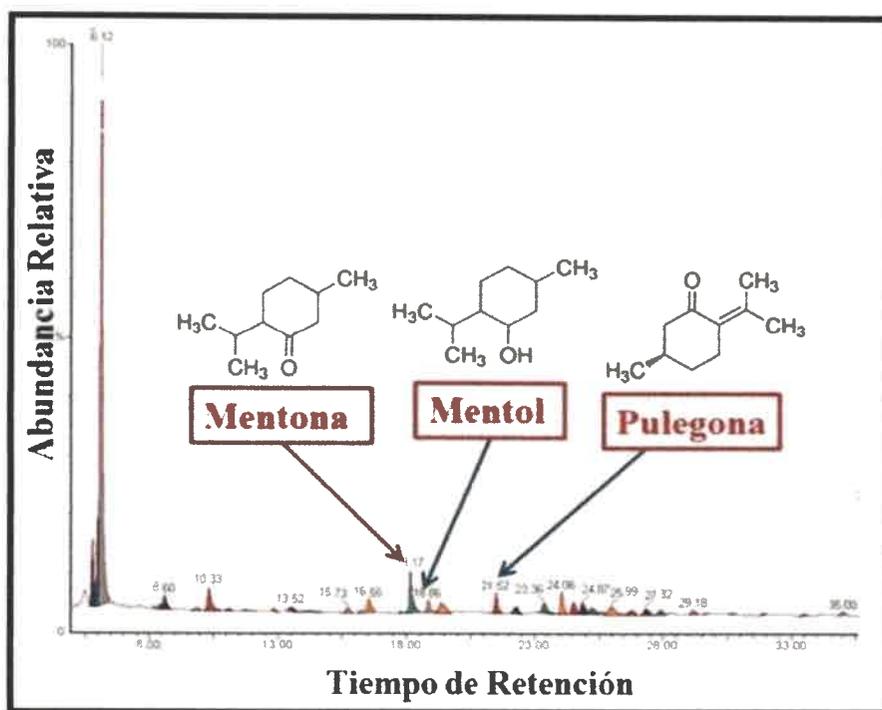


Fig. 3.3. Cromatograma GC/MS de la mezcla de VOCs emitida por plantas de *M. piperita*.

3.6.2. Cuantificación de los VOCs emitidos

Para determinar la emisión de los monoterpenos mayoritarios: pulegona, mentona y mentol se relacionó el área correspondiente al estándar interno con el obtenido para cada uno de los compuestos. La emisión de VOCs totales fue calculada relacionando la suma de todas las áreas presentes en las corridas cromatográficas (a excepción de la perteneciente al estándar interno), correspondientes a todos los monoterpenos emitidos por la planta, con el área correspondiente al estándar interno. La emisión fue expresada en ng emitidos/g de peso fresco/hs.

Para calcular la tasa de emisión de monoterpenos totales y de los compuestos mayoritarios, se relacionó el contenido total de AE con los VOCs emitidos por la misma planta y la concentración del monoterpeno particular en el AE con su respectiva emisión. Para la determinación del %R de los compuestos mayoritarios, fue considerado como el 100% la suma de las áreas de todos los compuestos presentes en el perfil cromatográfico (a excepción de la correspondiente al estándar interno); posteriormente, se relacionó el área de cada compuesto con ese valor (Banchio *et al.*, 2010).

3.7. Recuento de tricomas glandulares y estomas

Una capa de acrílico fue pincelada sobre las superficies abaxial y adaxial de las hojas del segundo nudo, la misma se dejó secar por unos minutos y posteriormente se extrajo cuidadosamente, montándola en un portaobjetos sobre glicerina diluida al 10% (D'Ambriogio de Argüeso, 1986). Por último, sobre la misma se colocó un cubreobjetos que fue sellado pincelando con esmalte acrílico su contorno.

La densidad de estomas y de las dos clases de tricomas glandulares: peltados y capitados (número/mm²) fue calculada utilizando registros de tres campos microscópicos escogidos al azar, por cada epidermis, empleando un aumento de 10X en el caso de los tricomas y 40X para la observación de los estomas. Las preparaciones histológicas fueron observadas con un microscopio Zeiss Standard modelo 16. Las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss Axiophot, equipado con captura digital de imagen (AxioVision 4.3, con cámara AxioCam HRc) (Cappellari *et al.*, 2015).

3.8. Determinación del contenido de clorofila total y de clorofilas "a" y "b"

El contenido de clorofila total y de las clorofilas "a" y "b" fue determinado tal como fue descrito por Arnon (1949). Se homogeneizaron, aproximadamente, 100 mg de tejido foliar en un mortero con el agregado de acetona al 80% v/v. Posteriormente, la suspensión obtenida fue filtrada y llevada a un volumen final de 10 ml con acetona al 80%. Por último, se midió, en un espectrofotómetro, la absorbancia a 650 y a 665 nm. La cantidad de clorofila total y de cada tipo ($\mu\text{g}/\text{gramo}$ de peso fresco de hojas) se determinó de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Mc Kinney, 1938):

Clorofila Total: $6,45 (\text{Abs } 665) + 17,72 (\text{Abs } 650)$

Clorofila "a": $11,16 (\text{Abs } 665) - 2,39 (\text{Abs } 650)$

Clorofila "b": $20,11 (\text{Abs } 650) - 5,18 (\text{Abs } 665)$

3.9. Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó a través de la técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se pesaron 200 mg de tejido vegetal (hojas o raíz) y se homogeneizaron con 5 ml de agua destilada. Luego de dejar reposar por 24 hs en oscuridad, se tomó una alícuota de 0.5 ml del extracto a la cual se le adicionaron 8 ml de agua destilada y 0.5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu. Transcurridos 5 minutos se agregó 1 ml de la solución de Na₂CO₃ al 20% p/v y luego de 1 hora se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro. El contenido total de fenoles fue expresado en términos

de mg de ácido gálico por gramo de peso fresco, siendo el ácido gálico un compuesto de referencia estándar (Cappellari *et al.*, 2013).

Se realizó una curva de calibración (*Ver Anexo II*), para ello se utilizó una solución estándar de ácido gálico (50 mg/l) de la cual se tomaron volúmenes de 0.1 ml a 2 ml, en intervalos determinados, completándose el volumen con la correspondiente cantidad de agua destilada.

3.10. Determinación de la actividad enzimática de L-fenilalanina amonio liasa

1. Obtención de extracto enzimático

Muestras de hojas de 100 mg fueron homogeneizadas en un mortero con N₂ líquido. Posteriormente, fue adicionado el buffer de extracción de proteínas (*Ver Anexo I*) en una relación 1:10 (p/v) y 1% de PVP (polivinilpirrolidón). La solución obtenida fue centrifugada durante 20 min. a 10.000 rpm y a 4°C. El sobrenadante obtenido fue utilizado como fuente enzimática y conservado a -80°C.

2. Determinación de la actividad específica de PAL

Fue realizada mediante el método propuesto por Paynet y col. (1971), utilizando como sustrato la L-fenilalanina y midiendo la cantidad de ácido *trans*-cinámico formado a 290 nm luego de 70 min. de incubación a 37°C. La curva patrón fue realizada utilizando como estándar una solución de ácido *trans*-cinámico (1 mg/ml) (*Ver Anexo II*). La actividad específica de PAL fue expresada en µg de ácido *trans*-cinámico/min/g de proteína.

3. Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó a través del método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985), utilizando como estándar albúmina bovina (1 mg/ml) (*Ver Anexo II*).

3.11. Pruebas de antagonismo “*in vitro*” de las cepas co-inoculadas

Para determinar si el crecimiento de una de las cepas co-inoculadas influye sobre el desarrollo de la otra se realizaron las siguientes pruebas.



3.11.1. Pruebas de inhibición en placa

Sobre la superficie de medio LB agarizado se inoculó un 1 ml de una suspensión de las cepas GB03 o WCS417r, conteniendo 1×10^9 UFC/ml. El inóculo fue extendido empleando una espátula de Drigalsky, para formar una pátina. Inmediatamente, se dispusieron sobre la superficie del agar, gotas de 3 μ l de una suspensión de la cepa nativa SJ04, conteniendo 1×10^9 UFC/ml. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 29°C. Al finalizar el tiempo de incubación se determinó la presencia o ausencia de un halo de inhibición alrededor de la gota de la cepa nativa.

En la otra prueba de inhibición en placa, se sembró una estría en medio LB agarizado de la cepa SJ04, para lo cual se empleó una suspensión conteniendo 1×10^9 UFC/ml. Perpendicularmente a la misma y sin tocarla, se sembró una estría de las cepas WCS417r o GB03, a partir de una suspensión de igual concentración que la correspondiente a la cepa nativa. Las placas se incubaron en estufa a 29°C durante 24 hs. Cumplido el tiempo de incubación se determinó presencia o ausencia de inhibición de crecimiento en la zona de unión de las estrias. Cada una de las pruebas se repitió tres veces.

3.11.2. Determinación de la resistencia o susceptibilidad a antibióticos

Después de haber probado el crecimiento de las cepas en medio LB suplementado con diferentes antibióticos y a distintas concentraciones, pudo determinarse la susceptibilidad de una de las cepas co-inoculadas y la resistencia de la otra, al mismo antibiótico (*Ver Anexo III*). Cabe destacar que la resistencia a polimixina 15 μ g/ml y a kanamicina 150 μ g/ml por parte de las cepas GB03 y WCS417r, respectivamente, es natural. Mientras que la resistencia a cloranfenicol 120 μ g/ml por la cepa nativa SJ04, fue generada a través del crecimiento de esta cepa en concentraciones crecientes del antibiótico anteriormente mencionado e intercalando crecimiento en medios sólidos y líquidos (presión de selección, de 10 en 10 μ g/ml, desde 10 a 120 μ g/ml). De esta manera se indujo el fenotipo resistente a cloranfenicol (C_m^R) hasta una concentración de 120 mg/ml.

3.11.3. Ensayo de co-inoculación en medio de cultivo

Para determinar si el crecimiento de una de las cepas co-inoculadas influye sobre el desarrollo de la otra se realizó una prueba de co-inoculación en medio líquido. Para lo cual en un Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 25 ml de medio LB estéril, se adicionaron 5×10^5

UFC/ml de cada una de cepas (12,5 µl de cada una de las suspensiones bacterianas conteniendo 1×10^9 UFC/ml). El recipiente se incubó en agitación a 150 rpm a 30°C

A las 24 y 48 hs de realizarse las co-inoculaciones, se tomaron alícuotas de 100 µl de los cultivos, se realizaron las correspondientes diluciones, las cuales fueron sembradas en placas conteniendo medio LB suplementado con los antibióticos adecuados (*Ver Anexo III*) y se incubaron durante 24 hs a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los recuentos y los cálculos necesarios para obtener las UFC/ml de cada cepa co-inoculada a cada tiempo.

Como control se siguió el crecimiento de cada cepa por separado; empleando el procedimiento descrito anteriormente. El ensayo se repitió tres veces.

3.12. Seguimiento de las cepas bacterianas inoculadas y co-inoculadas

A los 7, 14 y 30 días posteriores a la inoculación, una planta por tratamiento fue removida cuidadosamente de la vermiculita. La parte radical con vermiculita adherida fue colocada en un Erlenmeyer con 50 ml de solución fisiológica y 1% de SDS (tensioactivo aniónico: dodecilsulfato sódico), mientras que la parte aérea fue descartada. El erlenmeyer fue colocado en agitación por 1 hora a 150 rpm y a 30°C. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, el contenido del Erlenmeyer fue transferido a un mortero y las raíces fueron maceradas. Del macerado se tomó una alícuota de 100 µl a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 (hasta la dilución 1×10^6). Seguidamente se sembraron 3 gotas de 20 µl por cada dilución en placas de Petri conteniendo medio LB agarizado suplementado con los antibióticos correspondientes (*Ver Anexo III*) y el antifúngico cicloheximida a una concentración de 100 µg/ml. Después del período de incubación se realizó el recuento del número de colonias de cada cepa inoculada o co-inoculada presente en la planta al tiempo correspondiente. El ensayo se repitió tres veces.

3.13. Análisis estadístico

Las comparaciones entre los diferentes tratamientos, por cumplir los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza, se efectuaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y como test a posteriori se aplicó el test de Fisher LSD, a un nivel de probabilidad de $p \leq 0,05$. Para el análisis estadístico de la aplicación de fitohormonas se utilizó análisis de la varianza bifactorial, para poder evaluar los efectos de cada uno de los factores por separado (efectos principales) y sobre la interacción entre los factores. Para



estudiar la homogeneidad de las distintas variables estudiadas se realizó un análisis de conglomerados. Se utilizó el software Infostat versión 2011 (Grupo Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Capítulo IV
*Resultados y
Discusión*



Sección I:
Interacción Planta
Aromática - PGPR





4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SECCIÓN I: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA - PGPR

4.1.1. Efectos de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre diferentes parámetros del crecimiento vegetal

En la planta aromática estudiada, *M. piperita*, se registraron incrementos significativos en diferentes parámetros del crecimiento y desarrollo, después de la inoculación y co-inoculación con cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal (Fig. 4.1.1.); como ha sido reportado para otras especies vegetales (Vessey, 2003; van Loon, 2007; Pérez Montaña *et al.*, 2014; Vejan *et al.*, 2016). La dimensión de los cambios registrados dependió de la cepa bacteriana (*B. subtilis* GB03, *P. simiae* WCS417r, *P. putida* SJ04) o de las combinaciones de rizobacterias inoculadas (*P. simiae* WCS417r en combinación con *P. putida* SJ04, *B. subtilis* GB03 inoculado junto a *P. putida* SJ04) (Fig. 4.1., Fig. 4.2., Fig. 4.3., Tabla 4.1.).

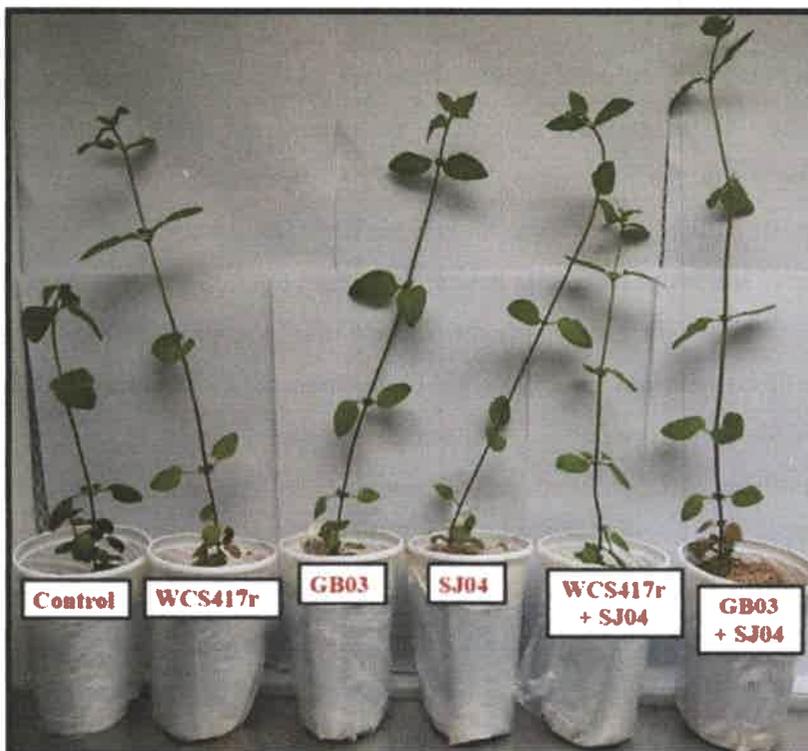


Fig. 4.1.1. Plantas de *M. piperita* a los 30 días de ser inoculadas o co-inoculadas.

El peso fresco de la parte aérea fue significativamente incrementado por los diferentes tratamientos de inoculación y co-inoculación, en comparación a plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.2.). El mayor incremento, del 45%, fue registrado en las plantas tratadas



con la combinación SJ04 + GB03. Las plantas inoculadas con una sola cepa PGPR, al igual que las co-inoculadas con WCS417r y SJ04, presentaron un incremento del 30%, aproximadamente, en comparación a plantas no tratadas.

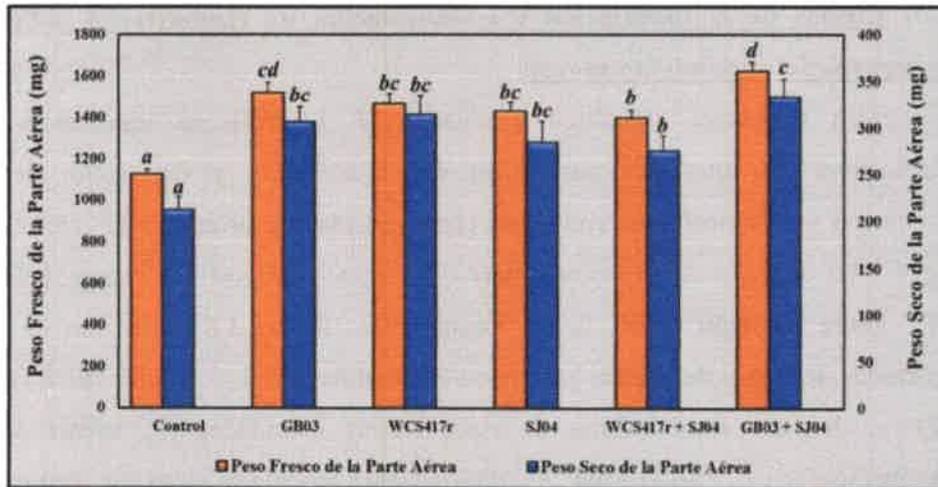


Fig. 4.2.2. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el peso fresco y seco de la parte aérea de plantas de *M. piperita*. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

En plantas inoculadas con *P. simiae* WCS417r en combinación con *P. putida* SJ04, el incremento en mencionado parámetro de crecimiento, puede deberse a un aumento del área foliar y del número de nudos (Tabla 4.1.1.). Mientras que en plantas inoculadas con una sola cepa o co-inoculadas con la combinación *B. subtilis* GB03 + *P. putida* SJ04, posiblemente sea la consecuencia del aumento del número de nudos, de hojas, de la longitud del tallo, del área foliar y, en algunos casos, del número de ramificaciones (Tabla 4.1.1.).

Se descarta la posibilidad de que el aumento del peso fresco de la parte aérea resulte únicamente de una mejora en la hidratación de la planta; en relación a que el peso seco de la misma también fue significativamente modificado por el tratamiento con rizobacterias ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.2.) (60% superior, aproximadamente, en plantas co-inoculadas con las cepas *B. subtilis* GB03 y *P. putida* SJ04, 45% en las tratadas con la cepa *P. simiae* WCS417r o con *B. subtilis* GB03 y 35 y 25% para las tratadas con la cepa nativa SJ04 y las co-inoculadas con *P. simiae* WCS417r y *P. putida* SJ04, respectivamente).



Tabla 4.1.1. Parámetros de crecimiento vegetal de plantas de *M. piperita* tratadas con cepas

Tratamiento	Nº de Hojas	Nº de Nudos	Área Foliar (cm ²)	Nº de Ramificaciones	Longitud del Tallo (cm)
Control	37.48 ± 0.95 a	17.99 ± 0.48 a	40.15 ± 1.89 a	4.72 ± 0.21 a	19.44 ± 0.7 a
GB03	44.8 ± 1.6 bc	21.58 ± 0.73 bc	62.48 ± 4.48 b	6.64 ± 0.34 c	23.13 ± 0.84 b
WCS417r	45.16 ± 1.33 c	22.49 ± 0.58 bc	59.81 ± 3.08 b	5.62 ± 0.28 b	22.56 ± 0.89 b
SJ04	46.67 ± 1.36 c	22.44 ± 0.71 c	59.92 ± 3.68 b	5.92 ± 0.28 bc	23.48 ± 0.92 b
SJ04 + WCS417r	41.1 ± 0.99 ab	20.65 ± 0.41 b	59.40 ± 2.81 b	5.24 ± 0.22 ab	21.41 ± 0.88 ab
SJ04 + GB03	45.56 ± 1.73 c	22.53 ± 0.83 bc	67.94 ± 5.46 b	5.44 ± 0.29 ab	28.56 ± 0.88 c

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Adicionalmente a lo descripto anteriormente, se ha registrado un significativo incremento del peso seco de la parte radicular de plantas tratadas con *P. simiae* WCS417r, *B. subtilis* GB03 y co-inoculadas (40% aproximadamente) ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.3.); siendo la longitud de la raíz (Fig. 4.1.3.) afectada positivamente por el tratamiento con WCS417r y por la co-inoculación de GB03 y SJ04 ($p < 0.05$). En relación, un aumento de la superficie radicular conduce a una mejora en la absorción de agua y nutrientes, lo que se ve reflejado en un mayor desarrollo vegetal. Se han reportado varios efectos de la inoculación de cepas PGPR sobre la morfología radicular (Vessey, 2003), incluyéndose el aumento en la longitud y en el número de raíces laterales (Zhang *et al.*, 2007).

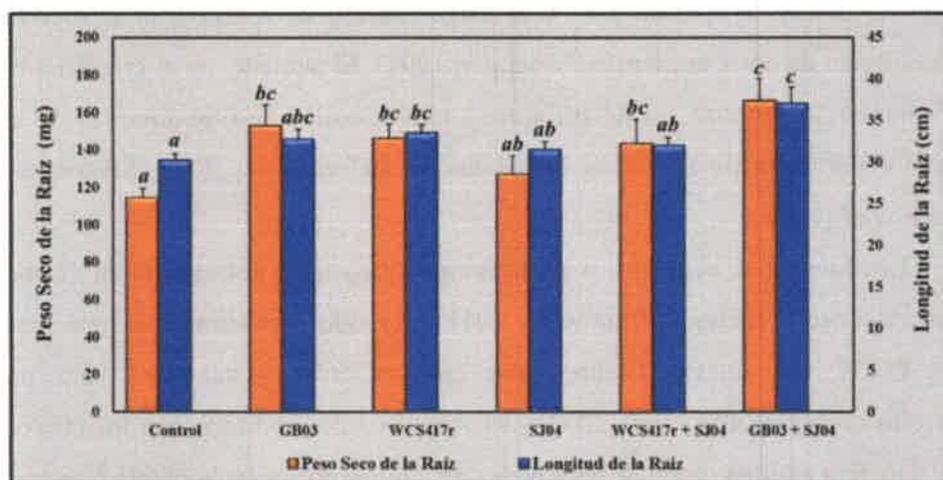


Fig. 4.1.3. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal sobre el peso seco y la longitud de la raíz en plantas de *M. piperita*. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Al analizar los diferentes parámetros de crecimiento evaluados, puede observarse que las plantas inoculadas con la combinación GB03 + SJ04 tuvieron un desarrollo muy similar que las inoculadas solo con una de estas cepas. Sin embargo, las plantas co-

inoculadas con WCS417r y SJ04 presentaron un desarrollo menor de la parte aérea, que las plantas tratadas con WCS417r o SJ04. Lo que podría sugerir que la presencia de ambas cepas en la raíz neutraliza los respectivos mecanismos de fitoestimulación. Cada cepa co-inoculada podría estar empleando estrategias diferentes para colonizar la raíz y estimular el desarrollo vegetal, por lo que es posible que las señales moleculares liberadas tanto por la planta como por los microorganismos entren en conflicto, afectando los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal. Estudios de co-inoculación realizados previamente, en similitud con este estudio, reportan que ciertas mezclas de cepas microbianas no tienen efectos sinérgicos, o por lo menos comparables, sobre la promoción del crecimiento vegetal, con respecto a la aplicación separada de los microorganismos (Schmidt *et al.*, 2004; Felici *et al.*, 2008; Cappellari *et al.*, 2013).

En el presente estudio las plantas fueron crecidas en vermiculita bajo un sistema de crecimiento artificial. La elección de esta sustancia inerte se debió a que su uso facilita la remoción de la planta sin ocasionarle daño a las raíces y porque la porosidad de este soporte inerte facilita el movimiento de los VOCs emitidos por las rizobacterias. Todas las plantas recibieron la solución de nutrientes Hoagland, en la cual el N, el P y otros nutrientes necesarios para el crecimiento están disponibles para asimilación por parte de la planta. Por lo que puede sugerirse que los mecanismos involucrados en la estimulación del crecimiento vegetal no fueron la fijación del N, la solubilización de fosfatos, ni el incremento en la disponibilidad de otros nutrientes (Kloepper, 1991). El aumento en el crecimiento registrado en plantas de *M. piperita*, puede atribuirse a la producción de fitohormonas y/o a la emisión de VOCs por parte de las cepas inoculadas (Banchio *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2011; Santoro *et al.*, 2016).

Las hormonas vegetales o fitohormonas juegan un rol crucial en el crecimiento y desarrollo vegetal (Peleg y Blumwald, 2011). Ha sido demostrada la capacidad de varias cepas PGPR de producir fitohormonas en cantidades sustanciales para promover el desarrollo vegetal (Zahir *et al.*, 2004). Además, ha sido reportado que los microorganismos de la rizósfera pueden modular los niveles de fitohormonas en la planta huésped, alterando así los niveles endógenos de estos fitoreguladores (Glick, 2012; Mahanty *et al.*, 2016).

Se estima que el 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera de varios cultivos poseen la capacidad de sintetizar y liberar IAAs como AIA (Dobbelaere *et al.*, 2003; Ahemad y Khan, 2011). Este fitoregulador produce un incremento de la superficie y la



longitud radical lo cual le permite a la planta un mayor y más fácil acceso a los nutrientes del suelo (Ahemad y Hasnain, 2014).

Se ha reportado que además de IAAs, los microorganismos encontrados en la rizósfera, son capaces de producir y liberar otros reguladores del crecimiento vegetal como citoquininas y GAs (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; García de Salamone *et al.*, 2005; Cassán *et al.*, 2008; Masciarelli *et al.*, 2014). Las citoquininas participan en la promoción de la división y del agrandamiento celular y la expansión de los tejidos en ciertas partes de la planta (Taiz y Zeiger, 2010). Las GAs son una clase de fitohormonas asociadas con la modificación de la morfología de la planta por la extensión de los tejidos vegetales, particularmente los del tallo (Taiz y Zeiger, 2010).

Además, ha sido propuesto que muchas PGPR pueden promover el crecimiento vegetal al disminuir los niveles de etileno en plantas; por la liberación de una hidrolasa específica que cliva el ACC, el precursor inmediato de mencionada fitohormona gaseosa en plantas (Shaharoon *et al.*, 2006; Hayat *et al.*, 2010; Drogue *et al.*, 2012).

Ha sido registrado que cepas de *P. fluorescens* y del género *Bacillus* poseen la capacidad de producir y liberar fitohormonas como AIA y citoquininas (García de Salamone *et al.*, 2001; Vikram, 2007; Beneduzzi *et al.*, 2008; Ait Kaki *et al.*, 2013; Ahmed y Hasnain, 2014). En nuestro laboratorio se ha determinado que la cepa nativa *P. putida* SJ04 es capaz de producir la hormona AIA (Santoro *et al.*, 2015). En adición, en cepas de *P. putida* y *P. fluorescens* ha sido detectada la producción de una ACC desamina, encargada de regular los niveles de etileno en plantas (Pastor *et al.*, 2016; Ghorbanpour *et al.*, 2016).

Estudios realizados durante las últimas décadas han demostrado que las rizobacterias son capaces de emitir VOCs (Vespermann *et al.*, 2007), los cuales pueden viajar a cortas o largas distancias a través del suelo (Wenke *et al.*, 2010). Zhang y col., (2007) identificaron, en plantas de *A. thaliana*, alrededor de 600 genes cuya expresión se ve modificada por la exposición a VOCs emitidos por *B. subtilis* GB03. Entre los cuales se encuentran genes asociados a la estructura de la pared celular, que favorecen la expansión y reducen la rigidez de la misma. Así como también, genes involucrados en el metabolismo y transporte de auxinas, que conducen a una acumulación de esta clase de fitohormonas a nivel radicular y de primordios de raíces laterales, favoreciendo así el desarrollo y la expansión del tejido radicular; aumentando la superficie de intercambio con el suelo.

En nuestro laboratorio, se han llevado a cabo varios ensayos de inoculación con rizobacterias en *M. piperita* y otras plantas aromáticas, bajo distintas condiciones de cultivo;



observándose, al igual que en el presente trabajo, un incremento de la producción de biomasa. En ensayos llevados a cabo en orégano (*Origanum majoricum*), mejorana (*Origanum majorana*) y suico (*Tagetes minuta*) (Banchio *et al.*, 2008; Banchio *et al.*, 2010; Cappellari *et al.*, 2013) la inoculación con la cepa *P. simiae* WCS417r, indujo un incremento del desarrollo vegetal, en porcentajes similares a los obtenidos en el presente estudio. En tanto que el tratamiento con *B. subtilis* GB03 afectó positivamente el desarrollo de plantas de *O. basilicum* y *O. majoricum*, pero no modificó el crecimiento de plantas de *O. majorana*. En coincidencia con lo observado en este estudio, plantas de menta cultivadas *in vitro*, manifestaron un incremento significativo en distintos parámetros de crecimiento después del tratamiento con cepas nativas de *P. putida* (Santoro *et al.*, 2015). Por otro lado, se registró que los VOCs emitidos por las cepas *B. subtilis* GB03 y *P. simiae* WCS417r son capaces de promover el crecimiento vegetal en plantas de *M. piperita* crecidas *in vitro*, siendo más significativos los incrementos en aquellas plantas expuestas a los VOCs de *B. subtilis* GB03 (Santoro *et al.*, 2011).

En ensayos realizados a campo, la inoculación de cepas de *B. subtilis* y *P. fluorescens*, afectó positivamente el desarrollo de plantas de frambuesa (*Rubus idaeus*) y de arándano (*Vaccinium corymbosum* cv. bluecrop) respectivamente (Orhan *et al.*, 2006; De Silva *et al.*, 2000).

4.1.2. Efectos de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el contenido de clorofila y el número de estomas

El contenido de clorofilas “a” y “b” y el contenido de clorofila total fue significativamente superior en plantas inoculadas y co-inoculadas que en plantas control ($p < 0.05$) (Tabla 4.1.2.). En plantas tratadas con GB03, SJ04 y co-inoculadas con estas dos cepas, el contenido de clorofila total y de clorofila “a”, fue significativamente mayor al de las plantas de los restantes tratamientos (un 45% superior, aproximadamente, al de plantas control). El contenido de clorofila “b” fue un 35% superior, aproximadamente, en plantas tratadas con rizobacterias ($p < 0.05$) (Tabla 4.1.2.).



Tabla 4.1.2. Contenido de clorofilas “a” y “b” y de clorofila total (µg/g de peso fresco) en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR.

Tratamiento	Clorofila “a”	Clorofila “b”	Clorofila Total
Control	71.58 ± 2.74 a	37.46 ± 1.67 a	112.44 ± 4.42 a
GB03	101.67 ± 3.46 c	55.16 ± 2.17 b	162.03 ± 5.47 c
WCS417r	86.84 ± 2.28 b	49.92 ± 1.83 b	140.90 ± 4.01 b
SJ04	101.78 ± 4.08 c	53.89 ± 1.99 b	160.50 ± 6.06 c
SJ04 + WCS417r	94.93 ± 5.36 bc	51.75 ± 2.92 b	151.20 ± 8.08 bc
SJ04 + GB03	102.74 ± 1.71 c	55.22 ± 2.19 b	163.26 ± 4.09 c

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

La fotosíntesis, es el proceso físico-químico, por el cual la energía lumínica es transformada en energía química, proporcionando compuestos orgánicos para el crecimiento y desarrollo de la planta (Yang *et al.*, 2014). La concentración de clorofila es un importante parámetro para evaluar la eficiencia fotosintética de la planta y la respuesta a estrés (Zhu *et al.*, 2012). Una concentración mayor de clorofilas “a” y “b” y de clorofila total en plantas tratadas con rizobacterias, podría atribuirse a una mayor absorción de agua y nutrientes por las plantas inoculadas y co-inoculadas (Subramanian y Charest, 1997); lo que las hace menos susceptibles a estrés oxidativo que produce la destrucción del aparato fotosintético (Evelin *et al.*, 2009). En relación, Giri, (2003) reportó que la tasa fotosintética de plantas inoculadas con bacterias PGPR aumenta debido al mejor estado nutricional de las mismas. El incremento en el contenido de clorofila y, consecuentemente, el aumento en la fotosíntesis, es una respuesta de las plantas a la inoculación con cepas PGPR (Bashan *et al.*, 2006; Pérez Montaña *et al.*, 2014). En este sentido, Stefan y col. (2013) reportaron un incremento del contenido de clorofila total en plantas de frijol (*Phaseolus coccineus*) cuyas semillas fueron tratadas con cepas nativas pertenecientes al género *Bacillus* spp. La inoculación de plántulas de trigo con la cepa PGPR *A. brasilense* Cd incrementó significativamente la concentración de pigmentos fotosintéticos como clorofila “a”, “b” y de varios pigmentos fotoprotectores auxiliares (Bashan *et al.*, 2006). En relación, en plantas tratadas con hongos micorrízicos se observaron resultados similares a los reportados en este trabajo (Colla *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2012). Zhang y col., (2007) demostraron que la exposición a VOCs emitidos por *B. subtilis* aumenta la eficiencia de la fotosíntesis y el contenido de clorofila en plantas de *Arabidopsis*.

Los estomas son poros microscópicos localizados sobre la superficie aérea de plantas terrestres que consisten de un poro central rodeado por dos células oclusivas o



guarda. Cuando estas células están completamente turgentes, el poro se abre y esto permite la toma de CO₂, para el proceso de fotosíntesis, y la pérdida de agua por evapotranspiración (Schlüter *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2016). Cuando las células guarda pierden turgencia, el poro se cierra, lo cual tiene importancia durante, por ejemplo, períodos donde la disponibilidad de agua en el suelo es reducida. La densidad estomática, en la mayoría de las especies vegetales, es superior sobre la superficie abaxial de la hoja, presumiblemente por el rol de los estomas en evitar la pérdida de agua. El desarrollo estomático es influenciado por diferentes señales ambientales (Pillitteri y Torri, 2012).

La densidad estomática (N° de estomas/mm²) fue, aproximadamente, un 50% superior en la cara abaxial de las hojas de plantas inoculadas y co-inoculadas que en las de plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.4.). Plantas co-inoculadas con WCS417r y SJ04 manifestaron el mayor incremento en la densidad estomática, 145 estomas/mm² en relación a 92 estomas/mm² de plantas control).

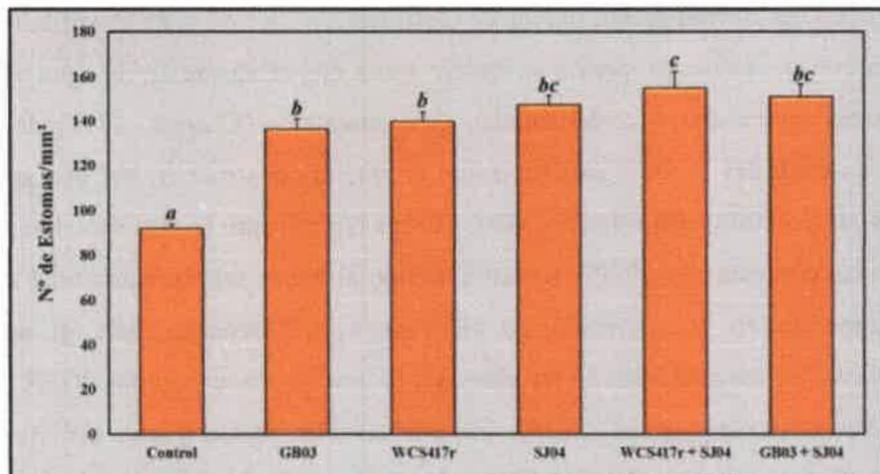


Fig. 4.1.4. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal sobre la densidad estomática (N°/mm²) en plantas de *M. piperita*. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

El aumento del número de estomas en hojas de plantas tratadas con rizobacterias podría relacionarse con la producción, por parte de las cepas inoculadas, de fitoreguladores como GAs y IAAs. En relación Saibo y col. (2003) reportaron que la aplicación de GAs en combinación con IAAs, resulta en una sobreproducción de estomas. Sin embargo, la inhibición de las señales de GAs, produce la eliminación de los estomas en el hipocótilo pero no afecta la producción de estas estructuras en hojas (Bergmann, 2004).

Un aumento de la densidad estomática podría permitirle a las plantas, en condiciones de buena hidratación, aumentar la conductancia para el intercambio gaseoso en



la superficie de las hojas y evitar así la limitación fotosintética por un suministro subóptimo de CO₂ (Schlüter *et al.*, 2003). Cuanto más estomas por unidad de superficie hay, más CO₂ puede ser tomado y más agua puede ser liberada (Berry *et al.*, 2010). No ha sido reportado con anterioridad el efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la densidad estomática.

4.1.3. Efectos de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre el contenido de monoterpenos en *M. piperita*

El tratamiento con rizobacterias estimuló la producción de monoterpenos en plantas de *M. piperita* ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.5.); la magnitud de los incrementos registrados dependió de la/las cepa/s inoculadas. La inoculación de WCS417r en combinación con SJ04 produjo el mayor aumento en el rendimiento (μg de AE/g de peso fresco) total de AE; llegando a valores de 27.04 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco en relación a 4.63 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco correspondiente a plantas control (6 veces superior). Las plantas tratadas con la combinación GB03 + SJ04 presentaron la misma tendencia; incrementándose el contenido de AE en estas plantas 5 veces, en comparación a plantas control. En plantas inoculadas con las cepas WCS417r o GB03 el rendimiento fue de 16.33 y 20.38 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, respectivamente; 4 veces, aproximadamente, superior al valor obtenido de plantas no inoculadas. El contenido total de monoterpenos fue triplicado en plantas tratadas con la cepa nativa SJ04.

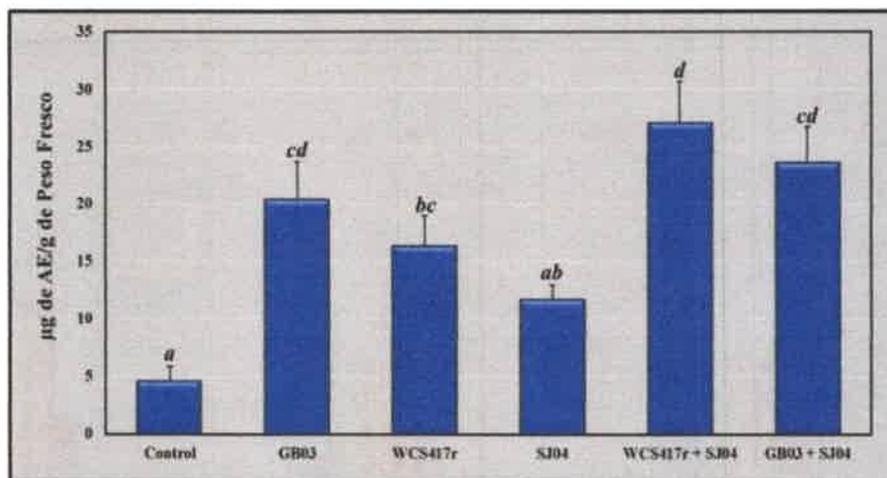


Fig. 4.1.5. Concentración de AE en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

En adición, el análisis cromatográfico de los AE correspondientes a plantas inoculadas y co-inoculadas, reveló una significativa variación cuantitativa de los compuestos mayoritarios del mismo (Fig. 4.1.6., Tabla 4.1.3.). Se observó principalmente un destacado



incremento de los principales monoterpenos en plantas inoculadas con la combinación WCS417r + SJ04.

La concentración de los monoterpenos limoneno, mentol y mentona fue, en general, superior en plantas tratadas con rizobacterias que en plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.6.). Las plantas tratadas con la combinación WCS417r + SJ04 presentaron el mayor incremento para los tres monoterpenos (4, 6.5 y 5.5 veces superior, respectivamente, que en plantas control). En plantas inoculadas con la combinación GB03 + SJ04 la concentración de limoneno fue 2.5 veces mayor, que la correspondiente a plantas control (Fig. 4.6.). En plantas inoculadas con una sola cepa PGPR, el mayor aumento en la concentración de este monoterpeno, fue registrado en plantas tratadas con *P. simiae* WCS417r. La inoculación con GB03 o SJ04 no produjo un aumento significativo del contenido de limoneno (Fig. 4.1.6.).

La concentración de mentol (Fig. 4.1.6) fue, aproximadamente, 5 veces superior a la registrada en plantas control, en plantas tratadas con WCS417r, GB03 o co-inoculadas con GB03 y SJ04 y 4 veces mayor en plantas inoculadas con la cepa nativa SJ04 ($p < 0.05$).

La concentración de mentona (Fig. 4.1.6) se cuadruplicó en plantas tratadas con la cepa GB03 y fue 3 veces mayor en plantas co-inoculadas con GB03 y SJ04 o tratadas con WCS417r ($p < 0.05$); mientras que la concentración de este monoterpeno se duplicó en plantas inoculadas con la cepa nativa SJ04, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$).

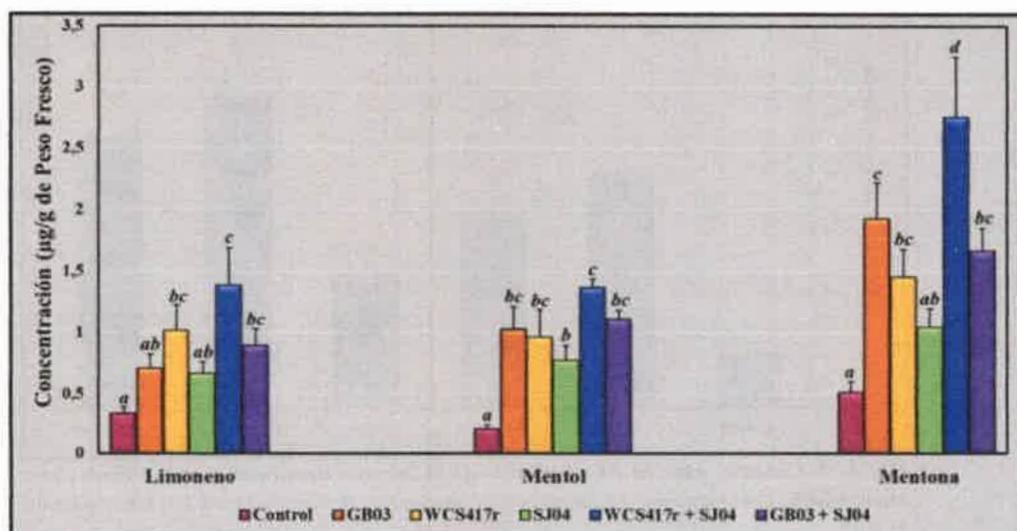


Fig. 4.1.6. Concentración de los monoterpenos limoneno, mentol y mentona en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



La concentración del monoterpeno mayoritario, pulegona (Tabla 4.1.3.), presentó un incremento en todos los tratamientos de inoculación y co-inoculación, a excepción del tratamiento con la cepa nativa SJ04. En plantas de ambos tratamientos de co-inoculación, el contenido de este monoterpeno fue 5 veces superior que en plantas control. En plantas inoculadas con una sola cepa PGPR, el máximo incremento fue registrado en plantas tratadas con GB03, en las cuales el contenido de pulegona fue 3.5 veces mayor que el de plantas no tratadas. En plantas inoculadas con WCS417r el incremento fue levemente menor.

La concentración del monoterpeno acíclico, linalool (Tabla 4.1.3.), fue significativamente superior en plantas tratadas con cepas PGPR ($p < 0.05$), a excepción de las inoculadas con SJ04. Las plantas co-inoculadas con WCS417r y SJ04, acumularon 4 veces más este compuesto que plantas control. En plantas inoculadas con GB03, WCS417r o tratadas con la combinación GB03 + SJ04 la concentración de linalool fue 3 veces mayor, que la correspondientes a plantas control.

Tabla 4.1.3. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) de los monoterpenos pulegona y linalool en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con rizobacterias.

Tratamiento	Pulegona	Linalool
Control	3.7 ± 0.33 a	0.11 ± 0.02 a
GB03	12.71 ± 1.07 bc	0.30 ± 0.02 b
WCS417r	10.57 ± 2.08 b	0.31 ± 0.02 b
SJ04	8.10 ± 0.93 ab	0.26 ± 0.01 ab
SJ04 + WCS417r	17.67 ± 2.92 c	0.48 ± 0.09 c
SJ04 + GB03	16.53 ± 2.52 c	0.32 ± 0.06 b

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

El aumento en el rendimiento total de AE en plantas inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR no se debió 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. Por lo que se sugiere que esta respuesta puede deberse a una estimulación de la biosíntesis de terpenos y/o al incremento del número de tricomas glandulares peltados. En ningún caso se registró una alteración cualitativa de los compuestos constituyentes del aceite, pero sí un cambio cuantitativo significativo de los componentes mayoritarios del mismo.



Los AE cumplen importantes roles ecológicos en plantas. El incremento en su biosíntesis proporciona una respuesta defensiva de la planta, a la colonización por microorganismos, ya que varios componentes del AE de *M. piperita* poseen importantes propiedades antimicrobianas, antifúngicas y/o insecticidas (Sangwan *et al.*, 2001; Bakkali *et al.*, 2008). De forma similar, se ha observado un incremento en la síntesis de monoterpenos como respuesta a la alimentación de insectos herbívoros (Harrewijn *et al.*, 2001; Banchio *et al.*, 2005), lo que le permite a la planta defenderse de futuros ataques. En general, la síntesis de monoterpenos es inducida por distintos tipos de estreses tanto bióticos como abióticos (Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que rizobacterias no patogénicas son capaces de estimular el metabolismo secundario vegetal a través del mecanismo denominado resistencia sistémica inducida (ISR) (van Loon y Glick., 2004). Determinados agentes biológicos son capaces de actuar como disparadores de la síntesis de enzimas claves involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2000), que están claramente relacionados con los mecanismos defensivos de la planta contra patógenos, a pesar de ser inducidos por bacterias no patogénicas.

La inducción de la síntesis de monoterpenos, por rizobacterias, en esta planta es coincidente con estudios previos en otras especies aromáticas realizados en nuestro laboratorio. La inoculación de *P. simiae* WCS417r incrementó el rendimiento total de AE 2,5 veces en *O. majoricum*, 24 veces en *O. majorana* y un 50% en *T. minuta* (Banchio *et al.*, 2010; Cappellari *et al.*, 2013). Los mVOCs emitidos por esta cepa bacteriana incrementaron 2 veces el contenido total de AE en plantas de *M. piperita* cultivadas *in vitro* (Santoro *et al.*, 2011). El presente estudio muestra efectos diferentes de la inoculación con *B. subtilis* GB03, sobre la acumulación de monoterpenos, ya que el tratamiento con esta cepa no tuvo efectos sobre el contenido total de monoterpenos en plántulas de *O. majorana* u *O. majoricum* (Banchio *et al.*, 2010). Sin embargo, la exposición a mVOCs emitidos por *B. subtilis* GB03 incrementó significativamente el rendimiento de AE en *O. basilicum* (albahaca) pero no en plántulas de *M. piperita* (Banchio *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2011). Un incremento significativo en el rendimiento de AE y en la concentración de los monoterpenos terpineol, mentona y mentol fue registrado en plantas de *M. piperita* inoculadas, *in vitro*, con cepas nativas de *P. putida* (Santoro *et al.*, 2015). Los efectos de las rizobacterias ó de sus VOCs, sobre la inducción de la síntesis de esta clase de metabolitos secundarios, variaron



claramente dependiendo de la cepa bacteriana y la especie vegetal, sugiriendo que las rizobacterias o sus metabolitos son reconocidas de manera específica por la planta.

En similitud con los resultados obtenidos en este estudio, la inoculación con cepas de *P. fluorescens* y *P. putida* indujo la biosíntesis de monoterpenos en la planta aromática y medicinal *Salvia officinalis* (Ghorbanpour *et al.*, 2016). Además, ha sido reportado que la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (AM), también estimula la biosíntesis de esta clase de metabolitos secundarios en varias especies aromáticas. En relación, en cultivos de *Mentha arvensis* inoculados con *Glomus fasciculatum* se observó un significativo incremento del contenido total de AE (Gupta *et al.*, 2002). En relación, Copetta y col. (2006) observaron cambios en la abundancia de pelos glandulares y en el rendimiento de AE, en plantas de *Ocimum basilicum* tratadas con AM.

Fue significativamente mayor el contenido total de AE y la concentración de los principales componentes del mismo en plantas co-inoculadas con *P. simiae* WCS417r y *P. putida* SJ04, en comparación a plantas tratadas con sola una de estas cepas; por lo que podría sugerirse un efecto sinérgico entre ambas rizobacterias sobre la inducción de la biosíntesis de monoterpenos en la planta en estudio. Sin embargo, la concentración de AE en plantas inoculadas con SJ04 + GB03 fue muy similar a la de plantas tratadas solo con una de estas rizobacterias. En este contexto Awasthi y col. (2011) determinaron que plantas de *Artemisia annua* co-inoculadas con *Glomus mosseae* y una cepa de *B. subtilis*, tuvieron una concentración del sesquiterpeno artemisinina, entre 25.5 y 103.2% superior que las tratadas con solo uno de estos microorganismos o que plantas control. Este sinergismo también ha sido observado entre *Glomus fasciculatum* y una cepa de *Pseudomonas* sobre la biosíntesis de forskolina, un diterpeno, en *Coleus forskohlii* (Singh *et al.*, 2013). En plantas de *T. minuta* el rendimiento total de AE y la concentración de los principales componentes del mismo, fue superior en plantas co-inoculadas con *P. simiae* WCS417r y *A. brasilense* Sp7, que en plantas inoculadas con una de estas cepas (Cappellari *et al.*, 2013). Varios reportes indican que la combinación de ciertas cepas microbianas muestran efectos sinérgicos (o al menos comparables) sobre la protección y promoción del crecimiento, en comparación a cuando son inoculadas por separado (Barea *et al.*, 2005).

Paralelamente el aumento producido en la densidad estomática y en el contenido de clorofila en plantas inoculadas puede ser reflejado en una mayor asimilación de C, lo que conduce a un incremento de la biosíntesis de terpenoides, proceso que requiere de la fijación de C a través de la fotosíntesis (Ghirardo *et al.*, 2011). La biosíntesis de terpenoides depende

del metabolismo primario y de las vías oxidativas por la demanda de C y energía (Singh *et al.*, 1991). El metabolismo primario juega un rol crucial en la síntesis de terpenoides, ya que los precursores de la vía MEP (gliceraldehído-3-fosfato y piruvato) están directamente conectados a la glucólisis (Tissier, 2012). Aquellos factores que incrementan la producción de materia seca afectan la interacción entre el metabolismo primario y secundario, conduciendo a un incremento en la biosíntesis de productos del metabolismo secundario vegetal (Shulka *et al.*, 1992).

Además de incrementar la concentración de los principales componentes del AE, el tratamiento con cepas PGPR produjo cambios en los porcentajes relativos (%R) de los mismos ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.7.). El %R para limoneno se incrementó un 43%, aproximadamente, en plantas inoculadas con una sola cepa PGPR, en comparación a plantas control y co-inoculadas ($p < 0.05$). El %R de linalool en plantas inoculadas con SJ04, WCS417r y co-inoculadas con estas dos cepas se duplicó; mientras que en plantas tratadas con GB03 o co-inoculadas con esta cepa en combinación con SJ04, este % fue similar al correspondiente a plantas control.

El %R para mentona se incrementó significativamente en plantas tratadas con WCS417r y en las inoculadas con esta cepa en combinación con SJ04 (Fig. 4.1.7.) ($p < 0.05$). En plantas co-inoculadas con WCS417r y la cepa nativa SJ04 el %R correspondiente a mentol fue duplicado. Esta misma tendencia se observó en plantas inoculadas con estas cepas individualmente.

El %R para pulegona, el principal componente del AE, disminuyó de 73.82% en plantas control a 64% en plantas tratadas con WCS417r o GB03 y a 67% en plantas co-inoculadas con WCS417r y la cepa nativa SJ04 (Fig. 4.1.7.). Las plantas de los tratamientos restantes no variaron significativamente, en relación al %R de este monoterpeno, de plantas control ($p > 0.05$).

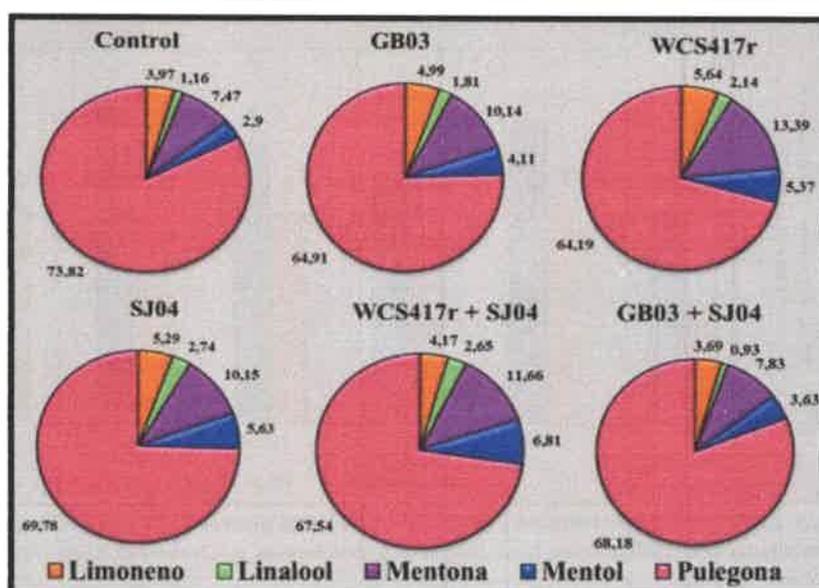


Fig. 4.1.7. % relativos de los principales componentes del AE de *M. piperita* en plantas tratadas con cepas PGPR.

Resulta interesante que en respuesta a la inoculación con rizobacterias, en algunos tratamientos, el %R de pulegona disminuyó y el de mentol aumentó significativamente; considerando que este último es el monoterpeno que le da valor al AE de *M. piperita*. En relación a los resultados obtenidos en este estudio, la exposición a VOCs emitidos por *P. simiae* WCS417r incrementó el %R de los monoterpenos pulegona y mentona, mientras que disminuyó el correspondiente a mentol; sin embargo, el %R para este compuesto aumentó en respuesta a los VOCs emitidos por *B. subtilis* GB03 (Santoro *et al.*, 2011).

4.1.3.1. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la densidad de estructuras secretoras de AE

Tricomas glandulares peltados y capitados estuvieron presentes en ambas caras de la hoja; siendo ambas estructuras, más abundantes sobre la superficie abaxial de la misma (Fig. 4.1.8.; Fig. 4.1.9; Fig. 4.1.10). El número de tricomas glandulares peltados, fue mayor en ambas caras, de hojas de plantas tratadas con rizobacterias ($p < 0.05$). En la cara adaxial de la hoja de plantas co-inoculadas y tratadas con una sola cepa PGPR el número/mm² de estas estructuras secretoras de AE fue duplicado; mientras que en la cara abaxial se observó un incremento del 70% aproximadamente.

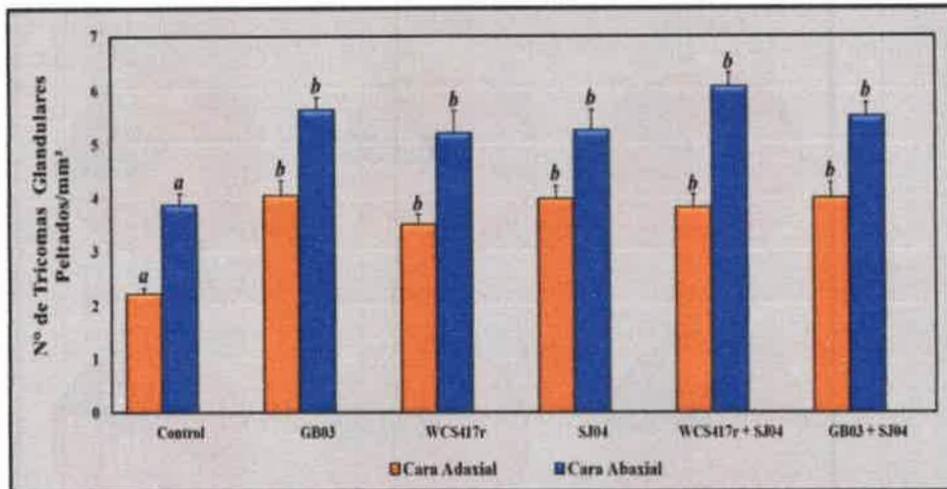


Fig. 4.1.8. Densidad de tricomas glandulares peltados en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con rizobacterias. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Sin embargo, el número de tricomas glandulares capitados, tanto en la cara adaxial como abaxial de la hoja, no fue modificado por los diferentes tratamientos de inoculación y co-inoculación (Fig. 4.1.9).

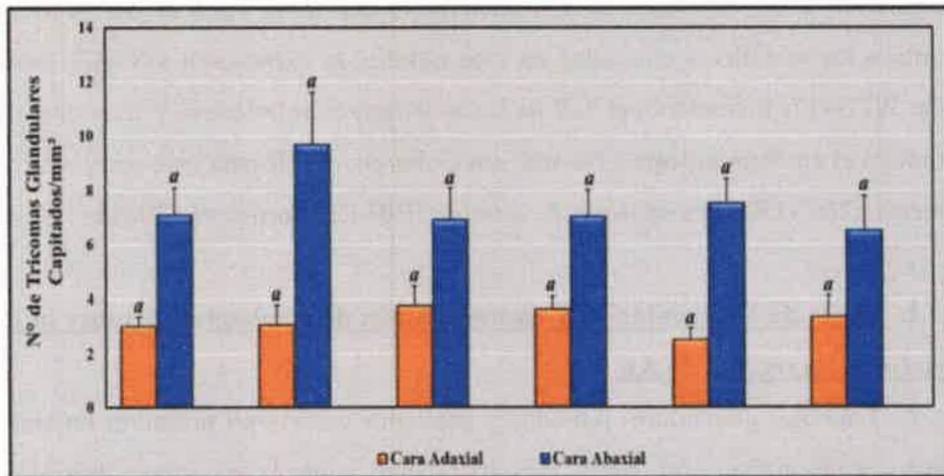


Fig. 4.1.9. Densidad de tricomas glandulares capitados en plantas de *M. piperita* tratadas con rizobacterias. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

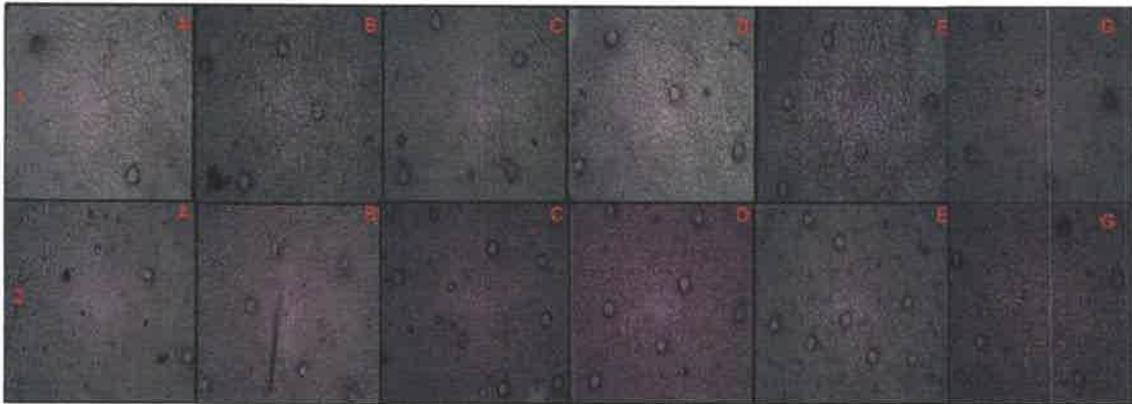


Fig. 4.1.10. Microfotografías de la superficie foliar de plantas de *M. piperita* tratadas con rizobacterias. 1. Cara adaxial 2. Cara abaxial. A: Control - B: *B. subtilis* GB03 - C: *P. simiae* WCS417r - D: *P. putida* SJ04 - E: *P. simiae* WCS417r + *P. putida* SJ04 - G: *B. subtilis* GB03 + *P. putida* SJ04.

Los resultados expuestos con anterioridad confirman que el aumento observado en el contenido total de AE en plantas inoculadas con rizobacterias, se debe al incremento del número de tricomas glandulares peltados, el principal sitio de síntesis de los AE. En relación, se ha observado una fuerte correlación positiva entre la densidad de tricomas glandulares y el nivel acumulado de AE y otros metabolitos secundarios en plantas de *O. basilicum*, *Origanum* sp., *A. annua* y *M. arvensis* (Zeng *et al.*, 2013). La densidad de tricomas glandulares es controlada por numerosos factores ambientales y hormonales (Boughton *et al.*, 2005; Lange y Ahkami, 2013).

En similitud con los resultados obtenidos en este trabajo, ha sido reportado que la inoculación de hongos micorrízicos incrementó la densidad de tricomas glandulares sobre ambas superficies de hojas de plántulas micropropagadas de *O. vulgare* (Morone Fortunato y Avato, 2008). En adición, en plántulas de *O. basilicum* colonizadas por tres diferentes hongos AM se observó un significativo incremento del número de tricomas glandulares peltados en la zona central y basal de la hoja (Copetta *et al.*, 2006).

Como ha sido mencionado anteriormente, las rizobacterias pueden inducir el mecanismo de ISR; este mecanismo involucra respuestas dependientes de JA y etileno (van Loon *et al.*, 1998; van Loon, 2007). Por otra parte, se conoce que el JA está involucrado en la formación de tricomas (Wasternack, 2014). Por lo que podría sugerirse que el aumento observado en la densidad de tricomas glandulares peltados se debe a que las rizobacterias inducen la activación de respuestas de defensa que involucran aumentos en los niveles endógenos de JA, lo cual tiene influencia sobre la ontogenia de mencionada clase de estructuras secretoras de AE (Boughton *et al.*, 2005).



4.1.4. Efecto de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la emisión de VOCs

La tasa de emisión (ng emitidos/hs x g de peso fresco) de VOCs fue mayor en plantas de *M. piperita* tratadas con microorganismos ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.11.). La co-inoculación de WCS417r y SJ04 triplicó la emisión de VOCs totales; llegando a valores de 920.05 ng emitidos/hs x g de peso fresco en relación a 290.61 ng emitidos/hs x g de peso fresco, correspondiente a plantas control. Las plantas inoculadas con las cepas WCS417r, SJ04 o GBO3 emitieron, aproximadamente, 2.5 veces más VOCs, que plantas no tratadas.

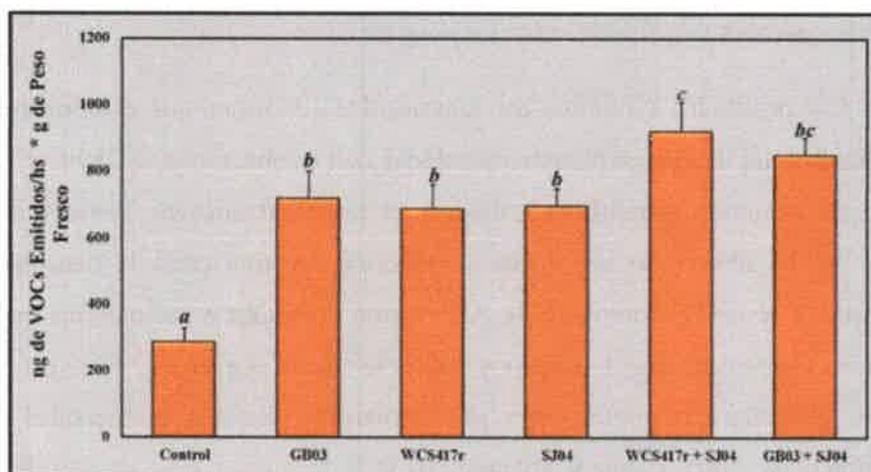


Fig. 4.1.11. Emisión de VOCs (ng/h * g de peso fresco) en plantas de *M. piperita* tratadas con rizobacterias. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

La emisión de los monoterpenos mayoritarios mentona, mentol y pulegona, en general, fue superior en plantas tratadas con cepas PGPR, que en plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.12). En plantas inoculadas y co-inoculadas como en plantas control, el principal monoterpeno emitido en la mezcla de VOCs fue mentona. En plantas tratadas con las cepas GB03, WCS417r o en plantas co-inoculadas, la emisión de este monoterpeno se incrementó, aproximadamente, un 60%, en comparación con plantas no inoculadas. La inoculación con SJ04 produjo un incremento, pero no significativo, de la emisión de mencionado compuesto.

Después de mentona, el monoterpeno que se emitió en mayor cantidad fue pulegona (Fig. 4.1.12). La emisión de este monoterpeno en plantas inoculadas y co-inoculadas fue 2.5 veces superior, aproximadamente, que en plantas control.

La emisión de mentol fue duplicada, en general, por el tratamiento con las distintas rizobacterias; solo no se observaron diferencias significativas, con respecto al control en el tratamiento con la cepa nativa SJ04; similar a lo expuesto para el monoterpeno mentona.

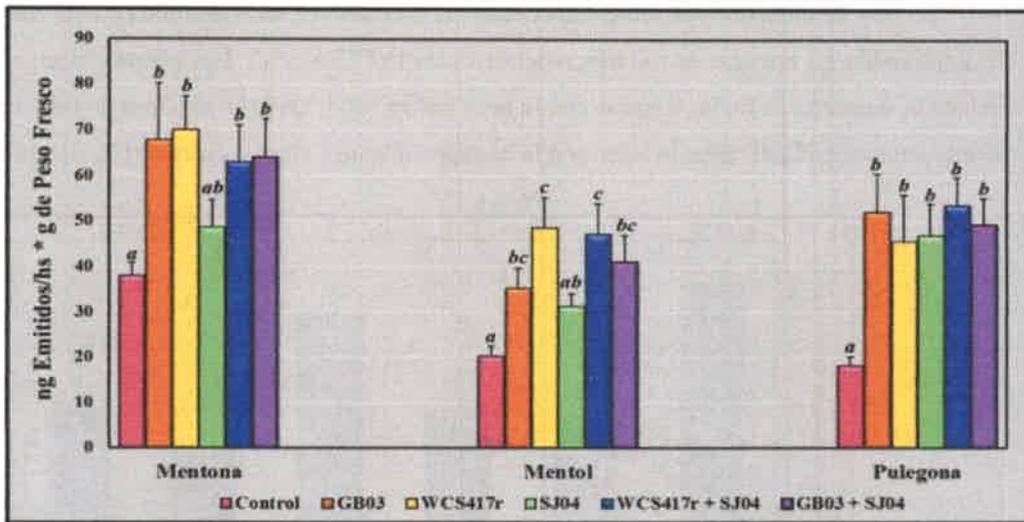


Fig. 4.1.12 Emisión (ng emitidos/hs * g de peso fresco) de los monoterpenos mentona, mentol y pulegona de plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

El tratamiento con cepas PGPR produjo, además, cambios en los porcentajes relativos (%R) de los principales componentes emitidos en la mezcla de VOCs: mentona, mentol y pulegona ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.13). El %R de mentona, en plantas tratadas con microorganismos fue de 6 a 10%, en comparación a plantas control en las cuales fue de un 3% aproximadamente ($p < 0.05$).

En plantas co-inoculadas y en las tratadas con las cepas WCS417r o GB03, el %R de mentol fue significativamente mayor que el correspondiente a plantas control e inoculadas con la cepa nativa SJ04 ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.13).

El %R de pulegona (Fig. 4.1.13) fue duplicado en plantas inoculadas con una sola cepa, en comparación a plantas control ($p > 0.05$). En plantas co-inoculadas el %R correspondiente a este monoterpeno fue significativamente superior que en plantas no tratadas.

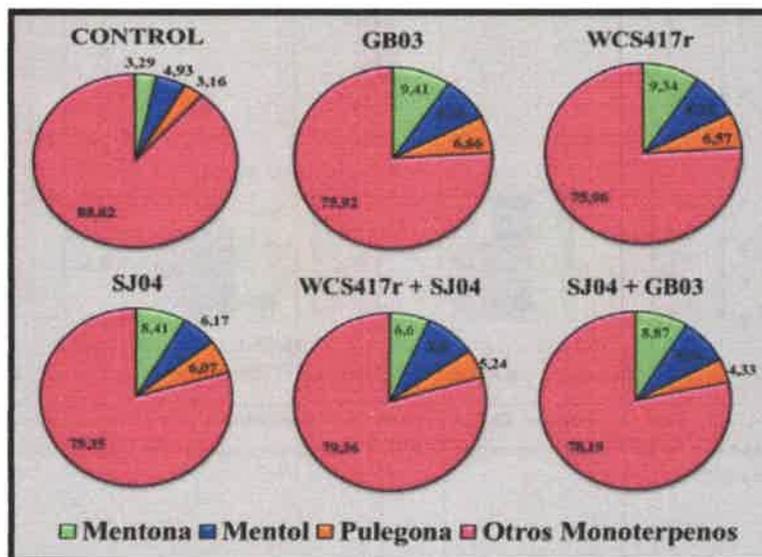


Fig. 4.1.13. % relativos de los principales monoterpenos emitidos por plantas de *M. piperita* tratadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

La tasa de emisión total relaciona la cantidad de monoterpenos emitidos con el contenido de AE almacenado en estructuras foliares especializadas (VOC/AE %). Las plantas inoculadas y co-inoculadas, a excepción de las tratadas con la cepa nativa SJ04, tuvieron una tasa de emisión total de monoterpenos significativamente inferior a la correspondiente a plantas control (Fig. 4.1.14).

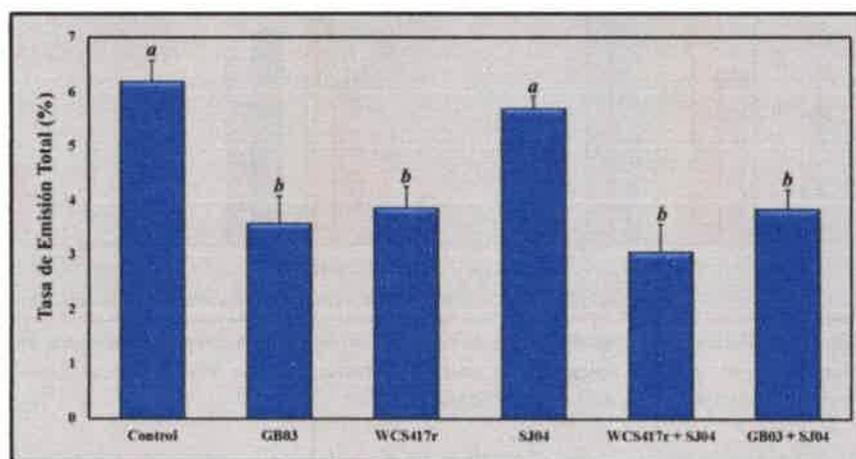


Fig. 4.1.14. Tasa de emisión total en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Las tasas de emisión de los monoterpenos mentona y mentol fueron más bajas en plantas tratadas con microorganismos que en plantas control (Fig. 4.1.15). Las plantas co-inoculadas e inoculadas con la cepa GB03 tuvieron una tasa de emisión de pulegona, significativamente inferior a la de plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.15).

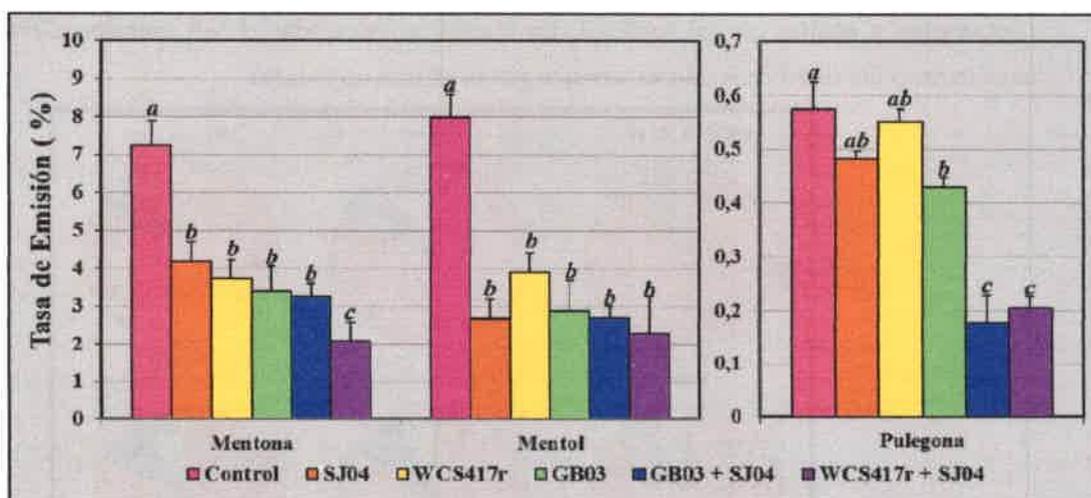


Fig. 4.1.15. Tasa de emisión de los monoterpenos mentona, mentol y pulegona en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



El tratamiento con rizobacterias incrementó tanto la producción de AE como la emisión de compuestos volátiles, pero no proporcionalmente. La producción de AE aumentó, aproximadamente 6 veces, mientras que la emisión de VOCs solo 3; esta es la explicación de la disminución observada en la tasa de emisión de monoterpenos. Ha sido demostrado que la producción y la liberación de VOCs son espacial y temporalmente reguladas y dependen de factores bióticos y abióticos (Holopainen y Gershenzon, 2010; Dudareva *et al.*, 2013).

Tanto en plantas control como inoculadas, la concentración relativa (%R) de los monoterpenos emitidos fue bastante diferente a la encontrada en el AE. La mezcla de monoterpenos emitida contiene altas proporciones de mentona y bajas de pulegona; mientras que el AE posee elevado contenido de pulegona y bajo de mentona. Particularmente, la pulegona representa, aproximadamente, el 70% del AE, mientras que solo un 5% de los VOCs. Estudios en otras especies vegetales también muestran que la composición de monoterpenos emitida puede ser diferente de la del AE (Gershenzon *et al.*, 2000; Banchio *et al.*, 2005). Las membranas de los compartimentos de almacenamiento pueden ser selectivamente más permeables a determinados monoterpenos (Werker, 1999).

Hasta el momento, poco se conoce sobre el mecanismo de emisión de los VOCs desde las células vegetales; antes de pasar al ambiente, estos compuestos deben atravesar la membrana plasmática y la pared celular. Análisis comparativos de los compuestos emitidos con los almacenados en los tejidos, revelan que la emisión de VOCs no depende únicamente de las propiedades de volatilidad de estos compuestos (Dudareva *et al.*, 2013). Los compuestos volátiles no polares difunden dentro de los compartimentos acuosos de forma más lenta, a pesar que se presume que los VOCs se mueven a través de cada barrera por difusión pasiva. Sin embargo, Widhalm y col. (2015) proponen que los compuestos volátiles deben cruzar múltiples compartimentos celulares para ser, por último, liberados al medio ambiente y presumen que pueden existir mecanismos biológicos involucrados en el movimiento de compuestos hidrofóbicos que puede contribuir a la emisión de volátiles, lo cual reduciría las barreras que deben atravesar.

Hasta el momento no han sido reportados estudios sobre el efecto de la inoculación de cepas PGPR sobre la emisión de VOCs; pero sí se han realizado estudios de este tipo en plantas aromáticas como también en otras especies vegetales con hongos micorrízicos arbusculares (AM), cuyos resultados guardan similitud con los obtenidos en este estudio. En plantas de *Artemisia annua* tratadas con *Glomus* spp. la emisión total de isoprenoides fue

ligeramente pero no significativamente superior en plantas micorrizas que en plantas control. Además, las plantas tratadas con el hongo AM se caracterizaron por una elevada emisión del monoterpene limoneno y de la cetona artemisia (Rapparini *et al.*, 2008). Panka y col., (2013) reportaron que la presencia del hongo endófito *Neotyphodium lolli* influyó fuertemente sobre la emisión de VOCs en tres genotipos diferentes de la gramínea perenne *Lolium perenne*.

En respuesta al ataque de herbívoros, las plantas pueden sintetizar y liberar complejas mezclas de VOCs que son cuali y cuantitativamente diferentes de las mezclas emitidas por plantas intactas (Sun *et al.*, 2014). Los compuestos emitidos pueden actuar directa o indirectamente sobre el herbívoro, ya que pueden funcionar como repelentes o atraer a los enemigos naturales de los mismos (van Schie *et al.*, 2007; Girón-Calva *et al.*, 2014). A su vez los VOCs emitidos por la planta atacada pueden inducir mecanismos de defensa en plantas vecinas no dañadas (Baldwin, 2010).

Por lo que la emisión de VOCs inducida por PGPR, puede proteger a la planta del ataque de organismos herbívoros. En relación, los VOCs emitidos por plantas de tomate micorrizadas resultan más atractivos para los parasitoides de afidos, que los volátiles emitidos por plantas no inoculadas (Guerrieri *et al.*, 2004). Los microorganismos del suelo como hongos AM o rizobacterias pueden afectar las interacciones de plantas con insectos a varios niveles tróficos (Pineda *et al.*, 2012). A su vez, el aumento en la emisión de VOCs inducido por cepas PGPR podría proteger a la planta de organismos fitopatógenos considerando que los principales monoterpenos emitidos poseen propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas (Sangwan *et al.*, 2001).

4.1.5. Efecto de la inoculación y co-inoculación de cepas PGPR sobre el contenido de compuestos fenólicos

La concentración de compuestos fenólicos en hoja fue superior en plantas tratadas con microorganismos ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.16). La mayor concentración de fenoles totales fue observada en plantas inoculadas con WCS417r o SJ04; siendo la misma dos veces mayor que la registrada para plantas control ($p < 0.05$). Las plantas co-inoculadas como las tratadas con GB03 mostraron un incremento aproximado del 70%. El contenido de compuestos fenólicos en raíz no fue afectado por el tratamiento con rizobacterias ($p > 0.05$) (Fig. 4.1.17.).

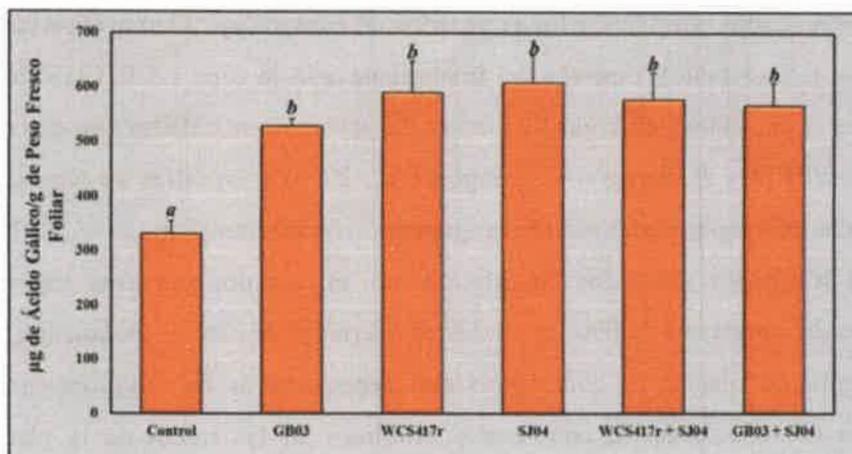


Fig. 4.1.16. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas de *M. piperita* tratadas con cepas PGPR. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

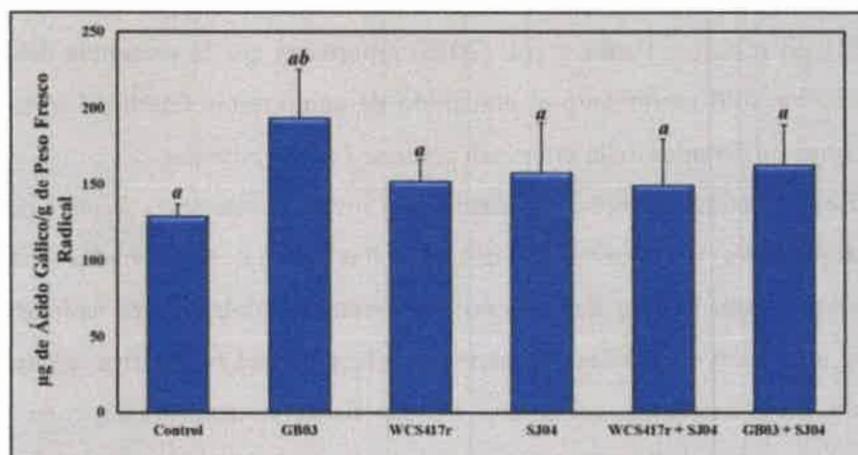


Fig. 4.1.17. Contenido de compuestos fenólicos en raíces de plantas de *M. piperita* tratadas con rizobacterias. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Los compuestos fenólicos son una de las principales clases de metabolitos secundarios vegetales. Algunos de ellos son sintetizados constitutivamente, mientras que la síntesis de otros es inducida como parte de una respuesta defensiva de la planta (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

En el presente trabajo, se determinó que la concentración de compuestos fenólicos aumentó significativamente en las hojas de plantas tratadas con microorganismos, pero no en raíz. Por lo que podría sugerirse que la inoculación de plantas con cepas PGPR incrementa la biosíntesis de compuestos fenólicos en la parte aérea del vegetal. De esta manera se corrobora la hipótesis de que las rizobacterias son capaces de estimular el metabolismo secundario vegetal.

Resultados similares a los reportados en este trabajo fueron observados en hojas de betelvine (*Piper betle*), después del tratamiento con la cepa NBRI1213 de *S. marcescens* (Lavania *et al.*, 2006), en hojas de plantas de garbanzo inoculadas con dos cepas PGPR: *P. fluorescens* Pf4 y *P. aeruginosa* (Singh *et al.*, 2003) y en tallos de plantas de *Eucalyptus* inoculadas con cepas pertenecientes al género *Streptomyces* (Salla *et al.*, 2014). En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, en los dos primeros casos se reportó un aumento del contenido de fenoles totales en las raíces de plantas inoculadas; sin embargo, el tratamiento de plantas de *Eucalyptus* con cepas nativas de *Streptomyces*, no indujo un aumento del contenido de compuestos fenólicos en las raíces de la planta. En nuestro laboratorio la inoculación de suico (*Tagetes minuta*) con rizobacterias incrementó el contenido de fenoles totales en la parte aérea de la planta (Cappellari *et al.*, 2013). Los hongos AM también pueden inducir la síntesis de compuestos fenólicos en plantas (Zeng *et al.*, 2013); en relación, Panka y col. (2013) reportaron que la presencia del hongo endófito *Neotyphodium lolli* incrementó el contenido de compuestos fenólicos en la parte aérea de tres genotipos diferentes de la gramínea perenne *Lolium perenne*.

Los compuestos fenólicos actúan como agentes protectores frente a patógenos debido a las propiedades antifúngicas de distintos flavonoides, relacionadas con los siguientes mecanismos: cross-linking de enzimas microbianas, inhibición de celulasas y pectinasas fúngicas, quelación de metales necesarios para la actividad enzimática; y/o formación de una estructura dura, cristalina como una barrera física contra el ataque de patógenos, etc. (Skadhauge *et al.*, 1997). También son secretados como un mecanismo de defensa a condiciones de estrés abiótico, tales como estrés hídrico, radiaciones UV, entre otros.

La síntesis de compuestos fenólicos por la vía de los fenilpropanoides es el resultado de un proceso de traducción de señales que ocurre después del daño, ataque de patógenos ó herbívoros ó elicitación (Felton *et al.*, 1999; Graham y Graham, 1996). Sin embargo, el mecanismo exacto de alteración de la concentración de compuestos fenólicos en plantas por el tratamiento con rizobacterias no ha sido dilucidado completamente hasta el momento.

4.1.6. Efectos de la inoculación y co-inoculación de rizobacterias sobre la actividad de la enzima PAL en plantas de *M. piperita*

La actividad enzimática (μg de ácido trans-cinámico/min./g de proteína) de PAL fue mayor en plantas inoculadas y co-inoculadas con rizobacterias que en plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.1.18.). La máxima actividad fue observada en plantas inoculadas con



WCS417r o SJ04; siendo la misma cinco veces mayor que la registrada para plantas control ($p < 0.05$). En plantas co-inoculadas como en las tratadas con GB03 la actividad de esta enzima aumentó tres veces.

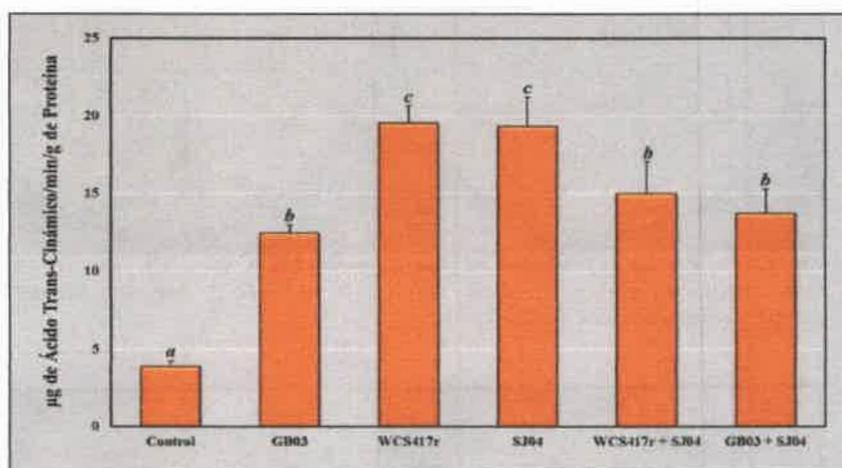


Fig. 4.1.18. Actividad de la enzima PAL en plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

El tratamiento con rizobacterias aumentó la actividad de la enzima PAL, lo cual podría ser la causa del aumento de la producción de compuestos fenólicos en hojas de *M. piperita*. La actividad de la enzima PAL es estimulada en diferentes procesos del desarrollo vegetal y, además, por una variedad de señales ambientales, incluyendo el ataque de organismos patógenos, heridas tisulares, radiación UV, exposición a metales pesados, bajas temperaturas y bajos niveles de nitrógeno, fósforo u otros iones (Zhang y Liu, 2015).

En similitud con los resultados expuestos anteriormente, Figueredo y col. (2014) reportaron que la co-inoculación de *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 incrementó la actividad de la enzima PAL en plántulas de maní (*Arachis hypogaea*).

4.1.7. Pruebas de antagonismo “*in vitro*” de las cepas co-inoculadas

4.1.7.1. Pruebas de inhibición en placa

En las Figs. 4.1.19B y 4.1.20B puede observarse que no hubo inhibición entre las cepas SJ04 y WCS417r, en medio LB al cabo de 24 hs incubación a 28°C. En la Fig. 4.1.20B, puede observarse un pequeño halo de inhibición alrededor de la colonia de la cepa nativa SJ04, sin embargo, en la Fig. 4.1.19A no se observa inhibición del crecimiento entre esta cepa por GB03.

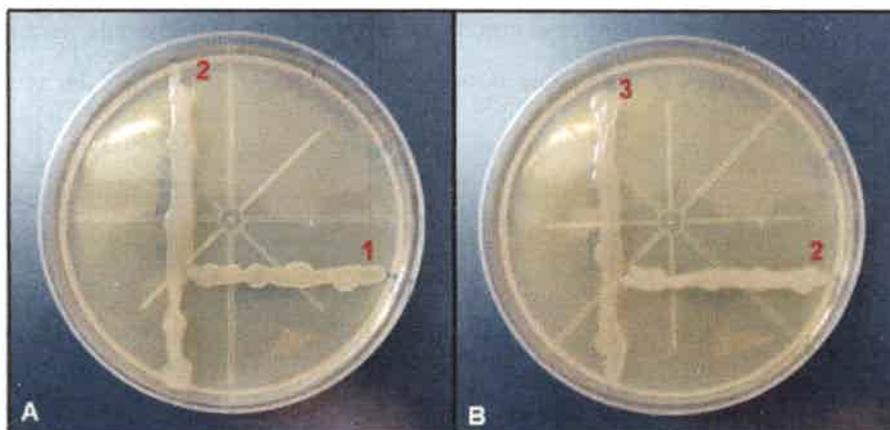


Fig. 4.1.19. Prueba de inhibición en placa en medio LB. A. Estría de *B. subtilis* GB03 (1) y en forma perpendicular estría de *P. putida* SJ04 (2). B. Estría de *P. fluorescens* WCS417r (3) y perpendicularmente estría de *P. putida* SJ04 (2).

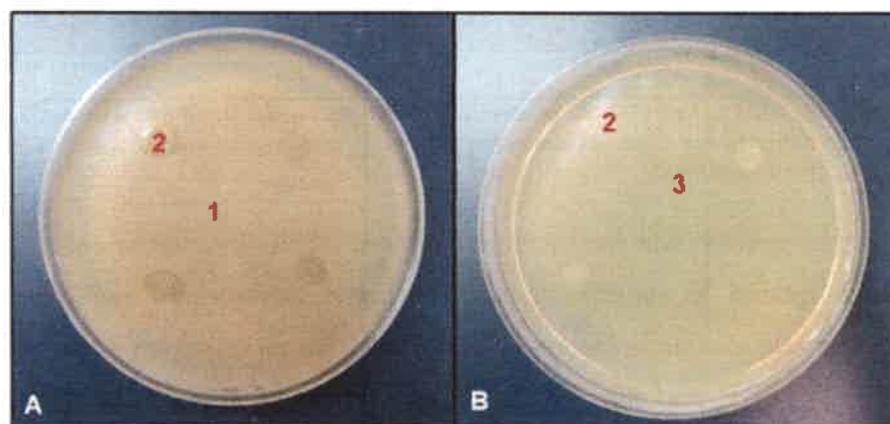


Fig. 4.1.20. Prueba de inhibición en placa en medio LB. A. *B. subtilis* GB03 (1) cepa sembrada de manera masiva y gotas de *P. putida* SJ04 (2). B. *P. fluorescens* WCS417r (3) cepa sembrada de manera masiva y gotas de *P. putida* SJ04 (2).

4.1.7.2. Ensayo de co-inoculación en medio de cultivo

En la Fig. 4.1.21. puede observarse que SJ04, tuvo el mismo comportamiento creciendo sola o en combinación con WCS417r. Sin embargo, el crecimiento de WCS417r fue menor cuando esta cepa fue inoculada junto a SJ04.

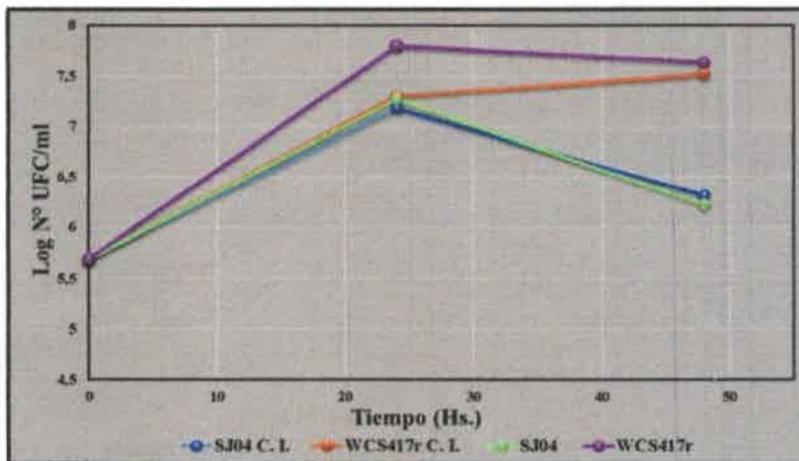


Fig. 4.1.21. Dinámica de WCS417r y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en medio LB.

Al analizar la Fig. 4.1.22. puede observarse que el crecimiento de SJ04, fue significativamente menor cuando esta cepa fue inoculada junto a GB03. El crecimiento de GB03 también fue menor cuando esta cepa creció junto a la cepa nativa SJ04.

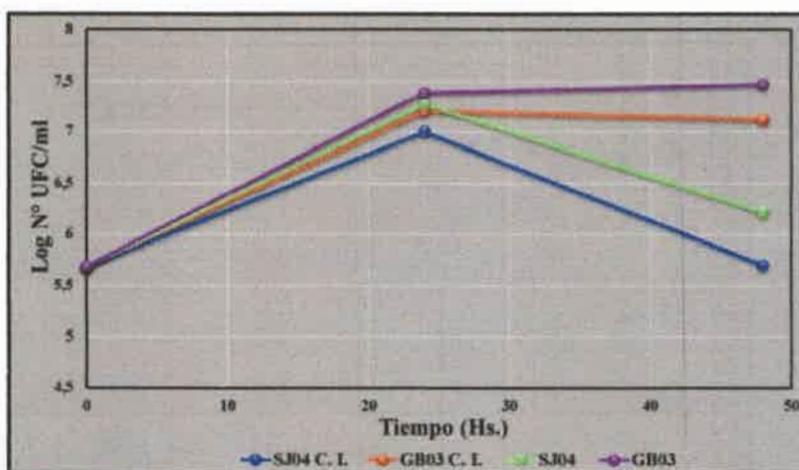


Fig. 4.1.22. Dinámica de GB03 y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en medio LB.

4.1.8. Seguimiento de las cepas bacterianas inoculadas y co-inoculadas

En la Fig. 4.1.23. puede observarse que el crecimiento de SJ04 fue similar tanto cuando esta cepa fue inoculada sola o como cuando lo hizo en combinación con WCS417r. El recuento de WCS417r fue disminuyendo progresivamente desde el momento de la inoculación hasta los 30 días posteriores. La presencia de SJ04 no modificó el crecimiento de WCS417r.

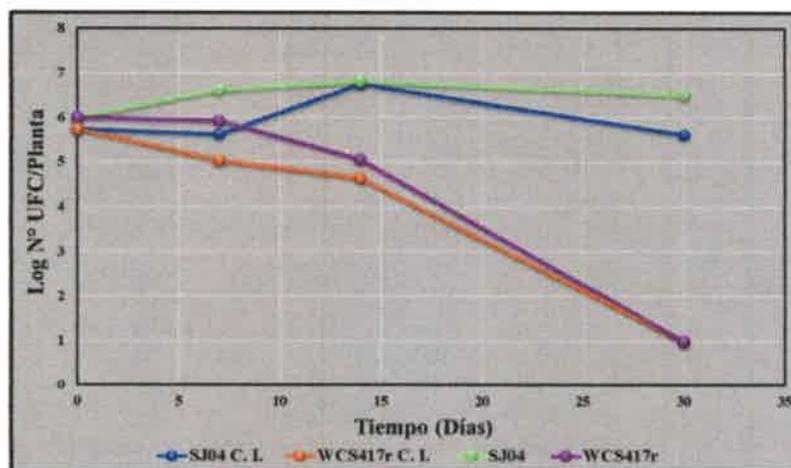


Fig. 4.1.23. Dinámica de WCS417r y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en la rizósfera de plantas de *M. piperita*.

En la Fig. 4.1.24. puede observarse que SJ04 y GB03, tuvieron el mismo comportamiento creciendo solas o en combinación. El N° de UFC, de estas cepas, presente en la planta a los 30 días fue mayor que el N° de UFC inoculadas.

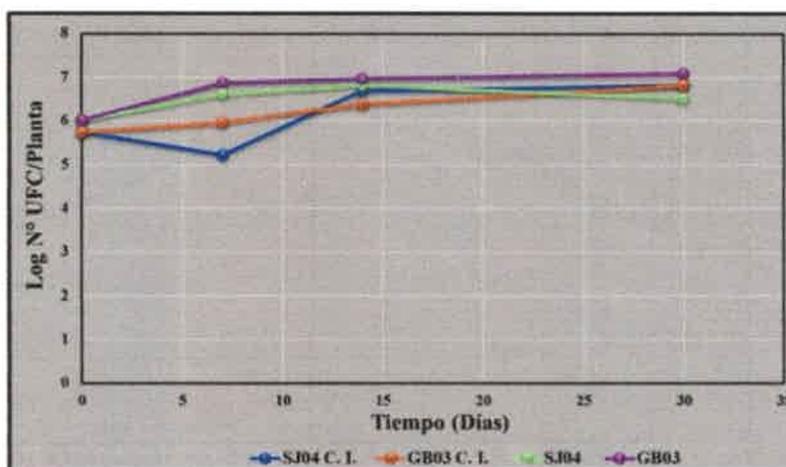


Fig. 4.1.24. Dinámica de GB03 y SJ04 creciendo en combinación (C.I.) o separadamente en la rizósfera de plantas de *M. piperita*.

Las cepas GB03 y SJ04, inoculadas solas o en combinación, siguen presentes en la rizósfera de *M. piperita* después de 30 días de ser inoculadas. Sin embargo, el N° de UFC de la cepa WCS417r disminuye progresivamente desde el momento de la inoculación, hasta desaparecer a los 30 días. Este resultado no es atribuible a la cepa nativa SJ04, ya que lo mismo se observó cuando esta cepa fue inoculada sola. Una posible explicación podría ser que la cepa WCS417r no logra adaptarse a los exudados radicales de *M. piperita*.



El conocimiento de los mecanismos de adaptación de las plantas es de interés desde un punto de vista ecofisiológico, pero estos mecanismos también constituyen un punto de partida importante para mejorar la producción vegetal, incluyendo la optimización de la producción de metabolitos secundarios.

La utilización de hongos y bacterias como inoculantes es una alternativa biotecnológica eficiente para estimular el metabolismo secundario de las plantas, y puede también conducir a información pertinente sobre ciertos procesos de adaptación que son poco conocidos actualmente. Se ha encontrado que la inoculación de determinadas cepas PGPR produce un incremento en la biomasa y una inducción sistémica de las vías biosintéticas de monoterpenos y compuestos fenólicos, lo que sugiere que la inoculación con rizobacterias puede aumentar significativamente la productividad y reducir la cantidad de fertilizante requerida para cultivos de plantas aromáticas.

Sección II:
*Interacción Planta
Aromática - PGPR -
MeJA*





4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2. SECCIÓN II: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-MeJA

4.2.1. Efecto de la inoculación con rizobacterias y la aplicación exógena de MeJA sobre diferentes parámetros del crecimiento vegetal

La aplicación exógena de MeJA produjo una inhibición del crecimiento, en plantas de *M. piperita* (Fig. 4.2.1., Tabla 4.2.1.). El efecto de inhibición generado por esta fitohormona fue más evidente a los 14 que a los 7 días posteriores a su aplicación. La inhibición del crecimiento vegetal, después del tratamiento con JA o sus derivados, ha sido reportado en muchas especies vegetales, bajo diferentes condiciones de cultivo (Baldwin *et al.*, 1998; Zhang y Turner, 2008; Krzyzanowska *et al.*, 2012; Heinrich *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2015; Shyu y Brutnell, 2015).

La magnitud de los cambios registrados, en los diferentes parámetros de crecimiento evaluados, dependió de la concentración de MeJA aplicada (Fig. 4.2.1., Tabla 4.2.1.). Las plantas tratadas con MeJA 4 mM, exhibieron el menor desarrollo, tanto a los 7 como a los 14 días posteriores a su aplicación. En relación, el peso fresco de la parte aérea de estas plantas, fue un 30% menor, aproximadamente, que el correspondiente a plantas control ($p < 0.05$), a los 14 días posteriores a la aplicación de MeJA. En tanto que las concentraciones 1 y 2 mM, si bien produjeron una significativa reducción del crecimiento vegetal, lo hicieron en un menor grado que la concentración 4 mM. Plantas no inoculadas esprayadas con MeJA 1 o 2 mM presentaron una disminución del 15%, aproximadamente, en el peso fresco de la parte aérea, a los 7 días posteriores a la aplicación de mencionada fitohormona, en comparación a plantas control ($p < 0.05$).

Plantas esprayadas con MeJA, previamente inoculadas con rizobacterias, tuvieron un crecimiento similar o menor que plantas control, dependiendo de la concentración de MeJA aplicada. Lo que sugiere que los mecanismos desencadenados por las PGPR, que conducen a un mayor desarrollo vegetal, fueron suprimidos por el posterior tratamiento con el derivado metilado del JA. El crecimiento y desarrollo vegetal y las respuestas al estrés son procesos comandados por diversas vías hormonales y éstas, a menudo, tienen “cross-talk” antagónicos o sinérgicos entre ellas (Grant y Jones, 2009; Depuydt y Hardtke, 2011).

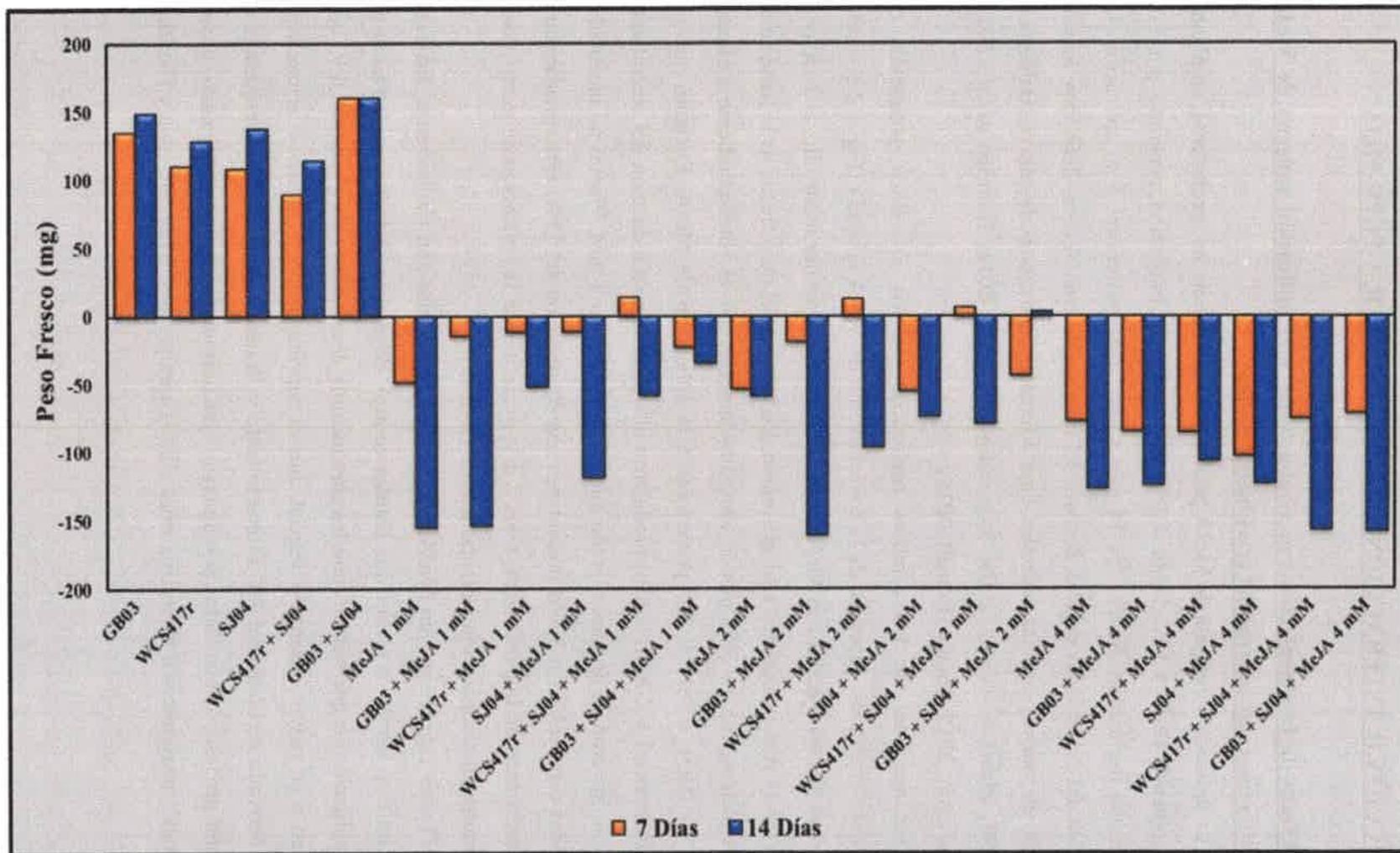


Fig. 4.2.1. Diferencia del peso fresco del tallo de plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con MeJA con el correspondiente a plantas control.



En relación, varios estudios lograron determinar que la síntesis de JA antagoniza con la biosíntesis y acumulación de GAs conduciendo a un retraso en el desarrollo vegetal (Yang *et al.*, 2012; Shahzad *et al.*, 2015). Heinrich y col. (2013) demostraron que las señales desencadenadas por JA reprimen la biosíntesis de GAs por inhibir la transcripción de varios genes que codifican para enzimas claves de la ruta biosintética de mencionados fitoreguladores en *Nicotiana attenuata*. Además de tener un “*cross-talk*” antagónico con GAs, el JA, podría interferir negativamente con otras hormonas que participan en la regulación del crecimiento como IAAs, BRs y citoquininas, inhibiendo así el desarrollo vegetal. Además, ha sido reportado el efecto negativo del JA sobre la progresión del ciclo celular en cultivo de células y particularmente sobre la mitosis (Noir *et al.*, 2013).

El crecimiento vegetal requiere de la remodelación de la pared celular primaria (Benatti *et al.*, 2012). Análisis de microarrays de cultivos de células de *Arabidopsis* tratados con MeJA mostraron una represión de la expresión de genes implicados en la biosíntesis y remodelación de la pared celular primaria, como aquellos que codifican para las enzimas celulosa sintasa y pectina liasa (Pauwels *et al.*, 2008). Lo expuesto anteriormente, sugiere que la inhibición del crecimiento observada después del tratamiento con MeJA puede deberse, entre otros factores, a la inhibición de la elongación celular.

El incremento en los niveles de JAs ocurre en las plantas a causa de diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos como daño mecánico, alimentación por herbívoros, infección por patógenos necrotróficos, etc. (Wasternack, 2007; Wu y Baldwin, 2010). Este incremento, generalmente, se asocia con un aumento en las defensas, pero también con una disminución del crecimiento vegetal (Heinrich *et al.*, 2013). En relación, plantas de *Arabidopsis* que sobreprodujeron JA, presentaron un tamaño reducido pero una mayor resistencia a insectos herbívoros y hongos (Bonaventure *et al.*, 2007; Hyun *et al.*, 2008). Un estudio realizado en plantas de *Nicotiana attenuata* demuestra que el ataque de larvas de *Manduca sexta* conduce a un aumento de los niveles JA, lo que desencadena la síntesis de compuestos de defensa, pero disminuye la expresión de un grupo de genes que codifican para proteínas involucradas en el proceso de fotosíntesis; lo que produce una disminución de la tasa fotosintética y, en consecuencia, del crecimiento vegetal (Mitra y Baldwin, 2013). Por lo expuesto anteriormente, podría sugerirse que, el crecimiento vegetal se detiene cuando la prioridad de la planta es la defensa.

Tabla 4.2.1. Longitud del tallo (cm), N° de hojas y ramificaciones en plantas de *M. piperita* tratadas con cepas PGPR y/o MeJA.

Tratamiento	N° de Hojas		Longitud del Tallo (cm)		N° de Ramificaciones	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	19.33 ± 2.04 <i>d</i>	29.50 ± 1.84 <i>cd</i>	9.07 ± 0.85 <i>cd</i>	9.47 ± 0.33 <i>ab</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	3.17 ± 0.17 <i>bc</i>
GB03	23 ± 2.04 <i>e</i>	32.11 ± 1.85 <i>d</i>	9 ± 0.85 <i>cd</i>	12.63 ± 1.02 <i>c</i>	2.33 ± 0.5 <i>a</i>	3.67 ± 0.67 <i>bc</i>
WCS417r	20.33 ± 2.04 <i>de</i>	41 ± 3.21 <i>e</i>	8.10 ± 0.85 <i>c</i>	12.33 ± 0.55 <i>c</i>	1.67 ± 0.5 <i>a</i>	4.00 ± 1.53 <i>c</i>
SJ04	21.67 ± 2.04 <i>de</i>	32.67 ± 2.85 <i>d</i>	8.63 ± 0.85 <i>cd</i>	12.10 ± 1.16 <i>c</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	3.33 ± 0.88 <i>bc</i>
WCS417r + SJ04	20.20 ± 2.04 <i>de</i>	35 ± 4.04 <i>d</i>	9.17 ± 0.85 <i>cd</i>	13.13 ± 1.06 <i>c</i>	2 ± 0.5 <i>a</i>	3.7 ± 0.17 <i>bc</i>
GB03 + SJ04	23.5 ± 2.04 <i>e</i>	40.33 ± 6.66 <i>e</i>	10 ± 1.04 <i>d</i>	13.60 ± 1 <i>d</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	4.33 ± 0.33 <i>c</i>
MeJA 1 mM	15.33 ± 2.04 <i>bc</i>	29.25 ± 0.95 <i>cd</i>	6.33 ± 0.85 <i>b</i>	9.20 ± 0.40 <i>ab</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	3.25 ± 0.25 <i>bc</i>
GB03 + MeJA 1 mM	17.80 ± 1.58 <i>cd</i>	31.50 ± 2.33 <i>cd</i>	6.10 ± 0.66 <i>b</i>	12.90 ± 0.42 <i>c</i>	2 ± 0.5 <i>a</i>	3.25 ± 0.25 <i>bc</i>
WCS417r + MeJA 1 mM	18.33 ± 2.04 <i>cd</i>	31.33 ± 1.86 <i>cd</i>	8.19 ± 0.85 <i>cd</i>	10.27 ± 1.76 <i>ab</i>	2 ± 0.5 <i>a</i>	4.33 ± 0.33 <i>c</i>
SJ04 + MeJA 1 mM	14.33 ± 2.04 <i>b</i>	31.25 ± 0.95 <i>cd</i>	5.63 ± 0.85 <i>ab</i>	9.68 ± 0.92 <i>ab</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	4.50 ± 0.65 <i>c</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 1 mM	15 ± 2.04 <i>bc</i>	26.67 ± 1.20 <i>c</i>	6.17 ± 0.66 <i>b</i>	11.8 ± 0.89 <i>b</i>	1.67 ± 0.5 <i>a</i>	4.00 ± 1.53 <i>c</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 1 mM	17 ± 2.04 <i>c</i>	24.33 ± 2.33 <i>bc</i>	7.83 ± 0.85 <i>c</i>	13.23 ± 0.46 <i>cd</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	3.25 ± 0.25 <i>bc</i>
MeJA 2 mM	14.67 ± 2.04 <i>b</i>	22.67 ± 1.86 <i>ab</i>	7.50 ± 0.85 <i>c</i>	8.83 ± 0.28 <i>a</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	2 ± 0.41 <i>ab</i>
GB03 + MeJA 2 mM	17.33 ± 2.04 <i>cd</i>	19.40 ± 2.23 <i>a</i>	7.17 ± 0.85 <i>bc</i>	11.63 ± 0.95 <i>b</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	2.75 ± 0.63 <i>b</i>
WCS417r + MeJA 2 mM	19.33 ± 2.04 <i>d</i>	22.75 ± 1.11 <i>ab</i>	6.77 ± 0.85 <i>bc</i>	12.85 ± 0.87 <i>c</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	2.25 ± 0.25 <i>ab</i>
SJ04 + MeJA 2 mM	14.50 ± 1.77 <i>b</i>	21.80 ± 2.63 <i>ab</i>	5.25 ± 0.74 <i>ab</i>	13.08 ± 0.88 <i>c</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	2 ± 0.71 <i>ab</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 2 mM	12.67 ± 2.04 <i>ab</i>	21.50 ± 1.55 <i>ab</i>	4.50 ± 0.85 <i>a</i>	11.72 ± 0.89 <i>b</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	3.17 ± 0.17 <i>bc</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 2 mM	16.50 ± 2.50 <i>c</i>	19.75 ± 2.06 <i>a</i>	6.17 ± 0.85 <i>b</i>	11.68 ± 0.98 <i>b</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	3.25 ± 0.48 <i>bc</i>
MeJA 4 mM	18 ± 2.04 <i>cd</i>	23.50 ± 1.50 <i>b</i>	6.03 ± 0.85 <i>b</i>	8.72 ± 0.21 <i>a</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	1.25 ± 0.25 <i>a</i>
GB03 + MeJA 4 mM	17 ± 2.04 <i>c</i>	23.75 ± 2.10 <i>b</i>	6.03 ± 0.85 <i>b</i>	10.65 ± 0.86 <i>ab</i>	1.67 ± 0.5 <i>a</i>	3.50 ± 0.65 <i>bc</i>
SJ04 + MeJA 4 mM	17.67 ± 2.04 <i>cd</i>	24.75 ± 2.87 <i>bc</i>	4.67 ± 0.85 <i>a</i>	11.05 ± 0.89 <i>b</i>	1 ± 0.5 <i>a</i>	2.50 ± 0.50 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 4 mM	14 ± 2.04 <i>b</i>	25.25 ± 1.89 <i>bc</i>	4.03 ± 0.85 <i>a</i>	11.1 ± 0.89 <i>b</i>	2 ± 0.5 <i>a</i>	2.75 ± 0.63 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 4 mM	16 ± 2.04 <i>c</i>	20 ± 1.22 <i>a</i>	6.57 ± 0.85 <i>bc</i>	8.67 ± 0.89 <i>a</i>	1.33 ± 0.5 <i>a</i>	3.17 ± 0.17 <i>bc</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



4.2.2. Efecto de la aplicación exógena de MeJA sobre el contenido y la composición del AE de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias.

La aplicación exógena de MeJA provocó un significativo incremento en la producción de monoterpenos en plantas de *M. piperita* (Fig. 4.2.2.). El rendimiento (μg de AE/g de peso fresco) total de AE en plantas no inoculadas tratadas con MeJA fue significativamente superior que en plantas control ($p < 0.05$) (Fig. 4.2.2.); la magnitud del incremento en el contenido total de AE dependió de la dosis de MeJA aplicada. En relación, el rendimiento de AE, fue superior en plantas tratadas con la mayor concentración: 4 mM; tanto a los 7 como a los 14 días posteriores al tratamiento. Incrementándose 5 veces, aproximadamente, el contenido de AE en estas plantas, en relación a plantas control ($p < 0.05$). Las concentraciones de AE registradas en plantas no inoculadas expuestas a las concentraciones 1 y 2 mM de MeJA, fueron similares a las observadas en plantas solo tratadas con rizobacterias.

La concentración de monoterpenos, en general, fue mayor a los 7 que, a los 14 días, posteriores al tratamiento con MeJA; por lo que podría sugerirse que el derivado metilado del JA desencadena la activación de respuestas de defensa en la planta en estudio, que involucran la estimulación de la biosíntesis de terpenoides, las cuales van disminuyendo progresivamente. La aplicación exógena de MeJA no produjo una alteración cualitativa de los compuestos constituyentes del aceite, pero si un cambio cuantitativo importante de los componentes mayoritarios del mismo (Fig. 4.2.2.; Fig. 4.2.3.; Fig. 4.2.4.). En relación el contenido de los monoterpenos mayoritarios: limoneno, linalool, mentona, mentol y pulegona fue, en general, superior en plantas tratadas con MeJA, en comparación a plantas control ($p < 0.05$).

La concentración de los principales monoterpenos y el contenido total de AE fue significativamente superior en plantas inoculadas o co-inoculadas y esprayadas con MeJA 2 mM. En relación, plantas inoculadas con la cepa WCS417r y tratadas con MeJA 2 mM, tuvieron a los 7 días posteriores al tratamiento con mencionada fitohormona, un rendimiento de AE 8 veces superior que el correspondiente a plantas control ($p < 0.05$). Lo que podría sugerir que a esta concentración, el derivado metilado del JA en combinación con las rizobacterias tienen un efecto sinérgico sobre la biosíntesis de terpenoides. Plantas tratadas con microorganismos y expuestas a MeJA 1 o 4 mM tuvieron un contenido total de AE inferior a plantas inoculadas no sometidas al tratamiento con el derivado metilado del JA.

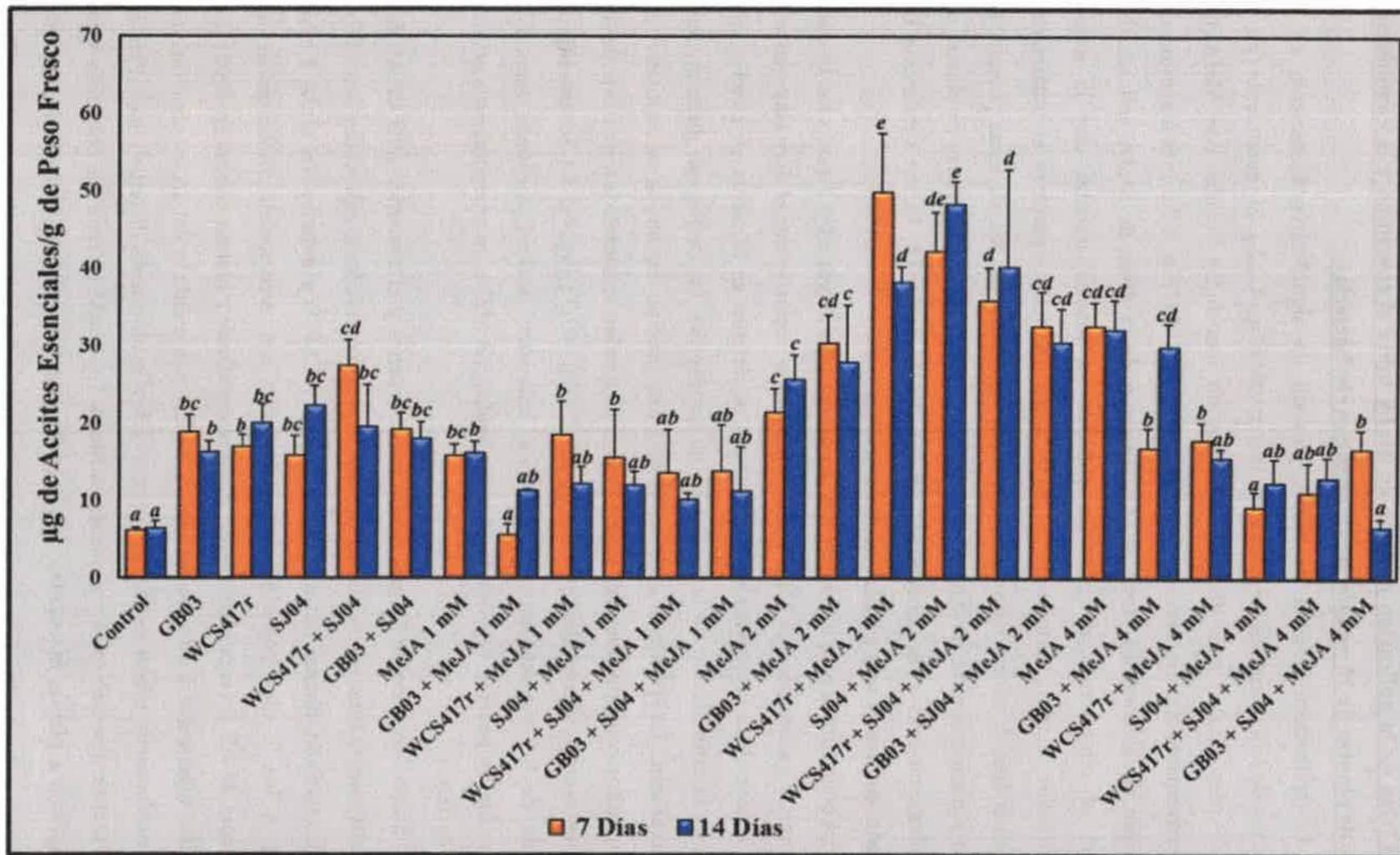


Fig. 4.2.2. Concentración de AE en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0,05$).

El JA, sus derivados y precursores están involucrados en la inducción de respuestas de defensa en plantas, principalmente contra herbívoros y patógenos necrotróficos (Karban y Baldwin, 1997; Hu *et al.*, 2013; Kautz *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014; Yang y Xie, 2015). Rosahl y Feussner (2005) demostraron que los JAs regulan la expresión de varios genes involucrados en las respuestas de defensa. Estas hormonas juegan un rol central en la regulación de la biosíntesis de varios metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides, fitoalexinas, cumarinas, antocianinas, entre otros (Howe, 2001; Maes *et al.*, 2011; Dutta y Khurana, 2015; Wasternack y Song, 2016).

En similitud con los resultados obtenidos en el presente estudio, Hudgins y col. (2004) reportaron que la aplicación exógena de JA 100 mM, indujo la acumulación de resinas terpenoides en la superficie de tallos de coníferas. En contraposición a lo expuesto en este trabajo, el tratamiento con JA no produjo un aumento significativo en la producción de terpenoides en hojas de *Eucalyptus*, las cuales contenían abundante número de cavidades secretorias (Henery *et al.*, 2008).

El tratamiento con JA o con su derivado volátil, MeJA, también induce la emisión de VOCs en plantas (Rodríguez-Saona, 2001; Glas *et al.*, 2012). En relación, tanto la emisión de linalool como el contenido de este monoterpeno en tricomas glandulares de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), aumentaron después de la aplicación de JA 1 mM. El tratamiento con mencionada fitohormona, también incrementó los niveles de transcripción del gen *LeMTS1*, el cual codifica para una linalool sintasa localizada en tricomas de plantas de tomate (van Schie *et al.*, 2007).

Pocos estudios, sobre los efectos de la aplicación exógena de JAs sobre la producción de metabolitos secundarios en plantas aromáticas y medicinales, han sido reportados. Złotek y col. (2016) reportaron que el tratamiento con JA incrementó significativamente el contenido de AE y de los monoterpenos linalool, eugenol y limoneno en la planta aromática y medicinal *Ocimum basilicum* (albahaca). Lo anteriormente expresado y los resultados obtenidos en este trabajo, indican que la biosíntesis de terpenoides, en plantas aromáticas y otras especies vegetales, puede ser inducida por el tratamiento con JA o su derivado metilado, MeJA.

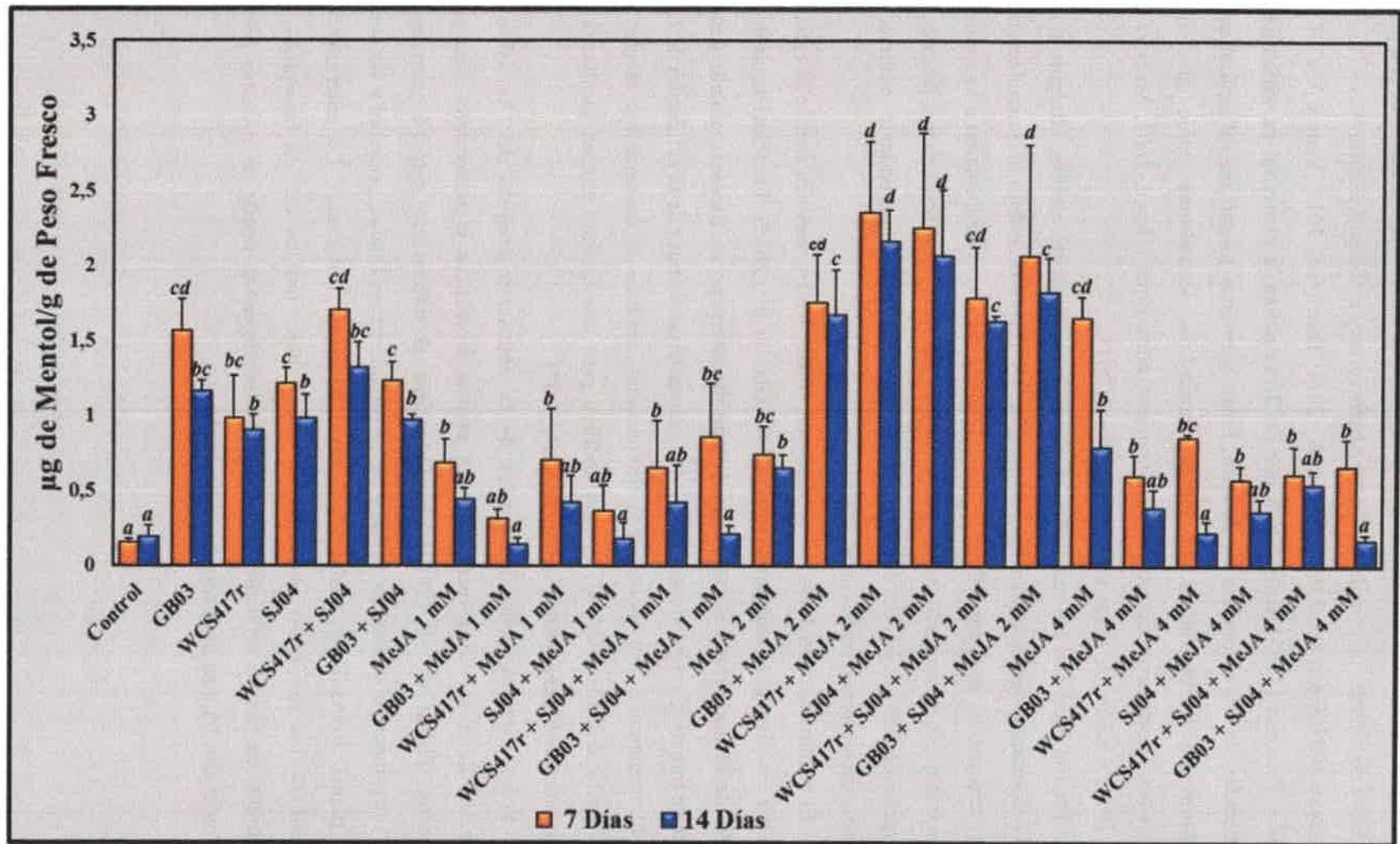


Fig. 4.2.3. Concentración del monoterpeno mentol en plantas de *M. piperita* inoculadas o co-inoculadas con cepas PGPR y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



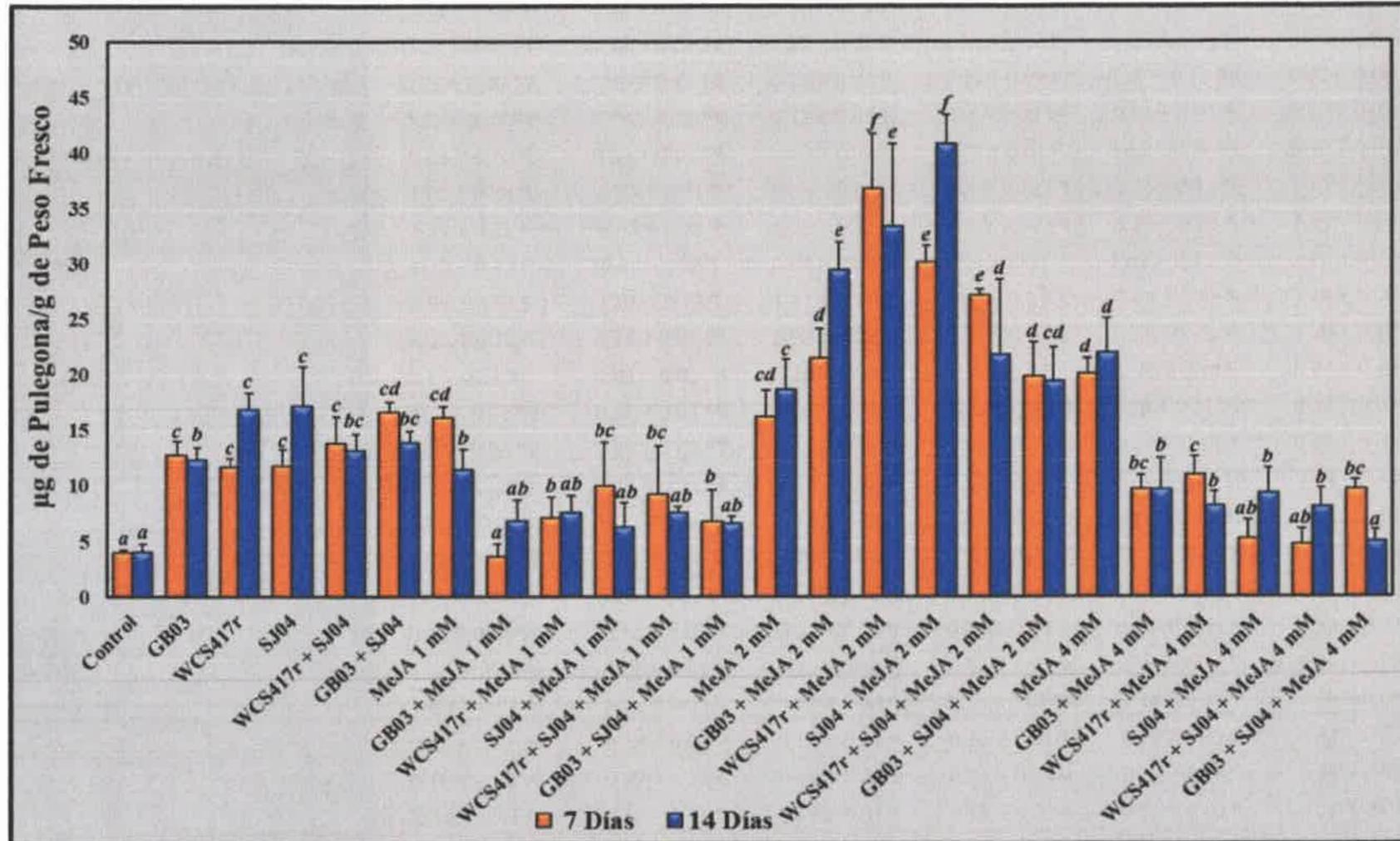


Fig. 4.2.4. Concentración de pulegona en plantas de *M. piperita* inoculadas o co-inoculadas con cepas PGPR y tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



Tabla 4.2.2. Concentración de los monoterpenos: limoneno, linalool y mentona en plantas de *M. piperita* inoculadas y/o tratadas con MeJA 1, 2 y 4 mM.

	Linalool		Limoneno		Mentona	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	0.14 ± 0.01 <i>a</i>	0.15 ± 0.01 <i>a</i>	0.15 ± 0.01 <i>a</i>	0.19 ± 0.05 <i>a</i>	0.17 ± 0.03 <i>a</i>	0.31 ± 0.03 <i>a</i>
GB03	0.56 ± 0.08 <i>bc</i>	0.35 ± 0.10 <i>c</i>	0.67 ± 0.10 <i>d</i>	0.24 ± 0.04 <i>b</i>	0.97 ± 0.08 <i>c</i>	0.34 ± 0.06 <i>a</i>
WCS417r	0.42 ± 0.01 <i>bc</i>	0.38 ± 0.05 <i>c</i>	0.15 ± 0.01 <i>a</i>	0.19 ± 0.01 <i>a</i>	0.56 ± 0.13 <i>b</i>	0.45 ± 0.05 <i>b</i>
SJ04	0.35 ± 0.01 <i>b</i>	0.37 ± 0.04 <i>c</i>	0.68 ± 0.09 <i>d</i>	0.35 ± 0.01 <i>bc</i>	1.34 ± 0.15 <i>c</i>	0.56 ± 0.09 <i>b</i>
WCS417r + SJ04	0.77 ± 0.14 <i>c</i>	0.31 ± 0.05 <i>b</i>	0.77 ± 0.09 <i>d</i>	0.27 ± 0.03 <i>b</i>	1.39 ± 0.16 <i>c</i>	0.74 ± 0.08 <i>c</i>
GB03 + SJ04	0.47 ± 0.08 <i>bc</i>	0.17 ± 0.03 <i>a</i>	0.77 ± 0.03 <i>d</i>	0.24 ± 0.01 <i>b</i>	1.16 ± 0.27 <i>c</i>	0.74 ± 0.03 <i>c</i>
MeJA 1 mM	0.61 ± 0.02 <i>c</i>	0.52 ± 0.05 <i>bc</i>	0.70 ± 0.03 <i>d</i>	0.23 ± 0.03 <i>b</i>	0.43 ± 0.08 <i>ab</i>	0.42 ± 0.06 <i>b</i>
GB03 + MeJA 1 mM	0.23 ± 0.04 <i>ab</i>	0.31 ± 0.06 <i>b</i>	0.40 ± 0.05 <i>c</i>	0.28 ± 0.03 <i>b</i>	0.18 ± 0.03 <i>a</i>	0.31 ± 0.07 <i>a</i>
WCS417r + MeJA 1 mM	0.35 ± 0.07 <i>b</i>	0.31 ± 0.06 <i>b</i>	0.37 ± 0.04 <i>c</i>	0.21 ± 0.06 <i>ab</i>	0.44 ± 0.13 <i>ab</i>	0.50 ± 0.15 <i>b</i>
SJ04 + MeJA 1 mM	0.32 ± 0.07 <i>b</i>	0.33 ± 0.04 <i>ab</i>	0.25 ± 0.03 <i>b</i>	0.27 ± 0.05 <i>b</i>	0.51 ± 0.13 <i>ab</i>	0.44 ± 0.10 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 1 mM	0.25 ± 0.07 <i>ab</i>	0.34 ± 0.03 <i>ab</i>	0.24 ± 0.06 <i>b</i>	0.25 ± 0.05 <i>b</i>	0.31 ± 0.12 <i>a</i>	0.39 ± 0.07 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 1 mM	0.23 ± 0.03 <i>ab</i>	0.15 ± 0.02 <i>ab</i>	0.18 ± 0.01 <i>a</i>	0.21 ± 0.06 <i>ab</i>	0.38 ± 0.11 <i>ab</i>	0.33 ± 0.03 <i>a</i>
MeJA 2 mM	1 ± 0.15 <i>d</i>	0.83 ± 0.07 <i>cd</i>	0.78 ± 0.03 <i>d</i>	0.48 ± 0.02 <i>c</i>	1.42 ± 0.14 <i>c</i>	0.59 ± 0.10 <i>b</i>
GB03 + MeJA 2 mM	0.79 ± 0.15 <i>c</i>	0.52 ± 0.01 <i>bc</i>	0.68 ± 0.09 <i>d</i>	0.93 ± 0.17 <i>d</i>	1.75 ± 0.17 <i>cd</i>	1.50 ± 0.19 <i>c</i>
WCS417r + MeJA 2 mM	0.84 ± 0.21 <i>c</i>	1.01 ± 0.15 <i>d</i>	1.11 ± 0.10 <i>e</i>	0.90 ± 0.14 <i>d</i>	2.54 ± 0.45 <i>e</i>	2.18 ± 0.26 <i>d</i>
SJ04 + MeJA 2 mM	1.12 ± 0.17 <i>e</i>	0.94 ± 0.06 <i>d</i>	0.64 ± 0.10 <i>d</i>	0.46 ± 0.03 <i>c</i>	1.95 ± 0.17 <i>cd</i>	1.80 ± 0.20 <i>c</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 2 mM	1.14 ± 0.25 <i>e</i>	0.92 ± 0.08 <i>d</i>	1.03 ± 0.11 <i>a</i>	0.63 ± 0.08 <i>cd</i>	2.30 ± 0.23 <i>d</i>	1.74 ± 0.13 <i>c</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 2 mM	1.03 ± 0.08 <i>d</i>	0.62 ± 0.04 <i>b</i>	0.99 ± 0.04 <i>e</i>	0.74 ± 0.15 <i>cd</i>	2.32 ± 0.14 <i>d</i>	2.12 ± 0.25 <i>d</i>
MeJA 4 mM	0.94 ± 0.10 <i>d</i>	0.77 ± 0.09 <i>cd</i>	0.40 ± 0.05 <i>c</i>	0.55 ± 0.01 <i>c</i>	0.97 ± 0.15 <i>bc</i>	0.40 ± 0.05 <i>b</i>
GB03 + MeJA 4 mM	0.21 ± 0.08 <i>ab</i>	0.48 ± 0.01 <i>ab</i>	0.22 ± 0.04 <i>b</i>	0.33 ± 0.02 <i>bc</i>	0.27 ± 0.07 <i>a</i>	0.40 ± 0.04 <i>b</i>
WCS417r + MeJA 4 mM	0.23 ± 0.02 <i>ab</i>	0.42 ± 0.15 <i>ab</i>	0.27 ± 0.09 <i>b</i>	0.42 ± 0.08 <i>c</i>	0.42 ± 0.12 <i>ab</i>	0.32 ± 0.08 <i>a</i>
SJ04 + MeJA 4 mM	0.20 ± 0.02 <i>ab</i>	0.38 ± 0.05 <i>ab</i>	0.23 ± 0.01 <i>b</i>	0.28 ± 0.06 <i>b</i>	0.20 ± 0.04 <i>a</i>	0.44 ± 0.08 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 4 mM	0.14 ± 0.03 <i>a</i>	0.42 ± 0.06 <i>ab</i>	0.25 ± 0.03 <i>b</i>	0.25 ± 0.05 <i>b</i>	0.22 ± 0.04 <i>a</i>	0.54 ± 0.04 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 4 mM	0.31 ± 0.04 <i>b</i>	0.27 ± 0.03 <i>ab</i>	0.26 ± 0.06 <i>b</i>	0.30 ± 0.04 <i>b</i>	0.21 ± 0.03 <i>a</i>	0.24 ± 0.03 <i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



4.2.2.1. Efecto del tratamiento con MeJA sobre la densidad de tricomas glandulares peltados y capitados en plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias.

El aumento en el contenido total de AE, registrado en plantas expuestas a MeJA, fue correlacionado con un incremento en la densidad de tricomas glandulares peltados, en ambas epidermis de la hoja. El número de mencionadas estructuras secretoras de AE, fue en general, significativamente mayor en plantas esprayadas con MeJA previamente tratadas con rizobacterias, que en aquellas expuestas a solo uno de los tratamientos. Por lo que podría considerarse que, la inoculación de rizobacterias y la aplicación exógena de MeJA, tienen un efecto sinérgico sobre la ontogenia de tricomas glandulares peltados en plantas de *M. piperita*. Los tricomas glandulares son considerados biofábricas que producen productos químicos de interés; el aumento de la densidad de estas estructuras es una forma adecuada de mejorar la producción de metabolitos secundarios (Yan *et al.*, 2016).

Si bien el aumento en la densidad de este tipo estructuras secretoras de AE, fue observado tanto a los 7 como a los 14 días posteriores a la aplicación de MeJA; el mayor incremento fue registrado a los 7 días, en ambas caras de la hoja. A este tiempo, en la superficie adaxial de hojas de plantas tratadas con MeJA 4 mM e inoculadas con rizobacterias, se observó la mayor densidad de estas estructuras; en las mismas el número de tricomas/mm² fue 2.5 veces superior que en plantas control ($p < 0.05$). La cara adaxial de hojas de plantas inoculadas y tratadas con MeJA 1 o 2 mM, en general, tuvieron la misma densidad (N^o/mm²) de estas estructuras (Fig. 4.2.5.). Sin embargo, a los 14 días, la superficie adaxial de hojas expuestas a MeJA 2 ó 4 mM, presentó un número de tricomas glandulares peltados, significativamente superior al de plantas tratadas con MeJA 1 mM o no tratadas con esta fitohormona ($p < 0.05$) (Fig. 4.2.5.).

En tanto en la cara abaxial, se observó a los 7 días posteriores a la aplicación, que plantas tratadas con MeJA 1 o 2 mM exhibieron el mismo número de tricomas glandulares peltados (Fig. 4.2.6.). Mientras que a los 14 días las plantas tratadas con la concentración 1 mM presentaron una densidad de tricomas glandulares peltados superior que las expuestas a MeJA 2 mM (Fig. 4.2.6.). En ambos tiempos, en la cara abaxial de la hoja de plantas inoculadas con rizobacterias y esprayadas con MeJA 4 mM, se observó el mayor número de esta clase de estructuras secretoras de AE.

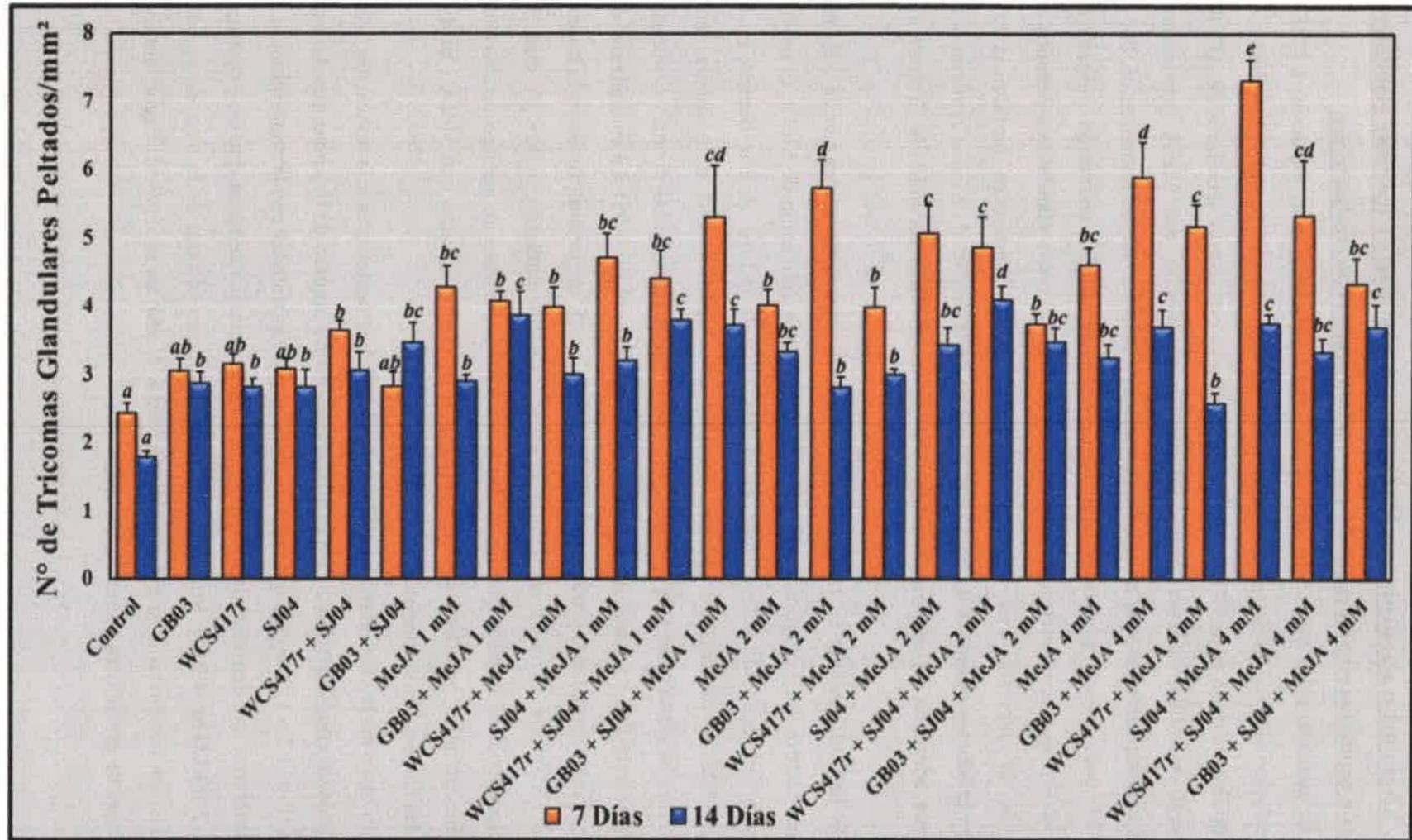


Fig. 4.2.5. Densidad (N°/mm²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara adaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 o 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



El número de tricomas glandulares capitados en las caras adaxial y abaxial de la hoja, tanto a los 7 como a los 14 días, solo fue modificado positivamente por el tratamiento con MeJA 4 mM ($p < 0.05$) (Tabla 4.2.3.). La aplicación exógena de MeJA, en las tres concentraciones testeadas, produjo en general, un incremento de la densidad de tricomas glandulares capitados, en la cara adaxial a los 7 días posteriores al tratamiento ($p < 0.05$).

En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, ha sido reportado que la aplicación exógena de MeJA 7.5 mM produjo un incremento en la densidad de tricomas glandulares sobre la cara adaxial de hojas nuevas de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Sin embargo, el número de tricomas sobre la cara adaxial de las hojas de esta planta fue mayor a los 14 que a los 7 días posteriores al tratamiento (Boughton *et al.*, 2005). Traw y Bergelson (2003) reportaron que el tratamiento con JA condujo a un significativo incremento de la densidad de tricomas en plantas de *Arabidopsis* y no encontraron diferencias del efecto de las concentraciones 0.1 y 1 mM, de mencionada fitohormona, sobre la densidad de estas estructuras. La participación del JA y sus derivados en la regulación de la formación de estructuras secretoras de AE, se hace más evidente al considerar que plantas mutantes de tomate que presentan defectos en la expresión de los componentes de la biosíntesis de JAs, presentaron un número de tricomas significativamente reducido (Li *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2014;).

Pocos estudios sobre los efectos de la aplicación exógena de JAs sobre la ontogenia de estructuras secretoras de AE, en plantas aromáticas y medicinales han sido reportados. Maes y col., (2011) observaron, en similitud con los resultados obtenidos en este estudio, que el tratamiento de *Artemisia annua* con JA promovió la formación de tricomas glandulares y activó la expresión de determinados genes que condujeron a un incremento en la acumulación de sesquiterpenos como artemisinina.

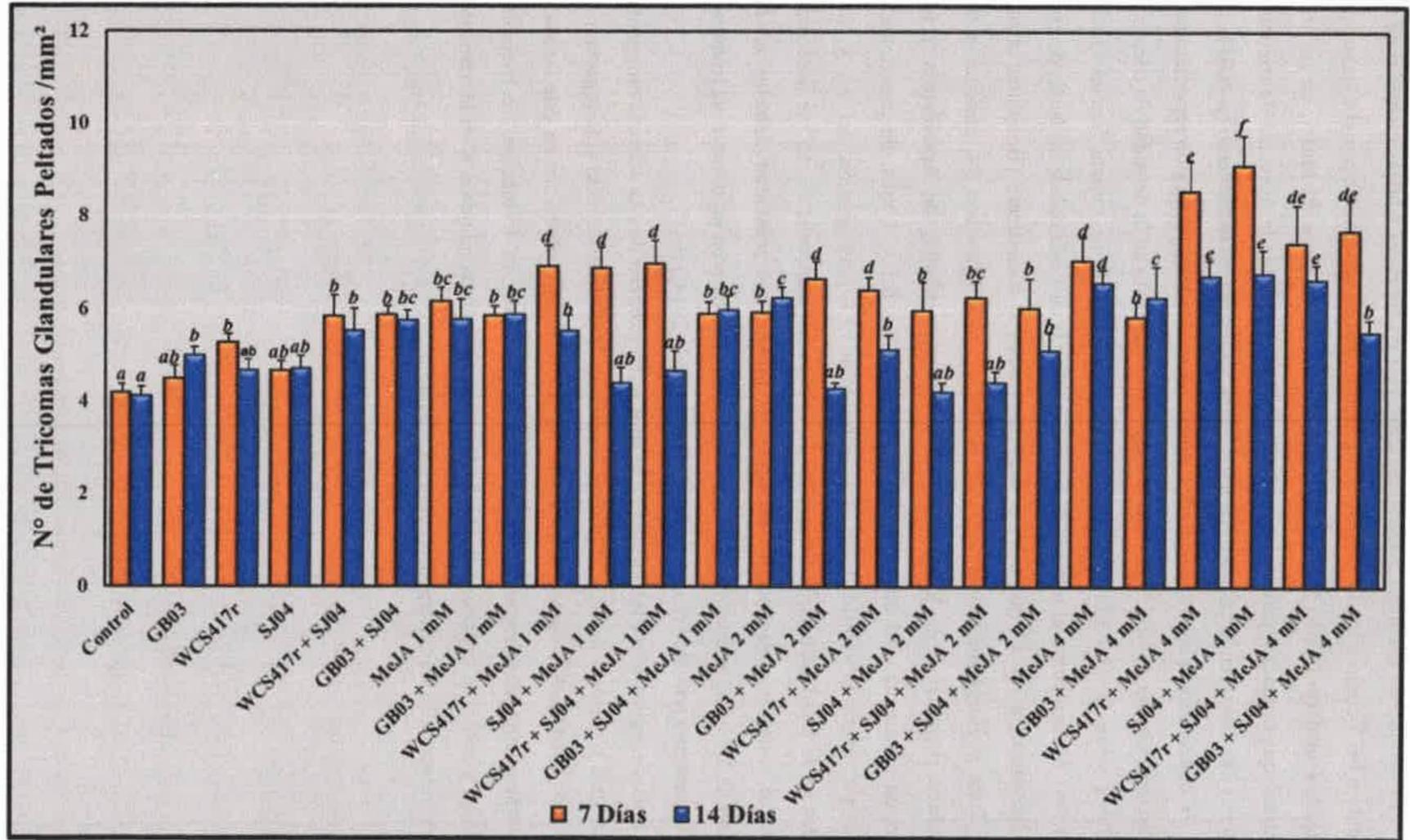


Fig. 4.2.6. Densidad (N°/mm²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara abaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 ó 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Fig. 4.2.3. Densidad (Nº/mm²) de tricomas glandulares capitados sobre las caras adaxial y abaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 o 4 mM.

	Cara Adaxial		Cara Abaxial	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	2.31 ± 0.24 <i>b</i>	2.19 ± 0.28 <i>b</i>	7.23 ± 0.40 <i>bc</i>	5.98 ± 0.43 <i>b</i>
GB03	2.10 ± 0.31 <i>ab</i>	1.09 ± 0.27 <i>a</i>	6.70 ± 0.5 <i>b</i>	4.75 ± 0.49 <i>ab</i>
WCS417r	1.54 ± 0.28 <i>a</i>	0.91 ± 0.20 <i>a</i>	6.42 ± 0.25 <i>b</i>	6.86 ± 0.66 <i>bc</i>
SJ04	1.97 ± 0.26 <i>ab</i>	1.31 ± 1.07 <i>ab</i>	6.30 ± 0.54 <i>b</i>	7.04 ± 0.76 <i>c</i>
WCS417r + SJ04	2.70 ± 0.45 <i>b</i>	2.22 ± 0.74 <i>ab</i>	10.86 ± 0.68 <i>d</i>	6.33 ± 0.66 <i>bc</i>
GB03 + SJ04	1.20 ± 0.22 <i>a</i>	2.14 ± 0.32 <i>b</i>	8.69 ± 0.71 <i>c</i>	7.46 ± 1.19 <i>c</i>
MeJA 1 mM	3.21 ± 0.55 <i>c</i>	0.68 ± 0.22 <i>a</i>	6.97 ± 0.67 <i>b</i>	5.38 ± 0.50 <i>b</i>
GB03 + MeJA 1 mM	3.20 ± 0.58 <i>c</i>	0.83 ± 0.21 <i>a</i>	9.48 ± 0.91 <i>cd</i>	6.01 ± 0.67 <i>b</i>
WCS417r + MeJA 1 mM	2.50 ± 0.42 <i>b</i>	0.95 ± 0.26 <i>a</i>	6.94 ± 0.33 <i>b</i>	4.39 ± 0.66 <i>ab</i>
SJ04 + MeJA 1 mM	2.31 ± 0.38 <i>b</i>	1.89 ± 0.36 <i>ab</i>	7.03 ± 0.43 <i>b</i>	4 ± 0.61 <i>a</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 1 mM	1.61 ± 0.32 <i>ab</i>	1.48 ± 0.33 <i>ab</i>	8.46 ± 0.72 <i>c</i>	6.61 ± 0.58 <i>bc</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 1 mM	1.92 ± 0.33 <i>ab</i>	2.43 ± 0.41 <i>b</i>	7.32 ± 0.50 <i>bc</i>	6.41 ± 0.79 <i>bc</i>
MeJA 2 mM	3.25 ± 0.64 <i>c</i>	1.62 ± 0.27 <i>ab</i>	9.87 ± 0.56 <i>d</i>	7.14 ± 0.77 <i>c</i>
GB03 + MeJA 2 mM	2.45 ± 0.51 <i>b</i>	0.97 ± 0.26 <i>a</i>	9.59 ± 0.98 <i>cd</i>	5.78 ± 0.45 <i>b</i>
WCS417r + MeJA 2 mM	2.01 ± 0.36 <i>ab</i>	1.57 ± 0.21 <i>ab</i>	6.10 ± 0.58 <i>ab</i>	5.61 ± 0.47 <i>b</i>
SJ04 + MeJA 2 mM	2.08 ± 0.42 <i>ab</i>	1.35 ± 0.27 <i>ab</i>	5.16 ± 0.72 <i>a</i>	4.14 ± 0.52 <i>a</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 2 mM	1.29 ± 0.15 <i>a</i>	1.76 ± 0.47 <i>ab</i>	6.16 ± 0.58 <i>ab</i>	7.85 ± 0.49 <i>c</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 2 mM	3.14 ± 0.30 <i>c</i>	1.86 ± 0.29 <i>ab</i>	8.50 ± 0.50 <i>c</i>	9.26 ± 0.83 <i>cd</i>
MeJA 4 mM	4.40 ± 1.25 <i>d</i>	1.32 ± 0.42 <i>ab</i>	8.68 ± 1.01 <i>c</i>	7.87 ± 0.76 <i>c</i>
GB03 + MeJA 4 mM	4.63 ± 0.91 <i>d</i>	2.28 ± 0.33 <i>b</i>	10.05 ± 0.72 <i>d</i>	8.52 ± 1.25 <i>cd</i>
WCS417r + MeJA 4 mM	3.33 ± 0.39 <i>c</i>	2.70 ± 0.46 <i>c</i>	14.68 ± 2.15 <i>e</i>	14.68 ± 2.15 <i>e</i>
SJ04 + MeJA 4 mM	6.17 ± 1.63 <i>d</i>	3.91 ± 0.55 <i>d</i>	15.56 ± 1.95 <i>f</i>	10.33 ± 0.99 <i>d</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 4 mM	3 ± 0.55 <i>c</i>	2.46 ± 0.43 <i>b</i>	7.76 ± 1.20 <i>bc</i>	6.75 ± 0.86 <i>bc</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 4 mM	1.80 ± 0.40 <i>ab</i>	2.33 ± 0.48 <i>b</i>	11.95 ± 0.79 <i>d</i>	11.04 ± 0.94 <i>d</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

4.2.3. Efecto de la inoculación de cepas PGPR y la aplicación de exógena de MeJA sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de *M. piperita*.

En el presente trabajo, la concentración de compuestos fenólicos fue significativamente mayor en hojas de plantas tratadas con MeJA, previamente inoculadas con cepas PGPR. Los tratamientos por separado, también, produjeron un notable aumento de la biosíntesis de esta clase de metabolitos secundarios. En general, el contenido de compuestos fenólicos fue mayor a los 14 que a los 7 días posteriores a la aplicación de mencionada fitohormona.

La mayor concentración de fenoles totales, a los dos tiempos evaluados, fue observada en plantas inoculadas con rizobacterias y tratadas con MeJA 4 mM; siendo esta 3.5 veces superior que la registrada en plantas control ($p < 0.05$). A los 7 días posteriores al tratamiento, se observó que las concentraciones 1 y 2 mM, en general, tuvieron un efecto similar sobre la acumulación de compuestos fenólicos en hoja, siendo esta significativamente superior que la correspondiente a plantas control. Sin embargo, a los 14 días se observó una respuesta dosis dependiente.

Por lo expuesto anteriormente podría sugerirse que tanto la inoculación con rizobacterias como el tratamiento con MeJA incrementan la biosíntesis de compuestos fenólicos en la parte aérea *M. piperita*. Además, podría advertirse que la combinación de ambos tratamientos tiene un efecto sinérgico sobre la producción de esta clase de metabolitos secundarios. Lo que haría concluir que las rizobacterias son capaces de incrementar la producción de compuestos fenólicos a través de la activación de vías de traducción de señales que involucran la participación del JA y/o sus derivados. En relación, se conoce que estas fitohormonas pueden actuar como moléculas señal “dirigiendo” una gran variedad de respuestas de defensa, incluyendo la síntesis de nuevos compuestos fenólicos (Beckers y Spoel, 2006; Ruiz-García *et al.*, 2013).

En similitud con los resultados obtenidos en este estudio, Krzyzanowska y col., (2012) reportaron que la acumulación del compuesto fenólico ácido rosmarínico fue incrementada, en suspensiones celulares de *M. piperita*, tras el tratamiento con MeJA. Además, se conoce que el derivado metilado del JA es capaz de regular la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y 4-hidroxifenilpiruvato reductasa (HPR), enzimas cruciales de la ruta biosintética de los fenilpropanoides (Yamamura *et al.*, 2001; Matsuno *et al.*, 2002). En relación, en plantas de albaca, la actividad de la enzima PAL aumento significativamente después del tratamiento con MeJA (Koca y Karaman, 2014).

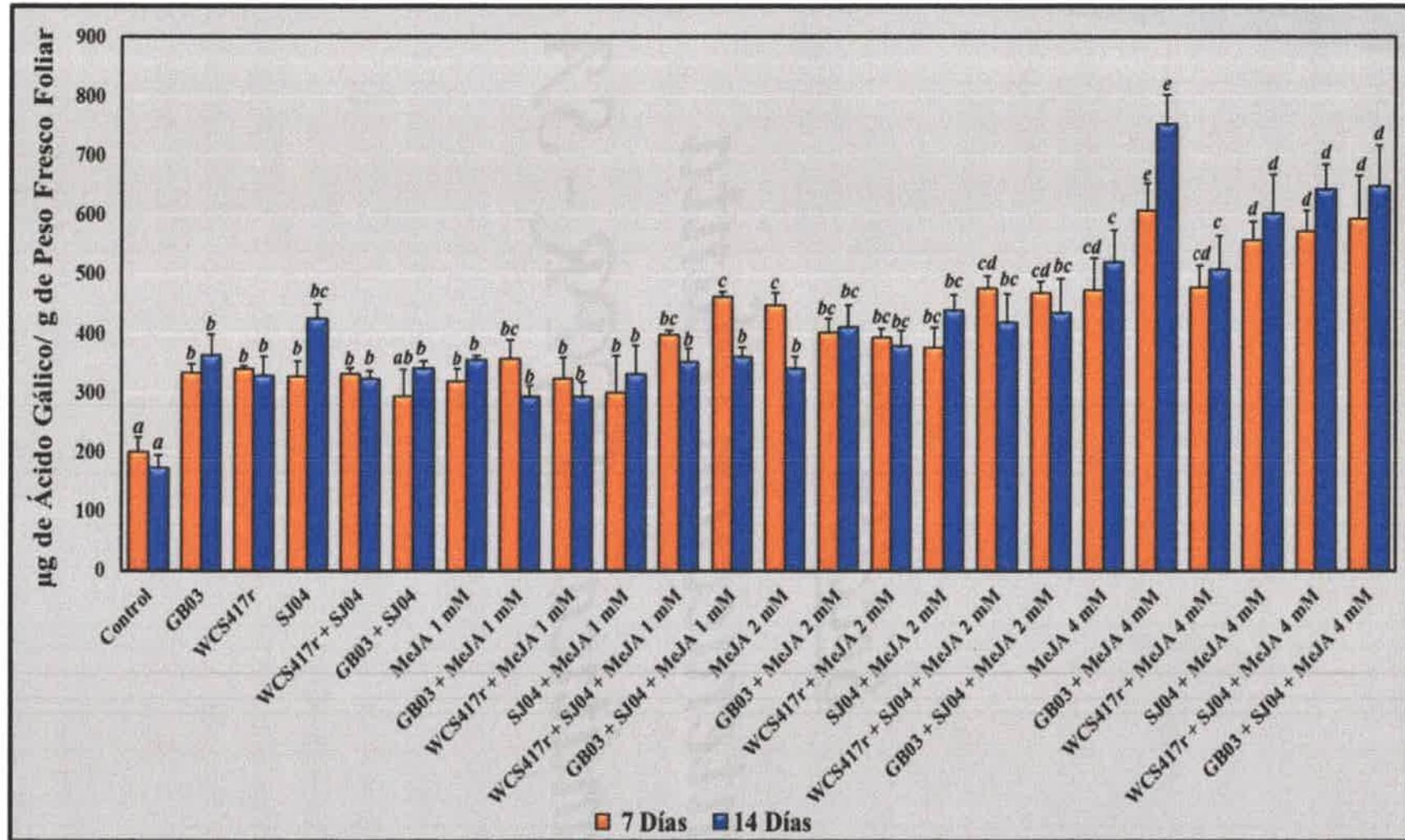


Fig. 4.2.7. Concentración de compuestos fenólicos en hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con MeJA 1, 2 o 4 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Sección III:

*Interacción Planta
Aromática - PGPR - SA*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. SECCIÓN III: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-SA

4.3.1. Efectos de la inoculación con rizobacterias y la aplicación exógena de SA sobre el crecimiento de plantas de *M. piperita*

La aplicación exógena de SA, no afectó negativamente el crecimiento de plantas de *M. piperita*, en comparación al tratamiento con MeJA (Fig. 4.3.1., Tabla 4.3.1.). En relación, plantas no inoculadas tratadas con SA 1 o 2 mM presentaron un peso fresco superior que plantas control ($p < 0.05$), tanto a los 7 como a los 14 días posteriores al tratamiento. La aplicación de mencionada fitohormona no influyó sobre los mecanismos desencadenados por las PGPR, que conducen a un mayor desarrollo vegetal, a los dos tiempos evaluados. Sin embargo, plantas inoculadas con rizobacterias y tratadas con SA no tuvieron un mayor desarrollo que las que solo fueron tratadas con cepas PGPR ($p > 0.05$).

Varios estudios reportaron que el SA o su derivado metilado, MeSA, afectan positivamente el desarrollo vegetal. En relación, Gutiérrez-Coronado y col. (1998) reportaron que el tratamiento con SA estimuló el desarrollo de plantas de soja (*Glicine max*), a los 7 días posteriores al tratamiento. Sandoval-Yepiz (2004) observó el mismo efecto de la aplicación de esta fitohormona en la planta aromática y medicinal *Tagetes erecta*. En plantas de arroz (*Oryza sativa*) se registró un significativo incremento en el peso del tallo y de la raíz, después del previo tratamiento de las semillas, con MeSA (Kalaivani *et al.*, 2016).

El incremento registrado en los diferentes parámetros de crecimiento evaluados después del tratamiento con SA pueden atribuirse a cambios en el estado hormonal de la planta (Shakirova *et al.*, 2003; Abreu y Munne-Bosch, 2009) o a una mejora en diversos procesos fisiológicos como fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y toma de nutrientes (Stevens *et al.*, 2006; Vazirimehr *et al.*, 2014). En relación, Faried y col. (2016) reportaron que el tratamiento con SA 0.5 mM aumentó el contenido de clorofila y la actividad fotosintética en plantas de maíz, lo cual se refleja en un mayor desarrollo vegetal. Además, ha sido reportado que, el SA inhibe la biosíntesis de etileno y aumenta la actividad del sistema antioxidante vegetal, modificando la actividad de enzimas antioxidantes preexistentes o alterando la expresión de sus genes (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014).

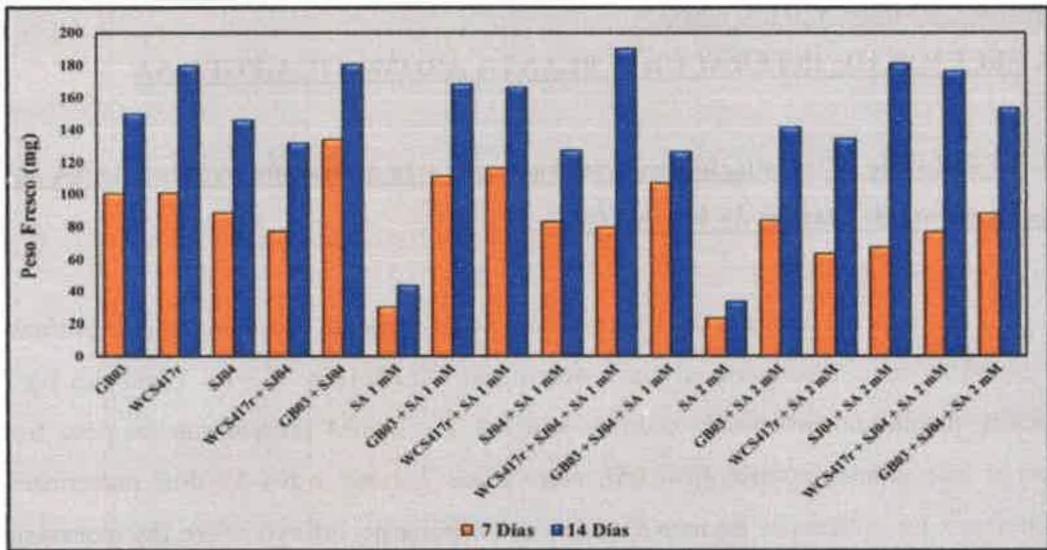


Fig. 4.3.1. Diferencia del peso fresco del tallo de plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con SA con el correspondiente a plantas control.

Tabla 4.3.2. Longitud del tallo (cm), N° de hojas y ramificaciones en plantas de *M. piperita* tratadas con cepas PGPR y/o SA.

Tratamiento	N° de Hojas		Longitud del Tallo (cm)		N° de Ramificaciones	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	22.75 ± 0.48 <i>a</i>	25.25 ± 1.70 <i>a</i>	5.38 ± 0.25 <i>a</i>	7.94 ± 0.34 <i>a</i>	3.60 ± 0.75 <i>a</i>	3.00 ± 1.05 <i>a</i>
GB03	23.17 ± 3.58 <i>a</i>	36.00 ± 2.00 <i>b</i>	7.40 ± 0.32 <i>b</i>	8.90 ± 0.17 <i>ab</i>	4.00 ± 0.86 <i>ab</i>	3.07 ± 0.67 <i>a</i>
WCS417r	24.50 ± 1.95 <i>ab</i>	39.00 ± 1.73 <i>b</i>	5.92 ± 0.24 <i>ab</i>	12.33 ± 0.55 <i>b</i>	4.33 ± 0.61 <i>ab</i>	4.00 ± 1.53 <i>b</i>
SJ04	21.00 ± 2.49 <i>a</i>	42.50 ± 1.44 <i>c</i>	6.52 ± 0.35 <i>ab</i>	9.25 ± 1.30 <i>ab</i>	3.60 ± 0.75 <i>a</i>	5.00 ± 0.58 <i>c</i>
WCS417r + SJ04	23.00 ± 1.75 <i>a</i>	29.33 ± 2.91 <i>ab</i>	7.10 ± 0.62 <i>b</i>	11.23 ± 1.11 <i>ab</i>	3.86 ± 0.63 <i>a</i>	3.33 ± 1.45 <i>ab</i>
GB03 + SJ04	28.00 ± 0.93 <i>b</i>	37.67 ± 2.19 <i>b</i>	6.88 ± 0.49 <i>ab</i>	10.93 ± 0.63 <i>ab</i>	4.83 ± 0.48 <i>b</i>	3.67 ± 1.76 <i>ab</i>
SA 1 mM	20.50 ± 0.87 <i>a</i>	25.25 ± 1.71 <i>a</i>	7.52 ± 0.70 <i>b</i>	10.06 ± 0.68 <i>ab</i>	3.20 ± 0.49 <i>a</i>	2.60 ± 0.40 <i>a</i>
GB03 + SA 1 mM	24.17 ± 0.65 <i>ab</i>	25.50 ± 1.71 <i>a</i>	7.92 ± 0.64 <i>b</i>	11.33 ± 0.82 <i>ab</i>	4.83 ± 0.31 <i>b</i>	3.00 ± 0.25 <i>a</i>
WCS417r + SA 1 mM	27.00 ± 2.07 <i>b</i>	23.00 ± 2.28 <i>a</i>	7.66 ± 0.49 <i>b</i>	10.27 ± 1.76 <i>ab</i>	4.60 ± 0.75 <i>b</i>	2.60 ± 0.50 <i>a</i>
SJ04 + SA 1 mM	27.00 ± 1.67 <i>b</i>	27.33 ± 2.40 <i>a</i>	8.35 ± 0.53 <i>b</i>	9.78 ± 0.80 <i>ab</i>	4.20 ± 0.58 <i>b</i>	4.40 ± 1.08 <i>bc</i>
WCS417r + SJ04 + SA 1 mM	20.33 ± 4.98 <i>a</i>	23.00 ± 2.28 <i>a</i>	6.73 ± 0.88 <i>ab</i>	12.68 ± 0.54 <i>b</i>	3.33 ± 1.45 <i>a</i>	4.17 ± 1.05 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + SA 1 mM	19.83 ± 3.20 <i>a</i>	24.33 ± 2.33 <i>a</i>	6.66 ± 0.80 <i>ab</i>	13.25 ± 1.01 <i>b</i>	4.33 ± 0.99 <i>b</i>	4.50 ± 1.32 <i>bc</i>
SA 2 mM	20.75 ± 1.11 <i>a</i>	25.25 ± 1.70 <i>a</i>	7.15 ± 0.75 <i>b</i>	10.18 ± 1.06 <i>ab</i>	4.00 ± 0.58 <i>b</i>	2.50 ± 0.87 <i>a</i>
GB03 + SA 2 mM	23.75 ± 1.18 <i>a</i>	25.25 ± 1.89 <i>a</i>	7.28 ± 0.54 <i>b</i>	11.90 ± 1.20 <i>b</i>	4.00 ± 0.58 <i>b</i>	2.50 ± 0.29 <i>a</i>
WCS417r + SA 2 mM	23.33 ± 1.89 <i>a</i>	25.00 ± 0.58 <i>a</i>	7.80 ± 0.58 <i>b</i>	9.94 ± 0.76 <i>ab</i>	3.00 ± 0.58 <i>a</i>	2.80 ± 0.49 <i>a</i>
SJ04 + SA 2 mM	23 ± 1.91 <i>a</i>	24.75 ± 1.89 <i>a</i>	5.78 ± 0.37 <i>a</i>	11.43 ± 0.89 <i>ab</i>	4.25 ± 0.75 <i>b</i>	3.75 ± 0.75 <i>ab</i>
WCS417r + SJ04 + SA 2 mM	22.75 ± 2.81 <i>a</i>	28.00 ± 0.82 <i>ab</i>	7.08 ± 0.50 <i>b</i>	11.02 ± 0.29 <i>ab</i>	4.20 ± 0.97 <i>b</i>	3.80 ± 0.86 <i>ab</i>
GB03 + SJ04 + SA 2 mM	22.25 ± 1.60 <i>a</i>	25.00 ± 2.77 <i>a</i>	7.46 ± 0.51 <i>b</i>	9.70 ± 0.72 <i>ab</i>	4.20 ± 0.80 <i>b</i>	2.25 ± 0.48 <i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).



4.3.2. Efecto de la aplicación exógena de SA sobre el contenido y la composición del AE de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias

El contenido total de AE fue mayor en plantas tratadas con SA que en plantas control, tanto a los 7 como a los 14 posteriores al tratamiento; sin embargo, el incremento registrado a los 7 días, no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) (Fig. 4.3.2.). A los 14 días, plantas no inoculadas tratadas con SA 1 o 2 mM tuvieron una concentración de monoterpenos dos veces mayor que plantas control ($p < 0.05$). La aplicación exógena de SA no modificó, en general, el contenido de AE en plantas inoculadas con rizobacterias, a los dos tiempos evaluados. Por lo que se descarta un posible sinergismo entre las rizobacterias y el SA sobre la inducción de la biosíntesis de AE.

El SA y el MeJA no tuvieron el mismo efecto sobre la biosíntesis de terpenoides en *M. piperita*; la respuesta generada después del tratamiento con SA fue significativamente menor que la producida por el derivado metilado del JA, aplicado a las mismas concentraciones. La aplicación exógena de SA, al igual que la de MeJA, no produjo una alteración cualitativa de los compuestos constituyentes del aceite.

El SA juega un rol clave en las respuestas de defensa frente a patógenos biotróficos y hemibiotróficos (Hara *et al.*, 2012; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016) y modula la actividad de determinadas enzimas que catalizan reacciones en las rutas biosintéticas de ciertas clases de metabolitos secundarios (Dong *et al.*, 2010). La aplicación exógena de SA sobre la superficie de la una planta es capaz de inducir una respuesta de defensa similar a la desencadenada en la SAR (Wang *et al.*, 2005). A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo mediado por SA en relación a la defensa en plantas, el rol central de esta fitohormona en la defensa vegetal, esta universalmente aceptado (Anand *et al.*, 2008).

SAR se caracteriza por ser de amplio espectro, es decir, que confiere resistencia no sólo al patógeno que la ha activado, sino también a otros organismos fitopatógenos. Se ha comprobado que la SAR es una resistencia duradera (activa durante días o semanas) en condiciones tanto naturales como de laboratorio, lo que la hace muy atractiva desde un punto de vista agronómico. La activación de SAR está acompañada de un incremento endógeno, local y sistémico, de SA. Esta acumulación de SA activa una serie de proteínas reguladoras y factores transcripciones que controlan la expresión de genes de defensa que codifican, por ejemplo, para proteínas PR (An y Mou, 2011).

La inducción de SAR ocurre en dos etapas, en la primera la planta reconoce el patógeno e induce respuestas locales de defensa a través de cascadas de señalización que con



llevan a la acumulación intracelular de SA. Esta acumulación induce el aumento de los niveles de especies reactivas del O₂ (ROS) y la expresión de genes relacionados a la patogenicidad (RP). Esta respuesta local promueve la segunda etapa de SAR, la inducción de resistencia en el tejido sistémico alejado del punto de infección. Se cree que el SAME, algunas quinasas y NO, entre otros, pueden tener un papel relevante como señales inductoras de la resistencia sistémica. En la SAR hay una estrecha relación entre SA, JA, IAAs y ET (Gao *et al.*, 2014).

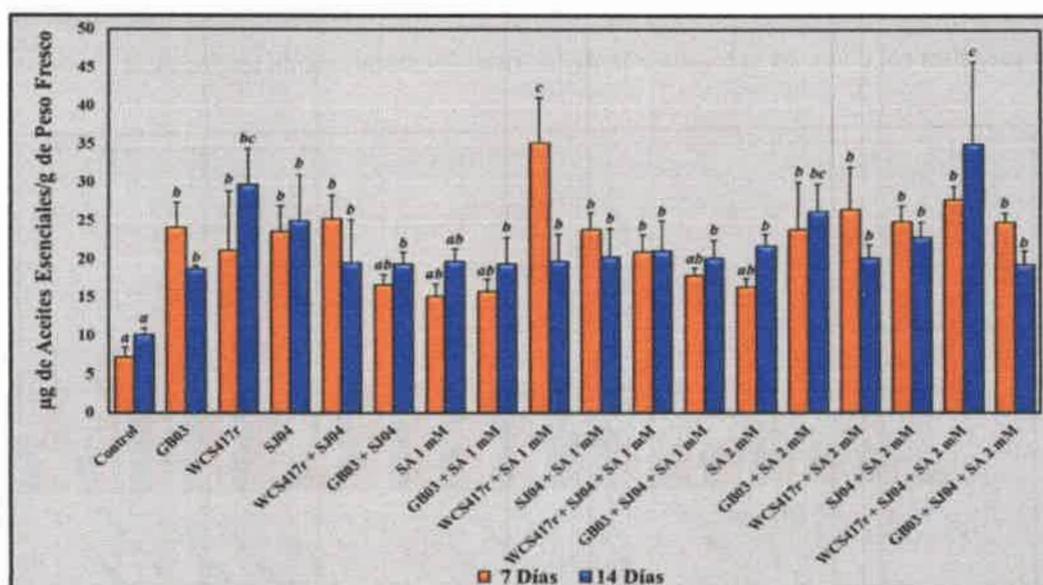


Fig. 4.3.2. Concentración de AE en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0,05$).

En relación a los resultados presentados en este estudio, el tratamiento de *Cistus Creticus* subsp. *creticus* con SA 5 mM aumento la expresión de dos genes, *CsDxs2* y *CsHMGR*, que codifican para enzimas que catalizan las primeras reacciones de las vías del metil-eritritol- fosfato y del mevalonato, respectivamente. Ambas vías están involucradas en la biosíntesis de mono, di y sesquiterpenos. El tratamiento con MeJA 100 µM también incrementó la transcripción del gen *CsDxs2*. Por lo que podría sugerirse que tanto el MeJA como el SA son capaces de inducir la expresión de genes que codifican para enzimas de las dos rutas biosintéticas de terpenoides (Pateraki y Kanellis, 2010). Zhang y col. (2013) reportaron que el tratamiento de soja (*Glicine max*) con SA 1 mM, indujo la transcripción de un gen, recientemente identificado, que codifica para una monoterpene sintasa.

Es limitado el número de estudios sobre los efectos de la aplicación foliar de SA sobre la acumulación de terpenoides en plantas aromáticas y medicinales. Zheljzakov y Astatkieb (2010), reportaron que el tratamiento de *M. spicata* con SA causó un incremento



en el contenido de los monoterpenos 1,8-cineol y β -caryophyllene. El SA, también incrementó rendimiento de AE y la concentración de los monoterpenos α -thujene, carvacrol y α -pineno pero disminuyó el contenido de timol y β -caryophyllene, en plantas de tomillo (*Thymus daenensis*) (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2014). El aumento en el contenido de AE en plantas tratadas con SA puede atribuirse a una mejora en la absorción de nutrientes, a un aumento en la densidad de estructuras secretoras (Idrees *et al.*, 2010).

Si bien el efecto producido por el SA, sobre la biosíntesis de terpenoides en la planta en estudio, es menor que la provocada por el MeJA, existen evidencias que de que el SA juega un rol clave en la regulación de las rutas biosintéticas de terpenoides.

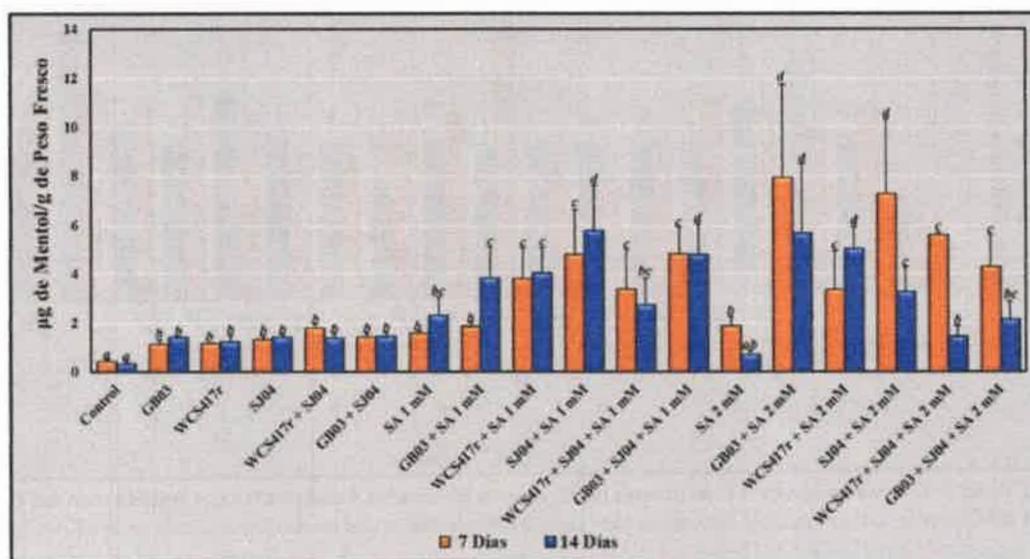


Fig. 4.3.3. Concentración de mentol en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0,05$).

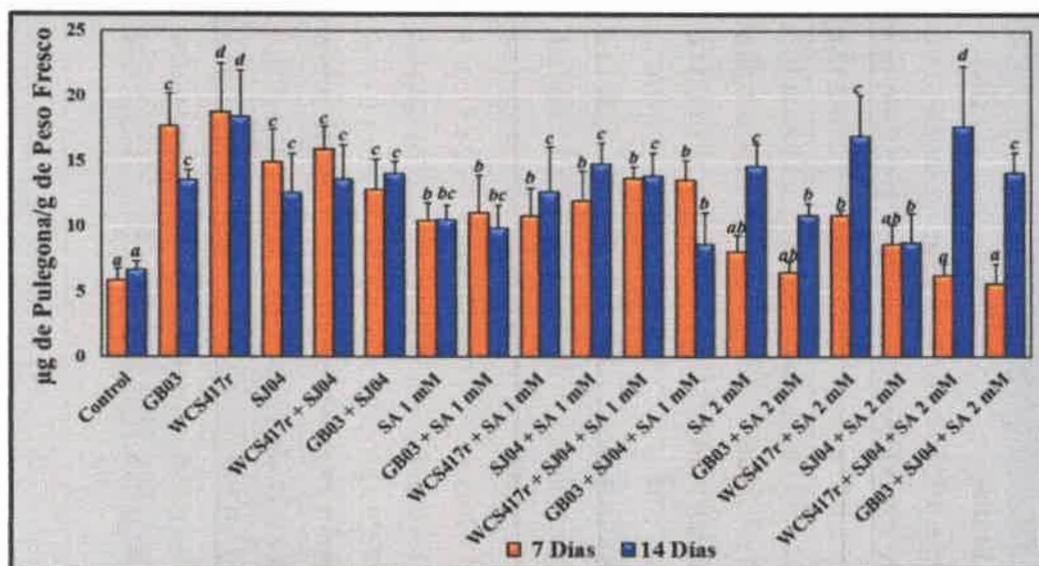


Fig. 4.3.4. Concentración de pulegona en plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas y tratadas con SA 1 o 2 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0,05$).

Tabla 4.3.2. Concentración de los monoterpenos: limoneno, linalool y mentona en plantas de *M. piperita* inoculadas y/o tratadas con SA 1 y 2 mM.

Tratamiento	Limoneno		Linalool		Mentona	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	0.47 ± 0.13 <i>a</i>	0.71 ± 0.09 <i>a</i>	0.05 ± 0.01 <i>a</i>	0.15 ± 0.05 <i>a</i>	0.69 ± 0.10 <i>a</i>	0.61 ± 0.09 <i>a</i>
GB03	0.74 ± 0.12 <i>ab</i>	1.12 ± 0.04 <i>b</i>	0.13 ± 0.01 <i>b</i>	0.20 ± 0.05 <i>b</i>	1.26 ± 0.08 <i>b</i>	1.38 ± 0.16 <i>b</i>
WCS417r	0.62 ± 0.11 <i>ab</i>	1.35 ± 0.10 <i>b</i>	0.17 ± 0.03 <i>b</i>	0.29 ± 0.07 <i>c</i>	1.73 ± 0.26 <i>c</i>	1.65 ± 0.13 <i>b</i>
SJ04	0.72 ± 0.07 <i>ab</i>	1.74 ± 0.05 <i>c</i>	0.15 ± 0.02 <i>b</i>	0.22 ± 0.07 <i>b</i>	1.46 ± 0.16 <i>b</i>	1.67 ± 0.10 <i>b</i>
WCS417r + SJ04	1.16 ± 0.06 <i>b</i>	1.61 ± 0.17 <i>b</i>	0.14 ± 0.02 <i>b</i>	0.17 ± 0.08 <i>ab</i>	1.66 ± 0.29 <i>c</i>	1.42 ± 0.09 <i>b</i>
GB03 + SJ04	1.17 ± 0.22 <i>b</i>	1.52 ± 0.22 <i>bc</i>	0.16 ± 0.02 <i>b</i>	0.15 ± 0.01 <i>ab</i>	1.79 ± 0.06 <i>c</i>	1.75 ± 0.14 <i>b</i>
SA 1 mM	1.09 ± 0.18 <i>b</i>	0.82 ± 0.10 <i>a</i>	0.05 ± 0.01 <i>a</i>	0.18 ± 0.04 <i>ab</i>	1.35 ± 0.09 <i>b</i>	1.00 ± 0.04 <i>ab</i>
GB03 + SA 1 mM	1.38 ± 0.08 <i>c</i>	1.44 ± 0.10 <i>b</i>	0.21 ± 0.01 <i>c</i>	0.18 ± 0.03 <i>ab</i>	1.34 ± 0.07 <i>b</i>	1.47 ± 0.14 <i>b</i>
WCS417r + SA 1 mM	0.66 ± 0.17 <i>a</i>	1.20 ± 0.12 <i>b</i>	0.19 ± 0.02 <i>b</i>	0.26 ± 0.06 <i>b</i>	0.44 ± 0.13 <i>ab</i>	1.52 ± 0.10 <i>b</i>
SJ04 + SA 1 mM	0.99 ± 0.18 <i>b</i>	1.21 ± 0.17 <i>b</i>	0.12 ± 0.01 <i>b</i>	0.27 ± 0.05 <i>b</i>	1.71 ± 0.35 <i>c</i>	1.33 ± 0.14 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + SA 1 mM	0.59 ± 0.17 <i>a</i>	1.34 ± 0.00 <i>b</i>	0.17 ± 0.01 <i>b</i>	0.15 ± 0.05 <i>ab</i>	1.06 ± 0.16 <i>b</i>	1.24 ± 0.05 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + SA 1 mM	1.38 ± 0.14 <i>c</i>	1.51 ± 0.11 <i>bc</i>	0.12 ± 0.01 <i>b</i>	0.21 ± 0.06 <i>b</i>	1.55 ± 0.15 <i>b</i>	1.55 ± 0.19 <i>b</i>
SA 2 mM	1.01 ± 0.20 <i>b</i>	1.13 ± 0.10 <i>b</i>	0.10 ± 0.01 <i>b</i>	0.28 ± 0.02 <i>b</i>	1.40 ± 0.09 <i>b</i>	1.10 ± 0.03 <i>ab</i>
GB03 + SA 2 mM	1.14 ± 0.03 <i>b</i>	1.59 ± 0.21 <i>bc</i>	0.18 ± 0.09 <i>b</i>	0.33 ± 0.17 <i>d</i>	1.50 ± 0.22 <i>b</i>	1.37 ± 0.16 <i>b</i>
WCS417r + SA 2 mM	1.06 ± 0.17 <i>b</i>	1.57 ± 0.13 <i>bc</i>	0.15 ± 0.02 <i>b</i>	0.20 ± 0.14 <i>ab</i>	1.31 ± 0.45 <i>b</i>	1.57 ± 0.11 <i>b</i>
SJ04 + SA 2 mM	1.18 ± 0.08 <i>b</i>	1.07 ± 0.16 <i>b</i>	0.14 ± 0.10 <i>b</i>	0.26 ± 0.09 <i>c</i>	1.53 ± 0.06 <i>b</i>	1.51 ± 0.07 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + SA 2 mM	1.08 ± 0.24 <i>b</i>	1.83 ± 0.13 <i>c</i>	0.18 ± 0.02 <i>b</i>	0.23 ± 0.08 <i>b</i>	1.48 ± 0.15 <i>b</i>	1.64 ± 0.10 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + SA 2 mM	1.14 ± 0.18 <i>b</i>	1.75 ± 0.11 <i>c</i>	0.16 ± 0.01 <i>b</i>	0.24 ± 0.15 <i>b</i>	1.56 ± 0.21 <i>b</i>	2.12 ± 0.25 <i>d</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

4.3.2.1. Efecto del tratamiento con SA sobre la densidad de tricomas glandulares peltados y capitados en plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias.

El número de tricomas glandulares peltados, fue significativamente mayor en hojas de plantas esprayadas con SA. Por lo que podría considerarse que mencionada fitohormona también se encuentra involucrada en la regulación de la formación de tricomas glandulares peltados en plantas de *M. piperita*.

Si bien el aumento en la densidad de este tipo estructuras secretoras de AE, fue observado tanto a los 7 como a los 14 días posteriores a la aplicación de SA; el mayor incremento fue registrado a los 7 días, en ambas caras de la hoja. A este tiempo, en la superficie adaxial de hojas de plantas tratadas con SA 2 mM e inoculadas con rizobacterias, se observó la mayor densidad de estas estructuras; en las mismas el número de tricomas/mm² fue 2.5 veces superior que en plantas control ($p < 0.05$).

Efectos del tratamiento con SA sobre la densidad de tricomas ha sido poco reportado. Sin embargo y en contraposición a los resultados reportados en este trabajo, plantas de *Arabidopsis* expuestas a SA exógeno presentaron un número de tricomas menor sobre la cara adaxial que plantas control (Traw y Bergelson, 2003).

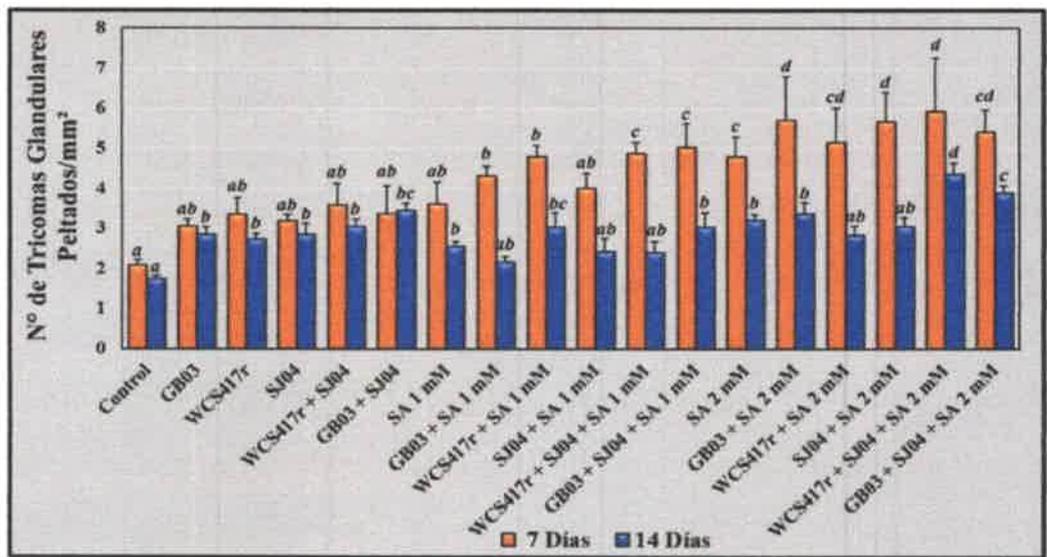


Fig. 4.3.5. Densidad (N°/mm²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara adaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con SA 1 o 2. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

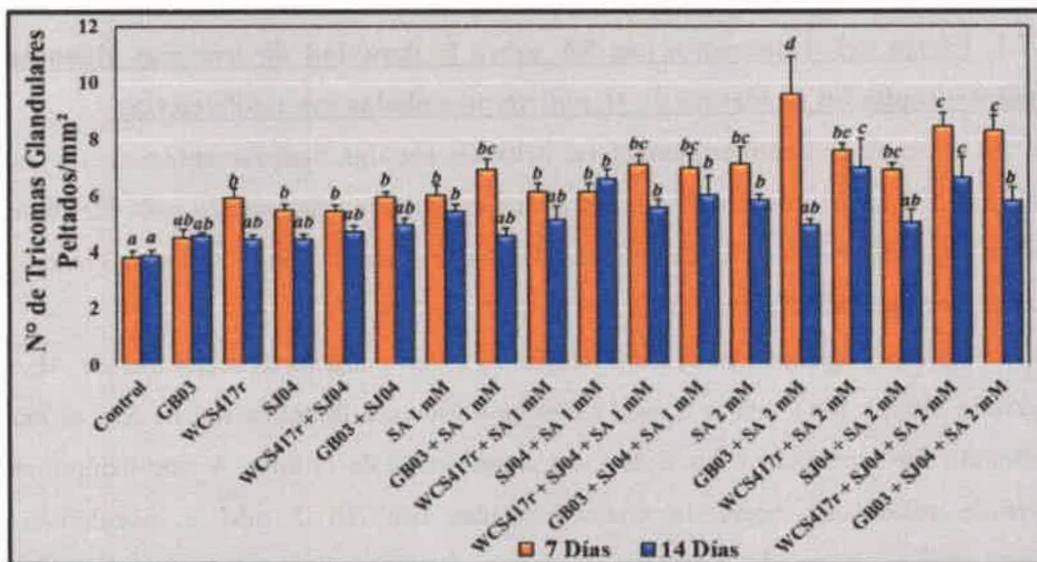


Fig. 4.3.6. Densidad (N°/mm²) de tricomas glandulares peltados sobre la cara abaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con SA 1 o 2 mM. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0.05$).

Tabla. 4.3.3. Densidad (N°/mm²) de tricomas glandulares capitados sobre las caras adaxial y abaxial de hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas con rizobacterias y/o tratadas con SA 1 o 2 mM.

Tratamiento	Cara Adaxial		Cara Abaxial	
	7 Días	14 Días	7 Días	14 Días
Control	2.51 ± 0.23 <i>a</i>	2.20 ± 0.26 <i>ab</i>	10.05 ± 0.66 <i>c</i>	3.87 ± 0.16 <i>a</i>
GB03	2.10 ± 0.31 <i>a</i>	2.86 ± 0.17 <i>ab</i>	6.70 ± 0.51 <i>b</i>	4.54 ± 0.13 <i>b</i>
WCS417r	1.55 ± 0.27 <i>a</i>	0.91 ± 0.20 <i>a</i>	8.74 ± 0.80 <i>bc</i>	4.42 ± 0.15 <i>b</i>
SJ04	2.08 ± 0.28 <i>a</i>	1.75 ± 0.41 <i>a</i>	5.71 ± 0.95 <i>b</i>	4.42 ± 0.17 <i>b</i>
WCS417r + SJ04	4.82 ± 0.72 <i>b</i>	2.22 ± 0.74 <i>ab</i>	8.95 ± 0.49 <i>bc</i>	4.69 ± 0.22 <i>b</i>
GB03 + SJ04	2.68 ± 0.54 <i>a</i>	2.19 ± 0.32 <i>ab</i>	6.65 ± 0.29 <i>b</i>	4.94 ± 0.23 <i>b</i>
SA 1 mM	3.54 ± 0.47 <i>ab</i>	2.14 ± 0.74 <i>ab</i>	6.38 ± 0.74 <i>b</i>	5.43 ± 0.27 <i>bc</i>
GB03 + SA 1 mM	2.45 ± 0.32 <i>a</i>	4.63 ± 0.80 <i>b</i>	5.58 ± 0.56 <i>b</i>	4.55 ± 0.27 <i>b</i>
WCS417r + SA 1 mM	2.22 ± 0.33 <i>a</i>	7.08 ± 0.79 <i>c</i>	0.89 ± 0.24 <i>a</i>	5.11 ± 0.51 <i>bc</i>
SJ04 + SA 1 mM	2.01 ± 0.55 <i>a</i>	4.38 ± 0.58 <i>b</i>	5.84 ± 0.56 <i>b</i>	6.58 ± 0.36 <i>c</i>
WCS417r + SJ04 + SA 1 mM	2.42 ± 0.76 <i>a</i>	5.19 ± 0.66 <i>b</i>	7.45 ± 1.34 <i>bc</i>	4.46 ± 0.31 <i>b</i>
GB03 + SJ04 + SA 1 mM	2.92 ± 0.48 <i>a</i>	5.30 ± 0.81 <i>b</i>	1.06 ± 0.39 <i>a</i>	6.03 ± 0.66 <i>c</i>
SA 2 mM	5.25 ± 0.88 <i>c</i>	6.82 ± 1.00 <i>bc</i>	12.09 ± 1.24 <i>c</i>	5.84 ± 0.21 <i>bc</i>
GB03 + SA 2 mM	6.10 ± 0.33 <i>d</i>	4.55 ± 0.82 <i>b</i>	4.38 ± 1.46 <i>b</i>	4.94 ± 0.20 <i>b</i>
WCS417r + SA 2 mM	5.52 ± 0.94 <i>c</i>	8.83 ± 0.67 <i>d</i>	7.72 ± 0.63 <i>b</i>	10.96 ± 1.07 <i>d</i>
SJ04 + MeJA 2 mM	0.91 ± 0.49 <i>a</i>	8.83 ± 0.67 <i>d</i>	2.31 ± 0.19 <i>a</i>	5.01 ± 0.52 <i>b</i>
WCS417r + SJ04 + MeJA 2 mM	2.51 ± 0.54 <i>b</i>	5.19 ± 0.65 <i>b</i>	2.99 ± 0.88 <i>a</i>	7.60 ± 0.77 <i>cd</i>
GB03 + SJ04 + MeJA 2 mM	2.14 ± 0.42 <i>a</i>	4.14 ± 0.66 <i>b</i>	11.57 ± 1.58 <i>c</i>	4.81 ± 0.49 <i>b</i>

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado (p<0.05).



4.3.3. Efecto de la inoculación de cepas PGPR y la aplicación de exógena de SA sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de *M. piperita*.

En el presente trabajo, la concentración de compuestos fenólicos fue, en general, significativamente mayor en hojas de plantas tratadas con SA, previamente inoculadas con cepas PGPR. Los tratamientos por separado, también, produjeron un notable aumento de la biosíntesis de esta clase de metabolitos secundarios. En general, el contenido de compuestos fenólicos fue mayor a los 14 que a los 7 días posteriores a la aplicación de mencionada fitohormona.

La mayor concentración de fenoles totales, a los dos tiempos evaluados, fue observada en plantas inoculadas con rizobacterias y tratadas con SA 2 mM; siendo esta dos veces superior que la registrada en plantas control ($p < 0.05$). Se observó que la concentración de compuestos fenólicos en hojas fue levemente superior en plantas solo tratadas con SA que en plantas inoculadas.

Por lo expuesto anteriormente podría sugerirse que tanto la inoculación con rizobacterias como el tratamiento con SA incrementan la biosíntesis de compuestos fenólicos en hojas de *M. piperita*. Además, podría advertirse que la combinación de ambos tratamientos tiene un efecto sinérgico sobre la producción de esta clase de metabolitos secundarios. Lo que haría concluir que las rizobacterias son capaces de incrementar la producción de compuestos fenólicos a través de la activación de vías de traducción de señales que involucran la participación del JA y SA.

En relación a los resultados obtenidos Gadzovska y col., (2012) reportaron que el tratamiento con SA incrementó el contenido de compuestos fenólicos y la actividad de las enzimas PAL y chalcona sintasa en cultivos celulares de *Hypericum perforatum*, una planta aromática. En plantas de maíz, tratadas con SA, también se observó, un significativo incremento en el contenido de compuestos fenólicos (Latif *et al.*, 2015).

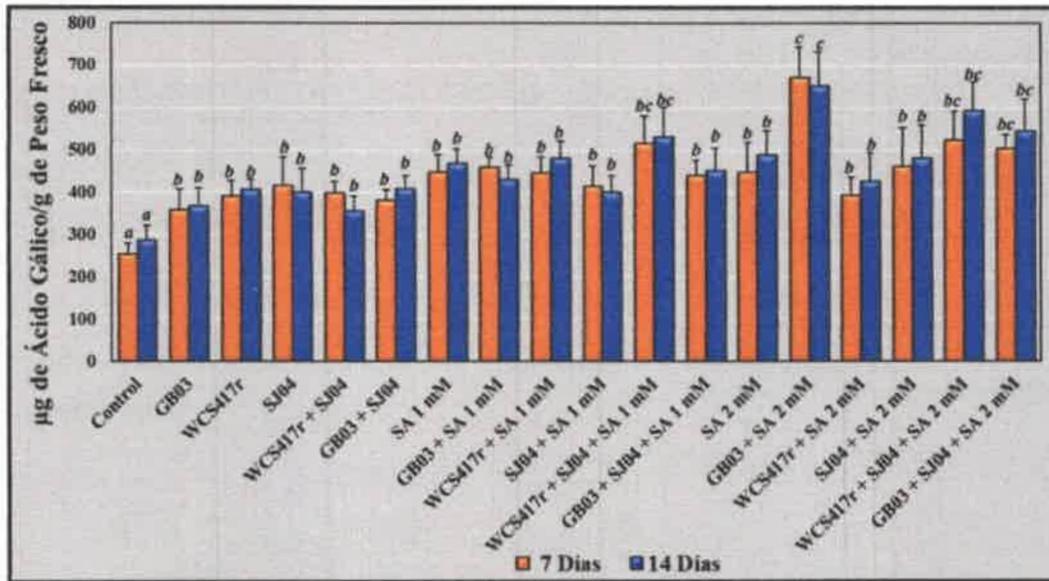


Fig. 4.3.7. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de plantas de *M. piperita* inoculadas y co-inoculadas con cepas PGPR y/o tratadas con SA. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al test estadístico utilizado ($p < 0,05$).

Capítulo V
Conclusiones





5. CONCLUSIONES

5.1. SECCIÓN I: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA - PGPR

La inoculación de las cepas PGPR *P. simiae* WCS417r, *P. putida* SJ04, *B. subtilis* GB03 o la co-inoculación de *B. subtilis* GB03 y *P. putida* SJ04 o de *P. simiae* WCS417r y *P. putida* SJ04 produce un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *M. piperita*.

En la planta estudiada, la magnitud de los incrementos en los diferentes parámetros de crecimiento, varía dependiendo la cepa inoculada o la combinación de rizobacterias co-inoculadas.

La inoculación conjunta de WCS417r y SJ04 o de GB03 y SJ04 no tuvo efectos sinérgicos sobre la promoción del desarrollo vegetal.

El tratamiento con rizobacterias produce un incremento de la concentración de clorofila total y de las clorofilas "a" y "b".

Las hojas de plantas inoculadas y co-inoculadas presentaron un número de estomas superior que las de plantas control.

La inoculación y co-inoculación de plantas de *M. piperita* con cepas PGPR produce un aumento en el contenido total de AE, en la concentración de los compuestos mayoritarios y en el número de estructuras secretoras de los mismos.

La co-inoculación de *P. simiae* WCS417r y *P. putida* SJ04 tuvo efectos sinérgicos sobre la biosíntesis de monoterpenos.

El efecto en la promoción del crecimiento y en el rendimiento total de AE por una determinada cepa o por los metabolitos emitidos por la misma, no presenta el mismo efecto o el mismo grado de respuesta en *M. piperita* y en otras plantas aromáticas, determinando que la respuesta es especie-específica.

La inoculación y co-inoculación de rizobacterias incrementó la emisión total de monoterpenos e indujo un aumento en la tasa de emisión de mentona, mentol y pulegona.

Las PGPR inoculadas modulan la actividad de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL), lo que en consecuencia, produce un aumento del contenido de fenoles totales en la parte aérea de la planta en estudio.

El incremento en el contenido total de AE, en la concentración y emisión de determinados monoterpenos y de fenoles totales, en adición al aumento de la actividad de la enzima PAL, reflejan la capacidad de estas bacterias de inducir mecanismos de defensa en plantas de *M. piperita*.

B. subtilis GB03 y *P. putida* SJ04 pueden co-existir en la rizósfera de plantas de *M. piperita*. El N° de UFC inoculadas de estas cepas se mantiene constante hasta los 30 días



posteriores a la inoculación. En contraste, *P. simiae* WCS417r aparentemente no logra adaptarse a los exudados radicales de esta especie aromática, por lo que el N° de UFC de esta cepa comienza a descender progresivamente desde el momento de la inoculación hasta los 30 días posteriores.

La inoculación de plantas aromáticas con rizobacterias es una alternativa biotecnológica interesante, ya que permite incrementar la producción de biomasa y de diversos metabolitos secundarios de importancia, sin efectos negativos para el medio ambiente.

	Biomasa	AE	Mentol	Tricomas	VOCs	Fenoles
Control						
GB03						
WCS417r						
SJ04						
WCS417r + SJ04						
SJ04 + GB03						

Tabla 5.1. Resumen de los efectos de las PGPR sobre diferentes parámetros en plantas de *M. piperita*.

5.2. SECCIÓN II: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-MeJA

El MeJA produce una inhibición del crecimiento vegetal y contrarresta los mecanismos de promoción del crecimiento desencadenados por la inoculación de cepas PGPR, en plantas de *M. piperita*.

La aplicación exógena de MeJA produce un aumento en el contenido de AE y en la concentración de los monoterpenos mayoritarios en plantas de *M. piperita*. Por lo que el derivado metilado del JA desencadena la activación de respuestas de defensa en la planta en estudio, que involucran la estimulación de la biosíntesis de terpenoides.

La aplicación exógena de MeJA produce un aumento en la densidad de tricomas glandulares peltados en plantas de *M. piperita*.

El MeJA también indujo la síntesis de compuestos fenólicos, otro importante grupo de metabolitos secundarios.

Los cambios registrados en la densidad de tricomas glandulares, contenido de compuestos fenólicos y monoterpenos en plantas inoculadas con rizobacterias y tratadas con MeJA, sugieren que las bacterias del suelo en combinación con el derivado metilado de JA, aplicado a determinadas concentraciones, producen un efecto sinérgico sobre la ontogenia de tricomas glandulares y la biosíntesis de metabolitos secundarios derivados de diferentes vías metabólicas.



Si bien la aplicación exógena de MeJA en combinación con la inoculación de rizobacterias incrementa significativamente la síntesis de productos del metabolismo secundario; el derivado metilado del JA inhibe el crecimiento vegetal. Por lo cual la inoculación de rizobacterias y el posterior tratamiento con MeJA, no resulta una estrategia biotecnológica interesante.

	Biomasa	AE	Mentol	Tricomas	Fenoles
Control					
PGPR					
MeJA 1 mM					
MeJA 1 mM + PGPR					
MeJA 2 mM					
MeJA 2 mM + PGPR					
MeJA 4 mM					
MeJA 4 mM + PGPR					

Tabla 5.2. Resumen de los efectos de la inoculación con rizobacterias y el tratamiento con MeJA sobre diferentes parámetros en plantas de *M. piperita*.

5.3. SECCIÓN III: INTERACCIÓN PLANTA AROMÁTICA-PGPR-SA

El SA produce un aumento del crecimiento vegetal y no afecta los mecanismos de promoción del crecimiento desencadenados por la inoculación de cepas PGPR, en plantas de *M. piperita*.

No existe un sinergismo entre mencionada fitohormona y las PGPR en la inducción de la promoción del crecimiento vegetal en la planta en estudio.

El SA y el MeJA tienen diferentes efectos sobre las vías de traducción de señales que regulan el crecimiento vegetal.

El tratamiento con SA estimula la biosíntesis de AE en *M. piperita*, pero en un grado menor que el derivado metilado del JA.

No existe un sinergismo entre las rizobacterias y el SA en la inducción de la síntesis de terpenoides, en la planta en estudio.

El SA, al igual que el MeJA, está involucrado en la ontogenia de tricomas glandulares peltados en *M. piperita*.

La síntesis de compuestos fenólicos es inducida por el tratamiento con SA.

El tratamiento conjunto de inoculación con cepas PGPR y aplicación exógena de SA no resulta una estrategia biotecnológica interesante, ya que no se observa un sinergismo entre ambos tratamientos sobre la promoción del crecimiento vegetal y la biosíntesis de metabolitos secundarios en la planta aromática en estudio.



	Biomasa	AE	Mentol	Tricomas	Fenoles
Control	1 green leaf	1 drop	1 blue square	1 dark square	1 phenol structure
PGPR	3 green leaves	3 drops	3 blue squares	3 dark squares	3 phenol structures
SA 1 mM	2 green leaves	2 drops	2 blue squares	2 dark squares	2 phenol structures
SA 1 mM + PGPR	3 green leaves	3 drops	3 blue squares	3 dark squares	3 phenol structures
SA 2 mM	2 green leaves	2 drops	2 blue squares	2 dark squares	2 phenol structures
SA 2 mM + PGPR	3 green leaves	3 drops	3 blue squares	4 dark squares	3 phenol structures

Tabla 5.3. Resumen de los efectos de la inoculación con rizobacterias y el tratamiento con SA sobre diferentes parámetros en plantas de *M. piperita*.

5.4. INTEGRACIÓN

Con el objetivo de realizar un resumen de la información presentada en el presente trabajo, presentamos un Análisis Clúster, conocido comúnmente como Análisis de Conglomerados, ya que es una técnica estadística multivariante que nos permite clasificar objetos formando grupos/conglomerados (clúster) que sean lo más homogéneos posible dentro de si mismos y heterogéneos entre si.

Para realizar dicho análisis se seleccionaron sólo las variables mas relevantes que caracterizaron los distintos tratamientos evaluados (contenido total de AE, contenido total de terpenos mayoritarios, contenido de fenoles totales, peso fresco de la parte aérea, longitud del tallo, número de tricomas peltados y capitados cara abaxial y adaxial).

Al analizar el dendograma podemos concluir que:

Los tratamientos de inoculación y co-inoculación se diferenciaron claramente del control y del resto de los tratamientos evaluados. A su vez, presentaron mucha homogeneidad entre ellos, ya que se agruparon a baja distancia.

Interesante: los tratamientos con hormonas se agruparon diferencialmente: un grupo o clúster estuvo formado por las plantas tratadas con MeJA, mientras que el otro grupo lo formaron las plantas expuestas a SA. En ambos casos esto fue independiente de la inoculación o co-inoculación bacteriana realizada previamente.

Plantas solo tratadas con rizobacterias se diferenciaron de las que además fueron expuestas a SA o MeJA exógeno. A su vez el comportamiento fue diferencial dependiendo de la hormona aplicada: MeJA ejerce un tipo de efecto y SA otro; por eso se forman clúster diferentes.

Considerando los datos presentados a lo largo del presente manuscrito, como aplicación biotecnológica podríamos sugerir que la inoculación con cepas PGPR sería el tratamiento recomendado para mejorar el cultivo de la planta aromática en estudio, tanto la producción de sus metabolitos secundarios como de biomasa.

Cabe destacar que los resultados expuestos en el presente manuscrito corresponden a ensayos realizados bajo condiciones ambientales controladas, es necesario realizar ensayos a campo para corroborar estos resultados y así en un futuro transferir estos conocimientos a los productores de plantas aromáticas.

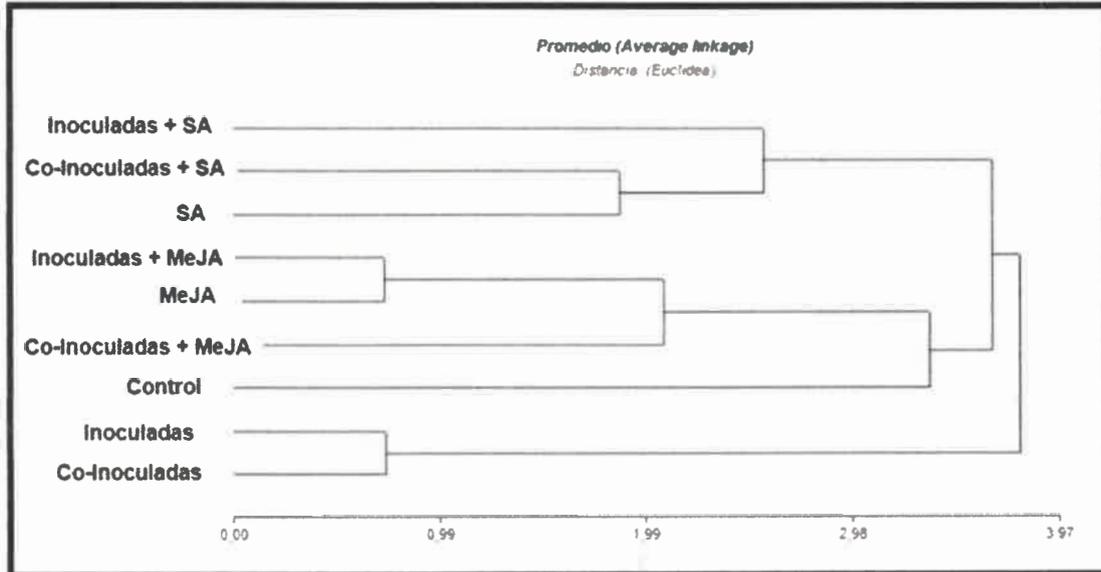


Fig. 5.1. Análisis de conglomerados



Bibliografía

Capítulo VI

6. BIBLIOGRAFÍA

- AACREA.** (2006). *Agroalimentos Argentinos II: Aromáticas*. Recuperado el 08 de Noviembre de 2016 en <http://www.fediap.com.ar/administracion/pdfs/Agroalimentos%20Argentinos%20II%20-%20AACREA.pdf>
- Abdala, G. y Cenzano, A.** (2006). Biosíntesis de jasmonatos y participación en procesos del desarrollo vegetal. En: *SAFV. Temas de Fisiología Vegetal*. (pp: 56-87). Río Cuarto, Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Abreu, M. E. y Munne-Bosch, S.** (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60: 1261-1271. DOI: 10.1093/jxb/ern363.
- Aflatuni, A.** (2005). *The yield and essential oil content of mint (mentha spp.) in northern Ostrobothnia*. Department of Biology, Faculty of Science, University of Oulu, Oulun Yliopisto, Oulu, Finlandia.
- Ahemad, M. y Khan, M. S.** (2011). Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under insecticide stress. *J. Microbiol.* 1 (2): 54-64.
- Ahemad, M. y Kibret, M.** (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* 26: 1-20. DOI: org/10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- Ahmed, A. y Hasnain, S.** (2014). Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol. J. Microbiol.* 63 (3): 261-266.
- Ait Kaki, A., Chaouche, N. K., Dehimat, L., Milet, A., Youcef-Ali, M., Ongena, M. y Thonart, P.** (2013). Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere. *Indian J. Microbiol.* 53 (4): 447-452. DOI: 10.1007/s12088-013-0395-y.
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A. y Anwar, F.** (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (8): 601-611. DOI: org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007.
- Amelunxen, F., Wahlig, T. y Arbeiter H.** (1969). Über den Nachweis des ätherischen öls in isolierten Drüsenhaaren und Drüschuppen von *Mentha piperita* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 61: 68-72.
- Anand A., Uppalapati, S. R., Ryu, C. M., Allen, S. N., Kang, L., Tang, Y. y Mysore, K. S.** (2008). Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 146: 703-715. DOI: 10.1104/pp.107.111302.
- An, C. y Mou, Z.** (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53: 412-428. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x.

- Antoun, H. y Prévost, D.** (2005). Chapter 1: Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Sidiqqi, Z. A. (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (pp:1-38). Netherlands: Springer.
- Anzuay, M. S., Frola, O., Angelini, J. G., Ludueña, L. M., Fabra, A. y 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. DOI: 10.1007/s13199-013-0250-2.
- Arnon, D. I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Ascensão, L. y Pais, M. S.** (1998). The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann. Bot.* 81: 263-271. DOI: 0305-7364}98}020263-09 \$25.00}0.
- Ávalos García, A. y Pérez-Urria Carril, E.** (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145.
- Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman, G. H. y Goldman, M. H. S.** (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9 (1): 484-505. DOI: 10.4238/vol9-1gmr754.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, A. y Tweddell, J.** (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1733-1740. DOI: org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013.
- Awasthi, A., Bharti, N., Nair, N., Singh, R., Shukla, A. K., Gupta, M. M., Darokar, M. P. y Kalra, A.** (2011). Synergistic effect of *Glomus mosseae* and nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain Daz26 on artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Appl. Soil Ecol.* 49: 125-130. DOI: org/10.1016/j.apsoil.2011.06.005.
- Babalola, O. O.** (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32 (11): 1559-1570. DOI: 10.1007/s10529-010-0347-0.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. e Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46 (2): 446-475. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- Bakker, P. A. H. M.; Pieterse C. M. J. y van Loon, L. C.** (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97 (2): 239-243. DOI: 10.1094/PHYTO-97-2-0239.
- Bakker, P. A. H. M., Van Peer, R. y Schippers, B.** (1991). Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent *Pseudomonas*: mechanisms and prospects. *Biotic Interaction and Soil-Borne Diseases* 221-230.
- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99: 191-203. DOI: org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- Baldwin, I. T.** (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (14): 8113-8118.

- Baldwin, I. T.** (2010). Plant volatiles. *Curr. Biol.* 20 (9): 392-397.
DOI: 10.1016/j.cub.2010.02.052.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C. y Preston, C.A.** (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science* 311: 812-815. DOI: 10.1126/science.1118446.
- Banchio, E., Bogino, P. C., Santoro, M., Torres, L., Zygadlo, J. y 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., Zygadlo, J. y Giordano, W.** (2008). Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 766-771. DOI: org/10.1016/j.bse.2008.08.006.
- Banchio, E., Xie, X., Zhang, H. y Paré, P. W.** (2009). Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 653-657.
DOI: 10.1021/jf8020305.
- Banchio, E., Zygadlo J. y Valladares G. R.** (2005). Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *J. Chem. Ecol.* 31 (4): 719-727. DOI: 10.1007/s10886-005-3540-1.
- Barea, J., Pozo, M. J., Azcón, R. y Azcón-Aguilar C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Experim. Bot.* 56: 1761-1778. DOI: 10.1093/jxb/eri197.
- Bari, R. y Jones, J. D. G.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69: 473-488. DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- Bashan Y., Bustillos, J. J., Leyva, L. A., Hernandez, J. P. y Bacilio, M.** (2006). Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fertil. Soils* 42: 279-285.
DOI:10.1007/s00374-005-0025-x.
- Bautista-Lozada, A., Bravo-Monzón, A. E. y Espinosa-García, F. J.** (2012). Importancia ecológica de la emisión de compuestos volátiles vegetales. En: Rojas, J. C. y Malo, E. A. (Eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. (pp: 268-286). El Colegio de la Frontera Sur. México.
- Beckers, G. y Spoel, S.** (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol.* 8: 1-10. DOI: 10.1055/s-2005-872705
- Benatti M. R., Penning, B. W., Carpita, N. C. y McCann, M. C.** (2012). We are good to grow: dynamic integration of cell wall architecture with the machinery of growth. *Front. Plant Sci.* 3: 187. DOI: org/10.3389/fpls.2012.00187.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. y Passaglia, L. M. P.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35 (4): 1044-1051.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P.** (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of

- nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *App. Soil Ecol.* 39: 311-320. DOI: org/10.1016/j.apsoil.2008.01.006.
- Berendsen, R. L., van Verk, M. C., Stringlis, I. A., Zamioudis, C., Tommassen, J., Pieterse, C. M. J. y Bakker, P. A. H. M.** (2015). Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics* 16: 539. DOI: 10.1186/s12864-015-1632-z.
- Bergmann, D. C.** (2004). Integrating signals in stomatal development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (1): 26-32.
- Berry, J.A., Beerling, D. J. y Franks, P. J.** (2010). Stomata: key players in the Earth system, past and present. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 233-240. DOI: org/10.1016/j.pbi.2010.04.013.
- Berzins, M. L. y Romagnoli, S.** (2005). Cultivo de plantas aromáticas. *Fruticultura y diversificación* 47: 24-32.
- Bohlmann, J. y Keeling, C. I.** (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54 (4): 656-669. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W. M., Hortensteiner, S., Chetelat, A., Martinoia, E. y Farmer, E. E.** (2007). A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in Arabidopsis. *Plant J.* 49: 889-898. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.03002.x.
- Bonzani, N. E., Costaguta, M. C. y Barboza, G. E.** (2007). Estudios anatómicos en especies de *Mentha* (Fam. Lamiaceae) de Argentina. *Arnaldoa* 14 (1): 77-96.
- Bosch, M., Wright, L. P., Gershenzon, J., Wasternack, C., Hause, B. y Col.** (2014). Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato. *Plant Physiol.* 166: 396-410. DOI: 10.1104/pp.114.237388.
- Boughton, A. J., Hoover, K. y Felton, G. W.** (2005). Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Chem. Ecol.* 31 (9): 2211-2216. DOI: 10.1007/s10886-005-6228-7.
- Brown, M. E.** (1974). Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12: 181-197. DOI: 10.1146/annurev.py.12.090174.001145.
- Cappellari, L. R., Santoro, M. V., Nieves, F., Giordano, W. y Banchio, E.** (2013). Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *App. Soil Ecol.* 70: 16-22. DOI: org/10.1016/j.apsoil.2013.04.001.
- Cappellari, L., Santoro, M., Reinoso, H., Travaglia, C., Giordano, W. y Banchio, E.** (2015). Anatomical, morphological, and phytochemical effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on peppermint (*Mentha piperita*). *J. Chem. Ecol.* 41 (2): 149-158. DOI: 10.1007/s10886-015-0549-y.
- Cassán, F., Sgroj V., Perrig, D., Masciarelli, O. y Luna, V.** (2008). Capítulo 4: Producción de hormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos



- de la promoción del crecimiento vegetal. En: Cassán, F. y García Salamone, I. (Eds.). *Cell physiology, plant response, agronomic and environmental research in Argentina* (pp. 61-86). Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.
- Chalal, M., Winkler, J. B., Gourrat, K., Trouvelot, S., Adrian, M., Schnitzler, J. P., Jamois, F. y Daire, X.** (2015). Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine. *Front. Plant Sci.* 6:350. DOI: 10.3389/fpls.2015.00350.
- Chen, C., Belanger, R., Benhamou, N. y Paulitz, T. C.** (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56:13-23.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y. y Xie, D.** (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate Jasmonate response in Arabidopsis. *Mol. Plant* 4: 279-288. DOI: 10.1093/mp/ssq073.
- Cheong, J. J. y Choi, Y. D.** (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS Genet.* 19 (7): 409-413.
- Cho, M. H. y Lee, S. W.** (2015). Phenolic phytoalexins in rice: biological functions and biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (12): 29120-29133. DOI: 10.3390/ijms161226152.
- Choi, J. S. y Kim, E. S.** (2013). Structural features of glandular and non-glandular trichomes in three species of *Mentha*. *Appl. Microsc.* 43 (2): 47-53. DOI: 10.9729/AM.2013.43.2.47.
- Choudhary, D. K. y Johri, B. N.** (2009). Interactions of Bacillus spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* 164: 493-513. DOI: 10.1016/j.micres.2008.08.007.
- Coban, O. y Baidar, N. G.** (2016). Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. *Ind. Crops Prod.* 86: 251-258.
- Cochrane, F. C., Davin, L. B. y Lewis, N. G.** (2004). The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65: 1557-1564.
- Colla, G., Roupael, Y., Cardarelli, M., Tullio, M., Rivera, C. M. y Rea, E.** (2008). Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biol. Fert. Soils* 44: 501-509. DOI:10.1007/s00374-007-0232-8.
- Collado, M. A., Dilascio, M., Scandaliaris, J. y Ahmed, M.** (2003). Características del mercado de plantas aromáticas. *Avance Agroindustrial* 24 (4): 33-35.
- Copetta, A., Lingua, G. y 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.

- Creelman, R. A. y Mullet, J. E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:355-381.
- Crews, T. E. y Peoples, M. B.** (2004). Legume versus sources of nitrogen: ecological tradeoff and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102 (3): 279-297. DOI:10.1016/j.agee.2003.09.018.
- Cronje, M. J., Weir, I. E. y Bornman L.** (2004). Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry A* 61: 76-87.
- Croteau, R. B., Davis, E. M., Ringer, K. L. y Wildung, M. R.** (2005). (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92 (12): 562-577. DOI: 10.1007/s00114-005-0055-0.
- D'Ambrogio de Argüeso, A.** (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur.
- Dai, J. y Mumper, R. J.** (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313.
- Demkura, P. V., Abdala, G., Baldwin, I. T. y Ballare, C. L.** (2010). Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiol.* 152: 1084-1095. DOI: 10.1104/pp.109.148999.
- Depuydt, S. y Hardtke, C. S.** (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21 (9): R365-373. DOI:10.1016/j.cub.2011.03.013.
- Derksen, H., Rampitsch, C. y Daayf, F.** (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* 207: 79-87. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.03.004.
- De Silva, A., Patterson, K., Rothrock, C. y Moore, J.** (2000). Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. *Hortscience* 35 (7): 1228-1230.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. y Okon, Y.** (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 532 (22): 107-149. DOI: org/10.1080/713610853.
- Dong, F., Fu X., Watanabe, N., Su, X. y Yang Z.** (2016). Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules* 21: 124. DOI: 10.3390/molecules21020124. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.009.
- Dong, J., Wan, G. y Liang, Z.** (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *J. Biotechnol.* 148: 99-104.
- Droge, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F. y Prigent-Combaret, C.** (2012). Which specificity in cooperation between phyto stimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* 163 (8): 500-510. DOI: 10.1016/j.resmic.2012.08.006.

- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K. y Kaplan, I.** (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 198: 16-32. DOI: 10.1111/nph.12145.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A. y Orlava, I.** (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 417-440. DOI: org/10.1080/07352680600899973.
- Dutta, S. y Khurana, S. M. P.** (2015). Chapter 8: Plant growth promoting rhizobacteria for alleviating abiotic stresses in medicinal plants. En: Egamberdieva, D., Shrivastava, S. y Varma, A. (Eds.). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants.* (pp. 167-200). New York, Estados Unidos: Soil Biology Series. Springer Books.
- Elechosa, M. A. y Juárez, M. A.** (2003). Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales: evaluación de la producción nacional. *IDIA XXI* 3 (5): 60-68.
- Evelin, H., Kapoor, R. y Giri, B.** (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Ann. Bot.* 104: 1263-1280. DOI: 10.1093/aob/mcp251.
- Faried, H. N., Ayyub, C. M., Amjad, M., Ahmed, R., Wattoo, F. M., Butt, M., Bashir, M., Shaheen, M. R. y Waqas, M. A.** (2016). Salicylic acid confers salt tolerance in potato plants by improving water relations, gaseous exchange, antioxidant activities and osmoregulation. *J. Sci. Food Agric.* DOI: 10.1002/jsfa.7989.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. y 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. DOI: org/10.1016/j.apsoil.2008.05.002.
- Felton, G. W., Korth, K. L., Bi, J. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Lamb, C. y Dixon, R. A.** (1999). Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Curr. Biol.* 9: 317-320.
- Felton, G. W. y Tumlinson, J. H.** (2008). Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Curr. Opin. Plant Biol.* (4): 457-463. DOI: org/10.1016/j.pbi.2008.07.001.
- Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S. y Zhang, Y.** (2005). Chapter 3: Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. En: Sidiqqi, Z. A. (Ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* (pp: 67-109). Netherlands: Springer.
- Figueredo, M. S., Tonelli, M. L., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Valetti, L., Muñoz, V., Anzuay, M. S., Ludueña, L. y Fabra, A.** (2014). Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. *J. Biosci.* 39 (5): 877-885.

- Figueroa-Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Pérez-Ramírez, I. F., Mercado-Silva, E. y Reynoso-Camacho, R.** (2014). Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of Peppermint (*Mentha piperita*) grown under drought stress. *J. Agric. Food Chem.* 62: (49) 12027-12033. DOI: 10.1021/jf503628c.
- Foster, R. C.** (1998). Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fert. Soils* 6: 189-203. DOI: 10.1007/BF00260816.
- Franche, C., Lindström, C. y Elmerich, C.** (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321: 35-59. DOI: 10.1007/s11104-008-9833-8.
- Fuchs, R., Schäfer, M., Geoffroy, V. y Meyer, J. M.** (2001). Siderotyping - A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 31-57.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A. y Col.** (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodiantrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 113: 25. DOI: 10.1007/s11240-012-0248-0
- Gandhi, S. G., Mahajan, V. y Bedi, Y. S.** (2015). Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta* 241 (2): 303-317. DOI: 10.1007/s00425-014-2232-x.
- Gao, Q-M., Kachroo, A. y Kachroo, P.** (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J. Exp. Bot.* 65: 1849-1855.
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K. y Nelson, L. M.** (2005). Chapter 6: Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. En: Siddiqui, Z. A. (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (pp: 173-195). Netherlands: Springer. DOI: 10.1007/1-4020-4152-7_6.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R. y Redondo-Nieto, M.** (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLoS One* 11 (2): e0150183. DOI: 10.1371/journal.pone.0150183.
- Gershenson, J., Maffei, M. y Croteau, R.** (1989). Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol.* 89 (4): 1351-1357.
- Gershenson, J., McConkey, M. E. y Croteau, R. B.** (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 122: 205-213.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Rahmani Samani, M., Hashemi, M. y Zeinali, H.** (2014). Salicylic acid affects growth, essential oil and chemical compositions of thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under reduced irrigation. *Plant Growth Regul.* 72: 289-301. DOI: 10.1007/s10725-013-9860-1.

- Ghasemi Pirbalouti, A., Sajjadi, S. E. y Parang, K.** (2014). A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 347: 229-239. DOI: 10.1002/ardp.201300287.
- Ghirardo, A., Gutknecht, J., Zimmer, I., Brüggemann, N. y Schnitzler, J. P.** (2011). Biogenic volatile organic compound and respiratory CO₂ emissions after ¹³C-labeling: online tracing of C translocation dynamics in poplar plants. *PLoS One* 6:e17393. DOI: org/10.1371/journal.pone.0017393.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M., Kariman, K. y Abbaszadeh Dahaji, P.** (2016). Phytochemical variations and enhanced efficiency of antioxidant and antimicrobial ingredients in *Salvia officinalis* as inoculated with different rhizobacteria. *Chem. Biodivers.* 13 (3): 319-330. DOI: 10.1002/cbdv.201500082.
- Giri, B., Kapoor, R. y 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. DOI: 10.1007/s00374-003-0636-z.
- Girón-Calva, P. S., Li, T., Koski, T. M., Klemola, T., Laaksonen, T., Huttunen, L. y Blande, J. D.** (2014). A role for volatiles in intra- and inter plant interactions in birch. *J. Chem. Ecol.* 40: 1203-1211. DOI: 10.1007/s10886-014-0514-1.
- Glas, J. J., Schimmel, B. C. J., Alba, J. M., Escobar Bravo, R., Schuurink, R. C. y Kant, M. R.** (2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (12): 17077-17103. DOI: 10.3390/ijms131217077.
- Glick B. R.** (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1-15. DOI: org/10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- Glick, B. R., Penrose, D. M. y Li, J. P.** (1998). A model for lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theoret. Biol.* 190: 63-68. DOI:10.1006/jtbi.1997.0532.
- Graham, T. L. y Graham, M. Y.** (1996). Signaling in soybean phenylpropanoid responses. *Plant Physiol.* 110: 1123-1133.
- Grant, M. R. y Jones, J. D.** (2009). Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science.* 324 (5928): 750-752. DOI: 10.1126/science.1173771.
- Gray, E. J. y Smith, D. L.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412. DOI: org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- Günter, E.** (1948). *The Essential Oils - Vol. I: History - Origin in Plants - Production - Analysis.* New York, Estados Unidos. D. Van Nostrand Company.
- Guerrieri, E., Lingua, G., Digilio, M. C., Massa, N. y Berta, G.** (2004). Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? *Ecol. Entom.* 29: 753-756. DOI: 10.1111/j.0307-6946.2004.00644.x.

- Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M. y Kumar, S.** (2002). Effect of the 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 Tech.* 81: 77-79.
- Gupta, P. y Kumar, V.** (2017). Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33 (1): 9. DOI: 10.1007/s11274-016-2176-3.
- Gutiérrez-Alcalá, G., Calo, L., Gros, F., Caissard, J. C., Gotor, C. y Romero, L. C.** (2005). A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular from a variety of plants. *J. Exp. Bot.* 56 (419): 2487-2494. DOI: 10.1093/jxb/eri241.
- Gutiérrez-Coronado, M. A., Trejo-López, C. y Larqué-Saavedra, A.** (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 563-565. DOI: 10.1016/S0981-9428(98)80003-X.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R. y Talon, M.** (2001). The plant-growth-promoting-rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
- Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T. y Miura, K.** (2012). Abiotic stress and role of salicylic acid in plants. En: Parvaiza, A. y Prasad, M. N. V. (Eds.). *Abiotic Stress Responses in Plants.* (pp: 235-251). New York, Estados Unidos: Springer.
- Harrewijn, P., Van Oosten, A. M. y Piron P. G. M.** (2001). *Natural Terpenoids as Messengers: a multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications.* Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publisher.
- Hassan, M. N., Zainal, Z. e Ismail, I.** (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* 13 (6): 727-739. DOI: 10.1111/pbi.12368.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. y Ahmed, I.** (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60: 579-598. DOI: 10.1007/s13213-010-0117-1.
- Heinrich, M., Hettenhausen, C., Lange, T., Wünsche, H., Fang, J., Baldwin, I. T. y Wu, J.** (2013). High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J.* 73 (4): 591-606. DOI:10.1111/tbj.12058.
- Henery, M. L., Wallis, I. R., Stone, C. y Foley, W. J.** (2008). Methyl jasmonate does not induce changes in *Eucalyptus grandis* leaves that alter the effect of constitutive defense on larvae of a specialist herbivore. *Oecologia* 56: 847-859. DOI: 10.1007/s00442-008-1042-x.



- Hiltner, L.** (1904). Über neuerer erfahrungern und problem auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtigung der grundung und brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft* 98: 59-78.
- Hirooka, K.** (2014). Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (9): 1471-1484. DOI: 10.1080/09168451.2014.943689.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I.** (1938). The water-culture method for growing plants without soil. En: *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ.* (pp: 347-353). California, Estados Unidos: Berkeley.
- Holopainen, J. K. y Gershenzon, J.** (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15 (3): 176-184. DOI: org/10.1016/j.tplants.2010.01.006.
- Howe, G. A.** (2001). Cyclopentenone signals for plant defense: remodeling the jasmonic acid response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12317-12319. DOI: 10.1073/pnas.231480898.
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L. y Xie, D.** (2013). JAVI controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol. Cell* 50: 504-515. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.04.027.
- Hudgins, J. W., Christiansen, E. y Franceschi, V. R.** (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiol.* 24: 251-264
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H. J. y Col.** (2008). Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev. Cell.* 14: 183-192. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.11.010.
- Idrees, M., Khan, M. M. A., Aftab, T., Naeem, M. y Hashmi, N.** (2010). Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in lemongrass varieties under water stress. *J. Plant Interact.* 5: 293-303.
- Iriti, M. y Faoro, F.** (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.* 10 (8): 3371-3399. DOI: 10.3390/ijms10083371.
- Jankiewicz, U. y Koltonowicz, M.** (2012). The involvement of *Pseudomonas* bacteria in induced systemic resistance in plants (Review). *App. Biochem. Microbiol.* 48 (3): 244-249. DOI: 10.1134/S0003683812030052.
- Jiang, S., Yao, J., Ma, K.W., Zhou, H., Song, J., He, S.Y. y Ma, W.** (2014). Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog.* 9: e1003715. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003715.
- Jordán, M. y Casaretto, J.** (2006). Capítulo 16: Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. En: Squeo, F.A. y Cardemil, L. (Eds.) *Fisiología vegetal*. La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.

- Jullien, F.** (2007). Mint. En: Pua, E. C. y Davey, M. R. (Eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 59.* (pp. 435-466). Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Kalaivani, K., Kalaiselvi, M. M. y Senthil-Nathan, S.** (2016). Effect of methyl salicylate (MeSA), an elicitor on growth, physiology and pathology of resistant and susceptible rice varieties. *Sci. Rep. 6:* 34498. DOI: 10.1038/srep34498.
- Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., Vuorela, H. y Raal, H.** (2013). Commercial peppermint (*Mentha x piperita L.*) teas: antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Res. Int. 53:* 758-766.
- Karban, R. y Baldwin, I. T.** (1997). *Induced Responses to Herbivory.* University of Chicago Press, Chicago.
- Kautz, S., Trisel, J. A. y Ballhorn, D. J.** (2014). Jasmonic acid enhances plant cyanogenesis and resistance to herbivory in lima bean. *J. Chem. Ecol. 40:* 1186-1996. DOI: 10.1007/s10886-014-0524-z.
- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A. y Khan, N. A.** (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci. 6:* 462. DOI: 10.3389/fpls.2015.00462.
- Khan, M., Rozhon, W. y Poppenberger, B.** (2014). The role of hormones in the aging of plants - A mini-review. *Gerontology 60:* 49-55. DOI: 10.1159/000354334.
- Kloepper, J. W.** (1993). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Metting, F. B. (Ed.). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management.* (pp: 255-273). New York, Estados Unidos: Marcel Dekker Inc.
- Kloepper, J. W., Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M. y Lifshitz, R.** (1991). The rhizosphere and plant growth. En: Keister, K. L. y Cregan, P. B. (Eds.). (pp: 315-326). Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.
- Koca, N. y Karaman, S.** (2014). The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil. *Food Chem. 166:* 515-521. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.065.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T. Stochmal, A. Oleszek, W.** (2012). The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult. 108:* 73-81. DOI: 10.1007/s11240-011-0014-8.
- Krzyzanowska, J., Janda, B., Pecio, L. Stochmal, A. y Oleszek, W.** (2011). Determination of polyphenols in *Mentha longifolia* y *M. piperita* field grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. *J. AOAC Int. 94* (1):43-50.
- Kumar, A.** (2016). Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *Int. J. Adv. Res. 4:* 116-124. DOI: 10.21474/IJAR01.

- Kumar, A., Prakash, A. y Johri, B. N.** (2012). Chapter 2: *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. En: Maheshwari (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp: 37-59). Berlin Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Kumar, D.** (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228: 127-134. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.04.014.
- Kumar, D., Chapagai, D., Dean, P., y Davenport, M.** (2015). Chapter 12: Biotic and abiotic stress signaling mediated by salicylic acid. En: Pandey, G.K. (Ed.). *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants.* (pp: 329-346). New York, Estados Unidos: Springer Science+Business Media.
- Kumar, M., Tomar, R. J., Lade, H. y Paul, D.** (2016). Methylo trophic bacteria in sustainable agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (120): 3-9. DOI:10.1007/s11274-016-2074-8.
- Lagrotteria, M. y Toya M. A.** (1987). Plantas medicinales y aromáticas del departamento San Javier. *Subsec. de Gest. Amb., Sec. Min. y Coord. Gob. Pcia. Cba.*
- Lange, B. M.** (2015). The evolution of plant secretory structures and the emergence of terpenoid chemical diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 139-159. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114639.
- Lange, B. M. y Croteau, R.** (1999). Genetic engineering of essential oil production in mint. *Cur. Opin. Plant Biol.* 2 (2): 139-144. DOI: 10.1016/S1369-5266(99)80028-4.
- Lange, B. M. y Turner, G. W.** (2013). Terpenoid biosynthesis in trichomes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnol. J.* 11: 2-22. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00737.x.
- Langenheim, J. H.** (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20 (6): 1223-1280. DOI: 10.1007/BF02059809.
- Latif, F., Ullah, F., Mehmood, S. y Col.** (2015). Effects of salicylic acid on growth and accumulation of phenolics in *Zea mays* L. under drought stress. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B -Soil & Plant Science.* DOI: 10.1080/09064710.2015.1117133
- Lavania, M., Chauhan, P. S., Chauhan, S. V. S., Singh, H. B. y Nautiyal, C. H.** (2006). Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr. Microbiol.* 52: 363-368. DOI: 10.1007/s00284-005-5578-2.
- Lawrence, B. M.** (2007). *Mint. The genus Mentha.* Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRS Press.
- Lee, B., Farag, M. A., Park, H. B., Kloepper, J. W., Lee, S. H. y 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0048744.

- Li, L., McCraig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., y Col.** (2003). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE 1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126-143. DOI: 10.1105/tpc.017954.
- Liu, X. M. y Zhang, H.** (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 6: 774. DOI: 10.3389/fpls.2015.00774.
- Liu, Z., Zhang, S., Sun, N., Liu, H., Zhao, Y., Liang, Y., Zhang, L. y Han, Y.** (2015). Functional diversity of jasmonates in rice. *Rice* 8 (5). DOI: 10.1186/s12284-015-0042-9.
- Loper, J. E.** (1988). Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.
- Lubbe, A. y Verpoorte, R.** (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind. Crops Prod.* 34: 785-801. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.01.019.
- Lucy, M., Reed, E. y Glick, B. R.** (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86 (1): 1-25. DOI:10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F.** (2009). Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Luria, S. E. y Burrous, J. W.** (1955). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74: 461-47.
- Maes, L., Van Nieuwerburgh, F. C., Zhang, Y., Reed, D. W., Pollier, J., Vande Castele, S. R., Inzé, D., Covello P. S., Deforce, D. L. y Goossens, A.** (2011). Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants. *New Phytol.* 189 (1): 176-89. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03466.x.
- Maffei, M.** (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S. Afr. J. Bot.* 76: 612-631.
- Maffei, M., Berteà, Z. y Mucciarelli, M.** (2007). Anatomy, physiology, biosynthesis, molecular biology, tissue culture and biotechnology of mint essential oil production. En: Lawrence, B. M. (Ed.) *Mint. The genus Mentha*. (pp: 41-85). Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRS Press.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. y Tribedi, P.** (2016). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* DOI: 10.1007/s11356-016-8104-0.
- Masciarelli, O., Llanes, A. y Luna, V.** (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiol. Res.* 169: 609-615. DOI: 10.1016/j.micres.2013.10.001.

- Matsuno, M., Nagatsua, A., Ogiharaa, Y., Ellisb, B. E. y Mizukami, H.** (2002). CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4P-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. *FEBS Lett.* 514: 219-224.
- Mazid, M., Khan, T. A. y Mohammad, F.** (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.* 3 (2): 232-249.
- McCaskill, D., Gershenzon, J. y 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. DOI: 10.1007/BF00199962.
- McKay, D. L. y Blumberg, J. B.** (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res.* 20: 619-633.
- Mc Kinney, G.** (1938). Some absorption spectra of leaf extract. *Plant Physiol.* 13: 128-140.
- Mehri, I., Turki, Y., Chair, M., Chérif, H., Hassen, A., Meyer, J. M. y Gtari, M.** (2011). Genetic and functional heterogeneities among fluorescent *Pseudomonas* isolated from environmental samples. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57 (2):101-114.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. y Inverardi, B.** (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250 1004-1006. DOI: 10.1126/science.250.4983.1004.
- 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. DOI: 10.1099/00221287-107-2-319.
- Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.** (2008). *Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. Especies, hierbas aromáticas y medicinales: Catamarca, Córdoba, Misiones y Salta.*
- Ministerio de Economía y Producción de la Nación.** (2006). *Informe sectorial aromas y esencias.* Recuperado el 08 de Noviembre de 2016 en http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/informes/anteriores/Info_Aroma_06_2006_03Mar.pdf
- Miransari, M.** (2014). Plant growth promoting rhizobacteria. *J. Plant Nutr.* 37: (14): 2227-2235. DOI: 10.1080/01904167.2014.920384.
- Mitra, S. y Baldwin, I. T.** (2013). RuBPCase activase (RCA) mediates growth-defense trade-offs: silencing RCA redirects jasmonic acid (JA) flux from JA-isoleucine to methyl jasmonate (MeJA) to attenuate induced defense responses in *Nicotiana attenuata*. *New Phytol.* 201 (4): 1385-1395. DOI:10.1111/nph.12591.
- Miura, K. y Tada, Y.** (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5: 4. DOI: 10.3389/fpls.2014.00004.

- Mols, M. y Abbe, T.** (2011). Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Envirom. Microbiol.* 13 (6): 1387-1394. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02433.x.
- Morone Fortunato, I. y Avato, P.** (2008). Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tiss. Org.* 93: 139-149.
DOI: 10.1007/s11240-008-9353-5.
- Muñoz, F.** (1996). *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado.* Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Murray, R. R., Emblow, M. S., Hetherington, A. M. y Foster, G. D.** (2016). Plant virus infections control stomatal development. *Sci. Rep.* 6: 34507.
DOI: 10.1038/srep34507.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Ahmad Zahir, Z., Javaid, A. y Ashraf, M.** (2013). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32 (2): 429-448.
DOI: org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005.
- Naznin, H. A., Kimura, M., Miyazawa, M. y 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.
DOI: 10.1264/jsme2.ME12085.
- Neilands, J. B.** (1973). Microbial iron transport compounds (siderochromes). En: Eichorn, G. L., (Ed.) *Inorganic Biochemistry.* (pp: 167-202) Amsterdam: Elsevier.
- Nicholson, R. L. y Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic compound and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
DOI: 10.1146/annurev.py.30.090192.002101.
- Noir, S., Bömer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T. L., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K. y Devoto, A.** (2013). Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiol.* 161: 1930-1951. DOI: 10.1104/pp.113.214908.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. y 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.
DOI: org/10.1016/j.scienta.2006.09.002.
- Palleroni, N. J.** (2005). Genus *Pseudomonas*. En: Brenner, D. J., Krieg, N. R. y Staley, J. T. (Eds.). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.* 2^{da} ed. Vol. 2. (pp: 323-379). New York, Estados Unidos: Springer.
- Panka, D., Piesik, D., Jeske, M. y Baturó-Ciesniewska, A.** (2013). Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. *J. Plant Physiol.* 170: 1010-1019.
DOI: org/10.1016/j.jplph.2013.02.009.

- Paré, P. y Tumlinson, J.** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121: 325-331. DOI: org/10.1104/pp.121.2.325.
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V. y Rovera, M.** (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Curr. Microbiol.* 73 (3): 346-353. DOI: 10.1007/s00284-016-1068-y.
- Pateraki, I. y Kanellis, A. K.** (2010). Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *Creticus*. *Plant Cell Rep.* 29: 629-641. DOI: 10.1007/s00299-010-0849-1.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan W., Inze, D. y Goossens, A.** (2008). Mapping methyl jasmonatemediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1380-1385. DOI: 10.1073/pnas.0711203105.
- Paynet, M., Martin, C. y Girand, M.** (1971). Activité phenylalanine ammiac lyase et hypersensibilite an virus de la mosaïque du tabac. *Acad. Sci. Paris* 273: 537-539.
- Peleg, Z. y Blumwald, E.** (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (3): 290-295. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.02.001.
- Pillitteri, L. J. y Torii, K. U.** (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 591-614. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105451.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J. y Cubo, T.** (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microb. Res.* 169: 325:336. DOI: org/10.1016/j.micres.2013.09.011.
- Pichersky, E. y Gershenzon, J.** (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 237-243.
- Pieterse, C. M. J., van Pelt, J. A., Verhagen, B. W. M., Ton, J., van Wees, S. C. M., León-Kloosterziel, K. M. y van Loon, L. C.** (2003). Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35: 39-54. DOI: org/10.1016/S0261-2194(00)00056-9.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M. y Bakker, P. A. H. M.** (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 347-375. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. y Crecchio, C.** (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol. Fertil. Soils* 51: 403. DOI: 10.1007/s00374-015-0996-1.
- Pineda, A., Soler, R., Weldegergis, B. T., Shimwela, M. M., Van Loon, J. J. y Dicke, M.** (2012). Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of



- parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signalling. *Plant Cell Environ.* 36 (2): 393-404. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02581.x.
- Piotrowska, A. y Bajguz, A.** (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* 72: 2097-2112. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.08.012.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M. y de Souza, J. T.** (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547. DOI: 10.1023/A:1020501420831.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon. H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M. y Palazon, J.** (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21 (2): 182. DOI: 10.3390/molecules21020182.
- Ramomoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. y Samiyappan, R.** (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plant against pest and diseases. *Crop Prot.* 20: 1-11. DOI: org/10.1016/S0261-2194(00)00056-9.
- Rangel Sánchez G., Castro Mercado, E., Beltran Peña, E., Reyes de la Cruz, H. y García Pineda, E.** (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12 (2): 90-95.
- Rapparini, F., Llusía, J. y Peñuelas, J.** (2008). Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biol.* 10 (1): 108-122. DOI: 10.1055/s-2007-964963.
- Raskin, I.** (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463. DOI: 10.1146/annurev.pp.43.060192.002255.
- Rasmann, S. y Turlings, T. C.** (2016). Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32: 62-68. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.06.017.
- Riachi, L. G. y De Maria, C. A.** (2015). Peppermint antioxidants revisited. *Food Chem.* 176: 72-81. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.
- Rita, P. y Animesh, D. K.** (2011). An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). *Int. Res. J. Pharm.* 2 (8): 1-10.
- Robson, F., Okamoto, H., Patrick, E., Harris, S. R., Wasternack, C., Brearley, C. y Turner, J. G.** (2010). Jasmonate and phytochrome a signaling in Arabidopsis wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability. *Plant Cell* 22: 1143-1160. DOI: 10.1105/tpc.109.067728.
- Rodríguez, H., Fraga, R., González, T. y Bashan, Y.** (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287: 15-21.



- Rodríguez-Saona, C., Crafts-Brandner, S. J., Paré, P. W. y Henneberry, T. J.** (2001). Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *J. Chem. Ecol.* 27 (4): 679-695. DOI: 10.1023/A:1010393700918.
- Rosahl, S. y Feussner, I.** (2005). Oxylipins. En Murphy, D. J. (Ed.). *Plant Lipids: Biology, Utilization, and Manipulation.* (pp: 329-354). Oxford: Black well Publishing.
- Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E.** (2013). Increasing the phenolic compound content of grapes by preharvest application of abscisic acid and a combination of methyl jasmonate and benzothiadiazole. *J. Agric. Food Chem.* 61 (16): 3978-3983. DOI: 10.1021/jf400631m.
- Ryan, K. G., Swinny, E. E., Markham, K. R. y Winefield, C.** (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochem.* 59 (1):23-32. DOI: org/10.1016/S0031-9422(01)00404-6.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. y Paré, P. W.** (2004). Bacterial volatiles trigger induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-1026. DOI: 10.1104/pp.103.026583.
- Saharan, B. S. y Nehra, V.** (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 2011: 1-30.
- Saibo, N. J., Vriezen, W. H., Beemster, G. T. y Van Der Straeten, D.** (2003). Growth and stomatal development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J.* 33: 989-1000.
- Salla T. D., Ramos da Silva, T., Astarita, L. V y Santarém, E. R.** (2014). *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of *Eucalyptus* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 85: 14-20. DOI: org/10.1016/j.plaphy.2014.10.008.
- Sánchez, E., García, D., Carballo, C. y Crespo, M.** (1996). Estudio farmacognóstico de *Mentha piperita* L (toronjil de menta). *Rev. Cub. Plantas Medic.* 1 (3): 40-45.
- Sandoval-Yapiz, M.** (2004). Reguladores de crecimiento XXIII: efecto del ácido salicilico en la biomasa del cempazuchitl (*Tagetes erecta*). Tesis de Licenciatura Instituto Tecnológico Agropecuario, Conkal, Yucatan, Mexico.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. y Sangwan, R. S.** (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth. Regul.* 34: 3-21. DOI: 10.1023/A:1013386921596.
- Santoro, V. M., Bogino, P. C., Nocelli, N., Cappellari, L., Giordano, W. F. y Banchio, E.** (2016). Analysis of plant growth-promoting effects of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from *Mentha piperita* rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Front. Microb.* 7: 1085. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01085.

- Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W. y Banchio, E.** (2015). Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. *Plant Biol.* 17 (6): 1218-1226. DOI: 10.1111/plb.12351.
- Santoro, M. V., Zygadlo, J., Giordano, W. y Banchio, E.** (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol. Biochem.* 49: 1177-1182.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.07.016.
- Sarkar, D. y Shetty, K.** (2013). Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 5: 395-413.
DOI: 10.1146/annurev-food-030713-092418.
- Schlüter, U., Muschak, M., Berger, D. y Altmann, T.** (2003). Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. *J. Experim. Bot.* 54: 867-874.
DOI: 10.1093/jxb/erg087.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H. y Tumlinson, J. H.** (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (18): 10552-10557.
- Schmidt, C. S., Agostini, F., Simon, A. M., Whyte, J., Townend, J., Lifert, C., Killham, K., Mullins, C.** (2004). Influence of soil type and pH on the colonization of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 1025-1046.
DOI: 10.1007/s10658-004-1600-y
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. y Lewinsohn, E.** (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 54 (4): 712-732.
DOI: 10.1111/j.1365313X.2008.03446.x.
- Seo, J. S., Joo, J., Kim, M. J., Kim, Y. K., Nahm, B. H., Song, S. I., Cheong, J. J., Lee, J. S., Kim, J. K. y Choi, Y. D.** (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J.* 65: 907-921. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04477.x.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H. y Rocha Sosa, M.** (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopat.* 21: 355-363.
- Shaharoon, B., Arshad, M. y Zahir, Z. A.** (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 155-159. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01827.x.

- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. O., Lee, I. J.** (2015). Foliar application of methyl jasmonate induced physio-hormonal changes in *Pisum sativum* under diverse temperature regimes. *Plant Physiol. Biochem.* 96: 406-416. DOI: org/10.1016/j.plaphy.2015.08.020.
- Shaikh, S. S., Sayyed; R. Z. y Reddy, M. S.** (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria: an eco-friendly approach for sustainable agroecosystem. En: Hakeem, K. R., Akhtar, M. S. y Abdullah, S. N. A. (Eds.). *Plant, Soil and Microbes.* (pp:181-201). Switzerland: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-27455-3_10.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, V., Fatkhutdinova, R. A., Fatkhutdinova, D. R.** (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317-322. DOI: org/10.1016/S0168-9452(02)00415-6.
- Shigenaga, A. M. y Argueso, C. T.** (2016). No hormone to rule them all: interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56: 174-189. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.06.005.
- Shrivastava, S., Egamberdieva, D. y Varma, A.** (2015). Chapter 1: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants: the state of the art. En: Egamberdieva, D., Shrivastava, S. y Varma, A. (Eds.) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants.* (pp. 1-16). New York, Estados Unidos: Soil Biology Series. Springer Books.
- Shulka, A., Abad Farooqi, A. H., Shukla, Y. N. y 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. DOI: 10.1007/BF00024071.
- Shyu, C. y Brutnell, T. P.** (2015). Growth–defence balance in grass biomass production: the role of jasmonates. *J. Exp. Bot.* 66: 4165-4176. DOI: 10.1093/jxb/erv011.
- Siddiqui, Z. A.** (2005). Chapter 4: PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. En: Siddiqui, Z. A. (Ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* (pp: 111-142). Netherlands: Springer.
- Singh, N., Luthra, R. y Sangwan, R. S.** (1991). Mobilization of starch and essential oil biogenesis during leaf ontogeny of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf.). *Plant Cell Physiol.* 653 (32): 803-811.
- Singh, R., Soni, S. K. y Kalra, A.** (2013). Synergy between *Glomus fasciculatum* and a beneficial *Pseudomonas* in reducing root diseases and improving yield and forskolin content in *Coleus forskohlii* Briq. under organic field conditions. *Mycorrhiza* 23: 35-44. DOI: 10.1007/s00572-012-0447-x.
- Singh, U. P., Sarma, B. K. y Singh, D. P.** (2003). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in Chickpea (*Cicer arietinum*). *Curr. Microbiol.* 46: 131-140.

DOI: 10.1007/s00284-002-3834-2.

- Skadhauge, B., Thomsen K. K. y Von Wettstein, D.** (1997). The role of barely testa layer in its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 126: 147-160.
- Smith, P. K., Kroha, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M. y Hritcu, L.** (2013). Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Sci. Hort.* 151: 22-29.
DOI: org/10.1016/j.scienta.2012.12.006.
- Stevens, J., Senaratna, T. y Sivasithamparam, K.** (2006). Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regul.* 49: 77-83. DOI: 10.1007/s10725-006-0019-1.
- Suárez, D. A.** (2013). *Cadena agroalimentaria del orégano y otras aromáticas en el Valle de Traslasierra. Lineamientos estratégicos para su desarrollo competitivo (provincia de Córdoba)*. Trabajo Final de Magister en Agronegocios y Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Subramanian, K. S. y Charest, C.** (1997). Nutritional, growth, and reproductive responses of maize (*Zea mays* L.) to arbuscular mycorrhizal inoculation during and after drought stress at tasselling. *Mycorrhiza* 7: 25-32.
DOI: 10.1007/s005720050159.
- Sun, X. L., Wang, G. C., Gao, Y., Zhang, X. Z., Xin, Z. J. y Chen, Z. M.** (2014). Volatiles emitted from tea plants infested by *Ectropis obliqua* larvae are attractive to conspecific moths. *J. Chem. Ecol.* 40 (10): 1080-1089.
DOI: 10.1007/s10886-014-0502-5.
- Taiz, L. and Zeiger E.** (2010). *Plant Physiology*. 3rd edn. Sunderland: Sinauer Associates.
- Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J. y Van der Helm, D.** (1981). Structure of ferripseudobactin, a siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.* 20: 6446-6457.
- Tian, D., Peiffer, M., De Moraes, C. M. y Felton, G. W.** (2014). Roles of ethylene and jasmonic acid in systemic induced defense in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Helicoverpa zea*. *Planta.* 239 (3): 577-589. DOI: 10.1007/s00425-013-1997-7.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H. y Hubbell, D. H.** (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Penicettum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.

- Tissier, A.** (2012). Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *Plant J.* 70 (1): 51-68. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04913.x.
- Traw, M. B. y Bergelson, J.** (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 (3): 1367-1375. DOI: 10.1104/pp.103.027086.
- Treutter, D.** (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7: 581-591. DOI: 10.1055/s-2005-873009.
- Turner, G. W., Gershenzon, J. y Croteau R. B.** (2000). Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* 124: 665-680.
- van Loon, L. C.** (2007). Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119 (3): 243-254. DOI: 10.1007/s10658-007-9165-1.
- van Loon, L. C. y Bakker, P. A. H. M.** (2003). Signalling in rhizobacteria-plant interactions. En: De Kroon, H. y Visser, E. J. W. (Eds.). *Root Ecology. Vol.168.* (pp: 297-330). Berlín, Alemania. Springer-Verlag. DOI:10.1007/978-3-662-09784-7_12.
- van Loon, L. C. y Bakker, P. A. H. M.** (2005). Chapter 2: Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. En: Sidiqqi, Z. A. (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* (pp: 39-66). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. y Pieterse, C. M. J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- van Loon, L. C. y Glick, B. R.** (2004). Increased plant fitness by rhizobacteria. En: Sandermann, H. (Ed.). *Molecular ecotoxicology of plants.* (pp: 178-205). Berlin, Alemania: Springer.
- van Schie, C. C. N., Haring, M. A. y Schuurink, R. C.** (2007). Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol. Biol.* 64: 251-263. DOI: 10.1007/s11103-007-9149-8.
- van Wees, S. C. M., Van der Ent, S. y Pieterse, C. M. J.** (2008). *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 443-448. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. DOI: org/10.1016/j.pbi.2008.05.005.
- Vazirimehr, M., Rigi, K. y Branch, Z.** (2014). Effect of salicylic acid in agriculture. *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 49: 291-296.
- Vejan, P., Abdullah R., Khadiran, T, Ismail, S. y Boyce, A. N.** (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - A review. *Molecules* 21 (5): 573. DOI: 10.3390/molecules21050573.
- Verbon, E. H. y Liberman, L. M.** (2016). Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* 21 (3): 218-229. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.01.013.
- Verma, V., Ravindran, P. y Kumar, P. P.** (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16: 86. DOI: 10.1186/s12870-016-0771-y.

- Vespermann, A., Kai, M. y Piechulla, B.** (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5639-564. DOI: 10.1128/AEM.01078-07.
- Vessey, J. K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255 (2): 571-586. DOI: 10.1023/A:1026037216893.
- Vikram, A.** (2007). Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. *Res. J. Microbiol.* 2: 550-559. DOI: 10.3923/jm.2007.550.559.
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M. y Dong, X.** (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036-1040.
- Wang, Y. H. e Irving, H. R.** (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal. Behav.* 6 (4): 494-500.
- War, A. R., Hussain, B. y Sharma, H. C.** (2013). Induced resistance in groundnut by jasmonic acid and salicylic acid through alteration of trichome density and oviposition by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *AoB Plants* 5: plt053.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100: 681-697.
- Wasternack, C.** (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development-applied aspects. *Biotechnol. Adv.* 32: 31-39. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.009.
- Wasternack, C. y Song, S.** (2016). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* DOI: 10.1093/jxb/erw443.
- Weller, D. M. y Thomashow, L. S.** (1993) Use of rhizobacteria for biocontrol. *Cur. Opin. Biotechnol.* 4: 306-311. DOI: 10.1016/0958-1669(93)90100-B.
- Wenke, K., Kai, M. y Piechulla, B.** (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* 231: 499-506. DOI: 10.1007/s00425-009-1076-2.
- Werker, E.** (1999). Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. *Flavour Fragr. J.* 8: 249-255. DOI: 10.1002/ffj.2730080503.
- Widhalm, J. R., Jaini, R., Morgan, J. A. y Dudareva, N.** (2015). Rethinking how volatiles are released from plant cells. *Trends Plant Sci.* 20 (9): 545-550. DOI: 10.1016/j.tplants.2015.06.009.
- Wink, M. y Schimmer, O.** (2009). Chapter 2: Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. En: Wink, M. (Ed.). *Annual Plant Reviews* Vol. 39. (Second Edition). (pp: 21-161). Reino Unido: Wiley-Blackwell.

- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M. y Pieterse, C. M. J.** (2016). Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Mol. Biol.* 90 (6): 623-634. DOI: 10.1007/s11103-016-0442-2.
- Wu, J. y Baldwin, I. T.** (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* 44:1-24.
- Wu, M., Zhang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Li, X., Zhou, Q. y 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. DOI: 10.1007/s00128-009-9731-7.
- Yamamura, Y., Ogihara Mizukami, H. Y. y Mizukami, H.** (2001). Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Rep.* 20: 655-662. DOI: 10.1007/s002990100373.
- Yan, C. y Xie, D.** (2015). Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotech J.* 13: 1233-1240. DOI:10.1111/pbi.12417.
- Yan, T., Chen, M., Shen, Q., Li, L., Fu, X., Pan, Q., Tang, Y., Shi, P., Lv, Z., Jiang, W., Ma, Y. N., Hao, X., Sun, X. y Tang, K.** (2016). HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*. *New Phytol.* DOI: 10.1111/nph.14205.
- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S. y Col.** (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 09: E1192-E1200. DOI: 10.1073/pnas.1201616109.
- Yang, J., Kloepper, J. W. y Ryu, C. M.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14: 1-4. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.004.
- Yang, Y., Tang, M., Sulpice, R., Chen, H., Tian, S. y Ban, Y.** (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi alter fractal dimension characteristics of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings through regulating plant growth, leaf water status, photosynthesis and nutrient concentration under drought stress. *J. Plant Growth Regul.* 33: (3) 612-625. DOI: 10.1007/s00344-013-9410-0.
- Yuan, Z. y Zhang, D.** (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 44-51. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.024.
- Zahir, A. Z., Arshad, M., Frankenberger, E. T.** (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: application and respective in agriculture. *Adv. Agron.* 81: 97-168. DOI: org/10.1016/S0065-2113(03)81003-9.
- Zeng, Y., Guo, L. P. y Col.** (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza* 23: 253-265. DOI: 10.1007/s00572-013-0484-0.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M. y Col.** (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 839-851. DOI: 10.1007/s00425-007-0530-2.

- Zhang, M., Liu, J., Li, K. y Yu, D.** (2013). Identification and characterization of a novel monoterpene synthase from soybean restricted to neryl diphosphate precursor. *PLoS One*. 4 :8(10):e75972. DOI: org/10.1371/journal.pone.0075972.
- Zhang, X. y Liu, C. J.** (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Mol. Plant*. 8 (1): 17-27. DOI: 10.1016/j.molp.2014.11.001.
- Zhang, Y. y Turner, J. G.** (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *Plos One* 3e3699. DOI: org/10.1371/journal.pone.0003699.
- Zheljazkov, V. D. y Astatkie, T.** (2011). Effect of distillation waste water and plant hormones on spearmint growth and composition. *J. Sci. Food Agric*. 91 (6): 1135-1141.
- Zhu, X. C., Song, F. B., Liu, S. Q., Liu, T. D. y Zhou, X.** (2012). Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant Soil Environ*. 58: 186-191.
- Zlotek, U., Michalak-Majewska, M. y Szymanowska, U.** (2016). Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chem*. 213: 1-7. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.052.

Anexos



Anexo I:
*Medios de Cultivo y
Soluciones de Trabajo*





ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE TRABAJO

Medio para riego

Medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938)

CaCl ₂ 1M	1 ml
KCl 1M	1 ml
MgSO ₄ 1M	400 µl
KH ₂ PO ₄ 1M	200 µl
FeCl ₃ 1M	200 µl
KNO ₃ 1M	500 µl
Solución de Micronutrientes	200 µl
Agua Destilada	c.s.p. 1000 ml

Solución de Micronutrientes

H ₃ BO ₃	283 mg
MnCl ₂	181 mg
ZnCl ₂ o ZnSO ₄	11 mg
CuSO ₄	5 mg
Na ₂ SO ₄	2.5 mg
Agua Destilada	c.s.p. 100 ml

Medio de cultivo para microorganismos

Medio Luria Bertani (LB) (Luria y Burrous, 1955)

NaCl	5 g
Extracto de Levadura	5 g
Tripteína	10 g
Agua Destilada	c.s.p. 1000 ml
Agar	15 g

Buffer de extracción de proteínas (PAL)

KH ₂ PO ₄	6.8 g
K ₂ HPO ₄	8.7 g
EDTA	0.37 g
Agua Destilada	1000 ml

Solución de L-fenilalanina 6 μ M - Tris HCl 0.5 M (PAL)

Buffer Tris HCl pH: 8: Tris Base 6.057 g

L-Fenilalanina 0.05 mg (en 50 ml de buffer Tris-HCl)

Anexo II:
Curvas de
Calibración





ANEXO II: CURVAS DE CALIBRACIÓN

✚ Curva de calibración ácido gálico (Fenoles Totales)

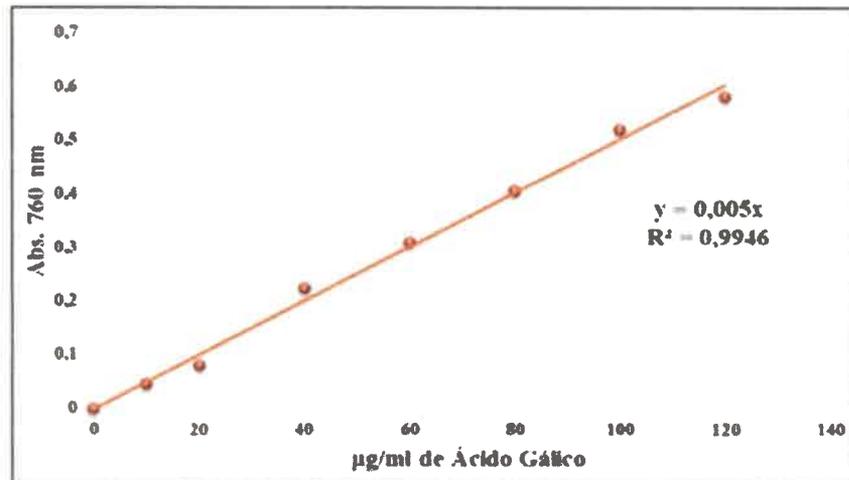


Fig. II.1. Curva de calibración ácido gálico.

✚ Curva de calibración ácido trans-cinámico (PAL)

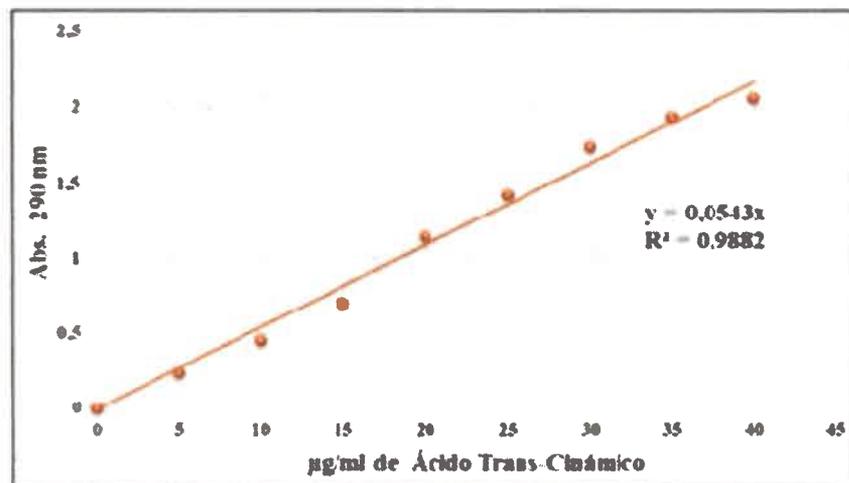


Fig. II.2. Curva de calibración ácido trans-cinámico.



Curva de calibración de ácido bicinonínico (Cuantificación de Proteínas - PAL)

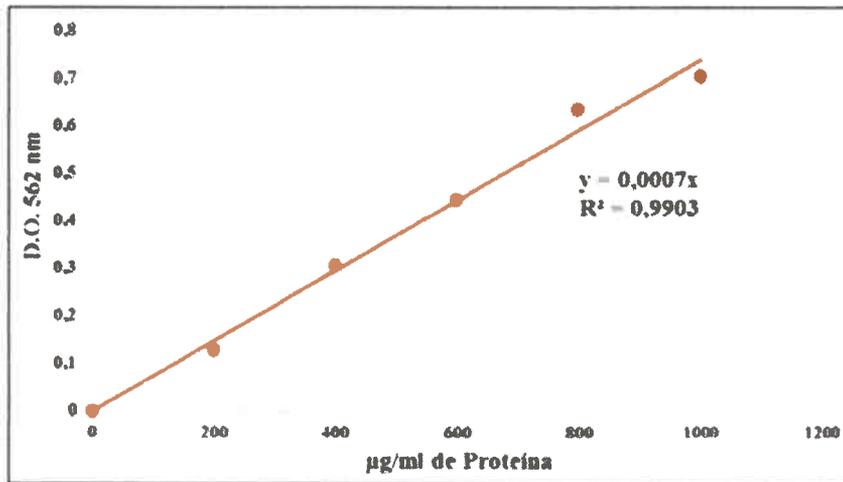


Fig. II.3. Curva de calibración ácido bicinonínico

Anexo III:

*Determinación de
la Resistencia o
Susceptibilidad a
Antibióticos*





ANEXO III: DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

▣ Medio LB suplementado con cloranfenicol (cm) 100 μ g/ml: crece *P. putida* SJ04 pero no *B. subtilis* GB03.



Fig. III.1. Medio LB suplementado con Cm 100 μ g/ml.

▣ Medio LB suplementado con polimixina (pol) 15 μ g/ml: crece *B. subtilis* GB03 pero se ve inhibido el desarrollo de *P. putida* SJ04.



Fig. III.2. Medio LB suplementado con Pol 15 μ g/ml.



Medio LB suplementado con cloranfenicol (Cm) 120 $\mu\text{g/ml}$: se observa crecimiento de *P. putida* SJ04 pero no de *P. simiae* WCS417r.



Fig. III.3. Medio LB suplementado con Cm 120 $\mu\text{g/ml}$.

Medio LB suplementado con kanamicina (Km) 150 $\mu\text{g/ml}$: crece *P. simiae* WCS417r pero no *P. putida* SJ04.



Fig. III.4. Medio LB suplementado con Km 150 $\mu\text{g/ml}$.



76699

(62)