

76700

DONACION

Don: Don. El Autor

Autor: Cocori, Adriana Beler

Exp:

Inv N: 76700





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
Departamento de Biología Molecular

Tesis para acceder al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO Y FUNCIONALIDAD DE MOLÉCULAS PRODUCIDAS POR
RAÍCES DE MANÍ Y RIZOBACTERIAS EN ESTRÉS HÍDRICO**

Microbióloga Adriana Belén Cesari

DIRECTOR: Dra. Marta S. Dardanelli

CODIRECTOR: Dra. Mirta B. García

Río Cuarto, Marzo 2017

76700

MFN:
Cust.
T-1130

COMISION ASESORA Y JURADO


Nombre y Apellido: Dra. Alicia Godeas.

Lugar de trabajo: Universidad de Buenos Aires.

Firma.....

Aclaración.....A. GODEAS.....

Nombre y Apellido: Dra. Mariana Melchiorre. Lugar de trabajo: Universidad Nacional de Córdoba

Firma.....

Aclaración.....Melchiorre.....

Nombre y Apellido: Dra. Elena Fernández.

Lugar de trabajo: Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma.....

Aclaración.....Elena Fernández.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha...Universidad Nacional de Río Cuarto. 22 de Marzo de 2017.....

Calificación.....

Con amor
A mis padres
Emma y Oscar

Agradecimientos

Es imposible olvidarme de aquel día que llegue al Laboratorio 17. A pocos meses de estar próxima a recibirme de Microbióloga, estaba buscando “trabajo” y sin tomar conciencia de lo que realmente se avecinaba, comencé a ingresar en este mundo de la investigación. Ya han transcurrido cinco años, y no puedo definir con una palabra todo lo que viví, más bien prefiero quedarme con todo lo que aprendí.

Durante estos años de arduo trabajo a fin de desarrollar todas las actividades y obtener los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, he logrado un importante desarrollo profesional y personal. Estoy inmensamente agradecida a todos quienes de una u otra manera hicieron que esto fuera posible, los llevaré siempre en mi alma.

En primer lugar agradecer a Dios, por la vida, por el lugar donde nací y por estar presente de esa manera tan especial en el interior del ser, señalándome siempre el mejor camino.

En segundo lugar agradecer a las instituciones y personas que han hecho posible mi formación como Doctora.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, dónde obtuve mi formación de Grado y luego desde hace cinco años me brindó no sólo un lugar y equipamientos necesarios para llevar a cabo el doctorado sino también importantes profesionales para dicha formación.

A la Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales (FCEFQyN) y al Departamento de Biología Molecular, lugar dónde desarrollé las actividades correspondientes a la Tesis Doctoral.

A las personas que componen la Secretaria de Postgrado de la FCEFQyN, por su buena disponibilidad para responder mis dudas y capacidad para resolver los problemas que fueron surgiendo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas de posgrado otorgadas para la realización de esta Tesis Doctoral. A las fuentes de financiamiento por becas y proyectos otorgados al grupo de investigación al cual pertenezco, entre ellas mencionar la Agencia Nacional de Promoción Científica, el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNRC.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), delegación de Córdoba, por permitirme realizar una pasantía de investigación.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP) por la beca otorgada para la realización de la estancia de investigación en la Universidad de Granada, España.

A los señores miembros de la comisión asesora y jurados de tesis, Dra. Alicia Godeas, Dra. Elena Fernández y Dra. Mariana Melchiorre, por sus tan valiosos aportes durante los informes de tesis que permitieron mejorar sustancialmente la calidad de este trabajo y por la excelente predisposición, esmero y celeridad en la corrección del manuscrito.

No me alcanzan las palabras de agradecimientos para aquellas personas que me formaron día a día durante estos cinco años de doctorado. A mi Directora de Tesis Doctoral, Dra. Marta Susana Dardanelli, aunque todos la llamamos Vicky. Gracias por darme lugar aquel día que aparecí en el laboratorio, por escucharme y abrirme las puertas del laboratorio, por tu esfuerzo y dedicación. Gracias por la libertad que me brindaste para trabajar y tomar decisiones, lo cual valoro mucho ya que no en todos los sitios siempre es posible y considero que no existe nada más agradable que trabajar con libertad, ya que te permite buscar y ampliar los horizontes tanto en lo que respecta a la investigación científica como en otros aspectos de la vida. Gracias.

A mi codirectora, Dra Mirta García, por su apoyo en mis comienzos, por sus consejos, aportes, correcciones y conocimientos transmitidos.

A mi codirectora no oficial, gran compañera, amiga y referente Dra. Natalia Paulucci. Naty!! Que puedo decir, estoy inmensamente agradecida a vos, son un ejemplo de vocación y sacrificio por el trabajo diario. Ante todo gracias por tu generosidad, por dar todo de vos al otro, a tus compañeros, por responder a mis dudas así te las pregunte mil veces, sea día de semana o fin de semana, siempre estas presente, no solo respondiendo con palabras sino trabajando al lado. Considero que sos una de las personas más importantes para mi formación como Doctora, aunque también me has enseñado mucho en la docencia. En lo que respecta a mi desarrollo personal, gracias por tus consejos y por tu oído todos estos años. Ojala pueda devolverte todo lo que me brindaste.

A la Dra. Inés Yslas, te conocí hace unos años y has hecho un lindo aporte al grupo con tu trabajo y presencia. Gracias por sumar más ganas en el trabajo, por estar presente aportando nuevas ideas, proyectos e iniciativas de interacción con otros grupos y hacer el trabajo más

interdisciplinario. Aparte de lo profesional, gracias por las charlas y mates compartidos por ser con nosotras como una becaria más, a pesar de que sos Directora de otras personas. Estoy segura de que en el futuro cercano nuestro trabajo juntas será fructífero.

A mis compañeros del Laboratorio 17. A quienes estuvieron y hoy ya no están trabajando con nosotros, y a los que en la actualidad están presentes. Gracias Yani, porque fuiste una de las primeras personas que me recibió y ayudó en el Lab, junto con Naty, principalmente con los lípidos. Por estar siempre presente, ayudando en lo que te pedí siempre. Gracias por los mates, los almuerzos compartidos, nuestras charlas sacando conclusiones de diversos temas, haciendo terapia de grupo, y porque no algunos llantos de por medio, pero siempre, siempre fueron más las risas! Cuando llegué al Lab también encontré a Julieta, habíamos comenzado la carrera juntas, pero no nos conocíamos muy bien. Y durante estos años todas las cosas que vivimos Juli solo puedo decirte gracias, por tu compañía, las risas, los mates, las cosas ricas, las charlas, tu ayuda y consejos. A pesar que hoy no trabajes en el mismo Lab, es tan fuerte el vínculo con el grupo que todo sigue igual que antes, eso dice más que las palabras. Que bello grupo!... Después llegó Cristopher, también habíamos sido compañeros durante la carrera, pero en estos años pude conocerte como compañero, y aportaste siempre buena onda y predisposición, simplemente decirte gracias por tu ayuda, colaboración y compañerismo. Desde el año pasado también compartiendo risas, charlas y lindos momentos con Alby, muchas gracias por tu apoyo, compañerismo, buena voluntad en todo, sos un gran aporte al grupo. Gracias a estas grandes personas yo sigo pensando... que bello grupo!

No puedo olvidarme de agradecer a Mariela Woelke, quien como técnica del Departamento de Biología Molecular, me ayudó siempre en los primeros años de mi doctorado. Gracias Mari por tus consejos, siempre con esa generosidad de madre. También estoy muy agradecida al técnico Miguel Bueno, no puedo definir su tarea, ya que sabe de todo y ayuda en todo. Gracias por tu buena predisposición siempre que te necesité. Gracias al Secretario del Departamento de Biología Molecular, Miguel Andrés, por su buena tarea desarrollada estos años, siempre informándome sobre las notas y otras cuestiones administrativas de las que poco conozco, gracias por tu calidez como persona.

Agradecer a demás a mis compañeros y compañeras de todos los laboratorios del Departamento de Biología Molecular por la buena onda, por prestarme siempre algún

reactivo que hacía falta y no teníamos, o un lugar en el baño de agitación, o intercambiar los turnos de la centrifuga, gracias por las explicaciones sobre algunas técnicas y apoyo durante los cursos de posgrado. Hago extensivo este agradecimiento a los profesores que me han brindado sus conocimientos y transmitido su experiencia a lo largo de todos estos años, ya sea a través de los cursos de posgrado, o simplemente en consultas que les realicé.

También quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron tanto en lo profesional así como en lo personal durante mi estadía en Granada, España, y han hecho de dicha estancia, una hermosa experiencia de vida. Gracias a la Dra. Carmen Luch Plá, por su predisposición a aceptarme en su laboratorio desde el primer momento que le envié un mail, y por su esfuerzo y dedicación para el pedido de la beca. Gracias por su ayuda cuando llegué a ese país tan lejano. Gracias a mis compañeros de laboratorio Miguel López Gómez y Javier Hidalgo, porque me ayudaron no solo en laboratorio, sino que dedicaron su tiempo en sacarme a pasear por Granada y organizar cenas y salidas. Gracias a Cristina, mi compañera de piso, que bella persona conocí, me hizo sentir siempre estar como en casa, por integrarme a su familia y acompañarme en muchos momentos. Espero regresar pronto a esa mágica ciudad.

En lo que respecta al desarrollo personal, y no tanto profesional, a lo largo de estos años, tengo mucho para agradecer. Los amigos...esas personas que uno elige en la vida...A mis amigas de toda la vida, Caro y Belén, por compartir tantos momentos, por escucharme, por las charlas y consejos. Gracias por acompañarme en este viaje. A mis amigas de hace muchos años, Mely, Mary, Yani, Viko, Ivi, Pame, a pesar de que la vida ha hecho que cada una siga su rumbo, la amistad y confianza que nos une es tan grande y siempre estaremos presentes. Son tan lindos los momentos que hemos compartido. Gracias por caminar a mi lado. A Aldy por la amistad de todos estos años, por ser una persona tan buena onda, con quien compartí y comparto muchas risas y gratos momentos. Gracias por hacerme conocer y ser partícipe del grupo las Pinkys, tan bellas personas todas, en especial gracias a mi amiga Lau, quien en estos últimos tiempos me ayudó mucho. Por muchos años de amistad, gracias por todo.

Ante todo gracias a mis padres Emma y Oscar, por estar siempre presente, por brindarme día a día su amor y todo su cariño, por escucharme estos años hablar de *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y *Arachis* a pesar de que no entendían muy bien de que les hablaba siempre

supieron aconsejarme. Gracias por la libertad que me dieron siempre, por dejarme tomar decisiones desde chica, por confiar en mí. Por los valores que me inculcaron, con eso fue suficiente para saber cómo actuar en mi vida, y ser la persona que soy hoy. Son grandes padres. Gracias a mis hermanas, Rosana, Daniela y María, por estar siempre presentes, por su apoyo, su compañía siempre es linda. Junto a mis padres, son el pilar fuerte en mi vida, a todos los amo con el corazón. Gracias a Tobías, ese niño tan feliz, mi sobri, gracias por llenar nuestras vidas de amor y felicidad. Gracias a mi nona, una mujer fuerte, bella, admirable, que con su experiencia de vida nos enseñó a toda la familia los mejores valores como ser humano. Gracias a mis abuelos que ya no están físicamente, María, Fiorino y José, aunque sé que desde arriba me guían.

Que puedo decir...si para mi familia no me alcanzan las palabras de agradecimientos... sólo puedo estar segura de que siempre estarán presentes, son lo más importante de mi vida.

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	XXIII
Índice de figuras	XXV
Resumen en español	XXIX
Resumen en inglés	XXXIII
Abreviaturas	XXXVIII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contexto general	5
1.1.1. Agricultura sustentable	5
1.1.2. El cultivo de <i>Arachis hypogaea</i>	7
1.1.3. El agua como factor limitante	9
1.1.4. Uso de microorganismos para mitigar el estrés hídrico en plantas	10
1.1.4.1. El género <i>Azospirillum</i>	12
1.1.4.2. El género <i>Bradyrhizobium</i>	13
1.2. Naturaleza química de la membrana bacteriana y su participación en la respuesta a cambios en el medio ambiente	15
1.2.1. Importancia de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas	15
1.2.2. Efectos los estreses abióticos sobre la membrana bacteriana y sus componentes	16
1.3. Interacción planta-microorganismo: características, eventos y mecanismos	20
1.3.1. Conceptos generales	20
1.3.2. Eventos tempranos de la interacción planta-microorganismos	21
1.3.2.1. Señales rizosféricas	21
1.3.2.2. Diversidad de compuestos biológicos presentes en las rizodeposiciones	23
1.3.2.3. Movilidad y quimiotaxis hacia exudados radicales	26
1.3.2.4. Adhesión bacteriana a raíces vegetales	27
1.3.3. Simbiosis rizobios- leguminosa y fijación biológica del Nitrógeno	29
1.3.4. Interacción triple rizobios-planta-PGPR	32
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.1. Hipótesis	37
2.2. Objetivo general	37
2.3. Objetivos específicos	37
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Metodología asociada al objetivo I	43
3.1.1. Material vegetal	43
3.1.2. Obtención de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i>	43

3.1.2.1. Solución Hoagland	45
3.1.2.2. Solución stock de micronutrientes	45
3.1.2.3. Solución de Hierro	45
3.1.3. Parámetros de crecimiento de <i>A. hypogaea</i>	45
3.1.4. Análisis de la composición molecular de rizodeposiciones	46
3.1.5. Análisis de la peroxidación lipídica en <i>A. hypogaea</i>	47
3.2. Metodología asociada al objetivo II	49
3.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	49
3.2.2. Medios de cultivo	50
3.2.2.1. Medio mínimo B (modificado)	50
3.2.2.2. Medio de cultivo D y D	50
3.2.2.3. Medio YEM	51
3.2.2.4. Medio mínimo NFB	51
3.2.3. Cálculo de los parámetros de crecimiento microbiano	52
3.2.4. Respuesta de las membranas bacterianas al déficit hídrico	53
3.2.4.1. Análisis lipídicos de la membrana bacteriana	53
3.2.5. Estudio del efecto del déficit hídrico en la membrana bacteriana	54
3.2.5.1. Análisis biofísico de la membrana bacteriana	54
3.2.5.2. Estudio del efecto del shock osmótico sobre la membrana bacteriana	55
3.3. Metodología asociada al objetivo III	56
3.3.1. Estudio del efecto del déficit hídrico sobre las etapas tempranas de la interacción planta-microorganismo	56
3.3.1.1. Ensayo de movilidad	56
3.3.1.2. Ensayo de quimiotaxis bacteriana hacia rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i>	56
3.3.1.3. Determinación del tamaño bacteriano de células vegetativas y diferenciadas	57
3.3.1.4. Adhesión de rizobacterias a raíces de <i>A. hypogaea</i>	57
3.3.1.5. Análisis de la producción de auxinas de las rizobacterias	58
3.3.2. Estudio del efecto del déficit hídrico sobre las etapas tardías de la interacción planta-microorganismo	58
3.3.2.1. Interacción <i>A. hypogaea</i> - <i>B. sp.</i> SEMIA 6144	58
3.3.2.2. Interacción triple <i>A. hypogaea</i> - <i>B. sp.</i> SEMIA 6144- <i>A. brasilense</i> Az 39	60
3.3.2.3. Parámetros de crecimiento de <i>A. hypogaea</i>	60
3.3.2.4. Estudio de la cinética de nodulación	61
3.3.2.5. Determinación de la aptitud simbiótica o capacidad infectiva	62
3.3.2.6. Análisis de la fijación biológica del nitrógeno bajo déficit hídrico	62
3.4. Análisis estadístico	63
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1. Efecto del déficit hídrico sobre los patrones de crecimiento y de exudación radical de <i>A. hypogaea</i>	69
4.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de PEG sobre el crecimiento y morfología de <i>A. hypogaea</i>	70
4.1.2. Efecto del déficit hídrico moderado sobre los parámetros de crecimiento de <i>A. hypogaea</i> a los 7 días	73

4.1.3. Composición molecular de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i> bajo déficit hídrico	75
4.1.3.1. Ácidos grasos	75
4.1.3.2. Flavonoides y auxinas	79
4.1.3.3. Ácidos orgánicos	81
4.1.3.4. Terpenos	83
4.1.4. Efecto del déficit hídrico en las membranas lipídicas de <i>A. hypogaea</i> .	84
4.2. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39. Membrana bacteriana: mecanismos de adaptación	89
4.2.1. Efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento de las rizobacterias	89
4.2.2. Efecto del déficit hídrico sobre la composición y metabolismo de lípidos de la membrana bacteriana	95
4.2.2.1. Análisis de ácidos grasos	95
4.2.2.2. Separación y análisis de fosfolípidos de la membrana bacteriana.	98
4.2.3. Dinámica de la membrana bacteriana durante la adaptación al déficit hídrico	101
4.2.3.1. Dinámica de la membrana celular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 bajo déficit hídrico	101
4.2.3.2. Dinámica de la membrana celular de <i>A. brasilense</i> Az 39 bajo déficit hídrico	106
4.3. Efecto del déficit hídrico en etapas tempranas de la asociación microorganismo- <i>A. hypogaea</i>	113
4.3.1. Efecto la inoculación sobre la composición de AG de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i>	113
4.3.2. Efecto del déficit hídrico sobre la movilidad y quimiotaxis bacteriana	117
4.3.3. Análisis del tamaño bacteriano	121
4.3.4. Efecto del déficit hídrico sobre la adhesión bacteriana a raíces de <i>A. hypogaea</i>	125
4.3.4.1. Adhesión de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 a raíces de <i>A. hypogaea</i> .	125
4.3.4.2. Adhesión de <i>A. brasilense</i> Az 39 a raíces de <i>A. hypogaea</i>	127
4.3.5. Cuantificación de AIA en rizobacterias	129
4.4. Efecto del déficit hídrico sobre las etapas avanzadas de la interacción <i>A. hypogaea</i> – microorganismo	133
4.4.1. Efecto de la inoculación simple y doble en <i>A. hypogaea</i>	133
4.4.2. Efecto de la inoculación sobre el contenido de MDA en plantas sometidas a déficit hídrico	139
4.4.3. Efecto del déficit hídrico en la cinética de nodulación de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en <i>A. hypogaea</i>	141
4.4.4. Efecto del déficit hídrico sobre la morfología del desarrollo nodular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en <i>A. hypogaea</i> en ausencia y presencia de <i>A. brasilense</i> Az 39	144
4.4.5. Efecto de la inoculación simple y la coinoculación sobre los parámetros de nodulación de <i>A. hypogaea</i>	148
4.4.6. Cálculos de los parámetros IRPA, RGR y df/dt	152
4.4.7. Efecto del déficit hídrico y la presencia de <i>A. brasilense</i> Az 39 sobre la actividad nitrogenasa de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144	155

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	159
PERSPECTIVAS	169
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1.	Composición química de rizodeposiciones de diversas especies vegetales.	23
1.2.	Composición química de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i> . L, creciendo bajo condiciones control y de déficit hídrico.	77
1.3.	Efecto del estrés hídrico sobre los parámetros de crecimiento en <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	93
1.4.	Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de AG.	96
1.5.	Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de PL.	100
1.6.	Efecto del estrés hídrico sobre la movilidad de tipo swarming y swimming de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	117
1.7.	Efecto del estrés hídrico sobre la longitud celular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39, en diferentes condiciones de crecimiento.	123
1.8.	Parámetros de nodulación de <i>A. hypogaea</i> en condiciones control y de estrés hídrico inoculada con <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y coinoculada con <i>A. brasilense</i> Az 39.	150
1.9.	Efecto del déficit hídrico y de la inoculación simple y coinoculación, sobre los parámetros IRPA, RGR y df/dt en plantas de 33 días de crecimiento.	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Distribución geográfica del cultivo de maní en la República Argentina.	6
1.2. Características botánicas relacionadas a <i>A. hypogaea</i> .	8
1.3. Ejemplos de interacciones en la rizósfera entre las plantas y otros organismos.	11
1.4. Representación esquemática de los parámetros de la fluidez de membrana.	19
1.5. Proceso bifásico de adhesión de <i>A. brasilense</i> a la superficie radical de la planta.	28
1.6. Diferentes estadios de la infección a través de hilo radical y de crack entry.	30
3.1. Sistema hidróponico de tubo empleado para la recolección de rizodeposiciones.	44
3.2. Plantas de <i>A. hypogaea</i> sembradas en sistemas de vasos plásticos en cámara de cultivo de plantas.	59
4.1. Relación entre peso seco de <i>A. hypogaea</i> de 7 días de crecimiento con respecto al potencial hídrico de la solución Hoagland.	71
4.2. Plantas de <i>A. hypogaea</i> L luego de 7 días de crecimiento bajo diferentes condiciones.	72
4.3. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre plantas de maní de 7 días de crecimiento.	74
4.4. Efecto del estrés hídrico en la peroxidación de los lípidos en hojas y raíces de <i>A. hypogaea</i> de 7 de crecimiento.	85
4.5. Curva de crecimiento de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144.	91
4.6. Curva de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Az 39 crecida en condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM)	91
4.7. Evaluación cualitativa de la viabilidad celular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39 (LIVE/DEAD®).	92
4.8. Cambios en la polarización de la sonda DPH en células <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 después de shock osmótico (PEG).	102
4.9. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de AG y PL.	104
4.10. Cambios en la polarización de DPH en células <i>A. brasilense</i> Az 39 después de shock osmótico (PEG).	107
4.11. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de AG y PL de <i>A. brasilense</i> Az 39.	108
4.12. Ácidos grasos detectados en rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i> inoculadas y recolectadas luego de 7 días de crecimiento.	116
4.13. Fotografías de placas de movilidad de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	118
4.14. Fotografías tomadas con microscopio óptico, de células vegetativas y células swarmer y swimming de: <i>A. B. sp.</i> SEMIA 6144; <i>B. A. brasilense</i> Az 39.	124
4.15. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento.	126
4.16. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de <i>A. brasilense</i> Az 39 a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento.	128
4.17. Efecto del déficit hídrico en la producción de AIA de <i>A. brasilense</i> Az 39 y <i>B. sp.</i> SEMIA 6144.	130
4.18. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) y de la inoculación y coinoculación en plantas de <i>A. hypogaea</i> durante 33 días.	134

4.19.	Efecto conjunto de la inoculación y el estrés hídrico sobre plantas de maní de 33 días.	137
4.20.	Efecto del estrés hídrico y de la inoculación simple y doble en la peroxidación de los lípidos en hojas de <i>A. hypogaea</i> de 7 y 30 días de crecimiento.	140
4.21.	Estudio de la cinética de nodulación de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en plantas de <i>A. hypogaea</i> en ausencia o presencia de estrés hídrico.	142
4.22.	Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 inoculada en plantas de <i>A. hypogaea</i> .	145
4.23.	Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en plantas de <i>A. hypogaea</i> coinoculada con <i>A. brasilense</i> Az 39.	146
4.24.	Raíces y nódulos de plantas inoculadas de <i>A. hypogaea</i> de 22 y 33 días de crecimiento.	147
4.25.	Raíces y nódulos de plantas coinoculadas de <i>A. hypogaea</i> de 22 y 33 días de crecimiento.	148
4.26.	Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de fijación de N ₂ .	157
4.27.	Esquema integrador de resultados y conclusiones.	167

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo y Argentina es uno de los principales países productores del mundo, concentrando su producción en la provincia de Córdoba. El déficit hídrico es uno de los principales estreses abióticos, por lo que es importante el estudio de su efecto sobre la planta de maní y los microorganismos rizosféricos, así como el estudio de moléculas y de mecanismos de tolerancia involucrados en la adaptación. De éste modo es posible planificar nuevas estrategias que favorezcan dicha interacción en condiciones de déficit hídrico.

En base a la problemática planteada, el objetivo general de esta investigación fue estudiar los cambios que se desencadenan en *Arachis hypogaea* L. así como en las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39 frente al déficit hídrico. Para ello se abordó la investigación de compuestos biológicos producidos por las raíces de maní en condiciones de déficit hídrico; el efecto que este tipo de estrés tiene sobre componentes celulares de rizobacterias que se asocian a maní para luego determinar el efecto del déficit hídrico en etapas tempranas y tardías de la asociación microorganismos-maní.

El déficit hídrico moderado (-0,28 MPa) causó reducción en los parámetros de crecimiento de *A. hypogaea* L, siendo más sensible la parte aérea que la raíz. Dicha condición indujo estrés oxidativo (manifestado por un incremento en la peroxidación lipídica), así como también cambios fisiológicos exhibiendo modificaciones en el patrón de exudados radicales. Mediante técnicas cromatográficas se determinó que en la respuesta al déficit hídrico estuvieron involucradas diversas moléculas de señalización celular, como el ácido graso oleico (18:1 Δ^9), los flavonoides naringenina y hesperidina, el aminoácido triptófano, los ácidos orgánicos láctico y succínico así como también monoterpenos así como los sesquiterpenos farnesol y nerodiol.

El estrés hídrico afectó negativamente el crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, aunque ambas bacterias lograron adaptarse al efecto que causa el déficit hídrico. La medida de la polarización de fluorescencia luego de aplicar un shock osmótico sobre las bacterias, indicó que el efecto inmediato del déficit hídrico consiste en fluidificar la membrana bacteriana. La respuesta a este efecto fue dinámica para ambas cepas, y se logró mediante la modificación del grado de insaturación de los ácidos grasos así como en la composición de fosfolípidos. De ésta forma, las rizobacterias restauran la fluidez óptima de la membrana y la viabilidad celular luego del shock.

Respecto a las etapas tempranas de la interacción *A. hypogaea* - rizobacterias, el déficit hídrico no afectó la movilidad de *B. sp. SEMIA 6144* y favoreció a la cepa *A. brasilense Az 39*. Ambas rizobacterias mostraron quimiotaxis hacia los exudados radicales de la planta de maní. El siguiente paso en el proceso de interacción investigado fue la adhesión de células bacteriana a las raíces y fue mayor en plantas sometidas a déficit hídrico, lo cual resultó importante para mantener la interacción bajo ésta condición ambiental adversa. A pesar de ello, la simbiosis *A. hypogaea* - *B. sp. SEMIA 6144* resultó sensible al estrés, los parámetros de nodulación y de fijación biológica del Nitrógeno, medida mediante el análisis de intercambio de gases, fueron reducidos. Aun así, la inoculación mitigó los efectos negativos del déficit hídrico sobre el crecimiento vegetal. La coinoculación favoreció el desarrollo de las plantas sometidas a estrés hídrico, aunque sus efectos fueron menores a la inoculación simple, bajo las dosis estudiadas. La presencia de *A. brasilense Az 39* así como el déficit hídrico, no afectaron la eficiencia de la nitrogenasa. Por lo tanto, la reducción en la tasa de fijación de Nitrógeno se debe principalmente a la disminución en la biomasa nodular y no a un efecto sobre la actividad enzimática.

Los resultados de éste trabajo de Tesis Doctoral brindan las primeras evidencias de los cambios fisiológicos y bioquímicos a los que está sujeta la leguminosa *A. hypogaea* L así como las rizobacterias *B. sp. SEMIA 6144* y *A. brasilense Az 39*, frente al déficit hídrico. La adaptación al estrés permite el establecimiento de la interacción planta-bacteria, y mitiga los efectos negativos del estrés hídrico, consiguiendo así mejor crecimiento de *A. hypogaea* L en ambientes donde ocurre dicha condición ambiental.

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the most important legume crops in the world and Argentina is one of the main producing countries of the world, concentrating its production in Córdoba province. The water deficit is one of the main abiotic stresses, so it is important to study its effect on the peanut plant and the rhizospheric microorganisms, as well as the study of molecules and mechanisms of tolerance involved in adaptation. In this way it is possible to plan new strategies that favor such interaction in conditions of water deficit. Based on the problems raised, the general objective of this research was to study the changes that occur in *Arachis hypogaea* L. as well as in the rhizobacteria *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 and *Azospirillum brasilense* Az 39 against the water deficit. In order to do this, we investigated the biological compounds produced by the peanut roots under water deficit, the effect that this type of stress has on cellular components of these rhizobacteria and then determine the effect of water deficit in the early and late stages of the microorganism-peanut association.

The moderate water deficit (-0.28 MPa) caused a reduction in the growth parameters of *A. hypogaea* L, the aerial part being more sensitive than the root. This condition induced oxidative stress (manifested by an increase in lipid peroxidation), as well as physiological changes exhibiting changes in the pattern of radical exudates. A number of cell signaling molecules, such as oleic fatty acid (18: 1 Δ 9), flavonoids naringenin and hesperidin, tryptophan amino acid, organic lactic acid and succinic acid were involved in the response to water deficit. As well as monoterpenes as well as the sesquiterpenes farnesol and nerodiol.

Water stress negatively affected the growth of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 and *Azospirillum brasilense* Az 39, although both bacteria were able to adapt to the effect that causes the water deficit. The measurement of the fluorescence polarization after osmotic shock on the bacteria indicated that the immediate effect of the water deficit is to fluidize the bacterial membrane. The response to this effect was dynamic for both strains, and was achieved by modifying the degree of unsaturation of the fatty acids as well as in the phospholipid composition. In this way, the rhizobacteria restore the optimal fluidity of the membrane and the cell viability after the shock.

Regarding the early stages of *A. hypogaea* - rhizobacteria interaction, the water deficit did not affect the mobility of *B. sp.* SEMIA 6144 and favored the strain *A. brasilense* Az 39. Both rhizobacteria showed chemotaxis towards the radical exudates of the peanut plant. The next

step in the interaction process investigated was the adhesion of bacterial cells to the roots and was higher in plants subject to water deficit, which was important to maintain the interaction under this adverse environmental condition. In spite of this, the symbiosis *A. hypogaea* - *B. sp.* SEMIA 6144 was sensitive to stress, the nodulation and biological nitrogen fixation parameters measured by the gas exchange analysis were reduced. Even so, inoculation mitigated the negative effects of water deficit on plant growth. The co-inoculation favored the development of plants subjected to water stress, although their effects were smaller than the simple inoculation, under the doses studied. The presence of *A. brasilense* Az 39 as well as the water deficit did not affect the efficiency of the nitrogenase. Therefore, the reduction in Nitrogen fixation rate is mainly due to the decrease in nodular biomass and not to an effect on enzymatic activity.

The results of this Doctoral Thesis provide the first evidence of the physiological and biochemical changes to which the legume *A. hypogaea* L., as well as the *B. sp.* SEMIA 6144 and *A. brasilense* Az 39, against the water deficit. The adaptation to stress allows the establishment of plant-bacteria interaction, and mitigates the negative effects of water stress, thus achieving better growth of *A. hypogaea* L., in environments where such an environmental condition occurs.

ABREVIATURAS

AG	Ácido graso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indol acético
Al	Aluminio
ANA	Actividad nitrogenasa aparente
ANOVA	Análisis de la Varianza (Analysis of Variance)
BS	Biomasa seca
C	Carbono
Cap	Capítulo
°C	Grado centígrado
¹⁴ C	Isótopo radiactivo del carbono 14
Ci	Curie
cm	Centímetro
CL	Cardiolipina
col	Colaboradores
c.s.p	Cantidad suficiente para
cv.	Cultivar
DO	Densidad óptica
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5 -hexatriene
EAC	Coefficiente de alocaión electrónica
ER	Exudado radical
FAME	Fatty Acid Methyl Esther
FAO	Food and Agriculture Administration
FBN	Fijación biológica del Nitrógeno
Fe	Hierro
FTIR	Fourier Transform Infrared
g	Gramos
GC	Gas Chromatography

H ₂ O (d)	Agua destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Ha	Hectárea
HPLC	High Performance Liquid chromatography
HPLC-MS	HPLC- Mass Spectrometry
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRPA	Índice raíz/parte aérea
I/S	Insaturado/Saturado
M	Molar
MDA	Malonaldehído
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mn	Manganesio
mM	Milimolar
MPa	Mega Pascal
NBD-PC	(1-oleoil-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) amino] dodecanoil}-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)])
N ₂	Nitrógeno molecular
NaCl	Cloruro de sodio
ND	No detectado
NI	No identificado
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NFR	Tasa de fijación de nitrógeno
PA	Parte aérea
P. (pp)	Página/s
PEG	Polietilenglicol
PG	Fosfatidilglicerol

PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	Logaritmo decimal negativo de la actividad molar de los iones H ⁺
PL	Fosfolípidos
PLA	Fosfolipasa A
PR	Parte raíz
RGR	Tasa de crecimiento relativo
r.p.m	Revoluciones por minuto
RS	Raíz seca
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
S.E.M	Desviación estándar de la media
s.	Segundo
sp./spp.	Especie/s
Swa	Swarming
Swi	Swimming
T	Temperatura
TBARS	Ácido tiobarbiturico
TBA	Ácido tiobarbiturico
TLC	Cromatografía en capa fina
Tn	Toneladas
TNA	Actividad nitrogenasa total
Trp	Triptófano
UFC	Unidad formadora de colonias
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Vol.	Volumen
YEM	Medio manitol-extracto de levadura
YEMA	Medio manitol- extracto de levadura- agar
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
ψo	Potencial osmótico

%	Por ciento
<	Menor
>	Mayor
®	Registrado

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1. Introducción

- 1.1. Contexto general. Importancia de las leguminosas y las rizobacterias.
- 1.2. Naturaleza química de la membrana bacteriana y su participación en la respuesta a cambios en el medio ambiente.
- 1.3. Interacción planta-microorganismo: características, eventos y mecanismos.

ÍNDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN

	Página
1.1. Composición química de rizodeposiciones de diversas especies vegetales.	23

ÍNDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

1.1. Distribución geográfica del cultivo de maní en la República Argentina.	6
1.2. Características botánicas relacionadas a <i>A. hypogaea</i> .	8
1.3. Ejemplos de interacciones en la rizósfera entre las plantas y otros organismos.	11
1.4. Representación esquemática de los parámetros de la fluidez de membrana.	19
1.5. Proceso bifásico de adhesión de <i>A. brasilense</i> a la superficie radical de la planta.	28
1.6. Diferentes estadios de la infección a través de hilo radical y de crack entry.	30

1.1. Contexto general. Importancia de las leguminosas y las rizobacterias

1.1.1. Agricultura sustentable. Conceptos, realidades y perspectivas

Debido al rápido incremento de la población, la cual se prevé que será de 9,4 mil millones para el año 2050, la producción de alimentos en todo el mundo deberá acrecentar significativamente para satisfacer las necesidades de alimentos en los próximos años. En este contexto, la agricultura enfrenta el desafío de cubrir la demanda creciente de alimentos (FAO, 2015).

A nivel mundial, los cultivos de leguminosas han experimentado el mayor aumento de superficie cultivada en comparación con otros cultivos. Las leguminosas son una fuente esencial de proteínas y aminoácidos de origen vegetal para la población de todo el mundo, y se deben consumir como parte de una dieta saludable para combatir, prevenir y ayudar a controlar enfermedades; también son una importante fuente de proteína de origen vegetal para los animales (FAO, 2016). Además, en simbiosis con rizobios las leguminosas tienen la propiedad de fijar el nitrógeno atmosférico (N_2), lo que puede contribuir a aumentar la fertilidad del suelo, aportando efectos positivos en el medio ambiente. Tal es la importancia de las leguminosas que en los últimos años se ha incentivado su cultivo como parte de una producción de alimentos sostenible orientada a lograr la seguridad alimentaria y la nutrición (FAO, 2016).

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo y proporciona alimentos de subsistencia directa y otros productos alimenticios (Celikkol *et.al*, 2010). Su semilla contiene aproximadamente un 50% de lípidos y un 25% de proteína de su peso seco (Xiao-gang Li *et.al*, 2013). Argentina es uno de los principales exportadores de maní en el mundo junto con China y Estados Unidos, ocupando hoy el primer lugar en las exportaciones de maní de alta calidad.

En la República Argentina, el maní ha sido objeto, a partir de mediados de la década del 70, de un cambio en el paradigma de su producción, producto de una serie de factores locales e internacionales. La consecuencia final ha sido el vuelco de la clásica producción con destino a la obtención de aceite, orientándose a partir de ese momento a la producción de maní

confitería, segmento del mercado mundial en el que nuestro país ha alcanzado un liderazgo en materia de exportaciones.

En la Figura 1.1.A., se observa la distribución geográfica del cultivo de maní en función del área sembrada promedio de las últimas cinco campañas. En Argentina se destinan aproximadamente unas 340 mil has para la siembra de maní, distribuidas entre el sur de la provincia de Córdoba, este de San Luis, norte de la Pampa y norte de Salta (MINAGRI, 2015). La provincia de Córdoba es la principal productora de maní en el país (Figura 1.1.A.), constituyéndose esta en una economía regional de importancia destacada para la zona. En 2016, la superficie cultivada en Córdoba llegó a las 313 mil has (92% del total nacional) con una producción de 859 mil tns, siendo las principales localidades productoras, Gral. Roca, Río Cuarto, Juárez Celman, Gral. San Martín, Tercero Arriba, Río Segundo (Figura 1.1.B.) (Gastaldi, 2016).

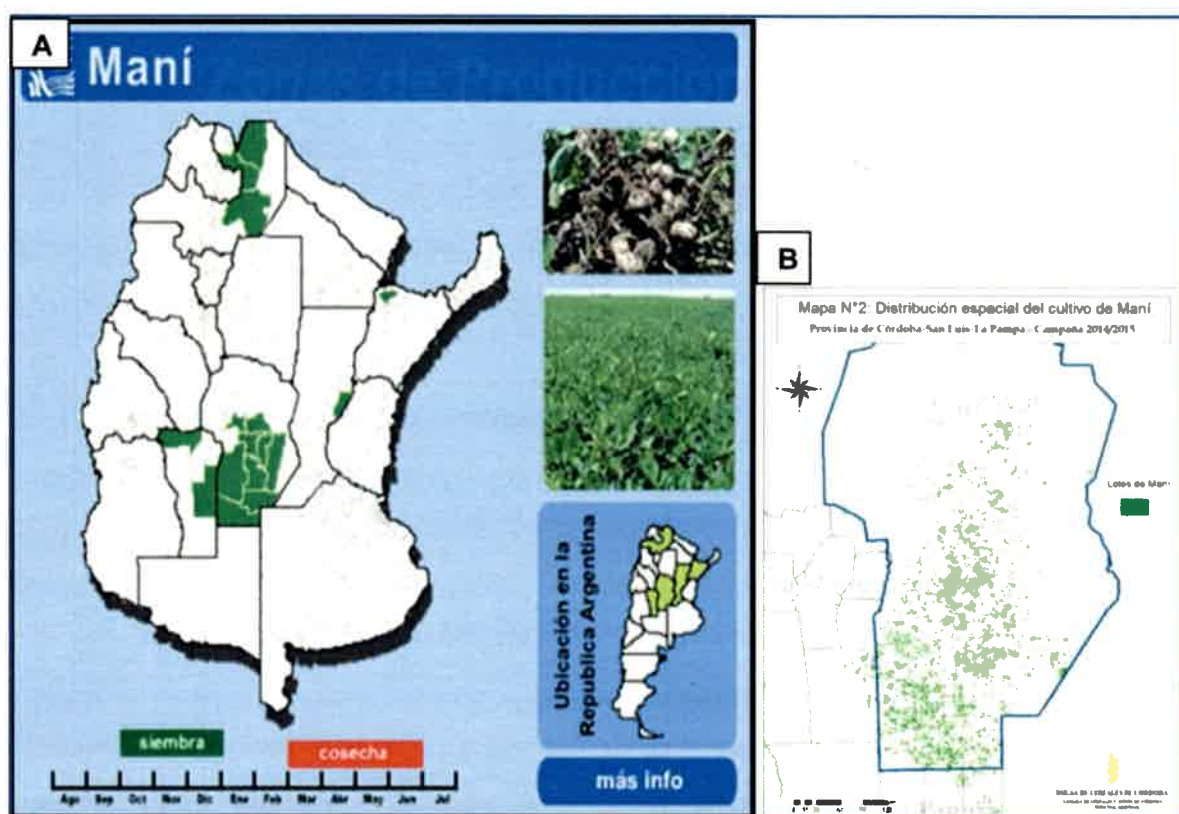


Figura 1.1. A. Distribución geográfica del cultivo de maní en la República Argentina (SAGPyA). B. Distribución de los lotes de maní, identificados con imágenes satelitales como los rendimientos ponderados (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2014).

Se sabe que la agricultura es vulnerable al cambio climático, que involucra diferentes estreses abióticos y es urgente el desarrollo de nuevas estrategias para minimizar los impactos negativos con el fin de aumentar la productividad de los cultivos. Diversos estudios han indicado que los microorganismos del suelo pueden ayudar a los cultivos a soportar los estreses abióticos de manera más eficiente. Algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria) pueden colonizar la rizósfera de muchas especies de plantas y conferir efectos beneficiosos así como también promover cambios físicos o químicos relacionadas con la defensa de la planta, para lograr así mayor tolerancia al estrés abiótico.

1.1.2. El cultivo de *Arachis hypogaea*

El maní es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo. Es originario de Sudamérica, donde el género *Arachis* está ampliamente distribuido en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay. El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) establece la siguiente clasificación botánica para esta leguminosa:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta (Plantas con flores)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae/Leguminosae

Género: *Arachis* L.

Especie: *Arachis hypogaea* L.

Subespecies:

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

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

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

El maní es una leguminosa perteneciente a la familia de las Fabáceas, presenta un crecimiento de tipo anual estival (crece de primavera a otoño), requiere temperaturas cálidas

para su crecimiento y desarrollo (Gillier y Silvestre, 1970). La temperatura óptima del suelo para su siembra debe ser igual o mayor a 16°C, y en nuestro país se logra normalmente en la segunda quincena del mes de Octubre (Pedelini, 2008). La planta de maní llega a medir de 30 a 50 cm de altura según las variedades y las condiciones del medio, su tallo principal es ascendente y presenta ramificaciones, las cuales pueden ser ascendentes, o pueden crecer sobre el suelo en las formas rastreras (Figura 1.2.), (Gillier y Silvestre, 1970).

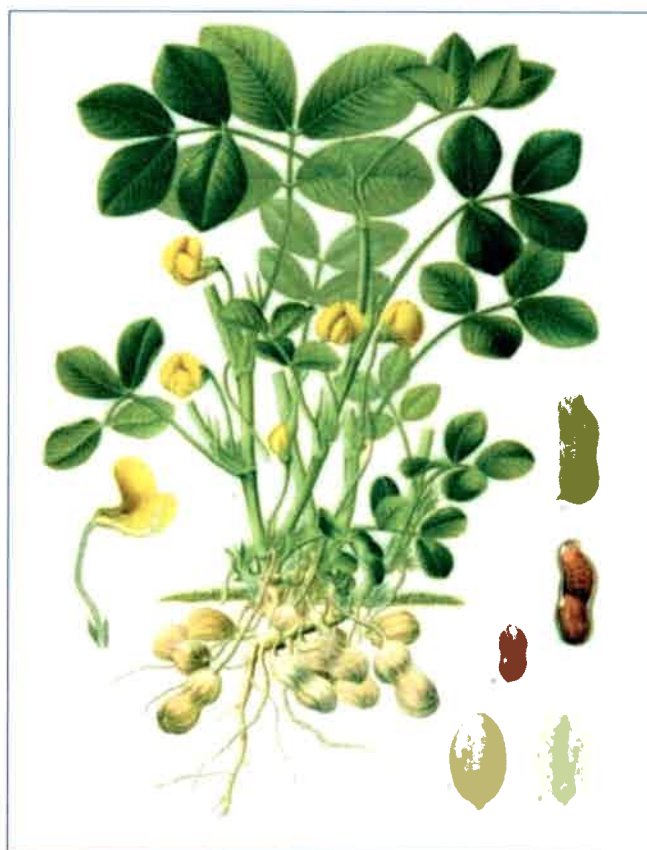


Figura 1.2. Características botánicas relacionadas a *Arachis hypogaea*.

El sistema radical está formado por un pivote central que puede hundirse a más de 1,30 m en los suelos cultivados, y por raíces laterales que nacen a diversas alturas de este pivote y se ramifican para constituir una densa cabellera. Las raíces laterales presentan pelos radiculares (Krauss *et.al*, 1996; Bonadeo *et.al*, 2003). Los frutos crecen bajo el suelo, dentro de una vaina leñosa, redondeada, que llega a medir de 2 a 7 cm, y que contiene de 1 a 5 semillas. Éstas son alargadas o redondeadas, con tegumento muy delgado, su peso puede variar entre 0,3 a 1,5 gr

(Pedelini, 2008). En condiciones normales la semilla de maní requiere de un suelo húmedo y con temperatura adecuada para su germinación y emergencia. Necesita embeberse con agua en un 35% o más de su peso para que se desencadene este proceso. El crecimiento de la raíz es la actividad dominante durante la etapa de germinación y emergencia de las plántulas. La radícula emerge a los 1 o 2 días de producida la germinación, la velocidad de avance y la profundidad del sistema radical final pueden modificarse por factores ambientales y de suelo (Sinavimo, 2016; Giayetto, 2006)

1.1.3. El agua como factor limitante

Los actuales sistemas de producción agrícola están sometidos constantemente a factores causantes de estrés como ataques de plagas, enfermedades, condiciones climáticas extremas (elevada temperatura, déficit hídrico y salinidad), deterioros de calidad nutricional de los suelos (Berry *et.al*, 2006). Estos factores afectan negativamente a la calidad y el rendimiento de los cultivos. En referencia a la agricultura y su panorama a futuro, una de las problemáticas mundiales, es el aumento tanto en la frecuencia como en la gravedad de los episodios de sequía y se prevé que las zonas afectadas por ella aumenten en extensión. A escala mundial, el rendimiento potencial de los cultivos se ve reducido por factores ambientales en un 70% y de este porcentaje, un 45% de la disminución del rendimiento es debido al déficit hídrico (Revista Europaexpress, 2013). De hecho, la escasez de agua causante de un estrés hídrico es el principal obstáculo para el crecimiento y la productividad de las plantas en gran parte de la superficie de la tierra dando como consecuencia una reducción de las áreas sembradas y de la productividad de los cultivos (Reddy *et.al*, 2003; Kramer 1983). Respecto a Argentina, los modelos climáticos indican que habrá un aumento generalizado de la temperatura media, principalmente en el norte del país, con más de 1 °C hacia el período 2020-2040. Ello agravaría las condiciones extremas que junto a las precipitaciones escasas incrementaría el déficit hídrico (MINAGRI, 2014). Investigaciones realizadas sobre diversas áreas geográficas revelaron que la vulnerabilidad de las plantas al déficit hídrico es dinámica y resulta de la combinación de factores biofísicos, de la administración y del uso del suelo y de las políticas agrícolas (Wilhite, 2000).

Frente a estos problemas, el campo de la investigación agropecuaria concibió la necesidad de pensar en nuevas estrategias que permitan incrementar los rendimientos agrícolas. La microbiología agrícola tiene mucho para aportar a los sistemas agropecuarios, para la producción y la sustentabilidad, ya que ofrece alternativas agronómicas eficientes, limpias y de bajo costo (Ventimiglia y Torreus Baudrix, 2008). Esto transforma en relevante el estudio de moléculas y de mecanismos de tolerancia que los cultivos expresen y sobre todo el rol de los microorganismos para promover su crecimiento y protegerlos de situaciones adversas. De éste modo es posible ampliar el conocimiento sobre la interacción planta-bacteria y planificar nuevas estrategias que favorezcan dicha interacción en condiciones de déficit hídrico.

1.1.4. Uso de microorganismos para mitigar el estrés hídrico en plantas

La sequía es la causa más común de insuficiencia grave de alimentos, especialmente en países en desarrollo, y constituye uno de los desencadenantes naturales más importantes de la malnutrición y la hambruna. Analizando estas consideraciones podemos resumir que el déficit hídrico es uno de los principales estreses abióticos, por lo que es importante el estudio de su efecto sobre la planta de maní y los microorganismos rizosféricos, para buscar estrategias sustentables que contribuyan a prevenir y/o mitigar dichos efectos.

La rizósfera es un ecosistema complejo que consta de una estrecha zona alrededor de la raíz de la planta donde existe una gran diversidad de microorganismos. Entre ellos se destacan los microorganismos PGPR, los cuales son capaces de establecer diferentes procesos de comunicación con las raíces de las plantas (Figura 1.3.) y que repercuten en beneficio para las mismas, estimulando su crecimiento (Kloepper y Schroth, 1980; Zhang *et.al*, 2015). Durante los últimos años se ha incrementado el uso de microorganismos para mejorar el rendimiento de los cultivos, su sanidad, la tolerancia al estrés y la eficiencia en el uso de insumos fertilizantes, entre otros (Adesemoye y Kloepper, 2009). El uso de inoculantes en base a microorganismos PGPR reúne a especies de diferentes géneros como por ejemplo *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y dentro de los hongos las micorrizas (González *et.al*, 2004). Algunos microorganismos PGPR pueden aumentar la resistencia de las plantas a factores desfavorables del medio ambiente como la

sequía, la salinidad y metales pesados (Creus *et.al*, 2005; Cohen *et.al*, 2009; Dodd *et.al*, 2010). Los suelos de la zona manisera se caracterizan por presentar una población nativa de rizobios capaces de nodular maní. Aun cuando existen en el suelo bacterias que están capacitadas para establecer la simbiosis, estas no siempre son lo suficientemente efectivas ya que pueden estar limitadas por factores ambientales (Giayetto, 2006).

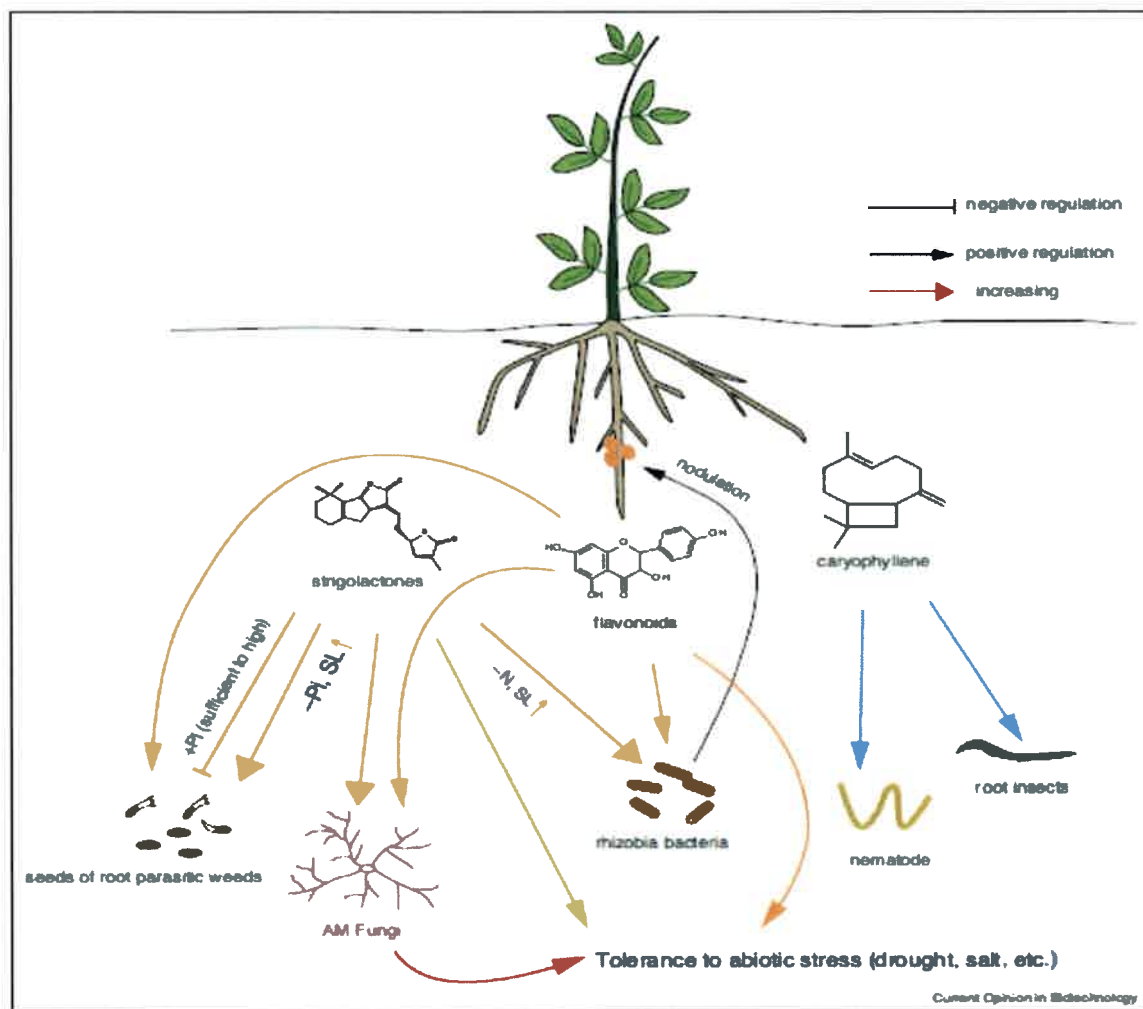


Figura 1.3. Ejemplos de interacciones en la rizósfera entre las plantas y otros organismos. Raíces de las plantas liberan señales químicas en la rizósfera, tales como flavonoides y b-cariofileno para mediar en las interacciones con otros organismos (Zhang *et.al*, 2015).

1.1.4.1. El género *Azospirillum*

Las especies del género *Azospirillum* son las PGPR más estudiadas por su capacidad de mejorar el crecimiento y desarrollo así como el rendimiento de numerosas especies vegetales cultivables (Dardanelli *et.al*, 2008b; Star *et.al*, 2012). Presentan una amplia distribución geográfica alrededor del mundo y han sido aisladas de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizosfera, incluyendo cereales, especies forrajeras, cactáceas, entre otras (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

El género *Azospirillum* está compuesto por bacterias pertenecientes a la subclase alfa de las proteobacterias (Okon y Labandera, 1994). Son bacilos anchos ligeramente curvados o rectos, Gram negativos o Gram variables que miden 0,6-0,7 x 2,1-3,8 μm . Poseen gránulos de reserva intracelulares de poly- β -hidroxibutirato. Presentan de uno a seis plásmidos, siendo el primordial el *p-90* involucrado en la biosíntesis del ácido indol acético (AIA) y en la adherencia a las raíces (Caballero-Mellado *et.al*, 1999). Hasta el presente se han descrito 19 especies: *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum canadense*, *Azospirillum doebereineriae*, *Azospirillum formosense*, *Azospirillum halopraeferens*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum melinis*, *Azospirillum oryzae*, *Azospirillum picis*, *Azospirillum rugosum*, *Azospirillum thiophilum*, *Azospirillum agrícola*, *Azospirillum fermentarium*, *Azospirillum formosense*, *Azospirillum humicireducens* y *Azospirillum zaeae* (Tarrand *et.al*, 1978; Skerman *et.al*, 1980; Magalhães *et.al*, 1983; Reinhold *et.al*, 1987; Khammas *et.al*, 1991; Ben Dekhil *et.al*, 1997; Eckert *et.al*, 2001; Xie y Yokota, 2005; Peng *et.al*, 2006, Mehnaz *et.al*, 2007a; Mehnaz *et.al*, 2007b; Young *et.al*, 2008; Lin *et.al*, 2009; Lavrinenko *et.al*, 2010; Lin *et.al*, 2012, 2016). Han sido aisladas de la rizósfera de diferentes suelos y cultivos en todo el mundo, tanto en climas tropicales como templados (Döbereiner y Day, 1976). Son bacterias diazotróficas de vida libre con capacidad de colonizar los tejidos internos y externos de las raíces (Bashan y Harrison, 1990). El pH del suelo juega un importante papel en la presencia de *Azospirillum*. Las especies de *A. lipoferum* y *A. brasilense* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, no lográndose su aislamiento en suelos con pH menor a 4,5 (Döbereiner *et.al*, 1976).

Poseen un metabolismo aeróbico, pero algunas cepas pueden utilizar nitrato o nitrito como aceptor final de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento varía desde 33 a 41° C. Son fijadores de nitrógeno de vida libre y poseen un metabolismo de carbono y nitrógeno muy versátil, que les permite una buena adaptación para establecerse en el competitivo ambiente de la rizósfera. Presentan movilidad a través de un flagelo polar en cultivos líquidos, y por numerosos flagelos laterales en medios sólidos. Observaciones microscópicas de raíces inoculadas con *Azospirillum*, revelaron la presencia de dos tipos celulares: una forma celular altamente móvil y una forma sésil, llamada quistes (Sadasivan y Neyra, 1985).

Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal está relacionado con la capacidad de *Azospirillum* de producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tales como la producción de AIA y en menor cantidad ácido indol-3-butírico (AIB) y de citocininas y giberilinas (Okon y Labandera, 1994). Se han propuesto diferentes vías de síntesis del AIA en *Azospirillum*, tres vías de síntesis dependientes de triptófano (Trp) y una vía independiente de Trp (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

1.1.4.2. El género *Bradyrhizobium*

En la rizosfera también podemos encontrar otros géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Trichoderma*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, hongos micorríticos y los rizobios. Bajo éste último término general se agrupan bacterias Gram negativas del suelo pertenecientes a los géneros de *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (González *et.al*, 2004). Estos organismos pueden asociarse con las raíces de leguminosas, mediante un diálogo molecular entre planta y rizobio para dar lugar a la formación de un nuevo órgano, el nódulo, que da lugar en su interior al proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), la interacción más exitosa desde el punto de vista agronómico.

El género *Bradyrhizobium* está formado por bacterias Gram negativas, aerobias, con forma de bacilos de 1,2 a 3,0 μm de longitud, presentan un flagelo polar o subpolar, son pleomórficas y no generan esporas. Su crecimiento en medio enriquecido con levadura es pobre y lento, requieren de 3 a 5 días para provocar turbidez moderada en medio líquido y

tienen un tiempo de generación de 6 a 8 h (Jordan y Allen, 1982). Pueden formar colonias circulares hasta 1 mm de diámetro, opacas, raramente translúcidas, blancas, convexas y con tendencia a tener textura granulosa (Wang *et.al*, 2007). La formación de polisacáridos extracelulares es común en *Bradyrhizobium*, al igual que la presencia de gránulos de poli-E-hidroxibutirato (Martínez-Viera., 1986). Son microorganismos de importancia agronómica ya que tienen la capacidad de establecer simbiosis con leguminosas de alto impacto mundial como lo es la soja (*Bradyrhizobium japonicum*, redefinido como *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium elkanii*) (Delamuta *et.al*, 2013) y maní (*Bradyrhizobium* spp) (Taurian *et.al*, 2008).

En base al análisis polifásico incluyendo caracterización fenotípica, han sido descritas tres especies dentro de éste género. Dentro de los rizobios para maní, recientemente han aparecido reportes de especies nodulantes como *Bradyrhizobium lablabi* (Chang *et.al*, 2011) y *Bradyrhizobium subterraneum* (Gronemeyer *et.al*, 2015). *Bradyrhizobium* sp. abarca aquellas cepas que pertenecen a *Bradyrhizobium*, pero que no forman nódulos en la soja, aunque sí en otras leguminosas. No hay especies definidas aún para este grupo, solamente son conocidas como *Bradyrhizobium* sp. y para diferenciarlas se aclara entre paréntesis el género de la leguminosa hospedera (Becquer *et.al*, 2004).

La mayoría de los rizobios son sensibles a los factores medioambientales del suelo, los cuales pueden afectar la persistencia y supervivencia de los inoculantes en el suelo y por lo tanto limitar la nodulación y la FBN, afectando negativamente la productividad de las leguminosas (Kulkarni y Nautiyal., 2000). Las membranas de las bacterias juegan un rol importante para la supervivencia de las células procariotas, ya que es la principal barrera entre ellas y el medio ambiente y eso ayuda a los microorganismos a adaptarse a las nuevas condiciones (Ghorbal *et.al*, 2013).

1.2. Naturaleza química de la membrana bacteriana y su participación en la respuesta a cambios en el medio ambiente

1.2.1. Importancia de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas

La membrana citoplasmática está formada por una bicapa lamelar de fosfolípidos (PL) y diferentes proteínas que se intercalan en ella. En esta estructura, los ácidos grasos (AG) componentes de los PL se sitúan hacia el interior de la bicapa y los grupos cabeza hacia el exterior, accesibles para la hidratación. La bicapa lipídica forma una barrera hidrofóbica que previene el movimiento de moléculas polares y permite la acumulación y retención de metabolitos y proteínas en el interior celular. Los lípidos además proporcionan una matriz adecuada para el funcionamiento de proteínas de membrana involucradas en funciones bioenergéticas y biosintéticas. La composición lipídica determina las interacciones y la dinámica de las moléculas de lípidos, las cuales a su vez definen las propiedades de barrera y permeabilidad de la membrana e influyen en la topología, las interacciones y las funciones de las proteínas de membrana (Denich *et.al*, 2003).

La membrana tiene múltiples funciones celulares importantes: contiene centenares de proteínas diferentes, diversos transportadores de nutrientes y productos metabólicos, así como muchas enzimas que intervienen en el metabolismo energético, en la síntesis de lípidos, en la exportación de proteínas, la translocación de macromoléculas de la pared celular, la señalización transmembrana, la homeostasis y la división celular entre otras (Denich *et.al*, 2003).

En bacterias Gram negativas, los PL predominantes son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC), con variaciones en la longitud de las cadenas acilos, el grado de insaturación y conformación (Denich *et.al*, 2003). Los PL están ubicados con sus cabezas polares orientadas externamente y sus cadenas lipídicas direccionadas hacia el interior de la bicapa siendo los AG predominantes aquellos de 14 a 20 átomos de carbono. Por lo general las cadenas acilos de mayor longitud incrementan la estabilidad de la bicapa, promoviendo una estructura más rígida mientras que, las cadenas más cortas contribuyen a la difusión y a una mayor fluidez de la bicapa (Mykytczuka *et.al*, 2007).

Los PL, tanto cuantitativamente como cualitativamente, son importantes ya que determinan las propiedades físicas de la membrana. Dependiendo del tamaño del grupo cabeza, los PL tienden a formar membranas del tipo bicapa o no bicapa. Generalmente PE forma membranas con estructuras de no bicapa, mientras que PC forma membranas con estructuras de bicapa. Cambios en las relaciones entre estos tipos de lípidos pueden alterar la forma total de la membrana (Dowhan, 1997).

Los AG que son componentes de los PL pueden ser saturados e insaturados. En los rizobios los AG saturados más importantes son palmítico (16:0) y esteárico (18:0) y dentro de los insaturados el más importante es el ácido cis-vaccénico (18:1 Δ 11) (Boumahdi *et.al*, 1999, Drouin *et.al*, 2000).

El grado de desorden y de movimiento molecular dentro de una bicapa lipídica es un parámetro que se conoce como fluidez de la membrana (Los y Murata, 2004). Como punto constante de contacto con el medio ambiente, la flexibilidad en la capacidad de adaptación de la membrana citoplasmática y de sus componentes es determinante para la supervivencia de las células (Mykytczuk *et.al*, 2007). Las interacciones lípido-proteína contribuyen a la estructura y modulación de la fluidez de la membrana (Dumas *et.al*, 1999; Fyfe *et.al*, 2001).

1.2.2. Efectos del déficit hídrico sobre la membrana bacteriana y sus componentes

La fluidez de la membrana es un parámetro muy importante en la homeostasis global de las células, las que se adaptan a los estímulos externos alterando la composición de los lípidos de forma que la fluidez de la bicapa permanezca relativamente constante mediante un proceso denominado “adaptación homeoviscosa” (Sinesky, 1974; Lindblom y Rilfors, 1989). Diversos tipos de estreses ambientales, temperatura y estrés osmótico, pueden alterar el orden de empaquetamiento de la membrana celular bacteriana así como causar alteraciones en las propiedades físicas de células vivas. Bajo condiciones fisiológicas normales, la mayoría de los glicerofosfolípidos en la membrana bacteriana son formadores de bicapa, en un estado lamelar (liquido cristalino) (Denich *et.al*, 2003). Este es el estado biológico activo de la membrana (Figura 1.4.), en el cual las moléculas lipídicas se funden y las isomerizaciones *trans* son capaces de propagarse libremente hacia arriba y debajo de las cadenas acilos (Gruner *et.al*, 1985).

Los cambios en la composición de la membrana celular mediante la variación de la cantidad de PL totales y/o su distribución, la modificación del tipo de AG incorporado durante la síntesis de PL o a través de cambios de la actividad de la fosfolipasa la cual regula la síntesis de algunos lisofosfolípidos permiten mantener la integridad de la membrana celular así como la fluidez en valores óptimos permitiendo así la mantención de sus funciones (Denich *et.al*, 2003).

Si tenemos en cuenta que la membrana bacteriana es la primer barrera de muchos de los estreses naturales (por ejemplo desecación, cambios de temperatura, presencia de tóxicos orgánicos, etc.) comprenderemos que el estudio de las alteraciones que se producen en los distintos componentes de la membrana en respuesta a estreses ambientales es fundamental para el entendimiento de la fisiología bacteriana. Los mecanismos de adaptación estudiados hasta el momento y que implican la modificación de los fosfolípidos pueden incluir: I) cambios en el grado de insaturación de los AG, II) formación de AG ciclopropanos, III) isomerización de *cis* a *trans* de los AG insaturados y IV) modificación de los grupos cabeza de los PL, (Hartig *et.al*, 2005).

Por ejemplo bajas temperaturas inducen un incremento en la proporción de AG insaturados, una disminución de la longitud de las cadenas acilo y un incremento en la ramificación de los AG, todos estos cambios pueden ocurrir por separado o en forma combinada (Russell *et.al*, 1984). Elevadas concentraciones de sal en el medio también incitan cambios en los AG, lo cual provoca lo que se conoce rigidificación de la membrana plasmática o disminución en la fluidez de la misma, la respuesta adaptativa más conocida en relación a esto es un marcado decrecimiento de la relación I/S (insaturado/saturado), debido a una disminución de los AG insaturados (Chihib *et.al*, 2005).

Al contrario del papel bien definido de los AG componentes de los PL en la respuesta a estímulos ambientales, existe muy poca información sobre la función fisiológica de los grupos de cabeza, tanto en condiciones normales como de estrés. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, en cepas nodulantes de maní como lo son *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 y TAL1000, la cepa L115 (perteneciente al género *Ochrobactrum*) así como también estudios realizados en la PGPR *Azospirillum brasilense* Az39, revelaron significativos cambios en los PL y AG de membrana por efecto de la temperatura de crecimiento y la salinidad, indicando el rol importante de estos componentes de membrana en la adaptación al estrés (Medeot *et.al*,

2007; Paulucci *et.al*, 2011, Paulucci *et.al*, 2015; datos de esta tesis publicados en Cesari *et.al*, 2016).

Existen numerosos métodos para monitorear la fluidez de la membrana y el más utilizado involucra la medición de la anisotropía de polarización de fluorescencia de 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). La polarización de la fluorescencia cuantifica el grado de despolarización de la luz emitida por la sonda y es una medida del estado de membrana (Mykytczuk *et.al*, 2007). La relación de polarización de la sonda y la fluidez de la membrana citoplasmática se correlacionan inversamente. A medida que la fluidez de la membrana citoplasmática bacteriana disminuye, la polarización aumenta y vice versa (Litman y Barenholz, 1982). El DPH es incorporado dentro de las membranas ubicándose de forma paralela a las cadenas acilos de la membrana lipídica. Puesto que el DPH no es completamente libre de girar dentro de las membranas, el grado de interacción entre el DPH y la membrana lipídica está restringido. El método espectroscópico de Fourier transform infrared (FTIR) se emplea para realizar análisis cuantitativos de exactitud sobre el estado físico de la membrana lipídica (Los y Murata, 2004).

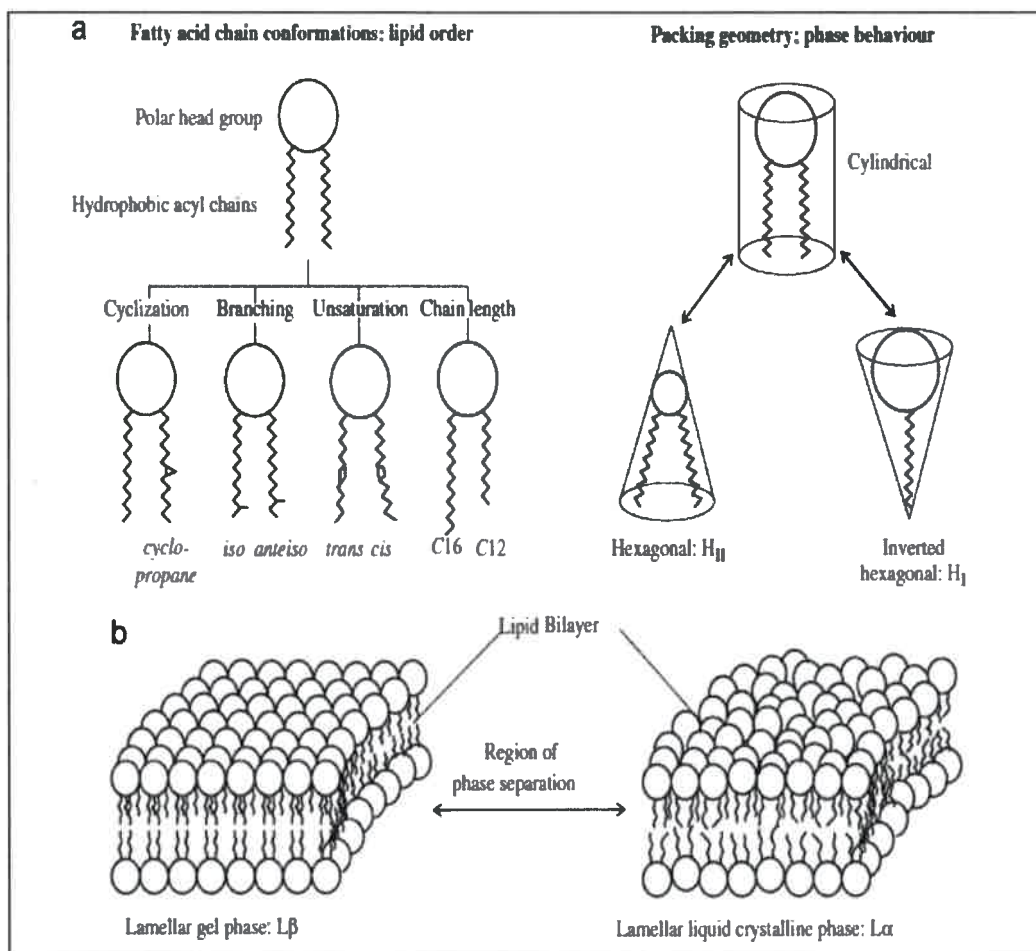


Figura 1.4. Representación esquemática de los parámetros de la fluidez de membrana. **A.** Morfología de la estructura de las cadenas acilos y de la cabeza polar de los glicerofosfolípidos; **B.** Fases de la bicapa lipídica bacteriana: dependiendo de las condiciones celulares y medioambientales, se puede encontrar en su forma activa como fase líquido-cristalino o bien como fase laminar gel. **c)** Fluidez y curvatura de la membrana citoplasmática bacteriana. Un valor óptimo de fluidez es crítico para la forma y función celular (Mykytczuka *et.al*, 2007).

1.3. Interacción planta-microorganismo: características, eventos y mecanismos

1.3.1. Conceptos generales

La interacción planta-microorganismo es una interacción altamente compleja. El microbioma beneficioso asociado con las raíces y tejidos de la planta, incluyendo los microorganismos PGPR, puede contribuir a mejorar la textura y estructura del suelo, así como aliviar el estrés de la planta por una variedad de mecanismos directos tales como la absorción de micronutrientes, homeostasis de fitohormonas, fijación de N_2 o indirectamente estimulando el sistema de defensa de las plantas contra los fitopatógenos, promoción de la germinación, reducción de la susceptibilidad a estrés logrando así mejoramiento en el crecimiento de las plantas y rendimiento del cultivo (Hayat *et.al*, 2010; Marasco *et.al*, 2013).

Se conoce que las PGPR se aplican a muchas plantas de importancia agronómicas para obtener efectos beneficiosos, tal como la aplicación de *Azospirillum* sp. (Bashan y de-Bashan, 2011). Los principales efectos visuales de inoculaciones con *Azospirillum* sp. son los cambios morfológicos de raíces, como la promoción de elongación de la raíz, el desarrollo de raíces laterales y adventicias, el alargamiento y ramificación de los pelos radicales (Creus *et.al*, 2005). La vía por la que *Azospirillum* sp. mejora del crecimiento de plantas es por la producción de fitohormonas por sí mismo y por la inducción de la síntesis de fitohormonas de los tejidos vegetales (Spaepen *et.al*, 2009; Bashán y de-Bashán 2011), principalmente AIA y giberelinas (GAs) (Bottini *et.al*, 1989) así como el aumento del número y la diversidad de los flavonoides presentes en exudados de plantas (Cassan *et.al*, 2009).

La interacción rizobio-leguminosa ha sido ampliamente caracterizada por el intercambio de señales químicas entre ambas partes que constituye la base de la química del complejo diálogo molecular establecido entre los reinos procariota y eucariota (Figura 1.2.) (Day *et.al*, 2000). Existen estudios y opiniones diferentes con respecto a las estrategias agrícolas más eficaces para inoculación de maní. Michelena *et.al*, (1996) informaron que la inoculación de ciertas cepas de rizobios dio lugar a mayor rendimiento de semillas con alto contenido de proteínas. Los suelos en las zonas productoras de maní de la provincia de Córdoba contienen poblaciones nativas de rizobios que son capaces de nodular maní, pero no siempre son muy eficaces. Estos simbioses nativos están limitados por factores ambientales, tecnología de producción, efectos

de las micotoxinas producidas por hongos del suelo, y otros factores (Bogino *et.al*, 2008). Sin embargo, la interacción de los rizobios con otros microorganismos presentes en el suelo o en el inoculante empleado, pueden concluir en un efecto un tanto positivo como negativo para el primero, y en consecuencia para la planta inoculada en cuestión. Varios autores han descrito que algunos microorganismos PGPR son capaces de modular los procesos de nodulación y FBN cuando son coinoculados con rizobios (Vicario *et.al*, 2015, Chibeba *et.al*, 2015). Además, se ha demostrado que la coinoculación de maní con los géneros bacterianos *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* incrementó los valores de la nodulación así como los parámetros de crecimiento de la planta de maní (Vicario *et.al*, 2015).

El éxito de los inoculantes formulados con numerosos microorganismos como práctica alternativa al empleo de inoculantes simples, dependerá principalmente de la cooperación microbiana entre los integrantes de dicho inoculante y de las condiciones medioambientales hostiles que tengan que afrontar.

1.3.2. Eventos tempranos de la interacción planta-microorganismos

1.3.2.1. Señales rizosféricas

Las plantas producen una amplia gama de compuestos químicos y señales moleculares que participan en su sistema de defensa contra organismos nocivos, o bien para potenciar el desarrollo de otros benéficos. El 20% de los productos de la fotosíntesis son liberados al suelo, aportando la base del establecimiento de la interacción planta-microorganismo, lo cual beneficia el crecimiento de la planta, la producción de fitohormonas, degradación de compuestos fitotóxicos y la supresión de compuestos patógenos (Antoun *et.al*, 1998).

Los compuestos orgánicos liberados por la raíz son llamados en su conjunto, “rizodeposiciones” y presentan una amplia diversidad estructural (Rovira, 1969). Pueden tener impacto directo en la solubilidad de minerales o indirectamente influenciar la disponibilidad de ciertos nutrientes por impulsar la actividad de microorganismos del suelo que los transforman (Neumann, 2007). Todos los compuestos presentes en las rizodeposiciones se pueden agrupar de acuerdo a diferentes criterios, estableciendo categorías para clasificarlos en: exudados, secreciones, lisados, gases y mucilagos (Grayston *et.al*, 1996).

Durante la germinación y el crecimiento, las raíces producen una variedad importante de compuestos, donde se incluyen azúcares y polisacáridos simples (arabinosa, fructuosa, glucosa, maltosa, manosa y oligosacáridos), aminoácidos (arginina, asparganina, cisteína y glutamina), ácidos orgánicos (ácido acético, ascórbico, fumárico, oxálico y málico) y compuestos fenólicos (Marschner, 1995). Dentro de los compuestos exudados con mayores pesos moleculares encontramos los flavonoides, enzimas, ácidos grasos, reguladores del crecimiento, esteroides, carbohidratos, alcaloides, poliacetilenos, entre otros (Marschner, 1995). Entre los metabolitos secundarios liberados por las plantas, también se encuentran los terpenos. Su emisión se da principalmente desde las hojas, aunque también se produce desde las raíces. Así, existe una gran diversidad estructural en los exudados de la raíz, que van desde moléculas relativamente sencillas hasta moléculas más complejas estructuralmente, como flavonoides y alcaloides (Oliveros-Bastidas, 2009).

La producción de rizodeposiciones es un proceso altamente variable y la cantidad y la calidad está influenciada por varios factores bióticos y abióticos. La regulación en la síntesis de flavonoides y ácidos grasos, puede deberse a su rol en la señalización durante la simbiosis, o por la necesidad de incrementar la biosíntesis celular (membranas lipídicas) para crear nuevos componentes estructurales, necesarios para el desarrollo nodular que se establece durante la simbiosis (Brechenmacher *et.al*, 2010; Haag *et.al*, 2012). Muchos factores abióticos como intensidad de luz, fotoperíodos, temperatura y estrés hídrico, también determinan los patrones de exudación, advirtiéndose en general, que las situaciones de estrés estimulan las exudaciones (Lynch y Whipps, 1990; Dardanelli *et.al*, 2010; Cohen *et.al*, 2015). El estrés hídrico es uno de los factores que más inducen la exudación radical debido al incremento de la presión osmótica del medio y a la necrosis radical (Curl y Truelove, 1986; Whipps, 1990; Cohen *et.al*, 2015). Dichos cambios ambientales pueden comprometer la eficacia de las comunicaciones rizosféricas, alterando diversas moléculas excretadas tanto por la planta (quimioatrayentes) como por las rizobacterias (Bais *et.al*, 2004; Dardanelli *et.al*, 2010).

En el inicio de la comunicación con las raíces, la movilidad bacteriana puede contribuir a su éxito (Ames *et.al*, 1981). Sin embargo, la gran mayoría de los mecanismos a través de los cuales se producen estos efectos no están del todo esclarecidos y menos aún en situaciones de estrés abiótico por lo que se precisan estudios más exhaustivos en este campo para poder optimizar y rentabilizar el potencial de estos microorganismos.

1.3.2.2. Diversidad de compuestos biológicos presentes en las rizodeposiciones

La tabla 1.1. presenta un resumen de la bibliografía consultada acerca de la diversidad química de las moléculas que componen las rizodeposiciones (Curl y Truelove, 1986; López de Vittoria y Lovell, 1993; Bertin *et.al*, 2003; Kamilova *et.al*, 2006; Faure *et.al*, 2009). Se puede observar en ella la abundancia y variedad en la naturaleza de estos componentes.

Tabla 1.1. Composición química de rizodeposiciones de diversas especies vegetales

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

FENÓLICOS	Flavonoles, flavonas (luteolina, biochanina, sorgolactona), flavononas, antocianinas, flavonoides, isoflavonoides, acetosiringona.	Regulación del crecimiento vegetal, interacciones alelopáticas, defensa de la planta, fitoalexinas, quimioatrayentes, iniciadores de las interacciones rizobio-leguminosa, micorrizas arbusculares y actinorrizas y sus huéspedes vegetales, estimulantes del crecimiento microbiano.
ÁCIDOS GRASOS	Linoleico, linolénico, oleico, palmítico, esteárico.	Regulación del crecimiento vegetal
ESTEROLES	Colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol	Regulación del crecimiento vegetal
VITAMINAS FACTORES DE CRECIMIENTO	Acido <i>p</i> -aminobenzoico, biotina, colina, ácido <i>n</i> -metionilnicotínico, niacina, pantotenato, piridoxina, riboflavina, tiamina, inositol	Estimulantes del crecimiento microbiano
ENZIMAS Y PROTEÍNAS	Fosfatasas ácidas, amilasa, proteasas, invertasa, poligalacturonasa, hidrolasa, lectinas.	Defensa de la planta, degradación de factores Nod

HORMONAS	Auxinas, etileno y su precursor (ácido aminociclopropano carboxílico), putrescina, jasmonatos, ácido salicílico, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, ácido cianhídrico	Regulación del crecimiento vegetal
IONES INORGÁNICOS	Cationes (88%): calcio, sodio, potasio, amonio, magnesio; aniones (12%): sulfato, cloruro, fosfato, nitrato	Regulación del crecimiento vegetal, adhesión microbiana, estimulantes del crecimiento microbiano
OTROS	Adenina, guanina, uridina, citidina, glucósidos, saponinas, scopoletinas, compuestos orgánicos fosforados, acil-homoserin-lactonas, xantona, estrigolactonas, especies reactivas del oxígeno: radicales oxhidrilo, aniones superóxido, H ₂ O ₂	Quorum sensing, defensa de la planta, regulación del crecimiento vegetal, adhesión microbiana, estimulantes del crecimiento microbiano

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

Varios estreses impiden el desarrollo normal de las raíces, como toxicidad por aluminio, por bicarbonato, salinidad, sequía, hipoxia, metabolitos microbianos tóxicos, microorganismos patógenos. En muchos casos, los exudados radicales parecen estar involucrados en dar

respuestas para aliviar los efectos inhibitorios de estos estreses sobre el crecimiento de las raíces, y por consiguiente sobre el crecimiento de la planta (Neumann, 2007).

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

1.3.2.3. Movilidad bacteriana y quimiotaxis hacia exudados radicales

Los microorganismos que presentan movilidad poseen una ventaja ecológica ya que son capaces de encontrar nichos más favorables o menos peligrosos para colonizar y persistir en un ambiente determinado. En el inicio de la comunicación con las raíces, la movilidad bacteriana puede contribuir en su éxito (Ames *et.al*, 2002). Henrichsen *et.al*, (1972), han identificado seis categorías de movilidad bacteriana: swimming (movimiento natatorio), swarming (bullir), twitching (movimiento pulsante), gliding (movimiento por deslizamiento), sliding (bacterias que se desplazan sobre los medios) y darting (bacterias expulsadas de la colonia). Swimming y swarming están correlacionados con la presencia de flagelos. Sin embargo, la gran mayoría de los mecanismos a través de los cuales se producen estos efectos no están del todo esclarecidos y menos aún en situaciones de estrés abiótico por lo que precisan estudios más exhaustivos en este campo para poder optimizar y rentabilizar el potencial de los microorganismos (Kearns, 2010).

La movilidad de tipo swarming se define como un movimiento rápido y coordinado de grupos de células bacterianas a través de una superficie semi-sólida, impulsado por flagelos laterales (Braeken *et.al*, 2008; Verstraeten *et.al*, 2008), y a menudo implica la diferenciación en células vegetativas y en células swarmer hiperflageladas (Fraser y Hughes, 1999). Las células swarmer se organizan en paralelo a lo largo de su eje longitudinal, lo cual le permite

colonizar rápidamente la totalidad de la superficie del medio agar (Daniels *et.al*, 2004). Este tipo de movilidad actualmente no está bien caracterizada en las bacterias que fijan nitrógeno.

La movilidad tipo swimming es un movimiento bacteriano también impulsado por flagelos polares, pero a diferencia del swarming, el movimiento es de células individuales que se mueven en ambientes líquidos (Kearns, 2010).

En el caso de los rizobios, la movilidad permite que las bacterias encuentren a su leguminosa hospedadora específica y establezcan simbiosis. El desplazamiento de las bacterias se encuentra limitado por la disponibilidad de nutrientes y las cepas de rizobios muestran una mayor movilidad ante la presencia de moléculas exógenas de señalización (Tambalo *et.al*, 2011).

La quimiotaxis no sólo requiere de moléculas quimio-atrayentes, sino que también es dependiente de la movilidad de las bacterias. Esto le permite avanzar hacia las raíces de las plantas donde pueden beneficiarse de exudados usándolos como fuente de carbono y energía, y por lo tanto pueden contribuir a la supervivencia y la colonización de la rizósfera. El mecanismo exacto de cómo interactúa *Azospirillum* con las raíces de las plantas todavía no se comprende completamente. Las bacterias pertenecientes a éste género, exhiben quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, compuestos aromáticos, así como hacia los exudados radicales (Borisov *et.al*, 2007). Además se demostró que la migración puede ser limitada por la humedad del suelo (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

1.3.2.4. Adhesión bacteriana a raíces vegetales

La unión de las rizobacterias a las células vegetales es un evento temprano requerido en las interacciones planta-microorganismo. La adhesión es también un paso inicial para la formación de biopelículas microbianas en raíces de las plantas. En el caso de la simbiosis establecida entre rizobio-leguminosa, se han propuesto varios mecanismos y moléculas de la superficie de ambos socios para explicar este proceso (Rodríguez Navarro *et.al*, 2007). La base molecular de la adhesión de rizobios todavía no está clara. Varios investigadores reportaron que las lectinas de la plantas huésped están implicadas en dicha unión (Smit *et.al*, 1986).

La adhesión bacteriana a las raíces ocurre en dos etapas. La primera fase de la unión es débil, reversible, y no específica, en la que las lectinas de plantas, una proteína bacteriana vinculante (ricadhesina) y la superficie bacteriana parecen estar involucrados. El segundo paso de unión requiere la síntesis de fibrillas de celulosa bacteriana que pueden causar una unión irreversible de las bacterias a las raíces. Glucanos cíclicos, polisacárido capsular, y fibrillas de celulosa también parecen estar implicados en la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La adhesión de las bacterias *Rhizobiaceae* a las raíces de sus plantas huésped se considera la primera etapa en el proceso de infección que lleva a una simbiosis fijadora de nitrógeno. Las bacterias nodulantes pueden entrar en las raíces de diferentes maneras: por la formación del hilo de infección ente las células de epidermis intactas o por "crack entry" (Dardanelli *et.al*, 2003). La adhesión de *Azospirillum* a las raíces de las plantas es esencial para una eficiente asociación con la planta huésped. Mediante ensayos *in vitro*, se ha demostrado que la adhesión es un proceso bifásico, tal como se puede observar en la figura 1.5. En un primer paso las bacterias se adsorben a las raíces como células aisladas en un paso rápido y reversible. Hay evidencias de la participación de flagelos polares en dicha fase de adsorción, como también la participación de proteínas de superficie bacteriana y polisacárido capsular. La fase de adsorción es seguida por una fase de anclaje, en la cual se forman agregados bacterianos. Dicho proceso depende de la producción de polisacáridos extracelulares (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Rodríguez Navarro *et.al*, 2007).

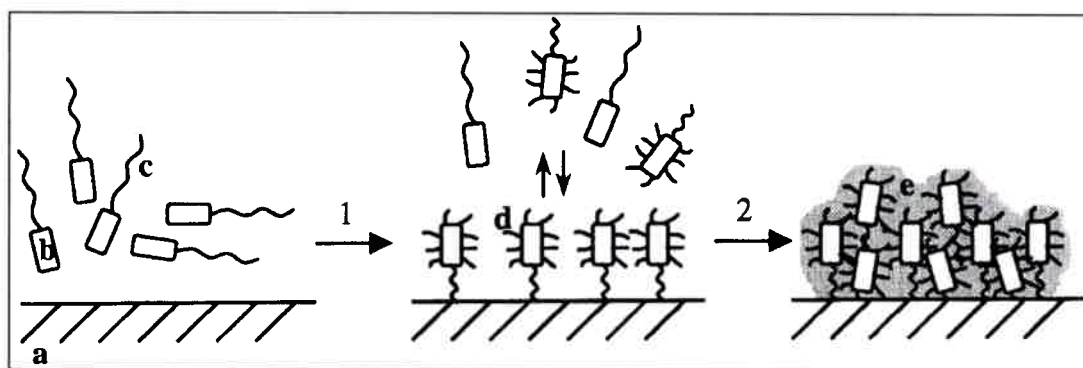


Figura 1.5. Proceso bifásico de adhesión de *A. brasilense* a la superficie radical de la planta (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

1.3.3. Simbiosis rizobio - leguminosa y fijación biológica del Nitrógeno

La interacción planta-microorganismo es específica y cada especie bacteriana se asocia con una leguminosa para llevar a cabo una simbiosis efectiva. Dos modelos de infección han sido descritos: uno a través de la entrada por un hilo de infección y otro a través de “crack entry” mediante extensiones intracelulares (Figura 1.6.). El primer tipo de infección ocurre en leguminosas que forman nódulos indeterminados (*Vicia*, *Trifolium*, *Pisum* y *Medicago*) y en algunas leguminosas subtropicales que forman nódulos determinados, tales como *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna*, *Lotus*, *Macroptilium* y *Pueraria* (Boorged y Rossum, 1997). Podemos mencionar ejemplos de asociaciones simbióticas (*E. meliloti*-alfalfa y *Rhizobium*-poroto) donde los rizobios infectan la leguminosa por un mecanismo que involucra la formación de un hilo de infección.

La infección por entrada crack ocurre en unas pocas leguminosas subtropicales tales como *Arachis*, *Sesbania*, *Neptunia* y *Stylosanthes*. Tal es el caso de la asociación *Bradyrhizobium*-maní, ocurre en la epidermis a través de penetración intracelular (crack entry) a nivel de la emergencia de las raíces laterales (Boorged y Rossum, 1997; Angelini *et.al*, 2005).

Los rizobios reconocen compuestos exudados por las raíces de las plantas, tales como los flavonoides, y responden con la producción de moléculas de la familia lipoquitooligosacáridos, factores Nod (Gilette y Elkan, 1996). Los factores Nod desencadenan en la planta numerosas respuestas, esenciales en la invasión y organogénesis del nódulo en las células epidérmicas de la raíz y de la corteza, donde se inicia la formación del primordio nodular. Cuando las bacterias llegan al primordio nodular, son liberadas al citoplasma de las células vegetales. Allí se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. Al conjunto constituido por uno o varios bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal, se lo conoce como simbiosoma. Con la aparición del simbiosoma, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro (Maunoury *et.al*, 2008). Resumiendo, el establecimiento de la simbiosis fijadora de N₂, es el resultado de tres eventos: a) la infección intracelular de las células hospedadoras por el microsimbionte; b) el desarrollo y la organogénesis del nódulo y c) el proceso de FBN. El primer y segundo evento ocurren simultáneamente mientras que la fijación ocurre después de que la organogénesis ha sido completada y sólo si la infección bacteriana es la adecuada (Subramanian, 2006).

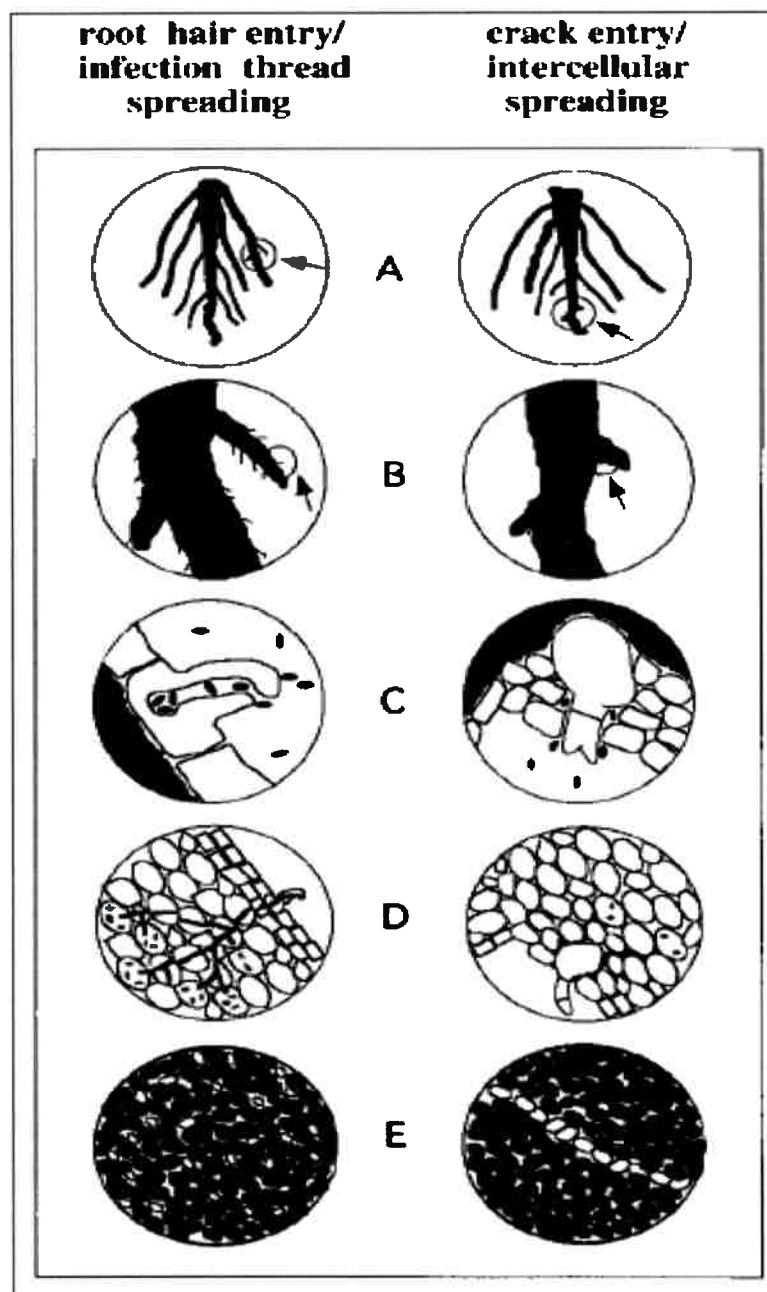


Figura 1.6. Diferentes estadios de la infección a través de hilo radical y a través del mecanismo crack entry (entrada crack). **A.** Sistema radicular principal y lateral. **B.** Pelos radicales, **C.** Hilo de infección (imagen a la izquierda), crack entry (imagen a la derecha), **D.** Infección a través del hilo (imagen a la izquierda), infección a través de las extensiones intracelulares (imagen a la derecha), **E.** Núcleos centrales infectados rodeados por pequeñas células no infectadas (imagen a la izquierda), o con una matriz de células no infectadas (imagen a la derecha).

La FBN, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa y es después de la fotosíntesis, es la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera (Broughton *et.al*, 2003). Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa. Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos. El sistema rizobiáceas-leguminosas ha sido estudiado ampliamente y en mayor profundidad. Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaceae*. Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de nitrógeno: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Dichas bacterias son capaces de formar nódulos en las raíces, así como en otros sitios de la planta, permitiendo que la planta crezca en un suelo pobre o restringido de nitrógeno, gracias a su actividad de fijar nitrógeno atmosférico del aire. Sin duda el grupo bacteriano mejor conocido es *Rhizobium*, el que es capaz de fijar nitrógeno molecular en asociación con leguminosas.

Para llevar a cabo el proceso estas bacterias deben encontrarse en proximidad con plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación. El proceso de nodulación comprende una secuencia de etapas que comienzan por la quimioatracción del rizobio hacia la raíz, iniciándose el contacto físico entre los dos simbiosomas (Caetano-Anollés, 1997). En el maní los nódulos se desarrollan únicamente en los sitios de emergencia de las raíces laterales donde la epidermis y la corteza de la raíz están dañadas (Boogerd y van Rossum, 1997; Uheda *et.al*, 2001). Posteriormente, la diseminación bacteriana se produce por los espacios intercelulares hacia la zona del tejido vegetal con actividad meristemática (Medeot *et.al*, 2009). Durante el desarrollo del nódulo, los rizobios se diferencian en bacteroides y permanecen rodeados por una membrana propia de este nuevo órgano, llamada membrana peribacteroidal, de origen vegetal, para constituir, en conjunto, la unidad de FBN o simbiosoma. Una vez en el nódulo,

los bacteroides, mediante un complejo enzimático nitrogenasa, presente en los microorganismos diazotróficos, catalizan la conversión del N_2 a NH_4^+ (Werner, 1992).

1.3.4. Interacción triple rizobios-planta-PGPR

Si bien la simbiosis rizobio-leguminosa es una de las interacciones que más atención ha recibido de toda la rizósfera, existen otras muchas que gozan de gran importancia a distintos niveles, como lo son la interacción PGPR-planta. El campo de la aplicación PGPR es considerablemente amplio, abarcando diversas metodologías y formas de trabajo en función al objetivo a conseguir. Así encontramos PGPRs cuyo efecto se manifiesta sobre el crecimiento de la planta tras afectar la fisiología de la misma, bien mediante mecanismos hormonales o bien por la producción de metabolitos que mejoren la nutrición de la planta (Kloepper *et.al*, 1988; Lucas-García *et.al*, 2001). Conjuntamente se encuentran aquellas PGPRs dedicadas a ejercer un efecto contra plagas, evitando o previniendo los efectos perjudiciales de los patógenos. De este modo podemos describir un efecto de biocontrol mediado por la producción de antibióticos, sideróforos y enzimas, o bien por inducción de una resistencia sistémica en la planta (ISR), por parte de la bacteria PGPR.

Se conoce que las PGPRs se aplican a semillas de cultivos de importancia agronómica para obtener efectos beneficiosos, tal como la aplicación de *Azospirillum* sp. (Bashan y de-Bashan 2010). Los principales efectos de la inoculación con *Azospirillum* sp. son los cambios morfológicos de raíces, como la promoción de elongación de la raíz, el desarrollo de raíces laterales y adventicias, el alargamiento y ramificación de los pelos radicales (Creus *et.al*, 2005; Molina-Favero *et.al*, 2008). La vía por la que *Azospirillum* sp. mejora del crecimiento de plantas es por la producción de fitohormonas por sí mismo y por la inducción de la síntesis de fitohormonas de los tejidos vegetales (Spaepen *et.al*, 2007; Basán y de-Basán. 2010), principalmente AIA y GAs (Bottini *et.al*, 1989; 2004; Fulchieri *et.al*, 1993) así como el aumento del número y la diversidad de los flavonoides presentes en exudados de plantas (Dardanelli *et.al*, 2008; Cassan *et.al*, 2009; Bdri *et.al*, 2013;).

La interacción rizobio-leguminosa ha sido ampliamente caracterizada por el intercambio de señales químicas entre ambas partes que constituye la base de la química del complejo diálogo molecular establecido entre los reinos procariota y eucariota (Day *et.al*, 2000). Existen

estudios y opiniones diferentes con respecto a las estrategias agrícolas más eficaces para inoculación de maní.

El empleo de simbioses fijadores de N_2 o bacterias fijadoras de N_2 en vida libre en el cultivo de leguminosas, ha contribuido sustancialmente a la economía del N_2 en los sistemas agrícolas (Chibeba *et.al*, 2015). Sin embargo la interacción de los rizobios con otros microorganismos presentes en el suelo o en el inoculante empleado, pueden concluir en un efecto un tanto positivo como negativo para el primero, y en consecuencia para la planta inoculada en cuestión. Varios autores han descrito que algunos microorganismos PGPR son capaces de modular los procesos de nodulación y FBN cuando son coinoculados con rizobios (Gray y Smith., 2005).

El uso de una bacteria “helper” durante la interacción rizobio-leguminosa, se ha estudiado en diversos sistemas y se ha observado que induce la temprana nodulación y el incremento en el número de nódulos por planta cuando se coinocula con *Ensifer* (formalmente *Sinorhizobium*) *meliloti* y *Delftia* sp. (Han *et.al*, 2005; Morel *et.al*, 2011; Ubalde *et.al*, 2012). El intercambio de señales moleculares entre *Ensifer-Delftia* durante la interacción demostró que la inoculación doble es mejor que la inoculación con *Ensifer*, favoreciendo la inducción de flavonoides inductores de genes nod, la producción de AIA, así como el incremento en la secreción de ácidos grasos insaturados de cadena corta, y de ácidos orgánicos. Todas estas moléculas probablemente están involucradas en una fluidificación de la membrana para preparar la raíz para la colonización de rizobios (Morel *et.al*, 2015).

El éxito de los inoculantes formulados con numerosos microorganismos como práctica alternativa al empleo de inoculantes simples, dependerá principalmente de la cooperación microbiana entre los integrantes de dicho inoculante y de las condiciones medioambientales hostiles que tengan que afrontar (Barea *et.al*, 2005).

CAPÍTULO 2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

“El estrés hídrico afecta el diálogo molecular entre *Arachis hypogaea* y sus rizobacterias, induciendo cambios en la producción de moléculas por parte de la raíz. El estrés hídrico también afecta la viabilidad de las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, las cuales se adaptan al estrés mediante modificaciones de la membrana lipídica.”

2.2. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar los cambios que ocurren a nivel fisiológicos y bioquímicos en *Arachis hypogaea* así como en las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, cuando son sometidas a déficit hídrico, y abordar posibles estrategias de adaptación y mejora en la producción bajo estas condiciones adversas.

2.3. Objetivos específicos

Para poder alcanzar el objetivo general, abordamos los siguientes objetivos específicos:

- I. Investigar la producción de compuestos biológicos producidos por las raíces de maní en condiciones de crecimiento bajo déficit hídrico.
- II. Analizar el efecto del déficit hídrico sobre componentes celulares de rizobacterias que se asocian a maní.
- III. Determinar el efecto del déficit hídrico en etapas tempranas y tardías de la asociación microorganismos-maní.

CAPÍTULO 3
MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

- 3.1.** Metodología asociada al objetivo I.
- 3.2.** Metodología asociada al objetivo II.
- 3.3.** Metodología asociada al objetivo III.

ÍNDICE DE FIGURAS DE MATERIALES Y MÉTODOS

	Página
3.1. Sistema hidropónico de tubo empleado para la recolección de rizodeposiciones.	44
3.2. Plantas de <i>A. hypogaea</i> sembradas en sistemas de vasos plásticos en cámara de cultivo de plantas.	59

3.1. Metodología asociada al objetivo I

3.1.1. Material vegetal

Se emplearon para los ensayos, semillas de *Arachis hypogaea* L. variedad Granoleico, provenientes de Criadero del Carmen (Gral. Cabrera, Córdoba).

Las semillas fueron lavadas tres veces en agua destilada estéril y posteriormente sumergidas en alcohol etílico 96° durante 30 seg para limpiar la superficie y por su efecto astringente, aumentar la porosidad y favorecer el ingreso del posterior desinfectante. Luego se quitó el alcohol y las semillas se lavaron con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente fueron sometidas a desinfección utilizando el agente peróxido de hidrogeno al 15% durante 15 min. Nuevamente se quitó el agente y las semillas fueron lavadas abundantemente con agua destilada estéril (Vincent, 1970).

Las semillas desinfectadas se transfirieron asépticamente a placas de Petri con Agar-Agua al 0,8% (p/v) y se incubaron en estufa de cultivo durante tres días, a 28 °C en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó aproximadamente 2 cm de longitud (Dardanelli *et.al*, 2009).

3.1.2. Obtención de rizodeposiciones de *A. hypogaea*

Cada semilla pre-germinada se transfirió asépticamente a un sistema hidropónico consistente de un tubo de vidrio conteniendo un soporte metálico para sostener la semilla y 30 ml de solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938). Las plantas se incubaron asépticamente durante 7 días en cámara de crecimiento sometidas a un fotoperiodo de 16 horas de luz a 24 °C alternadas con 8 h de oscuridad a 20 °C, preservando las raíces de la luz, por siete días (Dardanelli *et.al*, 2008b).

Para simular la condición de estrés hídrico, se adicionó a la solución nutritiva, Polietilenglicol 6000 (PEG) a distintas concentraciones 10 mM (-0,123 MPa), 15 mM (-0,28MPa), 20 mM (-0,55 MPa), 30 mM (-0,86 MPa) y 40 mM (-1,07 MPa) para determinar el potencial osmótico que genera un cambio significativo en los parámetros de crecimiento de plántulas de maní de siete días de crecimiento. El potencial osmótico (ψ_o) se determinó mediante la utilización de un osmómetro (Semi Micro K-7400, Knauer) que mide el

descenso crioscópico de la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con la concentración de PEG 15 mM generando un potencial osmótico de -0,28 MPa.

Al séptimo día cada planta se retiró del tubo y las rizodeposiciones fueron recolectadas asépticamente y se analizaron en medio TSA para descartar las rizodeposiciones contaminadas. Una vez obtenidas, se conservaron al resguardo de la luz para proteger a los componentes fotosensibles, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Las plantas se utilizaron para determinar los parámetros de crecimiento en presencia y ausencia de déficit hídrico.

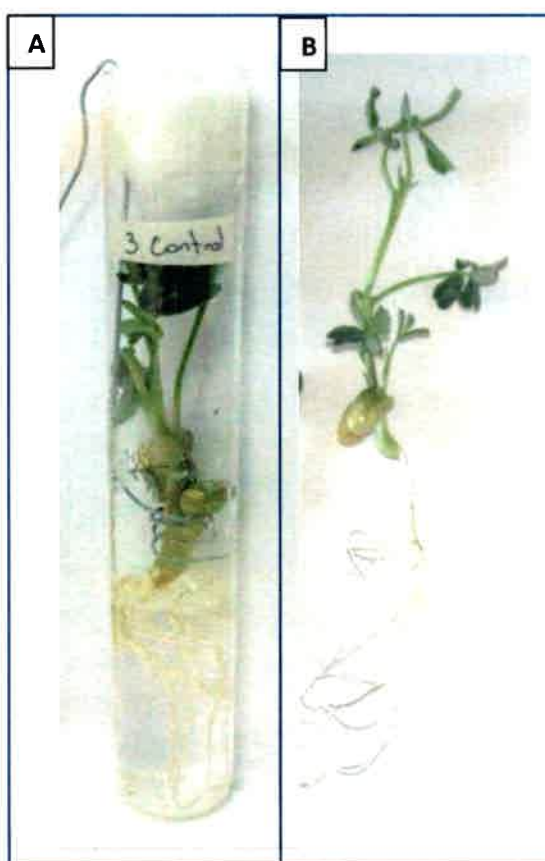


Figura 3.1. Sistema de tubo empleado para la recolección de rizodeposiciones. **A.** Sistema completo; **B.** Planta de *A. hypogaea* obtenida del sistema.

3.1.2.1. Solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938)

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

3.1.2.2. Solución stock de micronutrientes 1000X

H_3BO_3	286 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	901,3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21,8 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,6 mg
H_2O c.s.p.	100 ml

3.1.2.3. Solución de Hierro al 0,5 %

EDTA.Na	0,7 g
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 g
H_2O c.s.p.	100 ml

3.1.3. Parámetros de crecimiento de *A. hypogaea*

Longitud del tallo y de la raíz: se cortó la planta a la altura del nacimiento de la raíz, para separar la misma de la parte aérea y se midió la longitud de cada fragmento por medio de una regla métrica.

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

Peso seco del tallo y de raíz: un fragmento dentro del sobre anteriormente pesado, se colocó en estufa a 60°C hasta obtener peso constante. Los pesos se expresaron en miligramos.

3.1.4. Análisis de la composición molecular de rizodeposiciones

Un volumen de 150 ml de rizodeposiciones obtenidas por tratamiento, almacenadas a -20 °C, se liofilizaron hasta sequedad y se conservaron a resguardo de la luz a -20 °C hasta su procesamiento.

Ácidos grasos (AG): los lípidos fueron extraídos según lo descrito por Bligh y Dyer (1959); luego se agregó una solución 0,1M KCl en 50% de metanol para obtener una fase inferior clorofórmica y una fase superior acuosa. Generación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES): las fracciones extraídas en la etapa anteriormente descrita se colocaron en tubos especiales para metilación, y se secaron bajo nitrógeno. La metilación se realizó con trifluoruro de boro en metanol (F₃BMeOH), de acuerdo a lo indicado por Morrison y Smith (1964). Para la identificación de AG, los FAMES obtenidos, se secaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en hexano para su análisis por Cromatografía Gaseosa (GC), ajustando las condiciones de la separación según lo propuesto por Medeot (2009): una alícuota de 2 µl se inyectó en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con una columna altamente polar (HP 88).

Flavonoides, auxinas y triptófano: el análisis de flavonoides, IAA, y Trp se realizó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de masa (HPLC-MS). El material liofilizado se disolvió en 1 ml de agua desionizada y alícuotas de 20 µl se inyectaron en un tándem de ionización por electrospray HPLC MS. La separación cromatográfica fue realizada usando un sistema Perkin Elmer Serie 200 HPLC (Wellesley,

U.S.A.) acoplado a un Applied Biosystems QTRAP LC / MS / MS (Foster City, EE.UU.). Se empleó la columna ODS2 C18 de fase inversa con un tamaño de partícula de 5mm (Teknokroma, Barcelona, España). El flujo fue de 0,3 ml/min. Se emplearon testigos comerciales para la identificación de los diversos flavonoides. Se describen los procedimientos de separación y detección por Dardanelli *et.al* (2010).

Terpenos: con el fin de identificar los monoterpenos y sesquiterpenos, el material liofilizado fue diluido en 1 ml de metanol: agua destilada: ácido fórmico (85: 14: 1, v/ v /v) y 2 ml de diclorometanol y se dejaron durante la noche en 4 °C. Las muestras fueron eluidas en microcolumnas oasis y C18. Una alícuota de 100 µl se colocó en insertos con 1ng de 1-1-nhexadecano como patrón interno, y se inyectaron 2 µl en GC-EIMS. El programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial a 45°C durante 1 min, seguido de un aumento de 2 °C min hasta 130 °C, luego de 130 °C a 250 °C a una velocidad de 20°C/min y se mantuvo durante 10 min en 250°C. Los terpenos fueron identificados por comparación con testigos comerciales. Se describen los procedimientos de separación y detección por Salomón *et.al* (2013) y Gil *et.al* (2012).

Ácidos orgánicos: fueron identificados empleando el método descrito por Cawthray (2003) con modificaciones, utilizando cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplado a un detector de masa (UPLC-MS), WATERS modelo ACQUITY H CLASS (Centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada, España). Para la identificación se emplearon testigos comerciales. Se empleó como fase móvil Metanol, KH₂PO₄ y acetonitrilo de grado HPLC (HiPerSolv) de Merck (Darmstadt, Alemania). Con la finalidad de ajustar el pH de la fase móvil se emplearon H₂PO₃, H₂SO₄ y NaOH de calidad analítica. Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua Milli-Q y fueron desgasadas al vacío y filtrados a filtros de membrana de 0,2 µm.

3.1.5. Análisis de la peroxidación lipídica como indicador de estrés en *A. hypogaea*

La determinación del daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación) se realizó mediante el método descrito por Heath y Packer (1968), midiendo las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método está basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del malonaldehído (MDA), que es un producto final de la

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

El material vegetal (0,5 g) se extrajo con 5 ml de TCA al 20% (p/v) y 1 ml de butilhidroxitolueno al 4% (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4 °C. Para la reacción alícuotas de 0,5 ml de extracto se les añadió 1,5 ml de reactivo de TBA al 0,5% (p/v), preparado con TCA al 20%. Los tubos se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño regulado a 94 °C, durante 30 min en oscuridad para su posterior lectura. A la absorbancia leída se le resta la obtenida a 600 nm (absorbancia inespecífica). La curva patrón se preparó del mismo modo utilizando concentraciones conocidas de MDA (0 a 20 μ M) y un blanco con TCA. La peroxidación de lípidos se expresó en nmol de MDA g^{-1} PF (peso fresco).

3.2. Metodología asociada al objetivo II

3.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Se emplearon las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 recomendada para maní (MIRCEN/FEPAGRO, Brasil) y *Azospirillum brasilense* Az 39 (Rodríguez Cáceres, 1982), ambas promotoras de crecimiento vegetal y empleadas en formulaciones comerciales.

B. sp. SEMIA 6144 fue mantenido en medio manitol-extracto de levadura-agar (YEMA) (Somasegaran y Hoben, 1994) a 28 °C. El pH del medio fue ajustado a 7 antes de esterilizar, mientras que *A. brasilense* Az 39 fue conservado en medio sólido NFB (Estévez Amador, 2007).

Para la determinación del crecimiento bacteriano, la viabilidad y los parámetros bioquímicos, la cepa *B.* sp. SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 se cultivaron en medios líquidos B modificado (Van Brussel *et.al*, 1977; Medeot, 2009) y D y D (Dobereiner, 1976), respectivamente, en un baño de agua de agitación horizontal Allied Fisher Scientific a 28° C. Los medios fueron suplementados con PEG 15 mM para el tratamiento de estrés hídrico. El crecimiento bacteriano fue seguido midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 620 nm (DO₆₂₀) para *B.* sp. SEMIA 6144, y 600 nm (DO₆₀₀) en el caso de *A. brasilense* Az 39. El recuento de células viables se realizó por triplicado, mediante la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994), donde alícuotas de cada dilución se sembraron en placas con el medio sólido correspondiente. Los valores del recuento se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (LogUFC.ml⁻¹).

3.2.2. Medios de cultivo

3.2.2.1. Medio mínimo B (modificado)

Manitol	8 g
Ca(NO ₃) ₂	1,3 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,55 g
KNO ₃	0,55 g
FeNa EDTA	0,033 g
Oligoelementos	2,5 g
Extracto levadura	0,3 g
Tripteína	0,3 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml
pH	7

Oligoelementos	
H ₃ BO ₃	1,269 g
MnSO ₄ H ₂ O	0,462 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,398 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0974 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0354 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Luego de autoclavado el medio, se agregó 1 ml de K₂HPO₄ 1M estéril.

3.2.2.2. Medio de cultivo D y D

Fructosa	6,67 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Ext. levadura	0,1 g
NH ₄ Cl	0,214 g
K ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Microelementos	1 ml
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Microelementos	
FeCl ₃	10 g
H ₃ BO ₃	2,8 g
MnSO ₄	2,1 g
NaMoO ₄	2 g
ZnSO ₄	0,24 g
CuSO ₄	0,025 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.2.2.3. Medio YEM

Manitol	10 g
Ext. levadura	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 2H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml
pH	6,8

3.2.2.4. Medio mínimo NFB

Ac. Málico	5 g
KOH	4,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,02 g
FeEDTA(1,64%)	4 g
Microelementos	2 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Microelementos	
H ₃ BO ₃	1,4 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,2 g
MnSO ₄ H ₂ O	1,17 g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	1 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 g
Vitaminas	
Piridoxina	0,2 g
Biotina	0,1 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

La solución de vitaminas se esterilizó mediante filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y se añadió al medio una vez frío. Se ajustó el pH del medio a un valor de 6,8. Se esterilizó en autoclave y se agregó 1 ml de solución de vitaminas.

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

3.2.3. Cálculo de los parámetros de crecimiento microbiano

Velocidad Específica: se determinó la velocidad específica de crecimiento bacteriano (μ) empleando la ecuación A, donde Tf y Ti representan tiempos final e inicial, respectivamente, dentro de la fase exponencial de crecimiento bacteriano.

Tiempo de Generación: utilizando el valor de μ se realizó el cálculo del tiempo de generación (g), o de duplicación (expresado en horas) utilizando la ecuación B.

A.

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

B.

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

Además se calculó la biomasa húmeda (BH) y la biomasa seca (BS) así como el contenido de proteínas totales (Bradford, 1976) de cultivos crecidos en ausencia y en presencia de PEG.

Análisis de células vivas y muertas: Para determinar si el déficit hídrico reduce la viabilidad o genera mayor muerte celular en las rizobacterias en estudio, se utilizó el kit “LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kits” según la metodología descrito por Basaglia *et.al*, (2007). Esta técnica consiste en la distinción de bacterias que se encuentran vivas con de aquellas que no lo están. Consta de dos fluorocromos (SYTO9 e Ioduro de Propidio), en dónde el primero es capaz de incorporarse a todas las células, mientras que el segundo solo se incorpora a las células que presentan la membrana dañada (muertas) y reduce al SYTO9 contenidas en ella, siendo el único colorante capaz de florecer en esas células. Esta técnica tiene como principal utilidad, diferenciar aquellas bacterias que se encuentran vivas (verdes) y metabólicamente activas, de las que están vivas y no son capaces de crecer en medios de cultivos ricos, lo cual hace que el número de estas últimas células no esté presente en técnicas de recuento convencional. Un volumen de 1 ml de células (estresadas y control) se centrifugaron por 5 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente y se lavaron con solución fisiológica, resuspendiéndose en 1 ml de dicha solución. A una alícuota (10 μ l en 90 μ l de solución fisiológica) se le incorporó 0,3 μ l de la mezcla de tinción SYTO9/Ioduro de Propidio en una proporción 1:2 (15 min, en oscuridad). El resto de colorante se eliminó por lavado. Finalmente se montó 9 μ l en cámara de Neubauer o en portaobjetos y se observó al microscopio de epifluorescencia. Los filtros que se utilizaron para la selección de longitudes de onda de excitación y emisión fueron

Nikon B-2A para visualización de bacterias vivas (verdes) y Nikon Texas Red Y-2E/C para visualización de bacterias muertas (rojas).

3.2.4. Respuesta de las membranas bacterianas al déficit hídrico

3.2.4.1. Análisis de los componentes lipídicos de la membrana bacteriana

Incorporación de acetato marcado: [1-¹⁴C] acetato de sodio (2.26 GBq mmol⁻¹, New England Nuclear), previamente esterilizado, fue agregado al medio de cultivo a una concentración final de 37 kBq ml⁻¹, al tiempo cero de cultivo. Las células fueron cosechadas en fase exponencial tardía mediante centrifugación y los pellets usados inmediatamente para la extracción de lípidos. Los mismos procedimientos y condiciones fueron utilizados para las muestras no marcadas.

Extracción de lípidos: Los lípidos fueron extraídos según lo descrito por Bligh y Dyer (1959); luego se agregó una solución 0,1M KCl en 50% de metanol para obtener una fase inferior clorofórmica y una fase superior acuosa. La fase inferior, que contiene los lípidos, fue lavada dos veces con la misma solución de KCl, secada bajo flujo de N₂ y resuspendida en un volumen apropiado de cloroformo/metanol 2:1 (v/v).

Separación y análisis de fosfolípidos (PL) bacterianos marcados: Alícuotas de los extractos lipídicos totales fueron analizadas por cromatografía en capa delgada (TLC) usando como mezcla de solventes cloroformo/metanol/agua 65/25/4 (v/v/v) para la separación de PL. Todos los solventes fueron de calidad analítica o HPLC y provistos por Merck. Los lípidos fueron detectados con ninhidrina y con vapores de yodo e identificados por comparación con estándares purificados provistos por Sigma. Las placas de TLC fueron raspadas y las fracciones fueron cuantificadas por la radioactividad medida en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C). Las placas para TLC de sílica gel HLF (250 micrometros) fueron provistas por Analtech.

Análisis de ácidos grasos bacterianos no marcados: Los AG bacterianos metilados a partir de los extractos lipídicos no marcado según se describió previamente, se analizaron en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 serie II) equipado con una columna altamente polar (HP 88) de cianopropilo (longitud 60 m, diámetro interior 0,25 mm; espesor de la

película 0,2 micras) y un detector de ionización de llama. Las condiciones del GC fueron las siguientes: temperatura del inyector de 250 °C, temperatura del detector de 300 °C, y nitrógeno como gas portador. La temperatura se programó a 120 °C durante 1 min y después se aumentó en 10 °C/min a 175 °C durante 10 min, 5 °C/min a 210 °C durante 5 min y 5 °C/min a 230 °C durante 5 min. Los picos correspondientes a cada ácido graso se identificaron usando una mezcla de testigos provista por Sigma-Aldrich Chemical Co (Kates, 1973).

3.2.5. Estudio del efecto del déficit hídrico en la membrana bacteriana

3.2.5.1. Análisis biofísico de la membrana bacteriana

La fluidez de la bicapa lipídica de las rizobacterias en estudio, se determinó midiendo la polarización de fluorescencia de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Invitrogen) que se inserta en las membranas citoplasmáticas.

Siguiendo los procedimientos descritos por Trevors (2003), las células de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 fueron cultivadas en los medios de cultivo B modificado y medio D y D, respectivamente. Se ajustó hasta la DO_{600nm} 0,8 a 1, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron en buffer estéril Tris-HCl 15 mM (pH 7) y se resuspendieron en el mismo buffer hasta obtener una DO_{600nm} de 0,2. Luego, 1 μ l de la sonda fluorescente (solución madre: 12 mM en tetrahidrofurano) se añadió a cada alícuota de 3 ml de cultivo resuspendido para obtener una concentración final de sonda de 4 M. Los cultivos se incubaron en un agitador magnético a 200 rpm durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente para permitir la incorporación del DPH en las membranas citoplasmáticas. El cultivo se dividió: una parte se mantuvo como el control y la otra fracción fue utilizada para los tratamientos de shock con PEG 15 mM a diferentes tiempos de exposición (10, 20, 30 y 60 min). Las alícuotas se recogieron y se determinó su grado de polarización.

Por otra parte, se determinó la polarización de fluorescencia de las rizobacterias crecidas con o sin PEG 15 mM hasta fase estacionaria. Las mediciones de la polarización de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Hitachi 2500 con un polarizador Glam-Thomson. La longitud de onda de excitación para la sonda DPH fue de 358 nm y la longitud de onda de emisión fue 428 nm. El ancho de rendija para los haces de excitación y emisión

fueron de 12 y 10 nm, respectivamente. El grado de polarización se calcula a partir de la relación de polarización (P) usando la expresión $P = (IVV - IVHG) / ((IVV + IVHG))$, donde IVV y IVH son las intensidades de los componentes vertical y horizontalmente polarizadas de la luz emitida después de la excitación por luz verticalmente polarizada, y G es el factor de sensibilidad del sistema de detección (Lakowicz *et.al*, 1999).

3.2.5.2. Estudio del efecto del shock osmótico sobre la membrana bacteriana

Las células de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 cultivadas bajo las mismas condiciones que las utilizadas para las mediciones de la fluidez de membrana se utilizaron para evaluar el papel de los lípidos de membrana en respuesta al déficit de agua. Para la cuantificación de PL, previamente se añadió 0,5 Ci de acetato de sodio [$1-^{14}C$] a 25 ml de cultivo en el momento de la inoculación. Se realizó la extracción de lípidos totales por Bligh y Dyer (1959), y se identificaron los PL por TLC.

Los cultivo de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 se dividieron, una parte se mantuvo como el control y la otra parte fue utilizada para los tratamientos de shock con PEG 15 mM a diferentes tiempos de exposición (10, 20, 30 y 60 min). Las alícuotas se recogieron y se determinó su grado de polarización. Por otra parte, se determinó la polarización de fluorescencia de las rizobacterias crecidas con o sin PEG 15 mM hasta fase estacionaria. Las mediciones de la polarización de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Hitachi 2500 con un polarizador Glam-Thomson. La longitud de onda de excitación para la sonda DPH fue de 358 nm y la longitud de onda de emisión fue 428 nm.

Luego de conocer el efecto del PEG sobre las membranas de ambas rizobacterias, se analizó la respuesta al shock por PEG a nivel de composición de AG y PL de membrana, luego de 60 min de exposición a PEG. De éste modo es posible evaluar y comparar la respuesta temprana de las bacterias al déficit hídrico, y con la respuesta observada al finalizar el crecimiento bajo déficit hídrico (PEG 15 mM).

3.3. Metodología asociada al objetivo III

3.3.1. Estudio del efecto del déficit hídrico sobre las etapas tempranas de la interacción planta-microorganismo

3.3.1.1. Ensayo de movilidad

Los protocolos fueron adaptados de Deziel *et.al* (2001), realizándose modificaciones (Vicario *et.al*, 2015). Las placas de desplazamiento tipo “swarm” con 0,5% (p/v) de agar en agua (para algunos ensayos se suplementaron con 10 % p/v de medio YEM o LB) fueron inoculadas en superficie con 5 μ l de una suspensión bacteriana de DO_{620nm} 1. Las placas de “swimming”, con 0,3% (p/v) de agar en agua (suplementada con 10% (p/v) de medio YEM o LB para algunas determinaciones), fueron inoculadas por picadura. Se incubaron durante 8 días para el rizobio *B. sp.* SEMIA 6144 y 7 días para *A. brasilense* Az 39, en estufa a 28 °C.

El desplazamiento por swarming fue examinado a través de la expansión del patrón irregular de anillos característicos de este tipo de movilidad. El swimming fue determinado cualitativamente examinando la zona circular de turbidez formada por las células bacterianas que se encuentran migrando lejos del punto de inoculación.

Con la finalidad de evaluar la acción del estrés hídrico sobre la movilidad de los microorganismos, se emplearon cultivos crecidos en condiciones controles y en presencia de PEG 15 mM, en fase estacionaria de crecimiento y ajustados a DO_{620nm}1, a fin de sembrar en las placas de movilidad igual número de microorganismos.

3.3.1.2. Ensayo de quimiotaxis bacteriana hacia rizodeposiciones de *A. hypogaea*

Para conocer si las bacterias presentan quimiotaxis en respuesta a la presencia de rizodeposiciones de maní, sobre las placas de movilidad de tipo swarming y de swimming inoculadas se colocaron discos de papel absorbente embebidos con 8 μ l de rizodeposiciones de maní, concentradas. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones descritas en la sección 3.3.1.1. Se examinó la motilidad cualitativamente a través de la zona de turbidez

circular generada desde el punto de inoculación, observando variaciones en halo de desplazamiento bacteriano en presencia de rizodeposiciones.

3.3.1.3. Determinación del tamaño bacteriano de células vegetativas y diferenciadas

Se tomaron muestras de cultivos crecidos bajo condiciones controles y en presencia de PEG 15 mM, así como también de los halos de movilidad observados en las placas de swarming y de swimming de las condiciones estudiadas. Los extendidos coloreados por tinción de Gram fueron observados a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) y la adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G67,1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al mismo. El análisis digital de las imágenes, su procesamiento y las mediciones morfométricas fue realizado a través del software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania). Las fotografías fueron procesadas y el tamaño determinado, utilizando el software AXIOVISION 4.1 (Carl Zeiss).

3.3.1.4. Adhesión de rizobacterias a raíces de *A. hypogaea*

Cultivos de *B. sp.* SEMIA6144 y *A. brasilense* Az 39 en condición control y de estrés hídrico fueron crecidos hasta fase estacionaria. Las células fueron centrifugadas a 10.000 xg. El pellet obtenido se lavó tres veces con buffer PO₄Na 25 mM, pH 7,5 y se resuspendió en la misma solución para dar una concentración bacteriana de 2x10⁸ UFC/ml para *B. sp.* SEMIA6144 y de 1x10⁶ UFC/ml para *A. brasilense* Az 39 (Smit *et.al*, 1986; Dardanelli *et.al*, 2003; Albareda *et.al*, 2006; Vicario *et.al*, 2015).

Por otra parte se emplearon 5 raíces laterales de 2 cm de longitud de plantas de maní de siete días de crecimiento (tratamiento control y de estrés hídrico) y se sumergieron en 1 ml de suspensión bacteriana durante 2 h, en agitación 10 rpm y temperatura ambiente. Luego las raíces fueron lavadas 10 veces con buffer PO₄Na 25 mM a fin de remover las bacterias no adheridas. Para la cuantificación del número de bacterias adheridas, las raíces se incubaron en 500 µl de buffer fosfato, se molieron en un mortero estéril y se realizaron diluciones de la misma. El recuento se llevó a cabo por la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994), en medio sólido NFB. Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h y se determinó el

número de UFC/ml. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición. Finalmente el resultado se refirió a mg de peso seco de raíz (UFC/mg peso seco de raíces utilizadas). Para ello, por ensayo realizado, 5 raíces laterales de 2 cm de longitud y de igual peso húmedo que las utilizadas para el ensayo de adhesión, fueron llevadas a 60 °C en estufa hasta peso constante (5 días).

3.3.1.5. Análisis de la producción de auxinas por parte de las rizobacterias

Volúmenes de 25 ml del medio de cultivo para el crecimiento de las rizobacterias, fueron empleados con y sin la adición de triptófano (500 mg/ml). Estos fueron inoculados e incubados a 28 °C, en agitación (150 rpm) y oscuridad durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, una alícuota de 1,5 ml de cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y 1 ml del sobrenadante se homogeneizó con 2 ml de reactivo de Salkowski (H₂SO₄: 37,5 ml; FeCl₃ 0,5 M: 1,88 ml; H₂O: 62,5 ml, para un volumen final de 100 ml) e incubó en oscuridad 25 min. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 530 nm (Glickmann y Dessaux, 1995). Los valores de absorbancia obtenidos fueron comparados con la curva de calibración, de triptófano o AIA.

3.3.2. Estudio del efecto del déficit hídrico sobre las etapas tardías de la interacción planta-microorganismo

3.3.2.1. Interacción *A. hypogaea* - *B. sp.* SEMIA 6144

Una vez desinfectadas y pregerminadas las semillas según el apartado 3.1.1, se depositó una semilla por maseta que contenían vermiculita estéril, humedecida con 70 ml de agua destilada estéril por vaso.

Los tratamientos fueron:

- ✓ Control sin inocular
- ✓ Déficit hídrico sin inocular
- ✓ Control inoculado *B. sp.* SEMIA 6144
- ✓ Déficit hídrico inoculado *B. sp.* SEMIA 6144

Para el tratamiento de déficit hídrico, la solución de riego fue preparada adicionando PEG 15 mM. Los ensayos de inoculación se llevaron a cabo añadiendo 1 ml de cultivo de *B. sp. SEMIA 6144* 10^8 UFC/ml por semilla. Cada tratamiento constó de 12 unidades experimentales y se realizaron tres repeticiones independientes del ensayo.

El inóculo de *B. sp. SEMIA 6144* fue obtenido a partir de cultivos frescos crecidos en medio YEMA durante 96 h a 28 °C y posteriormente las células crecieron en dicho medio a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^8 UFC/ml (Dardanelli *et.al*, 2008; Vicario *et.al*, 2015).

Las plantas se incubaron durante 33 días en cámara de crecimiento sometidas a un fotoperiodo de 16 h de luz a 24 °C alternadas con 8 h de oscuridad a 20 °C, preservando las raíces de la luz (Dardanelli *et.al*, 2008). Los riegos se efectuaron dos veces por semana, a lo largo de los 33 días, con 10 ml de agua destilada estéril por vaso. Además las plantas pertenecientes a la condición de déficit hídrico, al día 15 fueron sometidas a un pulso de solución de PEG 15 mM. Al cabo de 33 días, las plantas fueron separadas del soporte, lavadas con agua destilada estéril y utilizadas para diferentes determinaciones.

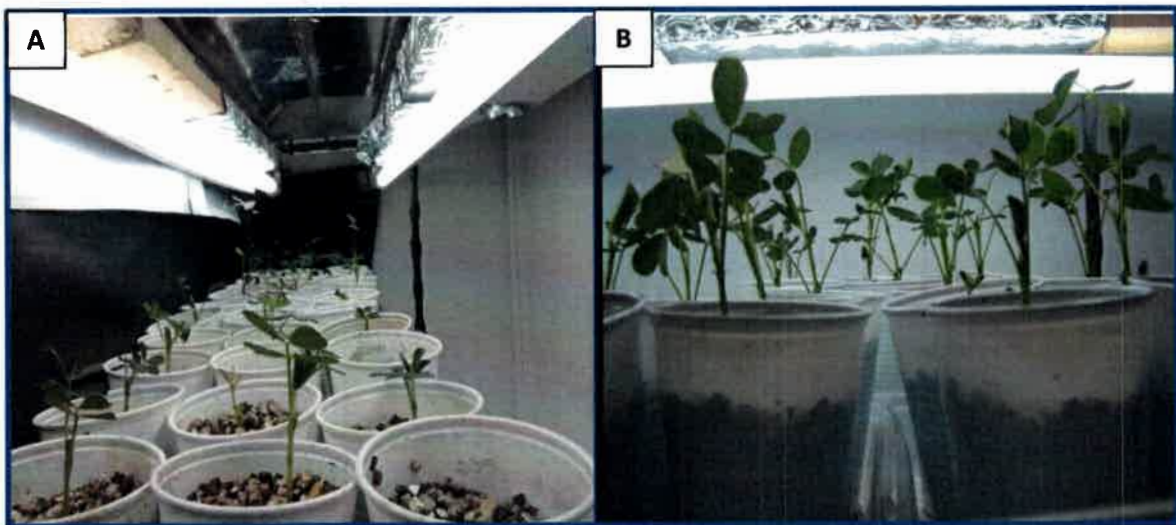


Figura 3.2. Plantas de *A. hypogaea* sembradas en sistemas de vasos plásticos en cámara de cultivo de plantas. **A.** Sistemas empleados en los ensayos de cinética de nodulación. **B.** Plantas de *A. hypogaea* inoculadas con *B. sp. SEMIA 6144*.

3.3.2.2. Interacción triple *A. hypogaea* - *B. sp.* SEMIA 6144 - *A. brasilense* Az 39

Una vez desinfectadas y pregerminadas las semillas según el apartado 2.1., se depositó una semilla por maseta conteniendo vermiculita estéril, humedecida con 70 ml de agua destilada estéril por vaso.

Los tratamientos fueron:

- ✓ Control sin inocular
- ✓ Déficit hídrico sin inocular
- ✓ Control coinoculado *B. sp.* SEMIA 6144 + *A. brasilense* Az 39
- ✓ Déficit hídrico inoculado *B. sp.* SEMIA 6144 + *A. brasilense* Az 39

Para el tratamiento de déficit hídrico, la solución de riego fue preparada adicionando 15 mM de PEG. Los ensayos de coinoculación se llevaron a cabo añadiendo 1 ml de cultivo de *B. sp.* SEMIA 6144 10^8 UFC/ml y 1 ml de cultivo de *A. brasilense* Az 39 10^6 UFC/ml, por semilla. Cada tratamiento constó de 12 unidades experimentales y se realizaron tres repeticiones independientes del ensayo.

Las plantas se incubaron asépticamente durante 33 días en cámara de crecimiento sometidas a un fotoperiodo de 16 h de luz a 24 °C alternadas con 8 h de oscuridad a 20 °C, preservando las raíces de la luz (Dardanelli *et.al*, 2008). Los riegos se efectuaron dos veces por semana, a lo largo de los 33 días, con 10 ml de agua destilada estéril por vaso. Además las plantas pertenecientes a la condición de déficit hídrico, al día 15 fueron sometidas a un pulso de solución de PEG 15 mM. Al cabo del tiempo de ensayo las plantas fueron separadas del soporte, lavadas con agua destilada estéril y utilizadas para diferentes determinaciones.

3.3.2.3. Parámetros de crecimiento de *A. hypogaea*

Longitud y peso seco del tallo y de raíz: tal como fue descrito en el apartado 3.1.3.

Número de nódulos: se determinó el número de nódulos presente en raíz principal, raíces laterales, estimándose el número total de nódulos (número de nódulos/planta).

Peso seco de nódulos: los nódulos fueron extraídos de cada planta y luego secados en estufa a 60°C días hasta obtener peso constante, expresado en mg de nódulos/planta.

Índice Raíz/Parte aérea (IRPA, López-Gómez, 2007): para obtener el índice IRPA se realizó el siguiente cociente:

$$\text{IR/PA: Peso seco raíz (mg) / Peso seco aéreo (mg)}$$

Tasa de crecimiento relativo (RGR): el peso seco de la radícula de semillas de tres días de germinación fue considerada como la biomasa inicial.

$$\text{RGR} = (\text{masa final} - \text{masa inicial}) / \text{masa inicial} / \text{diferencia de tiempo} = \\ \text{g ps/g ps/ días}$$

-Utilización de los recursos para la biomasa radical (**df/dt**): permite estimar cuánto del total de los recursos que toma la planta, lo destina a la biomasa radical.

$$\text{df/dt} = \text{RGR} \cdot (\delta - \text{Br/Bt})$$

Dónde: δ = (biom. debajo del suelo final – biom. debajo del suelo inicial) /biom. debajo del suelo final total.

Br: biomasa radical

Bt: biomasa total

Análisis de la lipoperoxidación: el contenido de MDA fue determinado tal como se indicó en el apartado 3.1.5.

3.3.2.3. Estudio de la cinética de nodulación

Para el ensayo de cinética de nodulación, las plantas fueron obtenidas tal como fue descrito en el apartado 3.2.2.1 y 3.2.2.2. Se desmontaron dos recipientes por condición y día de recuento (5, 7, 9, 11, 15, 18, 22, 25, 30 y 33) cuantificando el número de nódulos y comparando los resultados obtenidos entre las cuatro condiciones de ensayo. Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes del ensayo.

A fin de visualizar los primordios nodulares, las plantas fueron desmontadas durante los días de recuento y colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, durante 20 min, luego fueron lavadas con agua destilada estéril y se tiñeron con azul de metileno al 1%.

Posteriormente fueron visualizadas al microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Argentina S.A.) (Green y Emerich, 1999).

3.3.2.4. Determinación de la aptitud simbiótica o capacidad infectiva

Para la determinación de la aptitud simbiótica o capacidad infectiva también conocido como test de Burton, las plantas fueron separadas del soporte y lavadas con agua. Posteriormente se separaron y contabilizaron los nódulos de la raíz. Se consideraron como positivas aquellas plantas que presentaron 3 o más nódulos ubicados dentro de un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, un diámetro de 2,5 cm y una longitud de 2,5 cm. Los resultados se expresaron como porcentaje de plantas noduladas y se consideró positivo aquel ensayo que cuente con un mínimo de 80% de plantas positivas (noduladas).

3.3.2.5. Análisis de la fijación biológica del nitrógeno bajo déficit hídrico

El ensayo de la determinación de la actividad fijadora de nitrógeno (N₂) se realizó mediante el análisis de intercambio de gases según Witty y Minchin (1998), consistente en la medición de la evolución de H₂ que se produce junto con la reducción de N₂ a NH₃ de acuerdo con la siguiente ecuación:



Para realizar esta medida se emplea un sensor electroquímico de H₂. La medida del H₂ producido por los nódulos en una corriente de aire proporciona la actividad nitrogenasa aparente (ANA), ya que solo dos de los ocho electrones son empleados para la producción de H₂, mientras que el resto se utiliza para reducir el N₂ a NH₃. Para medir la actividad total de la nitrogenasa (TNA), se pasa a través de los nódulos una corriente de Ar/O₂ en una proporción 80/20%. En este caso todos los electrones son utilizados para la producción de H₂. Para determinar la tasa de fijación de N₂ (NFR) se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{NFR} = (\text{TNA} - \text{ANA}) / 3$$

También se puede calcular el coeficiente de alocaación electrónica (EAC), el cual nos indica la eficiencia de la nitrogenasa.

Los parámetros ANA, TNA, NFR y EAC fueron determinados para las plantas sometidas a los diversos tratamientos planteados.

3.4. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron sujetos a análisis de la varianza (ANOVA) con comparación de múltiples variables, aplicando el test de la menor diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) LSD Fisher.

En el caso de los ensayos de plantas, los tratamientos se compararon en conjunto: tratamientos control coinoculados vs tratamientos de estrés coinoculados.

Todos los análisis fueron llevados a cabo utilizando el programa InfoStat (InfoStat7 profesional ver-2007p, Grupo InfoStat, Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del déficit hídrico sobre los patrones de crecimiento y de exudación radical de *A. hypogaea*.

4.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de PEG sobre el crecimiento y morfología de *A. hypogaea*.

4.1.2. Efecto del déficit hídrico moderado sobre los parámetros de crecimiento de *A. hypogaea* a los 7 días.

4.1.3. Composición molecular de rizodeposiciones de *A. hypogaea* bajo déficit hídrico.

4.1.4. Efecto del déficit hídrico en las membranas lipídicas de *A. hipogaea*.

ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.1.

	Página
1.2. Composición química de rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i> . L, creciendo bajo condiciones control y de déficit hídrico.	77

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.1.

4.1. Relación entre peso seco de <i>A. hypogaea</i> de 7 días de crecimiento con respecto al potencial hídrico de la solución Hoagland.	71
4.2. Plantas de <i>A. hypogaea</i> luego de 7 días de crecimiento bajo diferentes condiciones.	72
4.3. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre plantas de maní de 7 días de crecimiento.	74
4.4. Efecto del estrés hídrico en la peroxidación de los lípidos en hojas y raíces de <i>A. hypogaea</i> de 7 de crecimiento.	85

4.1. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de crecimiento y de exudación radical de *A. hypogaea*

En Argentina, así como en el mundo entero, el área de siembra con *A. hypogaea* (maní) se está expandiendo anualmente, principalmente debido al interés de los productores por el alto precio internacional del producto. Muchas de las nuevas áreas cultivadas se caracterizan por ser áridas y semiáridas lo cual representa una dificultad ya que la productividad del maní está influenciada por la fluctuación de las precipitaciones (Reddy *et.al*, 2003; Cámara Argentina del Maní, 2010).

En nuestro país las precipitaciones son fluctuantes en la época de crecimiento del maní, y esto afecta a su rendimiento (Pietrarelli, 1980). En la región centro-sur de la provincia de Córdoba es frecuente la ocurrencia de periodos de estrés hídrico en los meses de enero y febrero, en coincidencia con el desarrollo reproductivo del maní (Giayetto, 2006).

El déficit de agua es uno de los estreses abióticos más importantes y es el principal obstáculo para el crecimiento y la productividad de las plantas en gran parte de la superficie de la tierra (Kramer, 1983). Una condición de sequía extendida conduce a un desarrollo interrumpido, senescencia de las hojas, marchitez, desecación y muerte (Schulze, 1986). La identificación de los componentes fisiológicos y bioquímicos del sistema de defensa antioxidante, que tiene un potencial para conferir tolerancia a la sequía, es esencial para la caracterización de cultivares tolerantes a la sequía y para mejorar la tolerancia al estrés en los cultivos (Celikkol *et.al*, 2010). Frente a este panorama se torna relevante el estudio de moléculas y de mecanismos de tolerancia que los cultivos expresen y sobre todo el papel que pueden jugar los microorganismos para promover su crecimiento y protegerlos de situaciones adversas.

4.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de PEG sobre el crecimiento y morfología de *A. hypogaea*. Establecimiento de las condiciones de trabajo posteriores

Con la finalidad de determinar la concentración de PEG necesaria para generar un potencial osmótico capaz de afectar visiblemente el crecimiento de la planta y establecer así un valor de déficit hídrico moderado para realizar nuestros estudios, se prepararon cinco soluciones sin y con el agregado de PEG. Las mismas fueron utilizadas en el sistema hidropónico donde crecieron plantas de maní, generando seis condiciones experimentales:

1. Solución Hoagland (0,07 MPa).
2. Solución Hoagland + PEG 10 mM (-0,13 MPa).
3. Solución Hoagland + PEG 15 mM (-0,28 MPa).
4. Solución Hoagland + PEG 20 mM (-0,55 MPa).
5. Solución Hoagland + PEG 30 mM (-0,86 MPa).
6. Solución Hoagland + PEG 40 mM (-1,07 MPa).

Después de 7 días de crecimiento en sistema hidropónico, las plantas fueron separadas de la solución y se les determinó peso seco de la parte aérea (PA) y peso seco de la parte radicular (PR). La figura 4.1., muestra la variación de la biomasa seca (BS) total de la planta en función del incremento del potencial osmótico de la solución Hoagland. Estos resultados demuestran el efecto perjudicial de los diferentes niveles de déficit hídrico, afectando aspectos del crecimiento de la planta lo cual involucra a la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica. Los efectos generales más evidentes del déficit hídrico son: reducción en el tamaño de la planta, área de la hoja y rendimiento del cultivo (Kramer, 1983).

El peso seco total de la planta de maní se redujo significativamente luego de aplicar PEG 15 mM (-0,28 MPa), mientras que la reducción del crecimiento fue drástico cuando las plantas fueron sometidas a un déficit hídrico severo (por encima de -0,5 MPa), observándose una reducción de más del 50% del peso seco de las mismas.

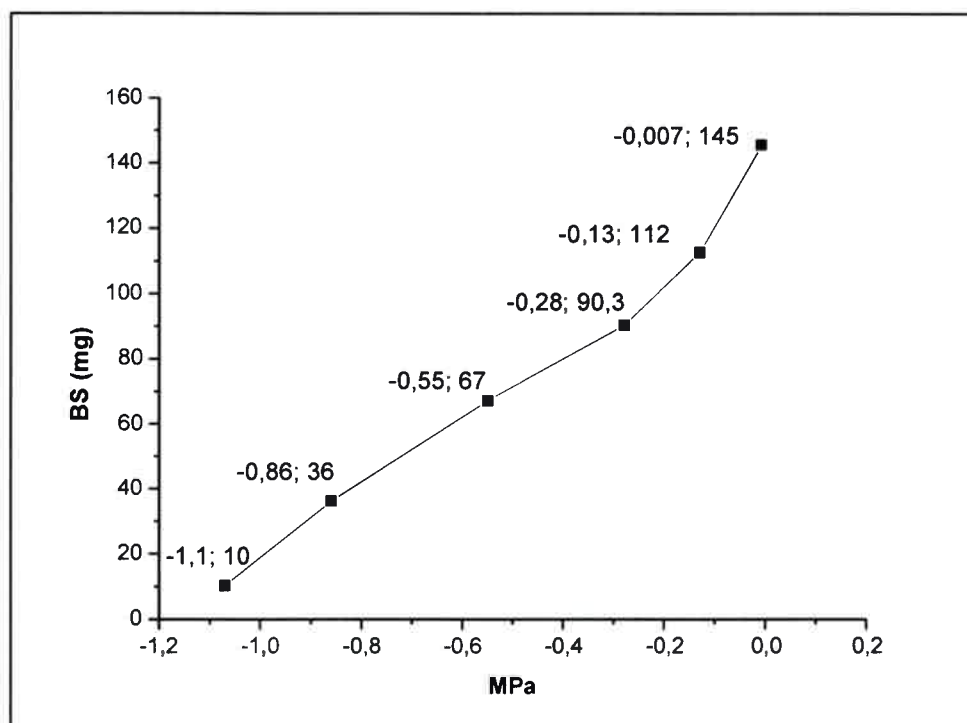


Figura 4.1. Relación entre peso seco (mg) de *A. hypogaea*. L de 7 días de crecimiento con respecto al potencial hídrico (MPa) de la solución Hoagland. Los puntos indican el peso seco para los niveles de déficit hídrico seleccionados en el estudio. Condiciones de derecha a izquierda: Hoagland control y Hoagland con PEG 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM. Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes.

La reducción del crecimiento implica principalmente la disminución del tamaño de la PA tal como se aprecia en la figura 4.2. El crecimiento de la PR respecto de la PA, se considera como un aspecto morfológico relacionado con el rendimiento o eficiencia de la planta, y al estar vinculado al equilibrio en el crecimiento de la misma, cualquier modificación en él refleja un cambio en los parámetros de crecimiento de ambos órganos vegetales (Munns, 1993).

Las plantas pertenecientes al grupo control presentaron una morfología normal, mientras que las plantas estresadas manifestaron cambios morfológicos principalmente en la parte aérea (Figura 4.2.).

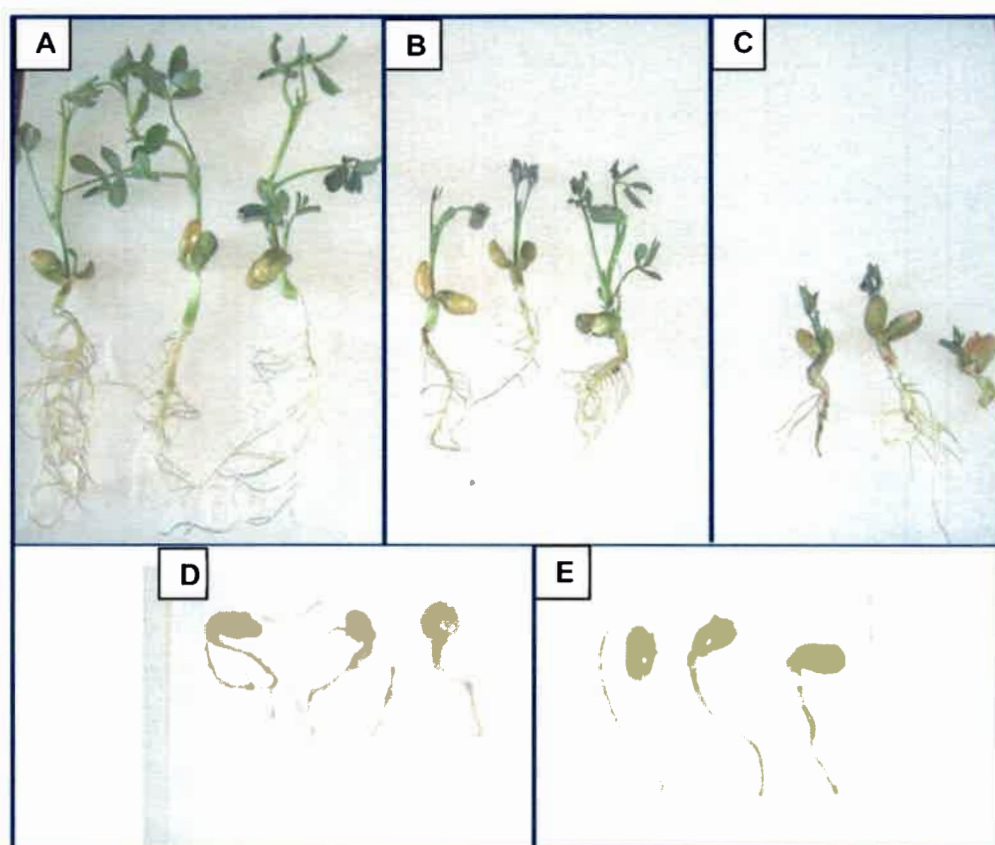


Figura 4.2. Plantas de *A. hypogaea*. L luego de 7 días de crecimiento bajo diferentes condiciones de trabajo. **A.** Hoagland control; Hoagland con PEG: **B.** 15 mM; **C.** 20 mM; **D.** 30 mM; **E.** 40 mM.

Cuando se empleó 10 mM de PEG se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta, sin embargo estos valores no resultaron estadísticamente significativos a los obtenidos en el tratamiento control. Al aumentar la concentración de PEG a 15 mM, las plantas desarrollaron una raíz de mayor diámetro y más oscura comparada con las controles. La PA presentó menor desarrollo y una marchitez moderada comparado con las hojas de las plantas provenientes del tratamiento control (Figura 4.2., B). En el caso del tratamiento con 20 mM se observó escaso desarrollo de la PA, mientras que la PR presentó morfología más gruesa y con menor número de raíces laterales, comparada al control (Figura 4.2., C). Cuando la concentración de PEG fue de 30 mM y 40 mM, las plantas no se desarrollaron (Figura 4.2., D, E).

Nuestros resultados son acordes con los informados por otros autores (Martínez, 2003; Hong-Bo Shao *et.al*, 2008; Laynez-Garsaball *et.al*, 2008). En estos trabajos los investigadores

concluyen que en respuesta al déficit hídrico, el sistema radicular es poco ramificado, la raíz principal detiene su crecimiento a fin de contribuir a la tolerancia a la sequía. También se observan curvaturas y engrosamientos de la raíz, pérdida de turgencia, así como también se inhibe la expansión foliar, se reduce la elongación y el número de nudos del tallo (Hamed y Ahmad. 2015).

A partir de la concentración de PEG 15 mM (-0,28MPa) se obtuvieron valores de peso húmedo y seco estadísticamente menores a los datos obtenidos en el tratamiento control, por lo que se decidió utilizar dicho potencial como el valor de trabajo capaz de generar un estrés hídrico moderado en plantas de maní, acorde al que sufre en nuestra zona manisera de la provincia de Córdoba (Giayetto, 2006).

4.1.2. Efecto del déficit hídrico moderado sobre los parámetros de crecimiento de *A. hypogaea* a los 7 días de crecimiento

Una vez que se estimó el valor de potencial de trabajo que causaba un estrés hídrico moderado sobre plantas de maní, se determinó la longitud, el peso húmedo y el peso seco de la PA y PR de las plantas de 7 días de crecimiento bajo condiciones control y de déficit hídrico (Figura 4.3.).

Como puede observarse en la gráfica 4.3., A, la longitud de la PA de las plantas de maní crecidas en presencia de PEG se redujo un 36% comparada con la PA de plantas controles, mientras que la longitud de la PR de las plantas estresadas disminuyeron un 18% comparado con la PR de las plantas control. Se registraron disminuciones estadísticamente significativas en el peso húmedo y seco de la PA y PR de las plantas cuando estas crecieron bajo un potencial osmótico de -0,28 MPa (Figura 4.3., B, C), resultados que se visualizan en la figura 4.2. La biomasa de la PA resultó más afectada que la PR, cuando la planta fue sometida al estrés hídrico, esto se debe a que las plantas que desarrollaron bajo sequía utilizan mayores recursos en el desarrollo radical en detrimento del crecimiento de su parte aérea.

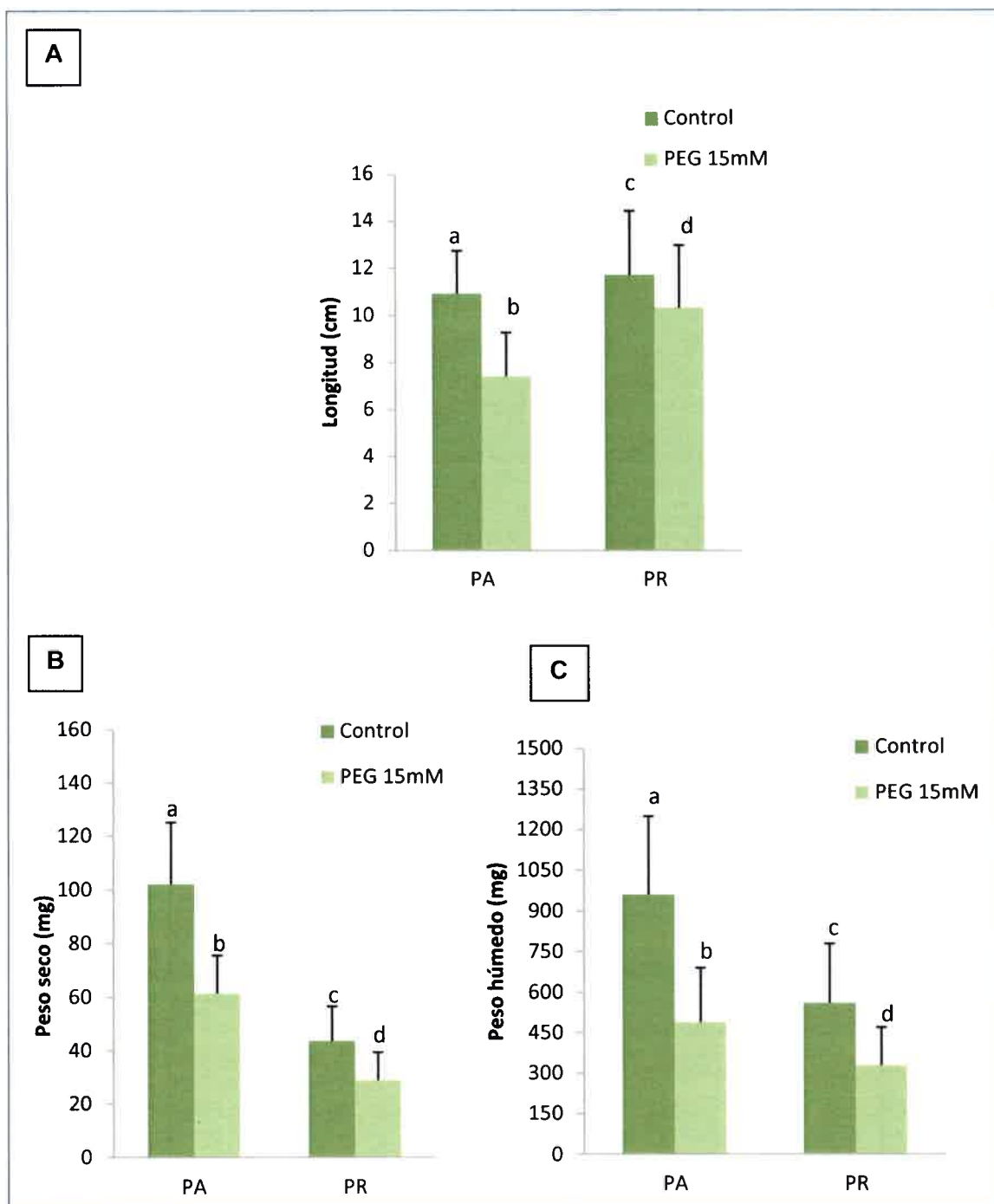


Figura 4.3. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre plantas de *A. hypogaea*. L de 7 días de crecimiento. **A:** Longitud (cm); **B:** Peso seco (mg); **C:** Peso húmedo de plantas de *A. hypogaea* de la PA y PR bajo diferentes condiciones: Hoagland control y PEG. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm S.E.M con 20 plantas por tratamiento y experimento. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La inhibición del crecimiento de la PA, y en menor medida de la PR es un síntoma generalizado del estrés hídrico, y ha sido reportado para numerosas especies vegetales sometidas a dicho estrés. Resultados semejantes han sido descriptos cuando se evaluó la resistencia a la sequía inducida por PEG en cultivos hidropónicos de especies forestales (Rodríguez *et.al*, 2008), arroz (García *et.al*, 2005), plántulas de tomate (Dell Amico *et.al*, 2006) y diversas leguminosas (Hamed y Ahmad, 2015).

4.1.3. Composición molecular de rizodeposiciones de *A. hypogaea* bajo déficit hídrico

Anteriormente se mencionó el efecto del potencial osmótico -0,28 MPa generador de un déficit de agua moderado, sobre los parámetros de crecimiento de plantas de maní. Con el propósito de investigar si se modifica la composición molecular de los exudados de raíces de maní bajo una condición de déficit hídrico, se procedió a la identificación de moléculas relevantes en la comunicación rizosféricas tales como ácidos grasos (AG), flavonoides, triptófano, auxina (AIA), ácidos orgánicos (AO) y terpenos presentes en las rizodeposiciones de maní (Tabla 1.2).

4.1.3.1. Ácidos grasos

En las plantas, los AG modulan una variedad de respuestas a estreses abióticos, como por ejemplo, los niveles de AG poliinsaturados en membranas de cloroplasto que afectan la fluidez y determinan la capacidad de las plantas de aclimatarse a ambientes que presentan temperaturas estresantes (Routaboul *et.al*, 2000; Iba, 2002). Otros autores han demostrado que los AG regulan la tolerancia a sal, sequía y metales pesados (Tumlinson y Engelberth, 2008; Upchurch, 2008).

Los AG de rizodeposiciones provenientes de plantas creciendo bajo condiciones control y de déficit hídrico durante 7 días, fueron analizados por cromatografía gaseosa y confirmados por espectrometría de masa (GC-MS). Como se observa en la tabla 1.2., los AG palmítico (16:0) y esteárico (18:0) presentaron porcentajes mayoritarios en todos los tratamientos, seguidos por los AG saturados laúrico (12:0) y mirístico (14:0). Los AG saturados de cadenas largas, de más de 20 átomos de carbono (C), fueron detectados en cantidades minoritarias, al igual que

la mayoría de los AG insaturados, donde sólo el ácido oleico ($18:1\Delta^9$) mostró niveles porcentuales más altos. En rizodeposiciones de plantas crecidas bajo déficit hídrico, se encontró una composición diferente de AG. En éste caso, se produjo una reducción en el porcentaje para los AG saturados 18:0, 16:0, 14:0 y 12:0, mientras que hubo incrementos en los porcentajes del AG insaturado $18:1\Delta^9$ y de los AG de más de 20C. Los AG de cadena corta se hallaron en baja proporción y su cantidad fue reducida durante el déficit hídrico (Tabla 1.2.). Se ha informado que los AG 12:0 y 14:0 poseen funciones antifúngicas, regulando la respuesta de defensa de la planta. Ambos son importantes para la mantención del proceso de señalización celular que opera durante el proceso de nodulación por *B. diazoefficiens* los cuales han sido hallados también en rizodeposiciones de soja (Brechenmacher *et.al*, 2010).

En concordancia con nuestros resultados, los AG 14:0, 16:0, 18:0 y $18:1\Delta^9$ fueron hallados en rizodeposiciones de varias especies vegetales (Bolton *et.al*, 1992; Fumero, 2011; Morel *et.al*, 2015). Lucas García *et.al*, 2001 encontraron valores altos del AG 16:0 en exudados provenientes de la leguminosa *Lupinus* a semejanza de lo obtenido en esta Tesis Doctoral

El incremento de $18:1\Delta^9$ en las rizodeposiciones es una señal que emite la planta frente a esta condición de estrés, y puede deberse a que el mismo es uno de los más abundantes en membranas vegetales y su acumulación en raíz podría estar involucrada en la modificación de la fluidez necesaria para el ingreso de rizobacterias a la célula vegetal. El AG $18:1\Delta^9$ regula positivamente las vías metabólicas necesarias para la síntesis de nuevas membranas requeridas durante el proceso de infección tal como lo es la biogénesis de membrana para simbiosomas y nódulos (Brechenmacher *et.al*, 2010).

El índice de insaturación de los AG denominado I/S fue calculado según Svenningsson *et.al* (1990). Para AG presentes en rizodeposiciones de maní, se obtuvo que dicho índice en condiciones normales fue de 0,08 mientras que bajo déficit hídrico resultó de 0,12, lo que implica un incremento de un 30% aproximadamente. Esto sugiere que hubo un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados en las rizodeposiciones de maní obtenidas bajo estrés hídrico.

Tabla 1.2. Composición química de rizodeposiciones de *A. hypogaea*. L, creciendo bajo condiciones control y de déficit hídrico (PEG 15 mM).

Familia Química		Condición de crecimiento	
		Control	PEG 15 mM
Ácidos Grasos (%)	Ácido Láurico (12:0)	2,1	ND
	Ácido Mirístico (14:0)	7,8 a	7,9 a
	Ácido Palmítico (16:0)	40 a	37,4 b
	Ácido Palmitoleico (16:1)	2,2	ND
	Acido Esteárico (18:0)	42 a	36,2 b
	Ácido Oleico (18:1 Δ9)	5,1 a	9,8 b
	NI (> 20C)	0,9 a	9,2 b
Flavonoides (ng/mg RS)	Apigenina	49,1 a	54,8 b
	Crisina	27,1	ND
	Genisteína	87 a	69,6 b
	Daidzeína	8	ND
	Naringenina	80,2 a	1029,4 b
	Naringina	31,5	ND
	Hesperidina	7 a	44,4 b
	Luteolina	0,02 a	1,6 b
Morina	1,7 a	15,3 b	
Aminoácido (ng/mg RS)	Triptófano	ND	39,7

Hormona (ng/mg RS)	AIA	0,26	ND
Ácidos Orgánicos (ng/mg RS)	Acido Málico	323 a	296,5 b
	Ácido Láctico	130 a	721,8 b
	Ácido Acético	179,2 a	117,2 b
	Ácido Cítrico	84,2 a	43,6 b
	Acido Succínico	58,2 a	673,5 b
Terpenos (+/-)	Ocimene	+	ND
	Carene	+	++
	Menthatriene	+	++
	Terpinolene	ND	+
	Farnesene	+	++
	Farnesol	ND	+
	Nerodiol	ND	+
Hymachelene	ND	+	

Ácidos grasos (%); flavonoides (ng/mg RS); triptófano (ng/mg de RS); AIA (ng/mg RS); Ácidos orgánicos (ng/mg RS); terpenos (presencia, ausencia, +/-); RS: raíz seca; ND: no detectado, NI: no identificado. Los valores representan la media de \pm S.E.M de cinco experimentos independientes. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados mediante GC, y corroborados mediante GC-MS, en colaboración con los servicios técnicos de la Dra. Monica Hourcade, Rosario, Santa Fe (Argentina). Los flavonoides fueron analizados mediante HPLC-MS en colaboración con los servicios de la Dra. Luna, Dpto de Fisiología Vegetal, UNRC, Córdoba (Argentina). Los ácidos orgánicos fueron analizados por UPLC en colaboración con la Dra. Lluch Plá y los servicios técnicos de la Universidad de Granada, Granada (España). El análisis de terpenos se realizó mediante HPPLC, en colaboración a los servicios técnicos prestados por la Dra. Piccoli, Mendoza (Argentina)

4.1.3.2. Flavonoides, auxinas y triptófano

Las raíces pueden liberar una variedad importante de moléculas implicadas en los procesos de interacción y comunicación con los microorganismos de la rizósfera. Los flavonoides son una clase importante de compuestos polifenólicos producto del metabolismo secundario de las plantas, donde para leguminosas se destaca su función como inductores de los genes *nod* presentes en los rizobios, importantes para establecer la simbiosis fijadora de N₂ así como también participan de manera activa en la quimiotáxis bacteriana (Winkel-Shirley, 2001; Morel *et.al*, 2015).

Rizodeposiciones de maní de 7 días, fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masa (HPLC-MS) (Tabla 1.2.). En las rizodeposiciones provenientes de la condición control, los flavonoides mayoritarios fueron genisteína, naringenina, apigenina y crisina. Se detectaron niveles más bajos de naringina, daidzeína, hesperidina y morina. Cuando se analizaron las rizodeposiciones provenientes de raíces bajo déficit hídrico, se observó incremento en los niveles de naringenina (de 80 hasta 1028 ng/mg de raíz seca (RS)) y hesperidina (de 7 hasta 44 ng/mg RS) y disminuyó la concentración de apigenina y genisteína en aproximadamente un 90%. Los flavonoides daidzeína y crisina no se detectaron en esta condición.

Basándose en las diferencias estructurales, los flavonoides pueden ser clasificados en diferentes sub-grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas. Todos estos tipos de flavonoides están relacionados con una ruta biosintética en común (Winkel-Shirley., 2001). La flavonova naringenina, es un precursor de casi todos los otros flavonoides y es un producto final común en sí (Cohen *et.al*, 2001). Como se puede apreciar en la tabla 1, uno de los principales cambios en el estrés hídrico fue la disminución de los flavones (apigenina, luteonina, y crisina). El flavonoide daidzeina no fue detectado bajo la condición de déficit hídrico. Este es un resultado a destacar ya que se conoce que este flavonoide es un supresor de genes *nod* de rizobios de maní (Novak *et.al*, 2002). También se detectó un incremento de los flavonones hesperidina y naringenina en las rizodeposiciones de plantas estresadas. Ambos flavonoides poseen alta capacidad inductora de genes *nod*, principalmente en *R. leguminosarum* (Novak *et.al*, 2002). La hesperidina es un flavonoide o-glucosido, que presenta unido a su C7 dos azúcares: ramnosa y glucosa. Una característica

importante de los flavonoides glicosilados es que poseen una actividad inductora de genes nod más fuerte que la forma aglicona (Rijke *et.al*, 2006). En nuestro trabajo la flavonona naringina (forma glucosilada de la naringenina), no fue detectada en rizodeposiciones proveniente de las plantas estresadas, mientras que en esta condición, aumentaron los niveles de su forma aglicona (naringenina). Los flavonoides pueden ser sintetizados y modificados en respuesta a factores bióticos y abióticos presentes en la rizósfera (Paiva, 2000). La solubilidad y movilidad de los flavonoides en un suelo, depende de las modificaciones que estos presenten. La glicosilación favorece la solubilidad en agua, y por lo tanto serán más fácilmente utilizados por los microorganismos, y las exoenzimas (Masaoka *et.al*, 1993).

Tal como se muestra en la tabla 1.2., en ambas condiciones de crecimiento, naringenina fue uno de los flavonoides mayoritarios. Nuestro resultado coincide con lo que se ha registrado en otros reportes, donde se ha observado que naringenina es exudado por las raíces de algunas leguminosas y es precursor de muchos flavonoides importantes (Novak *et.al*, 2006; Brechenmacher *et.al*, 2010).

Existen pocos estudios sobre los cambios en el patrón de flavonoides exudados por raíces de maní, bajo estrés abiótico. Dardanelli *et.al*, (2008), reportaron cambios en los exudados de raíces de soja, cuando ésta era sometida a estrés salino donde los flavonoides daidzeína y naringenina no fueron detectados. Zhou *et.al*, (2010), pudieron determinar que ante un estrés hídrico elevado, la exudación de flavonoides por parte de las raíces de caña de azúcar, disminuía drásticamente. Otros autores detectaron que el estrés hídrico generado por la aplicación de 10-30% PEG, incrementó la producción de flavonoides por parte de la planta medicinal *Glycyrrhiza inflata Batalin*, mientras que niveles superiores de PEG disminuyeron significativamente la producción de flavonoides (Ying *et.al*, 2007). Estos resultados indican una correlación entre la magnitud del déficit hídrico aplicado y la disminución de la producción de flavonoides por parte de la planta.

Las raíces de las plantas secretan auxinas en baja cantidad, lo cual dificulta su cuantificación en los exudados. En condiciones óptimas de crecimiento, las rizodeposiciones de maní presentaron niveles bajos de la auxina AIA (0,26 ng/mg RS). Una correlación inversa entre los niveles de Trp y AIA fue detectada para un mismo tratamiento, lo cual sugiere que la planta excreta Trp (de la raíz a la rizósfera) probablemente utilizada para la producción de AIA. El estrés hídrico inhibió la exudación de AIA, mientras que se registró 39,7 ng/mg RS de

su aminoácido precursor Trp (Tabla 1.2.). Además de la producción endógena de AIA por parte de la planta, existe una producción exógena asociada a los microorganismos del suelo. La mayoría del AIA presente en la rizósfera es derivada del Trp secretado por las raíces y convertida en AIA por algunas bacterias de la rizósfera (Kamilova *et.al*, 2006). Morel *et.al* (2015) informaron que para exudados radicales de alfalfa, la fitohormona AIA no fue detectada en los experimentos sin inocular, pero si en los inoculados, donde no se registró Trp. Éste último fue detectado en los estadios tempranos (exudados de plantas de 4 días de crecimiento). Similar a nuestros resultados, Nejad *et.al* (2011), observaron que en plantas de trigo, el déficit de agua durante su desarrollo disminuye el contenido de AIA en los exudados radicales. Teniendo en cuenta esta información, nuestros resultados sugieren que bajo condiciones de déficit hídrico, raíces de maní podrían usar como estrategia la exudación de Trp como una fuente de precursor para la producción bacteriana de AIA a fin de promocionar el crecimiento radical bajo ésta condición de crecimiento desfavorable.

4.1.3.3. Ácidos orgánicos

Dentro de los exudados radicales se encuentran compuestos de bajo peso molecular, como lo son los AO (Bais *et.al*, 2001). El perfil de exudados en plantas es muy variable, sin embargo los ácidos cítricos, málicos, malónico, fumárico son los más frecuentemente encontrados (Roelofd *et.al*, 2001). Los ácidos orgánicos están implicados en una gran variedad de procesos, actúan como fuente de nutriente (cítrico, oxálico, malónico, glutarico), mejora la toma de nutriente por parte de la planta (succínico, acético), participan en la detoxificación de metales pesados (cinámico, fórmico), inducen el crecimiento de rizobacterias preexistentes en el suelo y actúan como moléculas quimioatrayentes para los microorganismos hacia las raíces de las plantas (málico y fumárico) (Dakora y Phillips, 2002; Bertin *et.al*, 2003; Sandnes *et.al*, 2005; Khorassani *et.al*, 2011).

Los AO se encuentran usualmente presentes en los exudados radicales como parte de una estrategia de movilización de nutrientes presentes en los suelos. Algunos estudios indican que los AO están implicados en la movilización de Mn, el ácido oxálico está implicado en la movilización de Al, mientras que los ácidos málico y cítrico participan como quelantes de Fe (Bais *et.al*, 2001). En nuestro estudio, rizodeposiciones de maní de 7 días, provenientes de

plantas sometidas a estrés hídrico, fueron analizadas por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS). En las rizodeposiciones provenientes de la condición control, los AO mayoritarios fueron málico (323 ng/mg de RS), acético (179 ng/ mg RS), láctico (130 ng/mg RS) cítrico (84 ng/mg RS) y succínico (58 ng/mg RS). Bajo déficit hídrico se incrementó la exudación de ácidos orgánicos. Los niveles de ácido láctico (722 ng/mg RS) y succínico (673,5 ng/mg RS) incrementaron mientras que disminuyó la concentración de ácido málico y cítrico (Tabla 1.2.). éstos últimos se encuentran implicados en la mantención del balance y potencial osmótico. El ácido cítrico puede reducir el pH de la rizósfera y movilizar el CaPO_4 del suelo. En nuestros resultados, bajo la condición de déficit hídrico, se observó un importante incremento en la exudación de ácido láctico (524%). Éste ácido carboxílico se acumula principalmente en pelos radicales y participa en la nodulación de soja con *B. japonicum* y se acumula principalmente durante estrés salino (Brechenmacher et al., 2010). Los cambios observados en el perfil de exudación de los AO pueden ser considerados como una adaptación fisiológica al estrés más que como una respuesta pasiva de las plantas al estrés.

Algunos autores han indicado que por lo general las plantas monocotiledóneas exudan mayor cantidad de AO cuando crecieron bajo déficit de hierro (Fan *et.al*, 1997; Carvahais *et.al*, 2011). Se ha observado un incremento en la exudación de ácido cítrico y málico cuando las plantas de alfalfa crecen bajo deficiencia de fósforo (Holfland, 1989). Song *et.al* (2012) analizaron el cambio en el patrón de AO presentes en exudados radicales de maíz. Al igual que en los exudados de maní, los principales ácidos orgánicos presentes fueron ácido málico, láctico, acético, cítrico, y succínico. A diferencia de nuestros resultados también se encontró ácido fumárico. La concentración de ácidos orgánicos en exudados de maíz resultó afectada por el estrés osmótico (PEG 10% y 30%), siendo el principal ácido orgánico presente bajo esta condición el ácido málico. De manera similar a lo que sucede en el caso de maní (tabla 1.2), bajo déficit hídrico se incrementó la exudación de ácido láctico y succínico, mientras que disminuyó la exudación de ácido acético.

4.1.3.4. Terpenos

Otra de las moléculas de importancia biológica son los terpenos producidos por las plantas, los cuales están implicados en la defensa contra patógenos así como al estrés abiótico (Ormeño *et.al*, 2006; Salomon *et.al*, 2013). Los terpenos presentes en las rizodeposiciones de maní fueron analizadas por GC-MS. Comparados con testigos comerciales, en las rizodeposiciones provenientes de la condición control se identificó la presencia de cuatro terpenos: ocimene, carene, menthatriene y farnesene (Tabla 1.2). Los tres primeros pertenecen a la clasificación de los monoterpenos, mientras que farnesene a la de sesquiterpeno.

La aplicación de estrés hídrico indujo la exudación de terpenos. En comparación con las rizodeposiciones de la condición control, se observó un incremento en el perfil de monoterpenos exudados. Dos de ellos, menthatriene y carene, con propiedades antioxidantes y la aparición del terpinolene. Bajo esta condición, no se detectó el monoterpeno ocimene, mientras que se indujo la exudación de terpinolene a diferencia de la condición control. Respecto a los sesquiterpenos (farnesene, farnesol, nerodiol e hymachelene), el déficit hídrico indujo la exudación de hymachelene, nerodiol y farnesol, los cuales no habían sido detectados en ausencia del factor estresante. Al igual que en la condición control, el sesquiterpeno no cíclico farnesene fue detectado, aunque en mayor proporción.

La detección de terpenos se da principalmente desde las hojas, aunque también se produce desde las raíces. Su producción está relacionada con la defensa a patógenos, el ataque de herbívoros y al estrés abiótico (Beckett *et.al*, 2012; Gil *et.al*, 2012; Piccoli y Bottini, 2013). Esta última acción protectora ocurre a través de su actividad antioxidante, siendo capaces de secuestrar radicales libres y reducir el daño oxidativo, induciendo la integridad y estabilidad de las membranas (Aharoni *et.al*, 2003; Wei y Shibamoto, 2007; Beckett *et.al*, 2012). Como podemos observar en la Tabla 1.2., el estrés hídrico fomentó la exudación de monoterpenos principalmente aquellos con actividad antioxidante. Consecuentemente, podemos señalar que la presencia de estrés hídrico favoreció en maní la exudación de especies oxigenadas de sesquiterpenos, tales como farnesol y nerodiol, ambos de propiedades antimicrobianas (Salomon *et.al*, 2013).

Los resultados aquí descriptos son de gran importancia, y aportan datos relevantes a la escasa bibliografía sobre terpenos presentes en exudados radicales de leguminosas, dando

lugar nuevas expectativas respecto a la importancia de los terpenos en las comunicaciones rizobiales. No existe bibliografía que detalle o caracterice los terpenos presentes en exudaciones de raíces de maní. Similar a nuestros resultados, estudios realizados por Ormeño *et.al* (2007) demostraron que el estrés hídrico ejerció un efecto positivo sobre la producción de monoterpenos en *P. halepensis* y *C. albidus*, ya que los valores registrados para monoterpenos fueron significativamente más altos que los obtenidos para las plantas de la condición control. Los resultados obtenidos en este estudio también sugieren que los sesquiterpenos son probablemente reemplazados por monoterpenos cuando se prolonga la sequía, porque podría impedir ciclación de los precursores como el farnesil (Hansen y Seufert, 1999).

Algunos autores sostienen que el déficit hídrico afecta la emisión de terpenos, en diferentes maneras. La producción desde la hoja puede verse reducida, inhibida, no modificada o favorecida, a diferencia de otros estrés abióticos que han demostrado favorecer temporariamente la producción de terpenos (Staudt *et.al*, 2002; Funk *et.al*, 2004).

Nuestros resultados indicaron variación en el perfil de terpenos presentes en rizodeposiciones de plantas de maní sometidas a déficit hídrico, principalmente el incremento en la exudación de algunos terpenos con funciones antioxidantes. Para conocer si existe una correlación entre el estrés hídrico y el oxidativo, consideramos de importancia determinar un importante indicador de estrés en plantas como lo es el malondialdehído (MDA).

4.1.4. Efecto del déficit hídrico en las membranas lipídicas de *A. hypogaea*

Las membranas lipídicas son vulnerables al daño celular causado por diversos estreses, y el grado de daño generado es comúnmente utilizado como una medida de la tolerancia al estrés (Finean *et.al*, 1984; Bianucci *et.al*, 2013). Para conocer si el déficit hídrico causa daños a nivel de los lípidos de membrana procedentes de hoja y raíz de plantas de maní, investigamos el efecto de PEG en la peroxidación de los lípidos (Figura 4.4.).

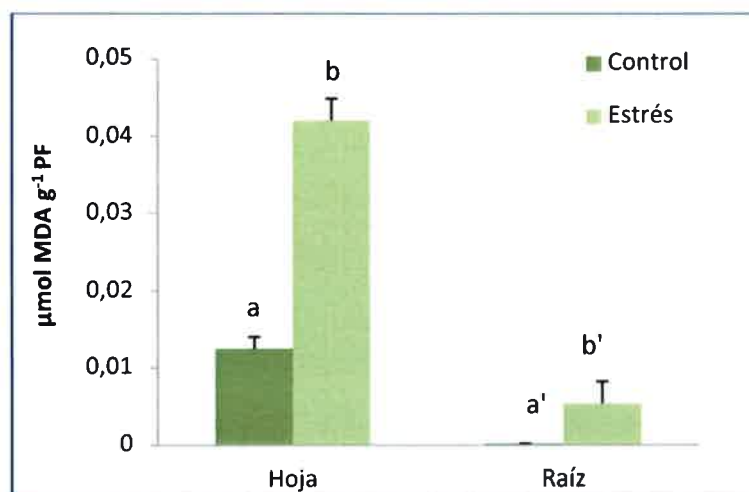


Figura 4.4. Efecto del estrés hídrico en la peroxidación de los lípidos en hojas y raíces de *A. hypogaea*. L de 7 días de crecimiento. Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La peroxidación de lípidos determinada como concentración de malonaldehído (MDA) es más intensa en hojas de plántulas de maní que en la raíz, donde la concentración de MDA es casi nula bajo condiciones óptimas de crecimiento. El déficit hídrico (PEG 15 mM) incrementó este parámetro en un 237% en hoja respecto al control, mientras que en raíz si bien el contenido de MDA es inferior al encontrado en hoja, aumentó de 0,002 a 0,0054 $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ PF (270%). Estos datos indican que el déficit hídrico genera un estrés en las plántulas y conduce a un daño en las membranas lipídicas. El contenido de MDA observado bajo esta condición, presenta una tendencia similar a la observada por Palma Martin (2009). Este autor reportó que para *P. vulgaris*, la peroxidación lipídica es superior en hoja que en raíz, aun así cuando las plántulas crecieron bajo estrés salino (NaCl 150 mM), aumentos significativos del contenido de MDA se observaron principalmente en hoja. Similares efectos se observó para *A. hypogaea* sometida a estrés salino (30, 210, 240 y 310 mM de NaCl), registrándose aumentos hasta del 300% en el contenido de MDA en hojas (Jain *et.al*, 2001). Bianucci *et.al* (2013), estudiaron el efecto que genera la presencia de Cd en *A. hypogaea*. Estos autores informaron un efecto negativo, produciendo daños oxidativos los cuales se observaron a nivel de la peroxidación lipídica principalmente en hojas. Sin embargo cuando

inocuaron con *Bradyrhizobium* sp. se logró reducir el contenido de MDA, indicando un efecto protector del inóculo frente al estrés por Cd.

Turkan et al (2004) estudiaron la respuesta del sistema antioxidante de *P. vulgaris* sometido a estrés hídrico. El contenido de MDA en hojas obtenidas de plantas de *P. vulgaris* sometidas a déficit hídrico mediante el agregado de PEG (10%) incrementó un 45% respecto al control y dicho porcentaje se mantuvo constante entre los 7 y 14 días de crecimiento.

Como se analizó en el apartado 4.1.3.4., plantas estresadas exudaron mayor cantidad de terpenos con funciones antioxidantes. Esto podría llegar a ser una medida para paliar el daño oxidativo que genera dicho estrés, lo cual vemos reflejado en una medida indirecta como lo es la peroxidación lipídica.

Consideramos importante conocer si la inoculación de las plantas de maní con rizobacterias resultaría capaz de mitigar los efectos del déficit hídrico sobre la peroxidación lipídica. En base a este supuesto, más adelante analizaremos el efecto del déficit hídrico en el contenido de MDA en hoja de plantas crecidas en presencia y ausencia de inóculos bacterianos.

4.1. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39. Membrana bacteriana: mecanismos de adaptación.

4.2.1. Efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento de las rizobacterias.

4.2.2. Efecto del déficit hídrico sobre la composición y metabolismo de lípidos de la membrana bacteriana.

4.2.3. Dinámica de la membrana bacteriana durante la adaptación al déficit hídrico.

ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.2.

	Páginas
1.3. Efecto del estrés hídrico sobre los parámetros de crecimiento en <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	93
1.4. Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de AG.	96
1.5. Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de PL.	100

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.2.

4.5. Curva de crecimiento de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144.	91
4.6. Curva de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Az 39 crecida en condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM)	91
4.7. Evaluación cualitativa de la viabilidad celular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39 (LIVE/DEAD®).	92
4.8. Cambios en la polarización de la sonda DPH en células <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 después de shock osmótico (PEG).	102
4.9. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de AG y PL.	104
4.10. Cambios en la polarización de DPH en células <i>A. brasilense</i> Az 39 después de shock osmótico (PEG).	107
4.11. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de AG y PL de <i>A. brasilense</i> Az 39.	108

4.2. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39. Membrana bacteriana: mecanismos de adaptación.

Los factores bióticos y abióticos, como ser la deficiencia de agua en los suelos, pueden alterar los parámetros de crecimiento tanto de las leguminosas como de las rizobacterias (ver Introducción, apartado 1.1.3. y 1.1.4.). El déficit hídrico es uno de los principales estreses abióticos, y bajo estas condiciones desfavorables, las bacterias sufren cambios metabólicos que permiten una adaptación final al nuevo entorno existente, o por el contrario, conducen a la muerte celular.

Con el fin de determinar la influencia que el déficit hídrico moderado produce en el crecimiento de las cepas estudiadas en esta Tesis Doctoral, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, se investigó la tolerancia al estrés mediante el seguimiento del crecimiento de dichas bacterias en medio mínimo líquido.

Si tenemos en cuenta que la membrana bacteriana es la primer barrera de muchos de los estreses naturales (por ejemplo desecación, cambios de temperatura, presencia de tóxicos orgánicos, entre otros) comprenderemos que el estudio de las alteraciones que se producen en los distintos componentes de la membrana en respuesta a estreses ambientales es fundamental para el entendimiento de la fisiología bacteriana. Por tal motivo, si las bacterias se adaptan a una condición de crecimiento adversa, se debe a las modificaciones que se han generado en ella. En esta Tesis Doctoral se estudió el comportamiento de la membrana bacteriana frente al déficit hídrico, analizando su efecto sobre los componentes lipídicos así como también los mecanismos involucrados en el proceso de adaptación.

4.2.1. Efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento de las rizobacterias

Tal como se indicó en la introducción, las rizobacterias son importantes fundamentalmente por los efectos benéficos que generan sobre el desarrollo vegetal. En el suelo, las rizobacterias frecuentemente se encuentran con un medio ambiente variable lo que incluye a varios tipos de estreses, que afectan su crecimiento, la fase inicial de la simbiosis y la FBN (Zahran, 1999).

En el apartado 4.1., demostramos que el estrés hídrico afecta el crecimiento y la producción de moléculas de maní con función en el diálogo molecular con microorganismos. A fin de estudiar si la presencia del déficit hídrico moderado de PEG 15 mM que afecta al maní, también ejerce cambios sobre rizobacterias empleadas sobre esta leguminosa, realizamos ensayos de crecimiento bacteriano en presencia y ausencia del factor estresante.

Las rizobacterias empleadas en este estudio fueron: *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, cepa de colección, recomendada como nodulante de maní, y la PGPR *Azospirillum brasilense* Az 39. Las figuras 4.5., 4.6., y 4.7., así como la tabla 1.3., exponen los resultados relacionados a los parámetros de crecimiento *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 en condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico.

Dentro del género *Bradyrhizobium*, encontramos algunas cepas que son de crecimiento rápido y otras lento (Paulucci *et.al*, 2011). Nuestros resultados indican que *B. sp.* SEMIA 6144 es una bacteria de crecimiento lento, con un tiempo de generación aproximadamente de 8,8 h, comenzando la fase estacionaria de crecimiento a las 96 h de cultivo, (Figura 4.5.). El crecimiento de esta bacteria en presencia de PEG fue afectado negativamente, observándose una disminución en la viabilidad a lo largo de la curva de crecimiento, siendo más notable éste efecto luego de las 48 h de crecimiento, y con un tiempo de generación bajo ésta condición de 12,8 h, un aumento de 4 h respecto a la condición control. La biomasa seca (BS) del cultivo crecido en condiciones de estrés y cuantificada al finalizar el crecimiento bacteriano, se redujo un 42% respecto a la condición control (Tabla 1.3.). Respecto a la biomasa húmeda (BH), en *B. sp.* SEMIA 6144 ésta fue abundante debido principalmente a la producción de exopolisacáridos (EPS). Sin embargo, cuando éste rizobio creció en estrés hídrico, su valor comparado con el ensayo control fue de un 65% menos.

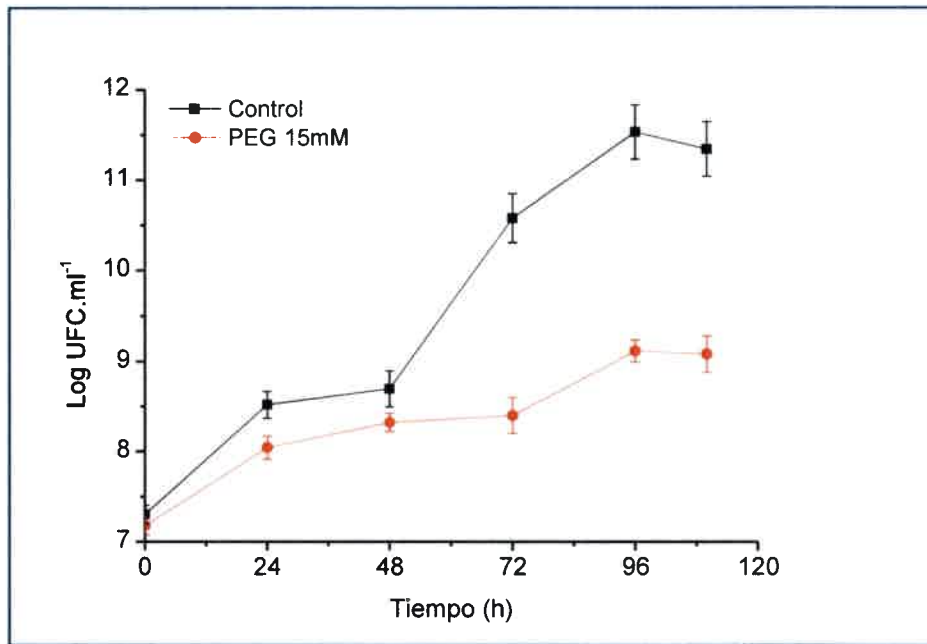


Figura 4.5. Curva de crecimiento de *B. sp. SEMIA 6144* crecida en condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM). Viabilidad expresada en Log UFC.ml⁻¹. Los puntos de cada curva representan el valor \pm SEM de tres ensayos independientes.

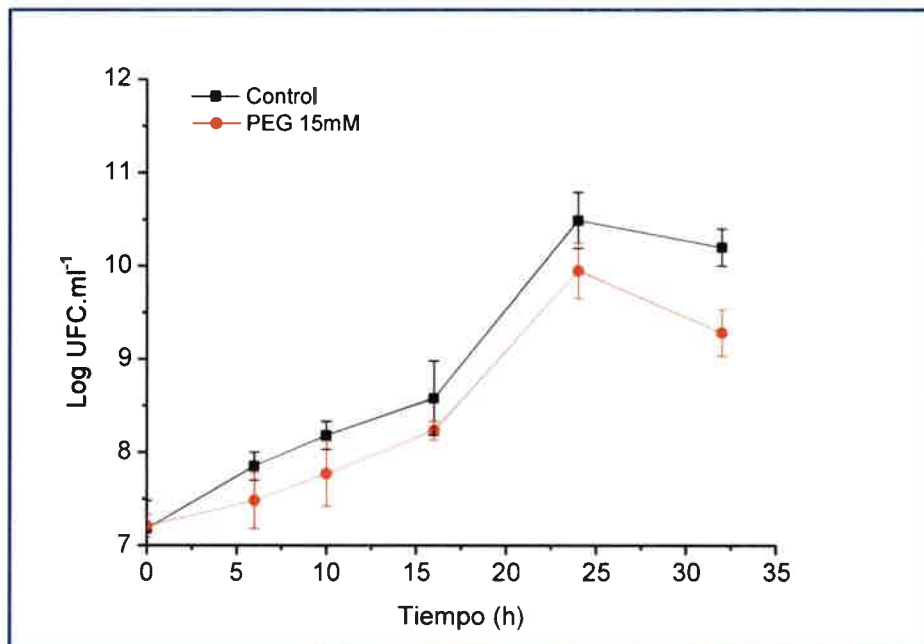


Figura 4.6. Curva de crecimiento de *A. brasilense Az 39* crecida en condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM). Viabilidad expresada en Log UFC.ml⁻¹. Los puntos de cada curva representan el valor \pm SEM de tres ensayos independientes.

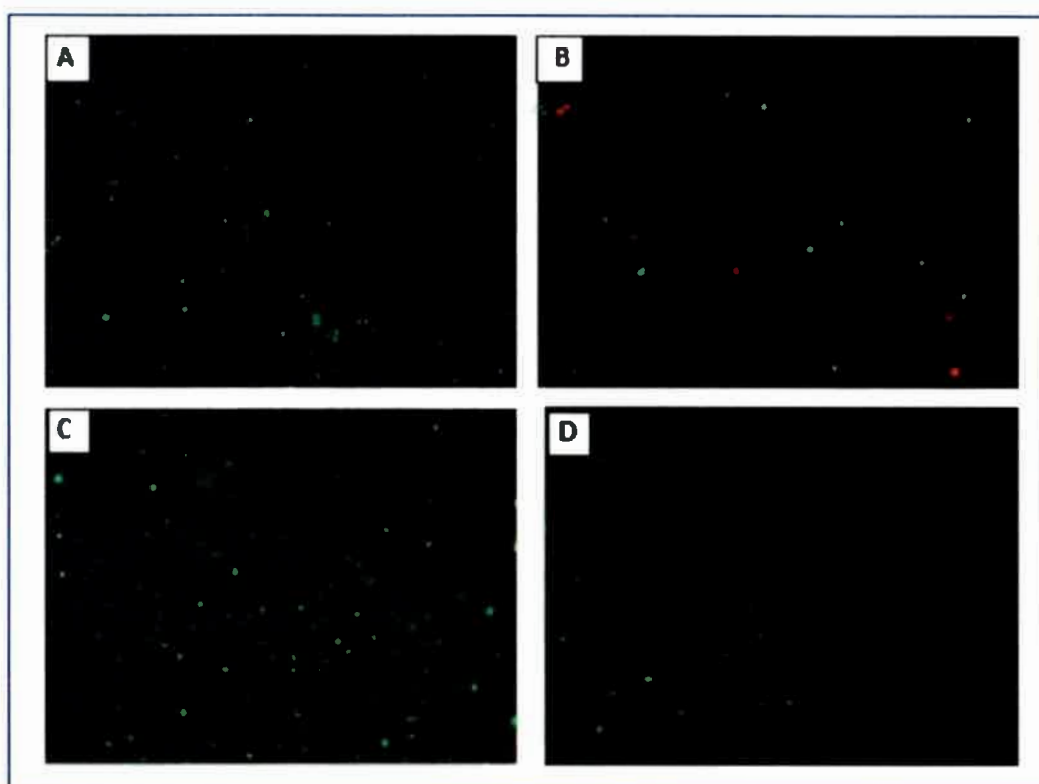


Figura 4.7. Evaluación cualitativa de la viabilidad celular de *B. sp.* SEMIA 6144 (A, B) y *A. brasiliense* Az 39 (C, D) mediante el empleo del el kit LIVE/DEAD[®]. Cultivo en fase estacionaria de células *B. sp.* SEMIA 6144 creciendo bajo condiciones control (A), y crecidas en presencia de PEG (B); Cultivo en fase estacionaria de células *A. brasiliense* Az 39 creciendo bajo condiciones control (C), y crecidas en presencia de PEG (D).

Cuando células cultivadas con y sin PEG hasta fase estacionaria se tiñeron utilizando el kit LIVE/DEAD[®], en el caso de *B. sp.* SEMIA 6144 se visualizó cualitativamente que el número de células verdes (vivas) en el cultivo estresado se redujo comparado al control, así como también se observó la presencia de mayor cantidad de células rojas (muertas). Esto indica que la presencia de PEG no sólo induce niveles más bajos de división celular sino que también induce un aumento de la muerte celular, lo que sugiere que no todas las células son capaces de adaptarse a la presencia de PEG (Figura 4.7., A y B).

Tabla 1.3. Efecto del estrés hídrico sobre los parámetros de crecimiento en *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39. Biomasa húmeda (BH); Biomasa seca (BS); Velocidad de crecimiento (μ); Tiempo de generación (g); Proteínas totales (PT).

Parámetros	Microorganismos	Condición de crecimiento	
		Control	PEG 15 mM
BH (mg/ml)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	34,2	11,4
	<i>A. brasilense</i> Az 39	3,9	2,6
BS (mg/ml)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	1,9	1,1
	<i>A. brasilense</i> Az 39	2,4	1,5
μ (UFC/ml. h)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	0,1	0,05
	<i>A. brasilense</i> Az 39	0,2	0,15
g(h)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	8,8	12,8
	<i>A. brasilense</i> Az 39	2,9	3,85
PT (μ g/mg biomasa)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	162,6	209,1
	<i>A. brasilense</i> Az 39	123	140

A. brasilense Az 39 es una bacteria PGPR de crecimiento rápido alcanzando la fase estacionaria aproximadamente a las 24 h de crecimiento, con un tiempo de generación de 2,9 h. La curva de crecimiento para *A. brasilense* Az 39 demostró un comportamiento diferente frente a la condición aplicada comparado con *B. sp.* SEMIA 6144 (Figura 4.6.). En presencia de PEG, *A. brasilense* Az 39 reduce el número de viables a partir de la fase lag de crecimiento. Bajo estrés hídrico, la velocidad de crecimiento fue 25% menor que el control y su tiempo de generación fue de 3,85 h, lo que representa un 0,95 h más que la observada en la condición control. Por otra parte la BH fue reducida en un 35% y la BS un 38% respecto al control (Tabla 1.3.).

Cuando células cultivadas con y sin PEG hasta fase estacionaria se tiñeron utilizando el kit LIVE/DEAD®, se visualizó cualitativamente menor cantidad de células verdes en el cultivo estresado comparado al control (Figura 4.7, C y D). Esto indica que la presencia de PEG estaría disminuyendo la tasa de generación celular. A diferencia de lo observado para *B. sp. SEMIA 6144* en donde se observó mayor presencia de células rojas, aquí no se destaca visualmente un aumento en la muerte celular, lo que podría sugerir que *A. brasilense* Az 39 es más tolerante al déficit hídrico respecto a *B. sp. SEMIA 6144*.

Con estos resultados podemos concluir que ambas rizobacterias son capaces de adaptarse a la condición probada, sin embargo los resultados parecen indicar que *B. sp. SEMIA 6144* es menos tolerante al estrés hídrico aplicado, ya que se redujo la velocidad de crecimiento y la biomasa en mayor medida que *A. brasilense* Az 39 al finalizar el crecimiento. Los valores de velocidad de crecimiento obtenidos coinciden con los de los respectivos géneros que se encuentran en bibliografía. Esta mayor tolerancia al estrés observada en *A. brasilense* en comparación a *Bradyrhizobium*, también ha sido descrita para el crecimiento bajo condiciones de salinidad, donde se pudo comprobar que los rizobios simbioses de maní son capaces de desarrollarse en condiciones de crecimiento adversas como es la presencia de concentraciones de NaCl de alrededor de 100 mM (Dardanelli *et.al*, 2009). En cambio otras rizobacterias como las del género *Azospirillum*, son capaces de tolerar valores de estrés salino de 200 mM de NaCl (Nabti *et.al*, 2007). Por otra parte, Abdel-Salam *et.al* (2010) estudiaron la tolerancia de 20 cepas rizobiales al déficit hídrico para ello determinaron el crecimiento en presencia de PEG 15% y al 30% suplementado en medio líquido YEM, por 96 h. De las 20 cepas analizadas, sólo 5 resultaron tolerantes al déficit hídrico inducido por un 30% de PEG. También existe una diferencia si la cepa es de crecimiento rápido o lento. Paulucci *et.al* (2011) demostraron que de dos cepas rizobiales nodulantes de maní sometidas a condiciones adversas de crecimiento (salinidad y alta temperatura), la cepa de crecimiento rápido TAL 1000 es más eficiente respecto a la cepa de crecimiento lento *B. sp. SEMIA 6144*.

4.2.2. Efecto del déficit hídrico sobre la composición y metabolismo de lípidos de la membrana bacteriana

Bajo estrés hídrico las membranas son expuestas a condiciones hiperosmóticas, la respuesta inmediata de los organismos sometidos a esta situación consiste en modificar la composición de la membrana bacteriana a fin de mantener correctamente las funciones de la membrana plasmática inalteradas y la homeostasis global de la célula, manteniendo la fluidez de la membrana en niveles óptimos (Ramos *et.al*, 2001).

4.2.2.1. Análisis de ácidos grasos

El mecanismo adaptativo más importante encontrado hasta el momento en bacterias como respuesta a una perturbación del medio es el cambio en la composición de los AG, (Ramos *et.al*, 2001). La tabla 1.4., muestra las variaciones en los AG de ambos microorganismos en estudio cuando estos fueron cultivados en presencia de PEG 15 mM.

Los AG más importantes encontrados en ambos microorganismos fueron 18:1 Δ^{11} (*cis*-vaccénico), 16:0, 18:0 y 16:1 Δ^9 . El AG mayoritario encontrado en *B. sp.* SEMIA 6144 fue el 18:1 Δ^{11} que representa un 73,8% del total de AG, seguido por 16:0 (16%), 18:0 (5%) y 16:1 (2,56%). Nuestros resultados son coincidentes con lo informado para el género bacteriano. Paulucci *et.al* (2011) estudiaron el efecto de la salinidad y alta temperatura de crecimiento sobre dos cepas rizobiales nodulantes de maní, como los son TAL 1000 y *B. sp.* SEMIA 6144, observándose que la composición de AG de *B. sp.* SEMIA 6144 en condiciones de crecimiento son semejantes a las aquí informadas. Por otra parte la distribución porcentual de AG de *B. sp.* SEMIA 6144 aquí reportadas es similar al descrito para *B. diazoefficiens* (Thige *et.al*, 2000)

El perfil de AG para *A. brasilense* Az 39 fue descrito (Tabla 1.4.). El AG mayoritario fue el 18:1 (63,6%) seguido del 16:1 Δ^9 (22,6%). A diferencia de *B. sp.* SEMIA 6144, se encontraron los AG saturados 12:0 y 14:0. Estos resultados se asemejan a los informados por Pérez *et.al* (2013) quienes al caracterizar tres cepas de *Azospirillum*, observaron que los AG 18:1, 16:1, 16:0, 18:0, 12:0 y 14:0 estaban presentes en todas las muestras analizadas.

Tabla 1.4. Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de AG de membrana de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39.

Ácido graso (%)	Microorganismo	Condición de crecimiento	
		Control	PEG 15 mM
Saturados			
Ac. Estéarico (18:0)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	4,9* ± 0,8	0,8* ± 0,3
	<i>A. brasilense</i> Az 39	2,1* ± 0,2	5,4* ± 0,4
Ac. Palmítico (16:0)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	17,3 ± 2,9	15,4 ± 1,5
	<i>A. brasilense</i> Az 39	8,2* ± 0,4	10,2* ± 1,9
Ac. Mirístico (14:0)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	ND	ND
	<i>A. brasilense</i> Az 39	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,01
Ac. Laurico (12:0)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	ND	ND
	<i>A. brasilense</i> A z39	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,4
Insaturados			
Ac. Cis-vaccénico (18:1 Δ^{11})	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	73,2* ± 4,5	81,5* ± 4,3
	<i>A. brasilense</i> Az 39	63,6* ± 2,2	59,2* ± 2,4
Ac. Palmitoleico (16:1)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	2,6* ± 1,2	1,1* ± 0,2
	<i>A. brasilense</i> Az 39	22,5 ± 2,5	23,8 ± 2,9
NI	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	1,4 ± 0,5	1,15 ± 0,7
	<i>A. brasilense</i> Az 39	1,2* ± 0,4	2,1* ± 0,8
I/S	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	3,5	5,1
	<i>A. brasilense</i> Az 39	7	4,75

Los AG del extracto lipídico total fueron metilados y resueltos mediante GC. Los resultados están expresados como porcentaje del área total de los picos cromatográficos. NI: compuestos no identificados, ND: compuesto no determinado, U/S: relación AG insaturados/AG saturados. Los valores representan la media ± S.E.M. de cinco experimentos independientes. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Resultados similares encontraron Pereyra *et.al*, (2006) para *A. brasilense* Cd crecido en medio líquido NFB. En esta bacteria el AG mayoritario fue el 18:1 (58%), seguido de 16:1 (14%), 16:0 (12%), mientras que el 18:0, 14:0 y 12:0 presentaron porcentajes entre 0.5-2%, semejantes al perfil de AG que nosotros registramos para *A. brasilense* Az 39 (Tabla 1.4.).

Cuando *B. sp.* SEMIA 6144 creció en presencia de PEG, el cambio más importante que ocurrió a nivel de los AG, fue un incremento en el porcentaje de 18:1 Δ^{11} (10%), concomitantemente con una disminución del AG insaturado 16:1 (58%) y del AG saturado 18:0 (83%) respecto del control (Tabla 1.4.). La respuesta a nivel de los AG de membrana es diferente según la condición de crecimiento aplicada. Paulucci *et.al* (2011) analizaron la composición de AG en cepas rizobiales crecidas bajo salinidad y alta temperatura (37 °C) y a diferencia de lo que ocurre con el déficit hídrico, ellos informaron una disminución del AG 18:1 Δ^{11} cuando *B. sp.* SEMIA 6144 creció en presencia de NaCl 50 mM o a 37 °C, o en combinación de ambas condiciones.

En relación a *A. brasilense* Az 39, cuando creció en presencia de PEG 15 mM, se observó una disminución del AG 18:1 (6,9 %) y un aumento de los AG saturados 18:0 (40%) y 16:0 (20%) respecto a la condición de crecimiento control (Tabla 1.4.).

Como consecuencia de estas modificaciones frente al estrés aplicado, la relación I/S aumentó (32,3%) para *B. sp.* SEMIA 6144, mientras que para *A. brasilense* Az 39 disminuyó (32,15%) respecto a la condición control (Tabla 1.4.). Esto indica que a nivel de los AG la respuesta de ambos microorganismos frente al estrés aplicado, resultó diferente, aumentando la síntesis de AG saturados en el caso de *A. brasilense* Az 39, e insaturado para el caso de *B. sp.* SEMIA 6144. Las modificaciones en el grado de insaturación podrían indicar que este mecanismo sería importante para mantener las propiedades físicas de la membrana plasmática, estos cambios asegurarían el funcionamiento normal de la célula bacteriana (Suutari y Laakso, 1994). Mecanismos como éste ya han sido informados por otros autores para otros microorganismos sometidos a diferentes condiciones ambientales, (Russell, 1990; Ramos *et.al*, 2000). Nuestros resultados nos indican un cambio a nivel de biosíntesis de AG que probablemente esté relacionado con regulaciones en los mecanismos por los cuales se sintetizan los AG.

Cambios en el grado de insaturación de los AG como respuesta a variaciones de las condiciones de crecimiento han sido informados para algunas rizobacterias (Medeot *et.al*,

2007; Ghorbal *et.al*, 2013; Paulucci *et.al*, 2011, 2015) y pueden ser considerados como una respuesta adaptativa universal (Suutari y Laakso, 1994). Estas regulaciones, de alguna manera podrían generar una composición final de AG tal como la que encontramos en esta cepa bajo diferentes condiciones, la cual sería apropiada para mantener la fluidez de la membrana en valores óptimos.

4.2.2.2. Separación y análisis de fosfolípidos de la membrana bacteriana

Se empleó el precursor radioactivo [$1-^{14}\text{C}$] acetato de sodio, el cual se incorporó en los lípidos de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 y se realizaron TLC de PL. El patrón de PL encontrado fue similar para ambas cepas y coincide con los reportados por otros autores para especies de rizobios y *Azospirillum* (Pereyra *et.al*, 2006; Medeot *et.al*, 2007; Paulucci *et.al*, 2011, 2015). En las dos cepas en estudio, el acetato radioactivo fue incorporado mayormente en los PL y el resto fue recuperado en la fracción de lípidos neutros (LN). Ambas cepas sintetizaron fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), lisofosfatidiletanolamina (LPE) y cardiolipina (CL) principalmente (Tabla 1.5). La diferencia más significativa entre ambas cepas se observó a nivel de PC cuya síntesis fue mayoritaria en *B. sp.* SEMIA 6144 y de PE, el cual fue sintetizado en mayor proporción en *A. brasilense* Az 39. Como se observa en la misma, los PL mayoritarios en *B. sp.* SEMIA 6144 son PC, PE y PG, mientras que CL y LPE son minoritarios.

Estos datos coinciden con los reportados por Medeot *et.al* (2007) quienes observaron que en *B. sp.* SEMIA 6144, el 44% de los PL totales correspondió a PC seguido de PE, PG y CL. Estos autores además sugieren que PC puede estar implicada en la respuesta bacteriana a las condiciones ambientales. En la tabla 1.5., se observa que en presencia de PEG 15 mM, se modificó la composición de PL en *B. sp.* SEMIA 6144, registrándose un aumento de PC (21,5%) mientras que PE disminuyó (14%), por otro lado mientras que PG se ha reducido (55%) y CL incrementó (46%), con respecto a la condición control. Numerosos estudios ha reportado en incremento de PC en respuesta a estrés abiótico. De manera similar a nuestros resultados, se ha informado para algunas cepas rizobianas y para *Ochrobactrum sp.* L115 expuestas a altas temperaturas (37 °C) y salinidad (NaCl), un incremento en la cantidad de PC en la membrana bacteriana (Paulucci *et.al*, 2011; Paulucci *et.al*, 2015). PE es sustrato para la

biosíntesis de PC, en este caso bajo déficit hídrico hay mayor síntesis de PC a expensas de PE, así como el aumento registrado en CL implicó una reducción en el porcentaje de PG, puesto que PG es el sustrato para la biosíntesis de CL (Denich *et.al*, 2003).

En el caso de *A. brasilense* Az 39, la concentración de PEG utilizada en este trabajo, produjo un efecto significativo en el marcado de algunos de los PL (Tabla 1.5.). Se observó un importante incremento en la biosíntesis de PC (51%) y de PG (12%), mientras que disminuyó la concentración de PE (67%) y CL (69%). Nuestros resultados indican que bajo crecimiento en déficit hídrico, hay un incremento en la biosíntesis de PL formadores de bicapa (PC y PG) y disminución de los no formadores de bicapa (principalmente de PE). Resultados similares fueron hallados por Pereyra *et.al* (2006), en un análisis que llevaron a cabo inoculando trigo con *Azospirillum* y aplicando estrés hídrico. Ellos observan que los PL mayoritarios en la condición control son PC mientras que PE disminuye.

En ambas rizobacterias se observó un incremento en la biosíntesis de PC bajo condiciones de estrés. Este incremento de PC y la disminución de PE indicarían que estos PL, principalmente, podrían estar involucrados en la respuesta al estrés hídrico, jugando algún rol importante en la modificación del estado físico de la membrana frente a estos cambios. Respuestas similares han sido informadas para *B. sp.* SEMIA 6144 bajo condiciones de elevadas temperaturas y salinidad, (Medeot *et.al*, 2007, Paulucci *et.al*, 2011, 2015; resultados de esta Tesis Doctoral publicados en Cesari *et.al* (2016).

PC es uno de los PL mayoritario de las membranas de ambos microorganismos. Este PL cumple funciones importantes en el crecimiento, en la FBN (participa en la formación de la leghemoglobina), en la formación de nódulos efectivos, en la movilidad (participa en la síntesis de flagelina) y en la supervivencia a estrés abióticos. Las bacterias que contienen altos porcentajes de AG insaturados en la membrana, poseen PC (gran cabeza polar) para compensar el incremento de volumen que generan los AG insaturados *cis*, y así mantener la estabilidad de la bicapa lipídica. En estrés hídrico se produce un incremento de PC para compensar la transición de membrana laminar a una membrana no laminar (Geiger *et.al*, 2012).

Tabla 1.5. Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) sobre la composición de PL de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39.

Fosfolípidos	Microorganismos	Condición de crecimiento	
		Control	PEG 15 mM
LPE	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	1* ± 0,5	0,9* ± 0,2
	<i>A. brasilense</i> Az 39	2,8 ± 1,3	1,8 ± 0,6
PC	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	40,75* ± 2,9	51* ± 3,7
	<i>A. brasilense</i> Az 39	28,5* ± 3,6	55,7* ± 5,6
PG	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	14,9* ± 1,4	6,7* ± 0,6
	<i>A. brasilense</i> Az 39	16,4* ± 4,5	18,8* ± 4,1
PE	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	26,1* ± 0,6	22,7* ± 2,5
	<i>A. brasilense</i> A z39	35* ± 1,5	11,6* ± 2,1
CL	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	7,3* ± 2	13,7* ± 2,8
	<i>A. brasilense</i> A z39	10,6* ± 2,8	3,3* ± 0,2
LN	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	3,3 ± 0,7	1,1 ± 0,3
	<i>A. brasilense</i> A z39	2,7* ± 0,4	2,7* ± 0,8
NI	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	6,6* ± 1,8	4,3* ± 1,2
	<i>A. brasilense</i> A z39	3,9* ± 1,4	6* ± 1,4

Las células fueron cultivadas en los medios correspondientes para ambas condiciones ensayadas, con [1-¹⁴C] acetato de sodio (37 KBq ml⁻¹) y se cosecharon en fase estacionaria. Fosfolípidos: lisofosfatidiletanolamina (LPE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), cardiolipina (CL), lípidos neutros (LN), No identificados (NI). Los valores representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los cambios descriptos en la tabla 1.5., manifiestan una alteración de la membrana por efecto del estrés hídrico, basada principalmente en el aumento de PC (PL estabilizador de bicapa). Debido a que PE puede ser sustrato de PC, parte de la disminución observada bajo déficit hídrico para ambos microorganismos, puede corresponderse con el aumento de PC. Sin embargo, a partir de PE también puede formarse LPE, PL que deriva de la acción de una fosfolipasa sobre PE, lo que también podría justificar parte de la disminución de los niveles de LPE en la membrana. Por lo tanto, podemos sugerir que en ambas bacterias ocurre un remodelamiento en los lípidos de membrana como respuesta adaptativa para soportar tal condición de estrés y mantención de las propiedades biofísicas de la membrana.

4.2.3. Dinámica de la membrana bacteriana durante la adaptación al déficit hídrico

Anteriormente hemos descripto la respuesta de la membrana a nivel de lípidos de ambas rizobacterias al crecimiento bajo estrés hídrico. Para conocer cuál es el efecto inmediato que provoca este estrés sobre la fluidez de la membrana celular de *B. sp. SEMIA 6144* y *A. brasilense Az 39*, se analizó la misma por medio de espectroscopia de fluorescencia utilizando la sonda de membrana DPH. Luego se estudió la respuesta temprana de la membrana, mediante el análisis de la composición de AG y PL de la bicapa lipídica.

4.2.3.1. Dinámica de la membrana celular de *B. sp. SEMIA 6144* bajo déficit hídrico

Luego de 96 h de crecimiento con PEG, la bicapa lipídica de *B. sp. SEMIA 6144* presentó el mismo valor de polarización de fluorescencia (P) que el observado en condiciones control ($P=0,2$). Esta respuesta, indica que la membrana *B. sp. SEMIA 6144* se adaptó al cambio osmótico del medio, logrando mantener la fluidez óptima para su viabilidad. Dicha adaptación implicó cambios a nivel de los lípidos, tal como los describimos previamente.

Para conocer la acción inmediata del déficit hídrico mediado por PEG sobre el estado físico de la membrana, se estudió el efecto del shock osmótico. Los cambios en la polarización de la sonda DPH fueron medidos mediante espectrometría de fluorescencia en colaboración con la Dra. Biasutti (Departamento de Química, UNRC, Rio Cuarto, Argentina), a los 0, 10, 20, 30 y 60 min luego de aplicación del shock osmótico (PEG 15 mM). Cuando se evaluó la fluidez de

membrana de células crecidas hasta fase exponencial (48 h) se observó que el valor P fue de $0,20 \pm 0,01$ y disminuyó a $0,11 \pm 0,02$ después de 20 min de exposición a PEG (Figura 4.8.), indicando que el PEG tiene un efecto fluidificante en la membrana celular. Sin embargo, a partir de los 30 min de exposición a PEG, el valor P retomó a un valor similar al obtenido en ausencia de PEG ($P = 0,19 \pm 0,02$). Estos resultados indican que *B. sp.* SEMIA 6144 se adaptó al déficit hídrico y pudo restablecer la fluidez óptima, logrando así mantener la funcionalidad de la bicapa lipídica bajo el estrés hídrico aplicado.

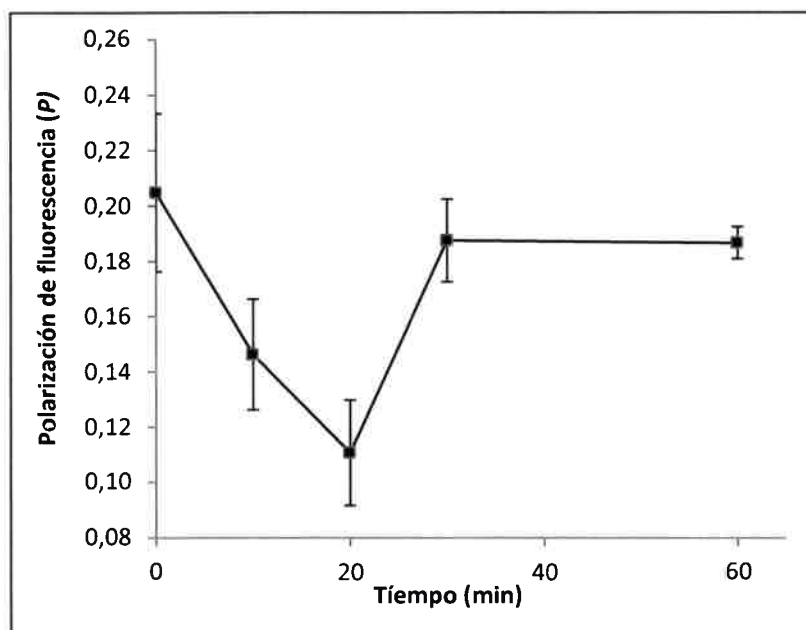


Figura 4.8. Cambios en la polarización de la sonda DPH en células *B. sp.* SEMIA 6144 después de shock osmótico (PEG) a diferentes tiempos. Las células cultivadas en medio B y fueron cosechadas en la fase exponencial tardía. La polarización de fluorescencia se midió en una alícuota como la muestra control. El resto del cultivo se trató con PEG 15 mM. Las alícuotas se recogieron a diferentes tiempos (10, 20, 30 y 60 min) para determinar el grado de polarización. Los resultados presentados son la media \pm SD de tres mediciones independientes.

El incremento en la presión osmótica del medio puede inducir modificaciones estructurales en la membrana, tal como la transición lipídica de fase, que puede dañar la propiedad de barrera de la membrana, inclusive provocar la muerte celular (Crowe y Crowe, 1992). Similar

a nuestros resultados, Beney *et.al* (2007), estudiaron los cambios en la anisotropía de fluorescencia del DPH en células de *B. diazoefficiens* luego de shock osmótico inducido por la aplicación de diferentes concentraciones crecientes de glicerol (-30 MPa). Ellos observaron que a medida que se incrementaba la concentración de glicerol en el medio, la disminución de la anisotropía era más pronunciada. Esto indica que hubo un incremento en la movilidad de la sonda, reflejando un aumento en la fluidez del medioambiente donde se encuentra el DPH (regiones hidrofóbicas). Todos los niveles de shock osmótico estudiados revelaron una tendencia de incremento en la fluidez de la membrana de *B. diazoefficiens* crecido a 28 °C. Estos autores además indicaron que el efecto de fluidificación corresponde o podría estar dado por cambios en la forma que adopta la membrana. Zhang *et.al* (2006), demostraron que el estrés osmótico induce el incremento de la curvatura de la bicapa acrecentando la movilidad del DPH. Algunos autores reportaron que la bicapa lipídica puede encontrarse en un estado cristalino (mayor fluidez que la fase gel), luego de una exposición prolongada a baja temperatura o a condiciones de agua reducida (Hazel y Williams, 1990).

Se estudió la respuesta temprana de *B. sp.* SEMIA 6144 al shock osmótico, a fin de conocer cuáles son los cambios en la composición de AG y PL que permitieron restaurar la fluidez óptima cuando las bacterias fueron expuestas a PEG durante 60 min (Figura 4.9., A y B). La respuesta temprana fue una disminución en el porcentaje del AG 18:1 Δ^{11} (82% a 76%) y un aumento de los AG 16:0 (16% a 19%) y 18:0 (1,2% a 3,8%) (Figura 4.9., A). Por otra parte, el índice I/S disminuyó de 4,7 a 3,3. Estos cambios pueden ser los responsables de contrarrestar el efecto del PEG (incremento de fluidez), ya que los AG saturados favorecen el empaquetamiento de la membrana celular.

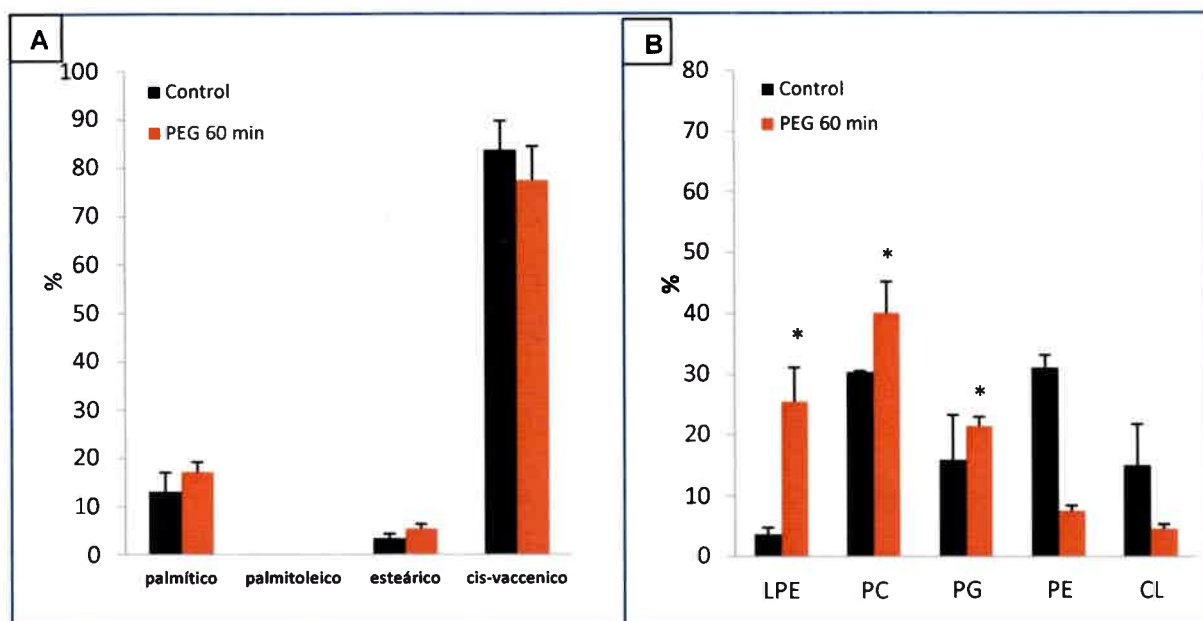


Figura 4.9. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de AG y PL de *B. sp.* SEMIA 6144. Las células fueron cultivadas hasta fase exponencial tardía, extraído los lípidos, y analizados. **A.** Análisis de ácidos grasos de *B. sp.* SEMIA 6144. Ac. Palmítico (16:0), Ac. Palmitoleico (16:1 Δ 9), Ac. Esteárico (18:0) y Ac. Cis-vaccénico (18:1 Δ ¹¹). **B.** Análisis de fosfolípidos: Lisofosfatidiletanolamina (LPE), Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidilglicerol (PG), Fosfatidiletanolamina (PE), Cardioplipina (CL). Los valores representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0, 05$).

Algunos autores estudiaron el comportamiento de la membrana de *E. coli* durante la desecación. Los principales AG presentes en *E. coli* en condición control son 16:0, 16:1 y 18:1. Durante 0,5 a 4 h de desecación, los AG fueron analizados, observándose un incremento en la proporción de los AG saturados y disminución de los AG insaturados. Los AG de cadena más corta que los anteriores mencionados, no fueron modificados (14C). Durante la desecación, así como en el estrés osmótico, la membrana celular transiciona desde un estado líquido cristalino a un estado gel donde incrementan las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas acilos de las moléculas lipídicas vecinas. Es decir que ocurre un incremento en el empaquetamiento de la membrana lipídica (Scheber *et.al*, 2009).

Mhamdi *et.al* (2014), trabajaron con cepas pertenecientes a los géneros *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* y *Rhizobium* creciendo a 28 °C, durante 5 días bajo estrés osmótico inducido por el agregado de PEG, 30%. Tras el análisis de los FAMES, ellos observaron que la proporción de los AG saturados 16:0 y 18:0 aumentó, mientras que los AG insaturados 16:1 y 18:1 disminuyeron su proporción, como mecanismo para reducir la fluidez y mantener la integridad de la membrana, similar a los resultados obtenidos cuando SEMIA6144 fue expuesto por 60 min a déficit hídrico.

En relación al análisis de PL de membrana, la respuesta observada en *B. sp.* SEMIA 6144 a los 60 min de exposición a PEG fue un incremento en el porcentaje de PC (30,3% a 40,2%) y LPE (3,6% a 25,5%) y una disminución en el porcentaje de PE (31,7% a 7,5%) y CL (15% a 4,5%) (Figura 4.9., B). Después de 96 h de crecimiento con PEG, el índice I/S aumentó de 3,4 a 5, mientras que como respuesta al shock osmótico aplicado durante 60 min, el índice I/S disminuyó de 4,7 a 3,3. Estas diferencias sugieren un comportamiento dinámico de la membrana. En la fase exponencial se encontró mayor cantidad de PL anicónicos (PG y CL). Sin embargo en respuesta temprana al shock osmótico se observó disminución en el porcentaje CL (Figura 4.9., B) y un marcado incremento en LPE. El aumento en el porcentaje de PC se observa tanto en la respuesta temprana (60 min de exposición PEG, Figura 4.9.) así como en la respuesta adaptativa (96 h de crecimiento con PEG, Tabla 1.5.). Puesto que PC deriva de PE, observamos una disminución en el contenido de este PL. Sin embargo a partir de PE también puede formarse LPE, lo que asimismo podría justificar parte de la disminución de los niveles de PE en la membrana. LPE es un PL intermediario del metabolismo y el turnover de los PL, deriva de una actividad fosfolipasa sobre PE y es rápidamente metabolizado debido a su habilidad de crear inestabilidad en las membranas (Nina *et.al*, 2013; Fuller *et.al*, 2001). Este supuesto puede explicar la presencia de altas concentraciones de LPE en la membrana durante la respuesta rápida a PEG y podemos sugerir que en las bacterias ocurre un remodelamiento en los lípidos de membrana como respuesta adaptativa al déficit hídrico moderado.

Estos resultados sugieren que *B. sp.* SEMIA 6144 responde rápidamente a la presencia de PEG alterando tanto su composición de PL como de AG, siendo los más importantes un aumento de LPE y PC a expensa de PE y un aumento del grado de insaturación de los AG. Sin embargo probablemente a la dificultad de permanecer por mucho tiempo con esa composición de lípidos, esta es modificada en el transcurso de la adaptación al déficit hídrico para alcanzar

finalmente la composición que se observa a las 96 h de crecimiento con PEG. Estos cambios simultáneos en el grupo de cabeza y de la cadena de acilo pueden contrarrestar o anular los efectos de PEG sobre la fluidez de la membrana citoplasmática de *B. sp.* SEMIA 6144 y mantenerla en valores óptimos que permitan mantener las funciones vital.

4.2.3.2. Dinámica de la membrana celular de *A. brasilense* Az 39 bajo déficit hídrico

Luego de 24 h de crecimiento con PEG, la bicapa lipídica de *A. brasilense* Az 39 presentó el mismo valor de fluidez (P) que el observado en condiciones control ($P= 0,2$). Estos resultados sugieren que la membrana *A. brasilense* Az 39 logró adaptarse al cambio osmótico del medio. Se conoce, que la perturbación de la fluidez de la membrana por factores extrínsecos dispara una respuesta activa que tiende a contrarrestar estos efectos por medio de cambios químicos intrínsecos. En *E. coli*, dos cultivos crecidos a 27 °C y 37 °C presentaron similar fluidez de la membrana (Beney y Gervais 2001) y las características dinámicas de los lípidos de las bacterias en crecimiento son los mismos, independientemente de la temperatura de cultivo. Esta característica se describe como la adaptación homeoviscosa (Sinesky, 1974).

Para determinar cómo las células de *A. brasilense* Az 39 perciben la deficiencia de agua a nivel de la bicapa lipídica, se evaluó la fluidez de membrana de células en fase exponencial de crecimiento, luego de la aplicación de diferentes tiempos de shock osmótico (0, 10, 20, 30 y 60 min con PEG 15 mM). A los 0 min, el valor P fue de $0,21 \pm 0,02$ y disminuyó a $0,14 \pm 0,02$ después de 20 min de exposición a PEG (Figura 4.10.), indicando que el PEG tiene un efecto fluidificante en el núcleo hidrofóbico de la membrana celular, similar a lo observado en *B. sp.* SEMIA 6144. Sin embargo, como se muestra en la figura 3, después de 60 min de exposición a PEG, el valor P retomó a un valor similar al obtenido en ausencia PEG ($P = 0,24 \pm 0,03$). Estos resultados indican que el efecto de fluidización generado por PEG fue contrarrestado en las membranas celulares.

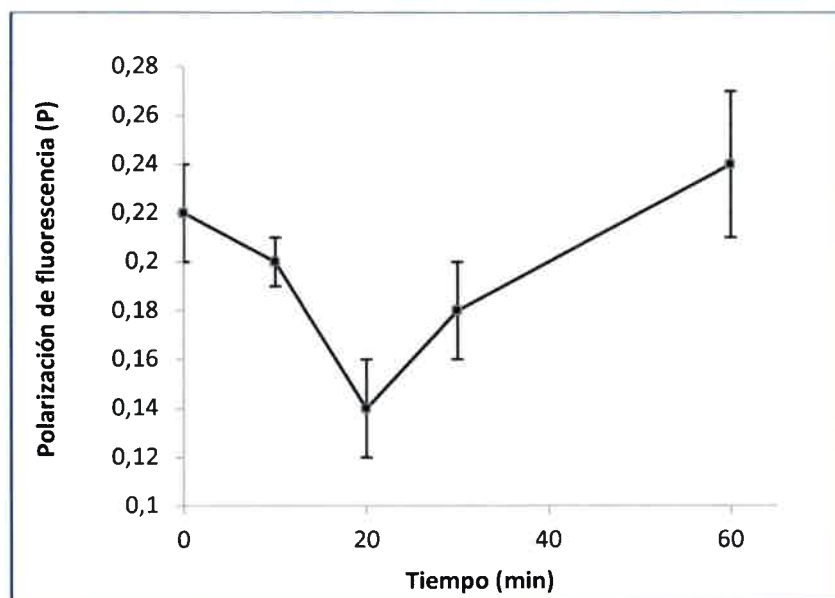


Figura 4.10. Cambios en la polarización de DPH en células *A. brasilense* Az 39 después de shock osmótico (PEG) a diferentes tiempos. Las células cultivadas en medio D y D fueron cosechadas en la fase exponencial tardía. La polarización de fluorescencia se midió en una alícuota como la muestra control. El resto del cultivo se trató con PEG 15 mM. Las alícuotas se recogieron a diferentes tiempos (10, 20, 30 y 60 min) para determinar el grado de polarización. Los resultados presentados son la media \pm SEM de tres mediciones independientes.

Para determinar los posibles mecanismos implicados en el mantenimiento de la fluidez de la membrana, también estudiamos la respuesta bacteriana a la presencia de PEG en términos de la composición de AG y PL de la membrana (Figura 4.11., A y B).

La modificación del grado de insaturación de los AG es uno de los mecanismos más importante para el mantenimiento de las propiedades físicas de las membranas de los rizobios (Paulucci *et.al*, 2011). En nuestro trabajo, cuando las bacterias fueron expuestas a PEG durante 60 min, se observó una disminución en el porcentaje del AG insaturados 18:1 Δ^{11} (70,5% a 63,6%) y un aumento del porcentaje de AG saturados 16:0 (6,7% a 9,2%) (Figura 4.11., A). El incremento del AG saturados fue de aproximadamente 30% respecto al control, lo que resultó en una disminución de la relación I/S.

En relación al análisis de PL de membrana, se produjo un marcado incremento en el porcentaje de PC (22,3% a 40,2%) y LPE (5,7% a 12,4%) y una disminución en el porcentaje

de PE (34,8% a 5,7%) (Figura 4.11., B) luego de la exposición a PEG durante 60 min. La respuesta observada a los 60 min de exposición a PEG fue similar a la observada cuando *A. brasiliense* Az 39 creció durante 24 h en presencia de PEG.

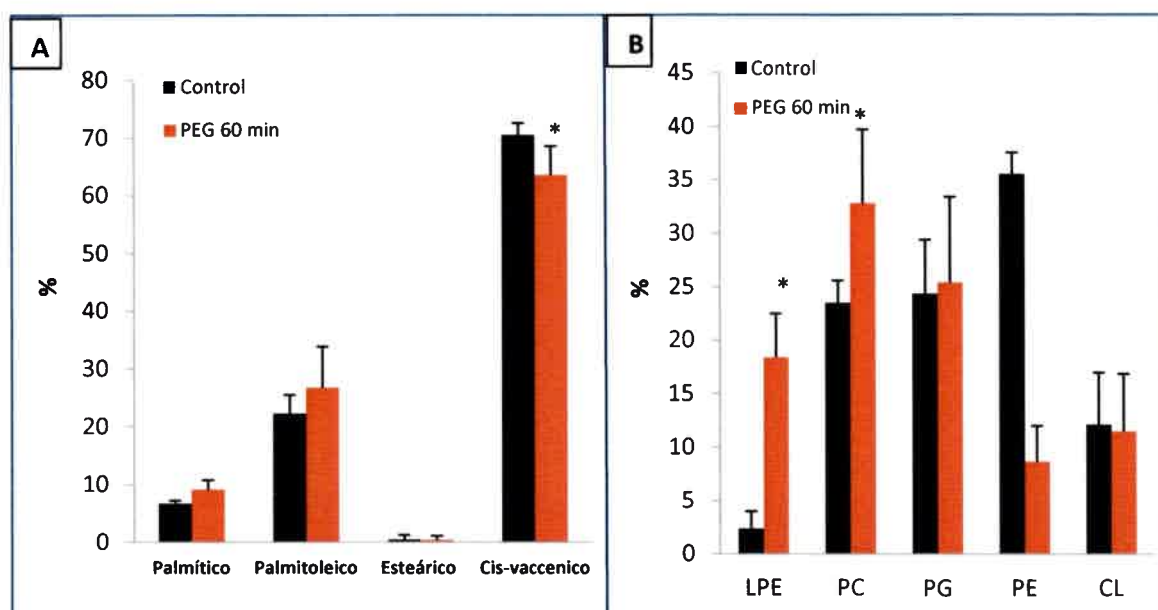


Figura 4.11. Efecto de diferentes tiempos de exposición a PEG en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos de *A. brasiliense* Az 39. Las células fueron cultivadas hasta fase exponencial tardía y los lípidos fueron extraídos y analizados. **A.** análisis de AG de *A. brasiliense* Az 39. Ac. Palmítico (16:0), Ac. Palmitoleico (16:1), Ac. Esteárico (18:0) y Ac Cis-vaccénico (18:1 Δ^{11}). **B.** análisis de PL: Lisofosfatidiletanolamina (LPE), Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidilglicerol (PG), Fosfatidiletanolamina (PE), Cardiolípidina (CL). Los valores representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La respuesta temprana similar a lo que ocurre en *B. sp.* SEMIA 6144, implicó un aumento de LPE, el cual posee como grupo cabeza polar a PE, por lo que podríamos sugerir que la disminución observada en la biosíntesis de PE podría ser el resultado de que PE este siendo destinada a la biosíntesis del lípido formador de bicapa PC y de LPE. PC es un lípido formador de bicapa en las membranas. Por otra parte, aunque LPE contiene el grupo cabeza PE, el cuál que debe aumentar el embalaje y por lo tanto las fuerzas de Van der Waals,

también carece de una cadena acilo, que debería disminuir las interacciones de Van der Waals. A pesar de esto, algunos autores indicaron que el incremento de LPE sobrelleva a una ligera disminución en la difusión lipídica, la cual podría atribuirse a la formación de enlaces de hidrógeno, indicado por los resultados de los análisis por ATR-FTIR (Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Estos resultados muestran que cambios simultáneos en el grupo de cabeza y en las cadenas acilos podrían utilizarse para cambiar la fluidez de la membrana (Kalani *et.al*, 2006).

Nuestros resultados muestran que los cambios simultáneos en el grupo cabeza polar y en la cadena de acilo de los PL estudiados podrían anular los efectos de PEG en la fluidez de la membrana para esta bacteria, tanto a los 60 min como luego de 24 h de exposición a PEG.

PC es un PL que tiende a formar estructura de bicapa en la membrana, de modo que aquellas que contengan una mayor cantidad de PC tienden a estar más empaquetadas que las que contienen mayores cantidades de PE (no formador de bicapa). La mantención de un equilibrio entre los PL formadores y no formadores de bicapa es crucial en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la membrana (Denich *et.al*, 2003). En la cepa *A. brasilense* Az 39, el aumento de PC con la deficiencia de agua podría ser indicativo de un importante mecanismo de adaptación para el mantenimiento de la estructura y función de la membrana bajo condiciones de estrés. Diversos estudios han informado de la participación de PC en las respuestas a estrés abiótico, por ejemplo Paulucci *et.al* (2015) observaron que el crecimiento de *Ochrobactrum* L115 a altas temperaturas (37 °C) y salinidad elevada (NaCl 300 mM), provocó un aumento en la síntesis de PC y disminución de PE.

4.2. Efecto del déficit hídrico en etapas tempranas de la asociación microorganismo-*A. hypogaea*.

4.3.1. Efecto la inoculación sobre la composición de AG de rizodeposiciones de *A. hypogaea*.

4.3.2. Efecto del déficit hídrico sobre la movilidad y quimiotáxis bacteriana.

4.3.3. Análisis del tamaño bacteriano.

4.3.4. Efecto del déficit hídrico sobre la adhesión bacteriana a raíces de *A. hypogaea*.

4.3.5. Cuantificación de AIA en rizobacterias.

ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.3.

	Página
1.6. Efecto del estrés hídrico sobre la movilidad de tipo swarming y swimming de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	117
1.7. Efecto del estrés hídrico sobre la longitud celular de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39, en diferentes condiciones de crecimiento.	123

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.3.

4.12. Ácidos grasos detectados en rizodeposiciones de <i>A. hypogaea</i> inoculadas y recolectada luego de 7 días de crecimiento.	116
4.13. Fotografías de placas de movilidad de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 y <i>A. brasilense</i> Az 39.	118
4.14. Fotografías tomadas con microscopio óptico, de células vegetativas y células swarmer y swimming de: <i>A. B. sp.</i> SEMIA 6144; <i>B. A. brasilense</i> Az 39.	124
4.15. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento.	126
4.16. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de <i>A. brasilense</i> Az 39 a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento.	128
4.17. Efecto del déficit hídrico en la producción de AIA de <i>A. brasilense</i> Az 39 y <i>B. sp.</i> SEMIA 6144.	130

4.3. Efecto del déficit hídrico en etapas tempranas de la asociación *A. hypogaea*-microorganismo

En los suelos hay distintos tipos de microorganismos que pueden establecer diversos diálogos moleculares con las raíces de las leguminosas, donde adquieren gran relevancia los que tienen efectos benéficos. El diálogo molecular entre ambos socios involucra diversos eventos como por ejemplo la producción y liberación de compuestos moleculares de señalización desde las raíces relacionados, la movilidad bacteriana, la adhesión, la colonización y para el caso de los rizobios el inicio de la nodulación (Estévez *et.al*, 2009; Dardanelli *et.al*, 2008ab; 2009). Los compuestos liberados se acumulan en la rizósfera y constituyen las primeras señales y más importantes para el establecimiento exitoso de la interacción (Dixon y Paiva, 1995).

El maní tiene la particularidad de ser ampliamente nodulado por rizobios de crecimiento lento pertenecientes al género *Bradyrhizobium* sp., aunque también se ha descrito la nodulación de maní por cepas de rizobio de crecimiento rápido (Taurian, 2008), permitiéndole a la planta fijar N₂. La contribución de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal por la fijación del N₂ no es significativa y ha sido cuestionada (Fages, 1994).

En la interacción planta - microorganismo debe ocurrir un diálogo molecular entre los dos participantes para coordinar los eventos tempranos de la interacción (Long, 1989). Sin embargo las condiciones medioambientales afectan a los integrantes así como a todo el proceso de la interacción.

Por este motivo, se estableció como tercer objetivo de esta Tesis Doctoral la determinación del efecto del déficit hídrico en etapas tempranas y tardías de la asociación maní-microorganismos.

4.3.1. Efecto la inoculación sobre la composición de AG de rizodeposiciones de *A. hypogaea* en presencia y ausencia de PEG 15 mM

La figura 4.12., muestra la composición de AG de las rizodeposiciones de maní inoculadas con *A. brasilense* Az 39 (A) y con *B. sp.* SEMIA 6144 (B), en condiciones control y de estrés hídrico (PEG 15 mM).

En los tratamientos no inoculados, los AG palmítico (16:0) y esteárico (18:0) presentaron porcentajes mayoritarios, seguidos por los AG saturados láurico (12:0) y mirístico (14:0). Los

AG saturados de cadenas largas, de más de 20 átomos de carbono (C), fueron detectados en cantidades minoritarias. Dentro de los AG insaturados, sólo el ácido oleico (18:1 Δ^9), identificado por GC-MS) mostró un valor porcentual elevado.

Si bien las rizodeposiciones provenientes de plantas inoculadas fueron filtradas para eliminar los microorganismos, no podemos asegurar que los AG detectados tengan como fuente de origen exclusivamente la planta. Brechenmacher *et.al*, (2010), analizaron e identificaron metabolitos extraídos de raíces y pelos radiculares de soja inoculadas con *B. diazoefficiens* mediante cromatografía gaseosa. Los métodos utilizados en su estudio no permitieron realizar una distinción entre los metabolitos producidos por el simbionte y los producidos por la planta huésped.

Rizodeposiciones provenientes de plantas controles e inoculadas con *A. brasilense* Az 39, mostraron un descenso de los AG 16:0 y 18:0, y un incremento de los AG 14:0, 16:1, 18:1. Dicho efecto fue más pronunciado en rizodeposiciones de plantas estresadas e inoculadas. Por lo tanto podemos decir, que la disminución de los AG saturados y el aumento de AG insaturados (principalmente del 18:1) es un efecto conjunto del estrés hídrico y de la inoculación con *A. brasilense* Az 39.

En respuesta al estrés hídrico y a la inoculación con *B. sp.* SEMIA 6144, no se detectaron los AG 12:0, 14:0 y 16:1, disminuyeron los AG saturados 16:0 y 18:0 e incrementó el AG insaturados 18:1. Algunos AG no fueron identificados, posiblemente el AG 18:3, y otros son AG de más de 20 C (Figura 4.12., B).

El incremento significativo en el porcentaje del AG 18:1 (Figura 4.12.), sugiere que podría estar implicado como molécula señal en la interacción maní-*Azospirillum/Bradyrhizobium*, y desempeñaría un rol importante en el estrés hídrico.

A través del análisis de GC-MS, se pudo determinar que el AG 18:1 presente en rizodeposiciones inoculadas, es una mezcla de 18:1 Δ^9 (68,5 %) y el 18:1 Δ^{11} (31,5 %). El AG 18:1 Δ^{11} es aportado por la bacteria, mientras que no podemos corroborar que el AG 18:1 Δ^9 sea exclusivamente de origen vegetal ya que el perfil de AG de *A. brasilense* Az 39 y *B. sp.* SEMIA 6144 analizado por GC-MS demostró la presencia de 18:1 Δ^9 . Para confirmar la posible actividad desaturasa responsable de estos resultados, se utilizó el sustrato ácido esteárico (18:0) [1- ^{14}C] para ambas cepas en estudio y los FAME obtenidos fueron

analizados por medio de TLC (Paulucci *et.al*, 2011). Como resultado se obtuvo que *A. brasilense* Az 39 y *B. sp.* SEMIA 6144 pudieron utilizar el sustrato externo y desaturarlo.

El ácido oleico es uno de los AG más abundantes en membranas vegetales y su acumulación en raíz colonizada con *Bradyrhizobium* podría estar involucrada en la modificación de la fluidez necesaria para el ingreso de esta bacteria a la célula vegetal (Brechenmacher *et.al*, 2010).

Brechenmacher *et.al* (2010), observaron cambios en los AG producidos por raíces y pelos radicales de soja durante el proceso de infección con *B. diazoefficiens*. Los cambios registrados fueron principalmente, una acumulación de los AG de 18 C. El AG linolénico (18:3) fue el más abundante luego de la inoculación con el rizobio. Éste AG modula la fluidez de la membrana necesaria para la colonización de las células por la bacteria y regula las vías metabólicas necesarias para la biosíntesis de nuevas membranas requeridas durante el proceso de infección. La acumulación de linolénico es también una respuesta de defensa de la planta, ya que el AG 18:3, ha sido señalado como la molécula que provee el sustrato para la lipooxigenasa y así seguir la vía de síntesis de ácido jasmónico (Upchurch, 2008).

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

Estudios previos han demostrado que moléculas derivadas de AG de 18 C, tales como ácido jasmónico (JA) y metil-jasmonato (MeJA) al ser liberados al medio, tienen la capacidad de inducir la expresión de genes *nod* en *Rhizobium leguminosarum* y en *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Rosas *et.al*, 1998). Frente a estos resultados, y al observar que en nuestro estudio los AG de 18C han sido mayoritarios en todos los tratamientos inoculados, podemos

conjeturar que la planta de maní podría estar liberándolos al medio y promoviendo la colonización radical por parte de las rizobacterias.

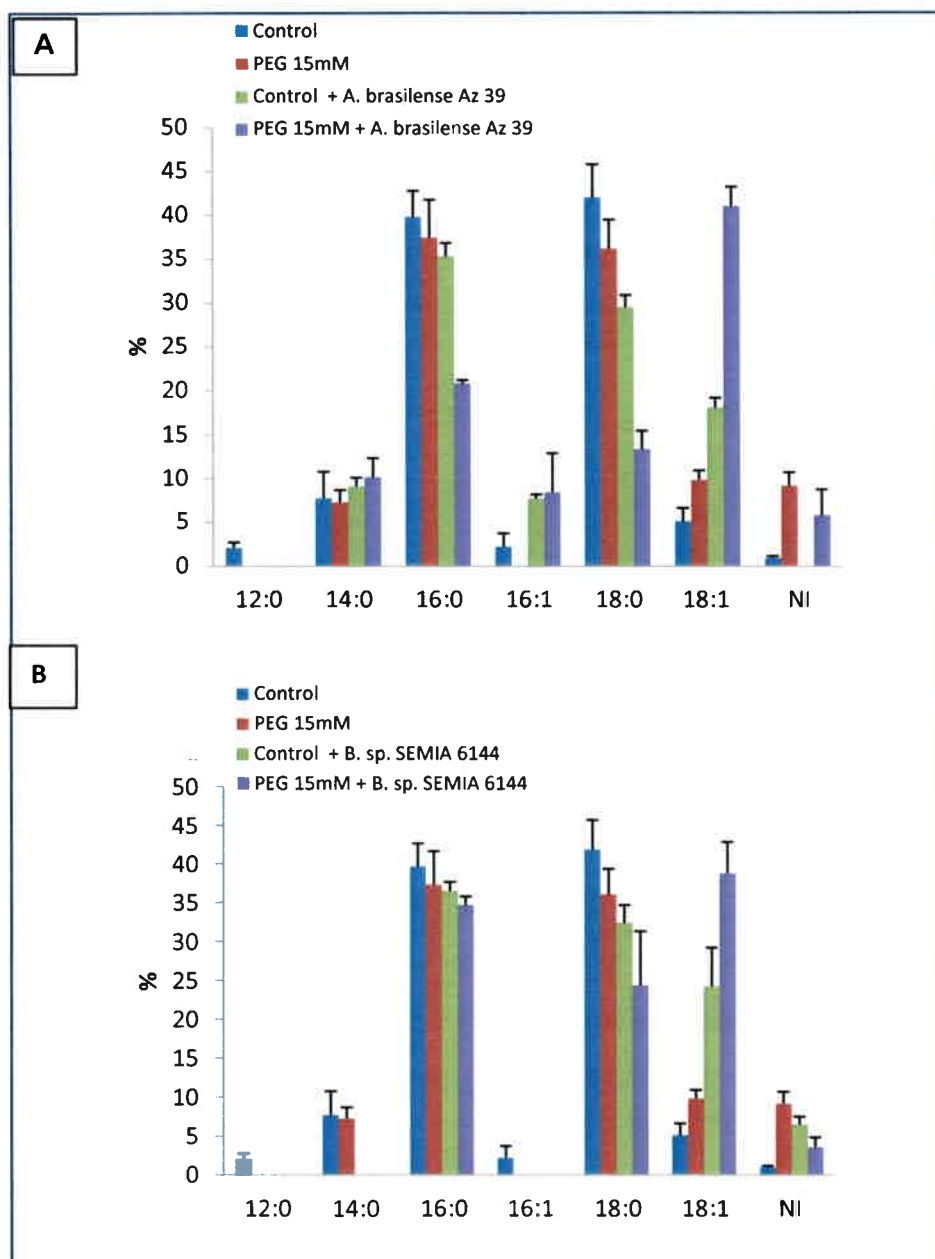


Figura 4.12. Ácidos grasos presentes en rizodeposiciones de maní inoculadas y recolectada a los 7 días. **A.** *A. brasilense* Az 39. **B.** *B. sp.* SEMIA 6144. **Barras azules:** Control. **Barras rojas:** PEG 15 mM. **Barras verdes:** control e inoculadas. **Barras lilas:** déficit hídrico (PEG 15 mM) e inoculadas. **NI:** AG mayores a 20C. Los valores representan la media de \pm S.E.M de tres experimentos independientes. Los * indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

4.3.2. Efecto del estrés déficit hídrico sobre la movilidad y quimiotaxis bacteriana

La movilidad de los microorganismos es crucial al momento de establecer una óptima colonización de la raíz y es exigua la caracterización de este evento en bacterias fijadoras de N₂ (Tambalo *et.al*, 2010). La tabla 1.6., resume el efecto del déficit hídrico sobre la movilidad de tipo swarming (Swa) y swimming (Swi) de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 medida como el diámetro del halo de desplazamiento (cm).

Tabla 1.6. Efecto del estrés hídrico sobre la movilidad de tipo swarming y swimming de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39.

<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144						
Condición de crecimiento	Swa	Swa + YEM	Swa + ER	Swi	Swi + YEM	Swi + ER
Control	0,7 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,5 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,4 ^a	1,7 ± 0,1 ^a
PEG 15 mM	0,8 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,6 ^b	1,0 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,4 ^b	1,9 ± 0,3 ^a	2,3 ± 0,2 ^b
<i>Azospirillum brasilense</i> Az 39						
	Swa	Swa + LB	Swa + ER	Swi	Swi + LB	Swi + ER
Control	0,7 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,6 ^a	8,1 ± 0,5 ^a	6,1 ± 0,6 ^a
PEG 15 mM	0,9 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^b	6,1 ± 0,2 ^b	8,0 ± 0,4 ^a	6,7 ± 0,4 ^a

Swa: agar-agua 0,5% p/v; **Swa + ER:** agar-agua 0,5% p/v + disco con ER (7 días); **Swi:** agar-agua 0,3% p/v; **Swi + ER:** agar-agua 0,5% p/v + disco con ER. ER: exudado radical. Los valores representan la media ± S.E.M de seis experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

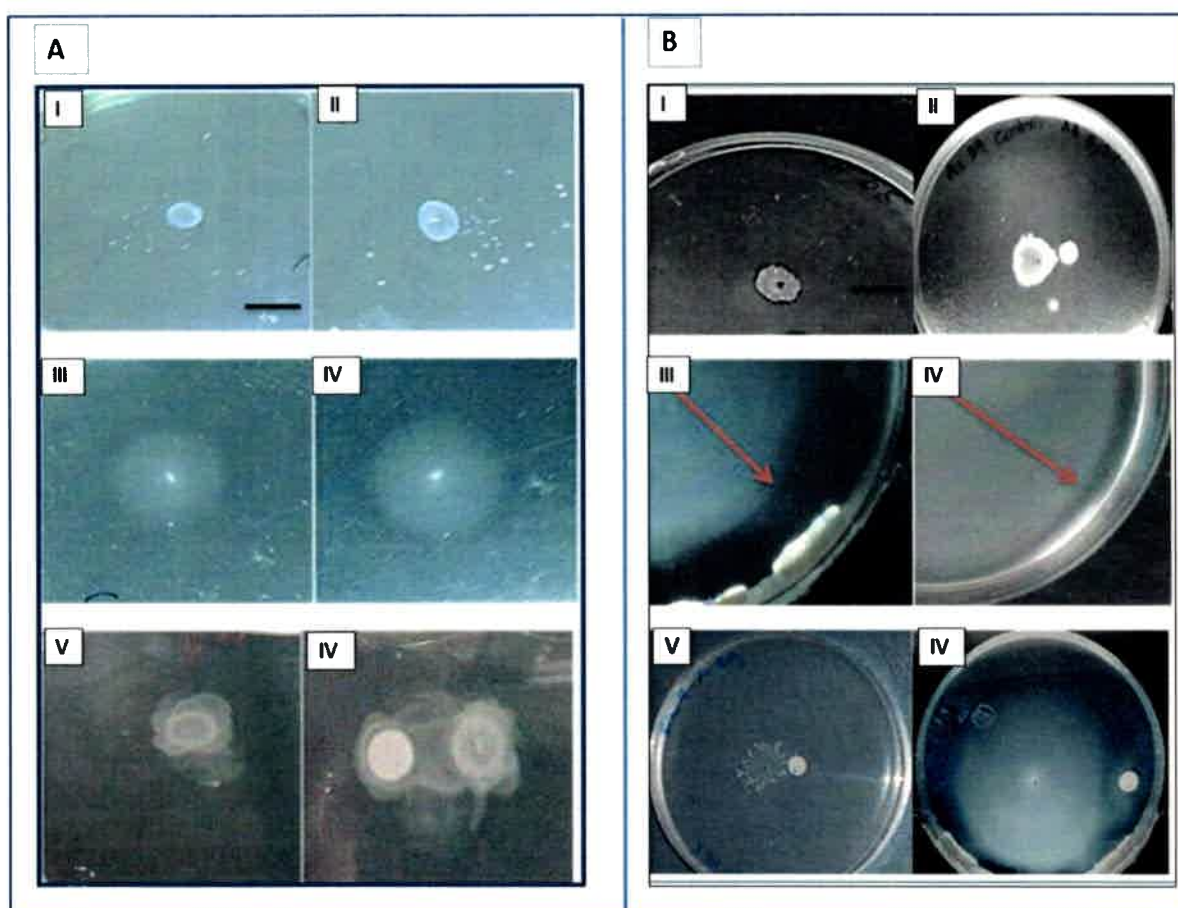


Figura 4.13. Fotografías de placas de movilidad de: **A.** *B. sp. SEMIA 6144* y **B.** *A. brasilense Az 39*. **A:** **I y II:**Swarming en placa de Petri, **I:** Cepa control, **II:** Cepa estresada (PEG 15 mM). **III y IV:** swimming en placa de Petri, **III:** Cepa control, **IV:** Cepa estresada. **V:** Swarming en agar agua 0,5% p/v + 10% p/v de YEM. **VI:** Izquierda: disco con ER, derecha: colonia swarm. **B:** **I:** Swarming en placa de Petri, **II:** Placa de quimiotaxis, **III:** Swiming en placa de Petri, **IV:** Swimming en agar agua 0,3 % p/v + 10% p/v de LB, **V:** Quimiotaxis en agar-agua 0,5% p/v, de la cepa estresada, **VI:** Quimiotáxis en agar-agua 0,3% p/v.

B. sp. SEMIA 6144 es una cepa de crecimiento lento recomendada como inoculante de maní (Gomes-Germano *et.al*, 2006). Esta cepa no posee un fenotipo notable de swarming (Medeot *et.al*, 2009). En placas de agar-agua 0,5% se observó un pequeño halo alrededor del punto de siembra (Figura 4.13., AI y AII), mientras que en placas de agar-agua 0,3% para estudio de Swi, el halo observado fue aproximadamente un 36% superior al swa (Figura 4.13., AIII y AIV). Resultados similares para el género *Bradyrhizobium*, han sido descritos. Vicario

et.al (2014), analizaron la movilidad swa y swi de cinco cepas rizobiales, tres de ellas recomendadas como inoculantes y dos nativas. En todas las cepas analizadas la movilidad de tipo Swi resultó en promedio un 70% superior al Swa. Por otra parte, Kanbel *et.al* (2006) registraron que para *B. diazoefficiens* el desplazamiento swi resultó mayor que el Swa. En el caso de *Bradyrhizobium* se conoce que posee un sistema flagelar doble, un flagelo grueso que se utiliza para el swimming para alcanzar las raíces de las plantas y uno fino utilizado para el desplazamiento tipo swarming llevado a cabo sobre la superficie radical antes de la formación del nódulo.

No se observan diferencias considerables en el swa de la cepa control y la estresada (Figura 4.13., AI y AII). Sin embargo, la adición de una fuente de carbono, en este caso manitol proporcionado por el medio de cultivo YEM, favoreció el swa de la cepa estresada en mayor medida que en el control (Tabla 1.6.). Los resultados indican que *B. sp.* SEMIA 6144 adquiere mayor movilidad cuando está en una condición de estrés, la cual también es favorecida por la adición de medio de cultivo YEM. Resultados similares fueron hallados por Covelli *et.al* (2013), quienes observaron que el agregado de manitol favoreció la movilidad de tipo swarming en *B. diazoefficiens*, formando halos de desplazamiento de 2-3 cm de diámetro, con bordes irregulares. Otros autores (Tambalo *et.al*, 2010) registraron en *R. leguminosarum*, un incremento en la producción de surfactantes contenidos en la zona transparente del halo de desplazamiento, cuya función es facilitar el swarming. Además notaron que en presencia de manitol, el movimiento fue más rápido que en presencia de glicerol o ausencia de fuente de carbono, atribuido a la alta producción de exopolisacáridos generados en manitol (Mandal *et.al*, 2007).

El swimming presentó un diámetro de expansión ligeramente superior al swarming. En nuestro estudio, el halo de desplazamiento de *B. sp.* SEMIA 6144 fue de 1,1 cm de diámetro e incrementó a 1,74 cm de diámetro en la cepa estresada (Figura 4.13., AIII y AIV). Este incremento en la movilidad podría estar relacionado con los cambios en la composición de la membrana lipídica que *B. sp.* SEMIA 6144 sufre cuando es estresada (Figura 4.13., A y Tabla 1.6). Resultados similares a los aquí presentados fueron hallados por Nieves *et.al* (2012), donde observaron que distintas cepas de rizobios presentaron un halo de “natación” o swimming menor al que se observó cuando se adicionó medio rico (TY).

Cuando en la placa se añadió un disco embebido con ER de maní, se observó que hubo un incremento del 12% para el Swa y del 21% para el Swi en la cepa control, mientras que para la cepa estresada el incremento fue del 20% para el Swa y del 5% para la movilidad de tipo Swi (Figura 4.13., AVI). Estos resultados indican que la presencia de componentes presentes en los exudados de raíces de maní (de 7 días de crecimiento) actúan como atrayentes del microorganismo, y que el mismo utiliza principalmente el movimiento Swi para acercarse a estos componentes. Este comportamiento también ha sido descrito para cinco cepas rizobiales nodulantes de maní, tal como lo informa Vicario *et.al* (2014). Ellos analizaron el comportamiento de los microorganismos cuando se los enfrentó a la presencia de exudados de semillas de maní, indicando un efecto de quimiotaxis positiva hacia éstos principalmente en la movilidad de tipo Swi, con incrementos desde el 12% al 22%, mientras que en el swa los valores rondaron el 5% superior al control.

Se ha demostrado que todas las especies de *Azospirillum* son móviles debido a la presencia de un flagelo polar, e inclusive algunas especies presentan flagelación mixta, tal es el caso de *A. brasilense* y *A. lipoferum*, lo cual le permite tener movilidad tipo swarming (flagelos laterales) y swimming (flagelo polar) (Borisov *et.al*, 2007; Kabel *et.al*, 2006). Cepas de *Azospirillum* han demostrado in vitro exhibir una posible quimiotaxis positiva a diferentes atrayentes, incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos (Okon *et.al*, 1980; Reinhold *et.al*, 1985; Zhulin y Armitage, 1993) y compuestos aromáticos así como a exudados radicales y raíces (Borisov *et.al*, 2009).

En nuestro caso, la movilidad tipo swarming observada para *A. brasilense* Az 39 fue en forma de halos, de bordes rugosos e irregulares, con un diámetro de 0,7-0,8 cm (Tabla 1.6). Cuando el microorganismo fue sometido al estrés hídrico, se observó un leve incremento en el desplazamiento tipo swarming (Tabla 1.6.). Bashan, (1986), demostró que la migración de células de *A. brasilense* hacia las raíces de plántulas de trigo ocurre tanto en suelos húmedos como en cultivos de arena (condición árida), indicando la capacidad de desplazamiento de la bacteria en condiciones de déficit hídrico.

Cuando el movimiento swimming fue evaluado para *A. brasilense* Az 39, el halo de desplazamiento fue de 6-7 cm de diámetro, un valor mayor al que corresponde a la movilidad de tipo swarming (Tabla 1.6). Comparando, *A. brasilense* Az 39 tiene un swimming superior al rizobio *B. sp.* SEMIA 6144.

Por otra parte, para determinar si la presencia de una fuente de carbono es importante para la movilidad, el medio agar agua fue suplementado con un 10% de medio de cultivo LB modificado por el agregado de glucosa (Tabla 1.6.). El aporte de glucosa no incrementó la movilidad tipo swarming, pero si lo hizo de manera significativa para la movilidad tipo swimming, tanto la cepa control como la estresada incrementaron la movilidad en un 30 % (Figura 4.13., BIV). Estos resultados refuerzan lo hallado en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, en donde se había observado que una condición de agar agua 0,3% suplementada con 10% LB, resultó óptima para la movilidad de *A. brasilense* Az 39. Sin embargo otros autores como Schelud'Ko *et.al* (2006), observaron que la adición de glucosa disminuyó la velocidad de swimming de la cepa *A. brasilense* Sp 245.

Como se puede observar en la figura 4.13 (II, V, VI) *A. brasilense* Az 39 mostró leve quimiotaxis hacia los exudados radicales (ER) de maní. Sin embargo, el incremento en movilidad y quimiotaxis hacia los ER fue estadísticamente significativo para la cepa *A. brasilense* Az 39 estresada con respecto a la condición control (Figura 4.13., B). Resultados similares fueron encontrados por Borisov *et.al* (2007) para *A. brasilense* Sp245 que incrementó el halo de movilidad de tipo swarming cuando se añadió al medio de cultivo exudados radicales de trigo. En nuestro trabajo observamos diferencias en el swarming cuando se añadió el disco con ER de maní, sin embargo otros autores como Schelud'Ko *et.al* (2006), demostraron que las fitohemaglutininas presentes en exudados de *P. vulgaris* no afectaron a la movilidad de la cepa *A. brasilense* sp. 245.

4.3.3. Análisis del tamaño bacteriano

A través de microscopía óptica se examinó la morfología y tamaño celular de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39, procedente de diversos tipos de crecimiento (Tabla 1.7, Figura 4.14.). La condición de estrés hídrico aplicado no modificó la morfología y el tamaño de *B. sp.* SEMIA 6144, mientras que las células de *A. brasilense* Az 39 incrementaron su longitud desde 1,6 a 2,15 μm cuando crecieron en presencia de PEG (resultados de ésta Tesis Doctoral publicados en Cesari *et.al*, 2016) es decir, incrementó significativamente su tamaño (Tabla. 1.7., Figura 4.14., AI, AII, BI Y BII). El incremento en el tamaño celular también ha sido observado en *Rhizobium* sp. NBRI330 cuando crece en presencia de altas concentraciones de

sal por 24 h (Kulkarni y Nautiyal 2000). Neumann *et.al* (2005) observaron que *Pseudomonas putida* cambió su forma y tamaño celular cuando creció en presencia de compuestos aromáticos como el fenol y 4-clorofenol. Las células mostraron un incremento en el diámetro dependiendo del efecto tóxico y de la concentración de los solventes aplicados. El mismo efecto en el aumento de tamaño celular se reportó para *Enterobacter* sp. en presencia de *n*-butanol. Teniendo en cuenta nuestros resultados y la bibliografía consultada, podemos concluir que la aplicación de un estrés abiótico induce un aumento en el tamaño de la célula bacteriana. Las células más grandes están mejor protegidas contra los compuestos orgánicos tóxicos en relación a células pequeñas sometidas al mismo estresor. Algunos autores han relacionado el incremento de tamaño celular con el aumento en las cantidades de PC en la membrana lipídica de las rizobacterias crecidas en estrés hídrico. Medeot *et.al* (2009), observaron que mutantes deficientes en la producción de PC de *B. sp.* SEMIA 6144, presentaron menor tamaño que la cepa salvaje. Bajo éste último concepto, nuestros resultados indicaron que las cepas crecidas en presencia de PEG aumentaron la cantidad de PC en la membrana bacteriana (Tabla 1.5.).

La diferenciación de células vegetativas en células swarmer o swimming, involucra cambios en la morfología, tales como hiperflagelación y elongación celular (Fraser y Huges, 1999). En este trabajo, pudimos observar un incremento significativo en la elongación de las células swimming con respecto a las células vegetativas (Figura 4.14., AV, AVI, BV y BVI).

La movilidad de tipo swarming ocurre a través de grupos multicelulares (Kearns, 2010). Las células swarmer se encontraron asociadas de diferentes maneras, muchas de ellas agrupadas y conectadas a lo largo de su eje longitudinal (Figura 4.14., AIII, AIV, BIII y BIV). El mismo comportamiento fue descrito para *R. leguminosarum* por Tambalo *et.al* (2010) y para *B. diazoefficiens* por Covelli *et.al* (2013). Al microscopio óptico, pudimos observar cómo la diferenciación de células vegetativas a células swarmer o swimming incrementó el ancho y largo de células de *A. brasilense* Az 39. Las células swarmer estresadas poseen mayor largo que las procedentes de una condición sin estrés. En el caso del swimming, las células estresadas de *B. sp.* SEMIA 6144 sufrieron una disminución significativa de la longitud celular (μm) celular, mientras que para *A. brasilense* Az 39 se observó una respuesta contraria (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Efecto del estrés hídrico sobre la longitud celular (μm) de *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39, en diferentes condiciones de crecimiento.

Tipo de células	Microorganismos	Condición de crecimiento	
		Control	PEG 15 mM
Células vegetativas	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	1,5 \pm 0,2	1,55 \pm 0,3
	<i>A. brasilense</i> Az39	1,6 * \pm 0,1	2,15* \pm 0,2
Células swarmer	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	1,8 \pm 0,5	2 \pm 0,5
	<i>A. brasilense</i> Az39	2,3* \pm 0,5	2,8* \pm 0,3
Células swimming	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	2,5* \pm 0,35	1,4* \pm 0,3
	<i>A. brasilense</i> Az39	2,4 * \pm 0,3	2,9* \pm 0,45

Los valores representan la media \pm S.E.M de seis experimentos independientes. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

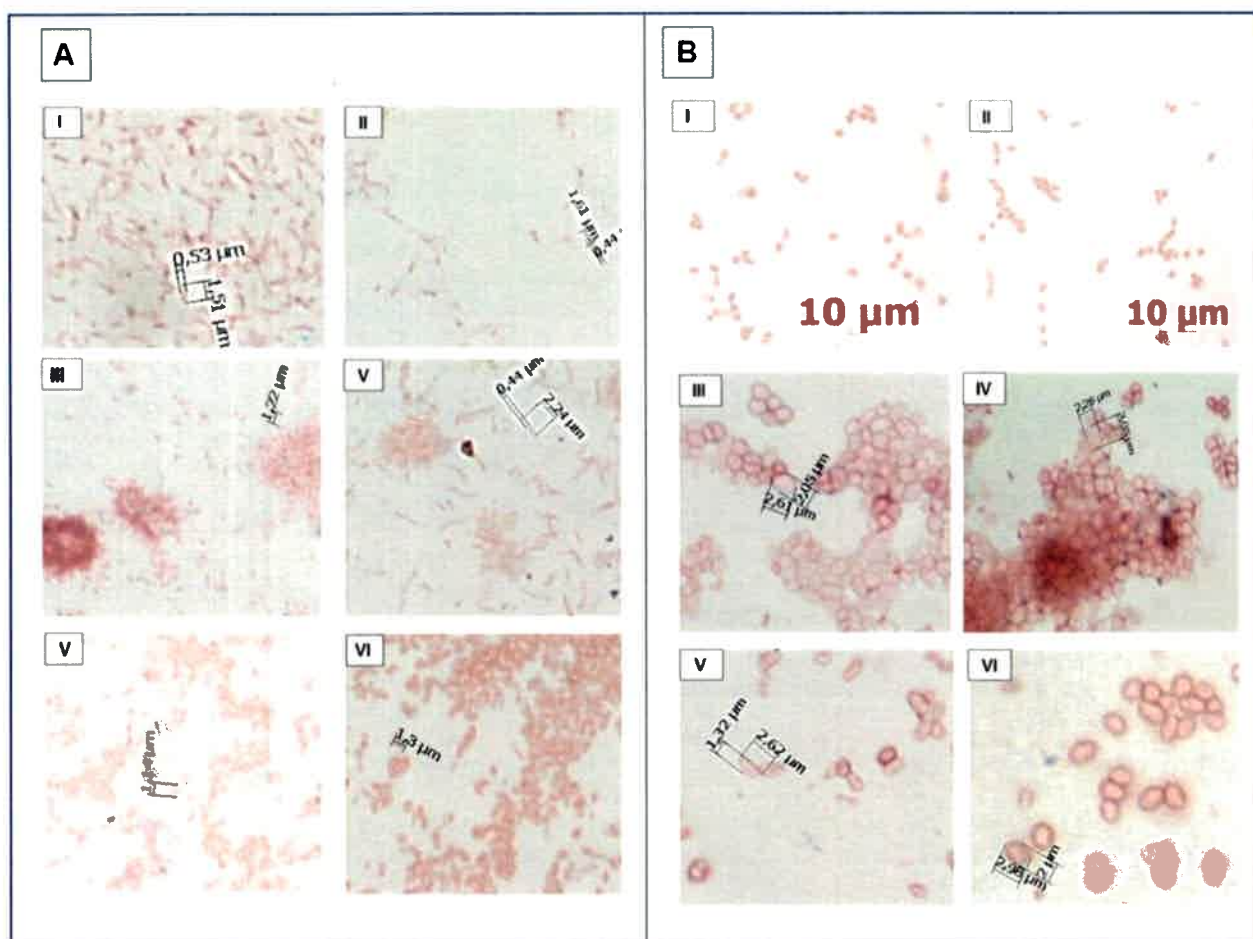


Figura 4.14. Fotografías capturadas empleando un microscopio óptico, de células vegetativas y células swarmer y swimming de: **A.** *B. sp. SEMIA 6144*; **B.** *A. brasilense Az 39*. **I:** Células vegetativas condición control; **II:** Células vegetativas crecidas con PEG; **III:** Células swarmer condición control; **V:** Células swarmer crecidas con PEG; **VI:** Células swimming condición control; **VI:** Células swimming crecidas con PEG. Las células fueron examinadas bajo microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Canon Powershot G67, 1 PC1089-cámara digital (Canon Inc., Japón) y se procesó con el software AxioVision 4,1 (Carl Zeiss).

4.3.4. Efecto del déficit hídrico sobre la adhesión bacteriana a raíces de *A. hypogaea*

4.3.4.1. Adhesión de *B. sp. SEMIA 6144* a raíces de *A. hypogaea*

La adhesión de los rizobios a las raíces de la planta hospedadora, es el primer paso para la infección y la nodulación. Varios mecanismos, y diversas moléculas señales, procedentes tanto de las bacterias y como de las plantas, han sido propuestas como mediadoras en este proceso (Albareda *et.al*, 2006).

En maní, los rizobios deben inducir divisiones celulares en la corteza de las raíces laterales emergentes y penetrar a través de las separaciones entre las células corticales y epidérmicas (Dardanelli *et.al*, 2003) proceso que se denomina entrada crack. Ellos utilizaron las raíces de plantas de maní de 31 días, para estudiar la adhesión de rizobios. Dardanelli *et.al* (2003) caracterizaron la adhesión de *B. sp. SEMIA 6144* y TAL 1000 a raíces de maní. Los resultados de los estudios cuantitativos y cualitativos revelaron que la adhesión depende principalmente de la fase de crecimiento de la bacteria. La adhesión óptima ocurre cuando la bacteria se encuentra en la fase exponencial tardía o estacionaria. En nuestro caso, utilizamos células de *B. sp. SEMIA 6144* crecidas hasta fase exponencial tardía.

Dos técnicas, el estudio numérico y microscópico, fueron empleadas para analizar la adhesión de *B. sp. SEMIA 6144* a las raíces laterales de plantas de maní, crecidas en condiciones óptimas y de estrés hídrico, empleando una suspensión bacteriana de *B. sp. SEMIA 6144* conteniendo 10^8 UFC/ml (Figura 4.15.). Aproximadamente 10^5 UFC fueron adheridas por mg de raíz seca (RS). *SEMIA 6144* crecida en condiciones de estrés mostró menor capacidad de adhesión a las raíces jóvenes laterales de maní, que la cepa no estresada cuando la planta fue sometida a estrés (Figura 4.15., A). Un dato estadísticamente significativo fue que las raíces de la planta procedente de la condición de estrés hídrico presentaron mayor número de bacterias adheridas a la superficie, que las raíces controles (Figura 4.15., A). Sin embargo cuando las bacterias crecieron estresadas, no se observan diferencias entre su adhesión a plantas en control o estrés. Dicho resultado, podría deberse a los cambios en la composición de las rizodeposiciones durante el estrés hídrico (Tabla 1.2.).

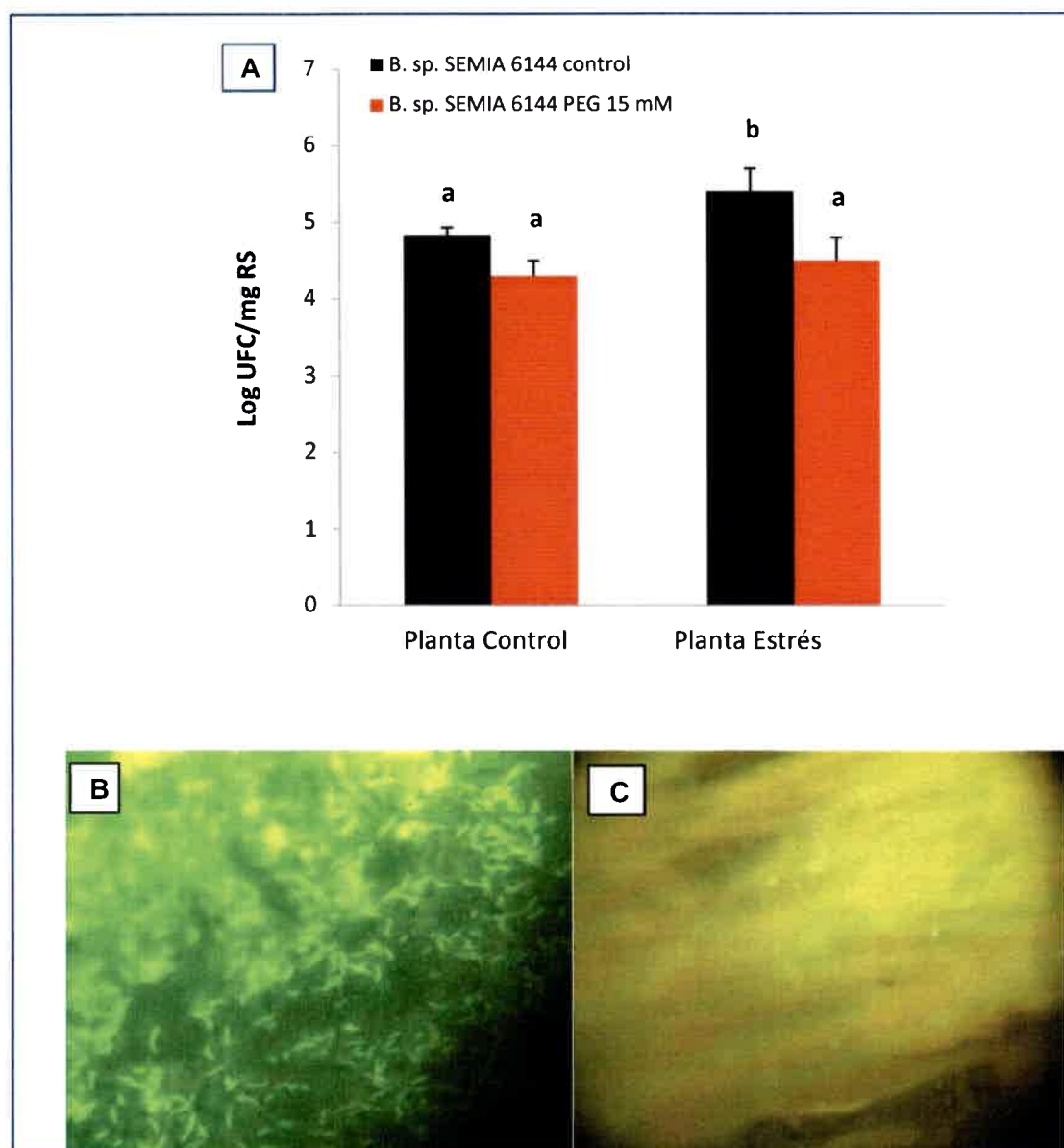


Figura 4.15. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de *B. sp. SEMIA 6144* a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento. **A.** Recuento de células adheridas a raíces de *A. hypogaea*, condición control y estrés hídrico. **B.** Suspensión bacteriana de la cepa *B. sp. SEMIA 6144* marcadas con NBD-PG. **C.** Bacterias marcadas con NBD-PG adheridas a la raíz lateral de una planta de maní control de 7 días. Imágenes tomadas por cámara Canon G10, Microscopio Axiolab (Zeiss). Los valores de la figura **A** se expresan como unidades formadoras de colonias adheridas por mg de raíz seca (UFC/mg RS) y representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La observación microscópica no tuvo fines cuantitativos, sino que se realizó a fin de confirmar la presencia de bacterias adheridas a la superficie radica. Las bacterias fueron marcadas con NBD-PG (Figura 4.15., B y C). A pesar de ser muy útiles en el estudio de la interacción temprana entre los rizobios y las raíces, los ensayos microscópicos presentan la desventajas de que requieren el uso de un gran número de bacterias (más de un millón de células por mililitro) para obtener resultados fiables (Matthysse *et.al*, 2001). En nuestro trabajo se empleó una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 UFC/ml (fase logarítmica). La fotografía B de la figura 4.16., muestra los microorganismos marcados con NBD-PG, y la fotografía B evidencia la presencia de pocas bacterias adheridas a la superficie de un segmento de raíz lateral de maní.

4.3.4.2. Adhesión de *A. brasilense* Az 39 a raíces de *A. hypogaea*

La unión de *Azospirillum* a las raíces de la planta huésped es fundamental para lograr una asociación a largo plazo, por tres razones: I: Sin una adhesión segura, las bacterias se pueden separar de la raíz, y el agua del suelos podría lavar las bacterias del rizoplano (Bashan, 1999); II: Si las bacterias no se adhieren a las células epidérmicas, las sustancias excretadas por la planta pueden difundirse en la rizósfera y ser consumidos por microorganismos. Además parte de las sustancias excretadas difunde en los espacios intercelulares de la corteza de la raíz lo que puede ser utilizado por las bacterias adheridas a raíz y III: Los sitios en las raíces en donde no hay células de *Azospirillum* adheridas, son vulnerables a la agresión de colonizadores no beneficiosos (Bashan *et.al*, 2004; 2011).

En este trabajo, para el estudio de la adhesión de *A. brasilense* Az 39, se eligieron raíces de plantas de maní de 7 días de crecimiento en condiciones óptimas y de déficit hídrico. Se analizó la adhesión de *A. brasilense* Az 39 a las raíces laterales de plantas de maní, mediante la técnica del recuento en placa, empleando 10^8 UFC/ml de *A. brasilense* Az 39 (Dardanelli *et.al*, 2003). Como se observa en la figura 4.16., aproximadamente 10^6 UFC se adhirieron por mg de raíz seca (RS). La cepa *A. brasilense* Az 39 procedente de un tratamiento de estrés disminuyó su capacidad de adhesión a las raíces jóvenes laterales de maní en comparación con la cepa no estresada.

Por otra parte, raíces de plantas procedentes de la condición de estrés hídrico presentaron mayor número de bacterias adheridas a la superficie que las raíces controles (Figura 4.16.). Resultados semejantes se obtuvieron cuando se estudió la adhesión de *B. sp. SEMIA 6144* a raíces de maní. En base a nuestros resultados, podemos sugerir que la bacteria *A. brasilense* Az 39 presentó un alto porcentaje de adhesión a las raíces y que aún crecida en déficit hídrico, la cepa no perdió significativamente su capacidad de adherirse a las raíces de maní de 7 días. En relación a esto y en concordancia con nuestro resultados, Albareda *et.al* (2006), estudiaron la adhesión de bacterias PGPR a raíces de leguminosas bajo condiciones control y de estrés salino. Para el caso *P. vulgaris*, ellos observaron que la adhesión de *A. brasilense* Sp7 fue mayor en las raíces de las plantas sometida a estrés salino respecto a las plantas crecida bajo la condición control.

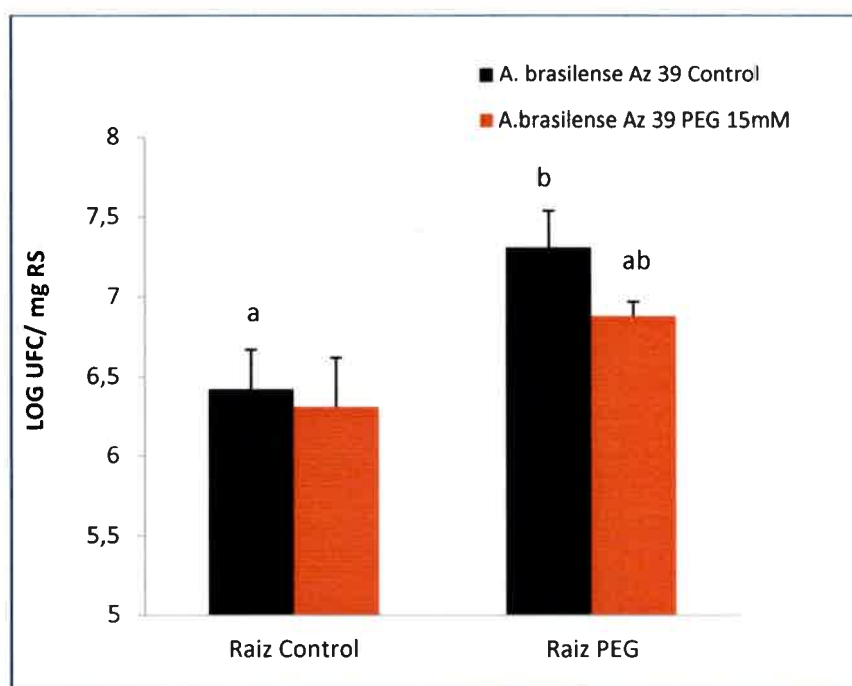


Figura 4.16. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) sobre la adhesión de *A. brasilense* Az 39 a raíces laterales de plantas de maní de 7 días de crecimiento. Condición control y estrés hídrico. Los valores se expresan como unidades formadoras de colonias adheridas por mg de raíz seca (UFC/mg RS) y representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

4.3.5. Cuantificación de AIA en rizobacterias

A. brasilense Az 39 demostró ser un buen productor de AIA en comparación con *B. sp.* SEMIA 6144. Como podemos observar en la figura 4.17., la adición de Trp en el medio de cultivo es importante para la producción de dicha fitohormona. *A. brasilense* Az 39 produjo 35,2 µg AIA/mg BS a través de la vía dependiente de Trp. Cuando el microorganismo creció bajo estrés hídrico, la producción de AIA incremento un 11% (39,5 µg AIA/mg BS) con respecto a la condición control. Sin embargo, en el caso de *B. sp.* SEMIA 6144, la adición de Trp al medio de cultivo no estimuló la producción de AIA. En ambas condiciones la producción de AIA fue mínima.

Resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo, fueron hallados por Aguilar-Piedras *et.al* (2008). Ellos observaron que la producción de AIA en *A. brasilense* en medio libre de nitrógeno y de Trp fue de 2 µg/mg BS, mientras que alcanzó valores de 24 µg/mg BS en un medio adicionado con fuente de nitrógeno y Trp. Esto indica que, en dicho microorganismo, la producción de AIA se lleva a cabo principalmente a través de la vía dependiente de Trp.

Cuando analizamos las rizodeposiciones, encontramos que las raíces de plantas sometidas a estrés hídrico liberaron Trp al medio. Nosotros planteamos como una hipótesis que el mismo pudo haber sido utilizado por la bacteria *A. brasilense* Az 39 para sintetizar AIA, reflejando un incremento del peso seco (mg) de las raíces de las plantas estresadas. Probablemente, el efecto benéfico de la inoculación de maní con la cepa *B. sp.* SEMIA 6144, no involucre al AIA, ya que esta cepa no es productora de dicha hormona (Figura 4.17.). Cassan *et.al* (2009), midieron la producción de AIA a través de HPLC de las cepas *A. brasilense* Az 39 y *B. diazoefficiens* E109. Ellos observaron que ambas cepas son capaces de excretar AIA (13,16 µg AIA/ml y 6,62 µg AIA/ml respectivamente). Ambas cepas fueron utilizadas para inocular semillas de maíz y de soja y las inoculaciones individuales y combinadas promovieron el incremento del peso seco de plántulas de soja y maíz. En nuestro trabajo la longitud de la raíz no fue aumentada en plántulas inoculadas, aunque incrementó el peso seco. En lo que respecta a este punto, Dobbelaere *et.al* (1999), demostraron que la inhibición de la longitud de la raíz junto con el aumento de volumen (raíces laterales) y peso seco de raíz son típicas respuestas a la producción bacteriana de AIA.

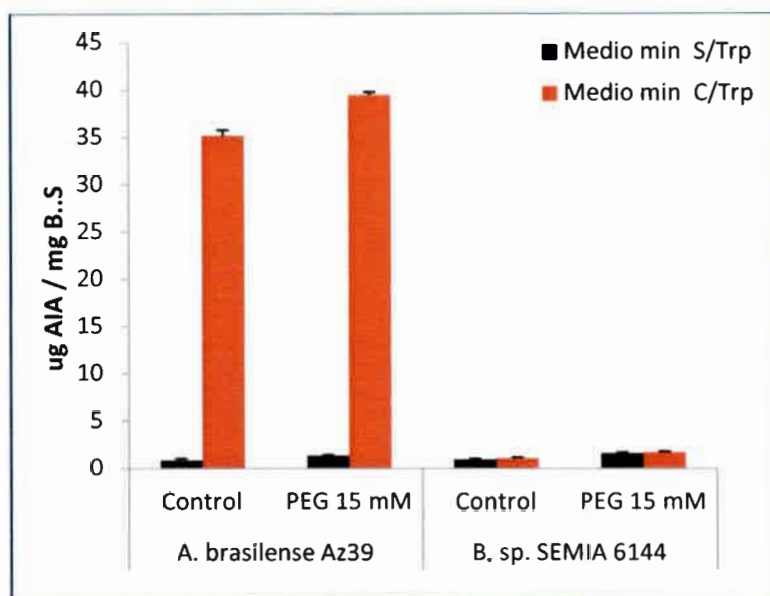


Figura 4.17. Efecto del déficit hídrico en la producción de AIA de *A. brasilense* Az 39 y *B. sp.* SEMIA 6144. Las bacterias fueron cultivadas en los medio de cultivo respectivos con y sin la adición de Trp. Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes.

4.4. Efecto del déficit hídrico sobre las etapas avanzadas de la interacción *A. hypogaea* - microorganismo.

- 4.4.1. Efecto de la inoculación simple y doble en *A. hypogaea*.
- 4.4.2. Efecto de la inoculación sobre el contenido de MDA en plantas sometidas a déficit hídrico.
- 4.4.3. Efecto del déficit hídrico en la cinética de nodulación de *B. sp* SEMIA 6144 en *A. hypogaea*.
- 4.4.4. Efecto del déficit hídrico sobre la morfología del desarrollo nodular.
- 4.4.5. Efecto de la inoculación simple y la coinoculación sobre los parámetros de nodulación de *A. hypogaea*.
- 4.4.6. Cálculos de los parámetros IRPA, RGR y df/dt .
- 4.4.7. Efecto del déficit hídrico y la presencia de *A. brasilense* Az 39 sobre la actividad nitrogenasa de *B. sp*. SEMIA 6144.

ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.4.

	Página
1.9 Efecto del déficit hídrico y de la inoculación simple y coinoculación, sobre los parámetros IRPA, RGR y df/dt en plantas de 33 días de crecimiento.	155

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 4.4.

4.18. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) y de la inoculación y coinoculación en plantas de <i>A. hypogaea</i> durante 33 días.	134
4.19. Efecto conjunto de la inoculación y el estrés hídrico sobre plantas de maní de 33 días.	137
4.20. Efecto del estrés hídrico y de la inoculación simple y doble en la peroxidación de los lípidos en hojas de <i>A. hypogaea</i> de 7 y 30 días de crecimiento.	140
4.21. Estudio de la cinética de nodulación de <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en plantas de <i>A. hypogaea</i> en ausencia o presencia de estrés hídrico.	142
4.22. Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 inoculada en plantas de <i>A. hypogaea</i> .	145
4.23. Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 en plantas de <i>A. hypogaea</i> coinoculada con <i>A. brasilense</i> Az 39.	146
4.24. Raíces y nódulos de plantas inoculadas de <i>A. hypogaea</i> de 22 y 33 días de crecimiento.	147
4.25. Raíces y nódulos de plantas coinoculadas de <i>A. hypogaea</i> de 22 y 33 días de crecimiento.	148
4.26. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de fijación de N_2 .	157

4.4. Efecto del déficit hídrico sobre las etapas avanzadas de la interacción *A. hypogaea*-microorganismo

Las respuestas de las plantas al déficit hídrico son complejas y afecta a diversos componentes. No sólo afecta el potencial agua de las células, induce el cierre de los estomas, decrece la fotosíntesis, la asimilación de nitratos y varias reacciones enzimáticas anabólicas (Grant *et.al*, 2012), sino también induce la generación de especies reactivas del oxígeno, las cuales causan la peroxidación de lípidos y como consecuencias daños en la membrana, degradación de proteínas, inactivación de enzimas y disrupción del ADN (Arrese-Igor *et.al*, 2011). Todos estos efectos, conllevan a la disminución del crecimiento vegetal y de los rendimientos de los cultivos. Una alternativa para mitigar estos efectos negativos consiste en la aplicación de biofertilizantes bacterianos sobre el suelo o raíces de las plantas, ya que constituye un método biotecnológico que le reporta al vegetal beneficios de manera natural. La posibilidad de utilizar estos microorganismos para favorecer la nutrición, el desarrollo de las plantas y la tolerancia a diferentes estreses ambientales, ofrece nuevas alternativas para incrementar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica como el maní, evitando el uso indiscriminado de fertilizantes químicos.

Sin embargo, como analizamos en el apartado 4.3., de Resultados y Discusión, el déficit hídrico moderado comprometió la eficacia del diálogo molecular que se establece entre *A.hypogaea* y las rizobacterias en estudio, afectando las etapas tempranas de la interacción. Para conocer si a pesar de ello, la inoculación logra mitigar los efectos que ocasiona el déficit hídrico moderado sobre el crecimiento de *A. hypogaea*, estudiamos el efecto del mismo en las etapas avanzadas de la interacción y los parámetros de crecimiento de *A. hypogaea* luego de ello.

4.4.1. Efecto de la inoculación simple y doble en *A. hypogaea*

Semillas de maní pre-germinadas, fueron transferidas a vasos con vermiculita estéril y se sometieron a los diferentes tratamientos. En el caso de la inoculación simple, cada semilla fue inoculada con 1ml de cultivo de *B. sp.* SEMIA 6144, mientras que en el tratamiento coinoculado, cada semilla fue inoculada con 1 ml de cultivo de *B. sp.* SEMIA 6144 1 ml de

cultivo de *A. brasilense* Az 39. Los tratamientos inoculados y no inoculados fueron sometidos a déficit hídrico mediante riego con una solución acuosa conteniendo 15 mM de PEG.

La figura 4.18., muestra los cambios morfológicos que presentaron las plantas de maní de 33 días, sometidas a diferentes tratamientos. Respecto a las plantas sin inocular, tal como se observa en la figura 4.18., A y B, el estrés hídrico provocó una reducción del crecimiento de las mismas, principalmente de la parte aérea. El mantenimiento de la longitud de la raíz respecto de la parte aérea, se considera como un aspecto morfológico relacionado con el rendimiento o eficiencia de la planta, el cual frente a estrés hídrico resulta en una reducción del desarrollo aéreo vegetal (Streeter, 2003). El déficit hídrico también afectó el desarrollo de la PA de plántulas de maní de 7 días, observándose la misma tendencia en plantas de 33 días de crecimiento bajo condiciones de déficit hídrico.

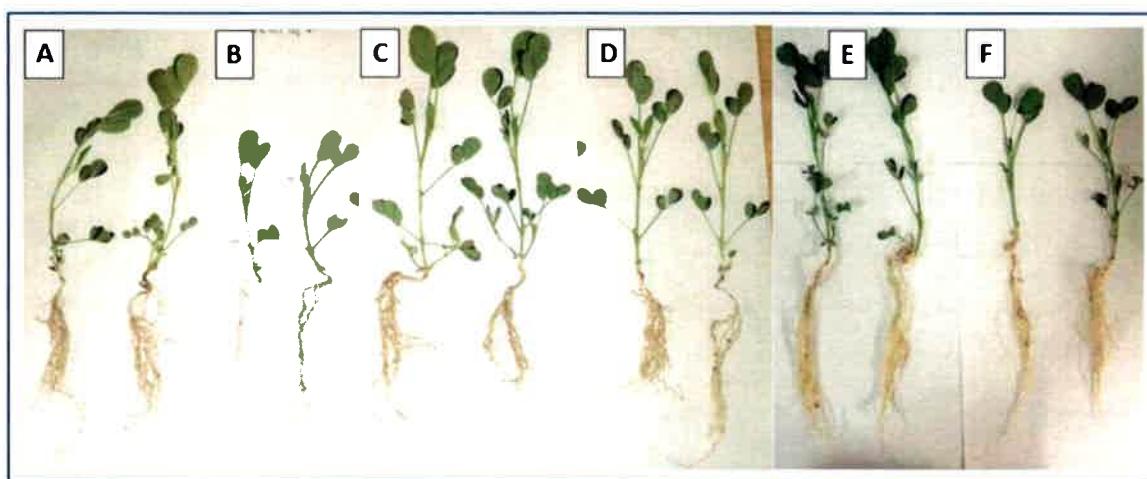


Figura 4.18. Efecto del estrés hídrico (PEG 15 mM) y de la inoculación y coinoculación en plantas de *A. hypogaea* durante 33 días. **A:** Plantas control, sin inocular; **B:** Plantas crecidas durante déficit hídrico (riego con PEG 15 mM) sin inocular; **C:** Plantas control inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144; **D:** Plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 sometidas a déficit hídrico; **E:** Plantas control coinoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39; **F:** Plantas coinoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 sometidas a déficit hídrico.

De la observación de la morfología de las plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144, podemos deducir que la inoculación favorece el desarrollo de las plantas, mitigando el efecto del estrés hídrico, mediante el mejoramiento del desarrollo aéreo y radical de las plantas sometidas a estrés (Figura 4.18., C y D). Respecto a la morfología de las plantas coinoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39, podemos observar que la coinoculación favoreció el desarrollo de las plantas control como de aquellas sometidas a estrés hídrico, tanto de la parte aérea como radical (Figura 4.18., E y F).

Se analizaron los parámetros de crecimiento de longitud (cm) y peso seco (mg) (Figura 4.19., A y B). La longitud de la PA de las plantas de maní crecidas en presencia de PEG 15 mM se redujo significativamente en un 22,8% comparado con plantas crecidas bajo condiciones control menos, mientras que la longitud radical de las plantas sometidas a déficit hídrico incrementó en un 20,3% respecto al control (Figura 4.19., A). Estos datos sugieren que la conservación de la raíz en detrimento de su parte aérea es un mecanismo adaptativo de la planta frente al estrés hídrico. Si bien la longitud radicar resultó incrementada, se observó disminución en el volumen radical producto del déficit hídrico. De modo que si analizamos la medida de la biomasa seca (mg) observamos una disminución en un 56% de la biomasa aérea, y un 57% menos de biomasa radical (Figura 4.19., B).

Respecto a la inoculación, en las plantas controles inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 se registraron incrementos significativos de un 23% en la longitud de la PA con respecto a plantas controles sin inocular. La PR presentó un aumento no significativo (5,6%) respecto al control no inoculado. El mismo efecto se observó en la biomasa seca, registrándose un aumento del 56% de la parte aérea. La inoculación de las plantas de maní con *B. sp.* SEMIA 6144 logró mitigar los efectos del déficit hídrico sobre los parámetros de crecimiento. Respecto a la longitud de la PA y PR, las plantas estresadas e inoculadas superaron a las plantas estresadas sin inocular, alcanzando valores similares a los de una planta control. También se observaron incrementos estadísticamente significativos en el peso seco de la PA (54%) y PR (33%) comparadas con plantas estresadas sin inocular (Figura 4.19.).

En relación a las plantas de maní crecidas en condiciones control y coinoculadas con ambas rizobacterias se observó un incremento de un 7% en la longitud de la parte aérea con respecto a plantas controles sin inocular. La PR presentó un aumento significativo en un 30,4% respecto al control no inoculado. El mismo efecto se observó en la biomasa seca, registrándose

un aumento en un 11,8% de la PA, y en un 14% de la PR. La coinoculación de las plantas maní con ambas cepas, provocó un efecto positivo sobre los parámetros de crecimiento en las plantas sometidas a estrés hídrico, aunque algunos de ellos fueron estadísticamente no significativos. Respecto a la longitud de la PA (Figura 4.19., A), las plantas estresadas y coinoculadas superaron a las plantas estresadas sin inocular, registrándose un incremento de un 8,25%, mientras que no se evidenció aumento en la PR. Respecto al peso seco (Figura 4.19., B), la PA incrementó en un 21% respecto a las plantas estresadas sin inocular. No se observaron incrementos en el peso seco de la PR.

Se conoce que la inoculación de maní con *Bradyrhizobium* favorece el crecimiento de la planta, sin embargo nuestros resultados son sumamente importantes y aportan nuevos datos, indicando que la inoculación de *A. hypogaea* con *B. sp.* SEMIA 6144, beneficia el crecimiento de las plantas en ambientes sometidos a estrés hídrico moderado revirtiendo el efecto negativo de la deficiencia de agua. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo refuerzan los resultados hallados. Dardanelli *et.al.* (2009), evaluaron el efecto de distintas cepas de *Bradyrhizobium* sobre el crecimiento y desarrollo de *A. hypogaea* en estreses abióticos (salinidad y sequía). Ellos demostraron que en condiciones de estrés hídrico (PEG 20 mM), los pesos secos de la PA y PR (tratamientos inoculado y no inoculados), no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Numerosos autores reportaron el efecto benéfico de la inoculación de plantas sometidas a estrés hídrico. Chakraborty *et.al* (2013), evaluaron el efecto de la inoculación de trigo (*T. aestivum* L.) creciendo en estrés hídrico (25% PEG). Ellos observaron que la inoculación generó mayor desarrollo aéreo con respecto al radical. Streeter, (2003), estudió el efecto de la aplicación de estrés hídrico durante cuatro semanas sobre plantas de soja. Similar a nuestros resultados, el autor destaca la reducción del 50% de la biomasa seca aérea en las plantas de soja estresadas respecto a las controles. Sin embargo, contrario a nuestros resultados, cuando estudió la inoculación con *B. diazoefficiens*, no detectó efecto significativo sobre el desarrollo de las plantas estresadas e inoculadas.

Numerosos autores reportaron un efecto benéfico de la coinoculación tanto de leguminosas como de no leguminosas. Entre de los microorganismos identificados para ayudar en el proceso de asociación simbiótica rizobio-leguminosa encontramos *Azospirillum* (Cassan *et.al*, 2009), *Bacillus* (Bullied *et.al*, 2002; Mishra *et.al*, 2009) y *Pseudomonas* (Fox *et.al*, 2011).

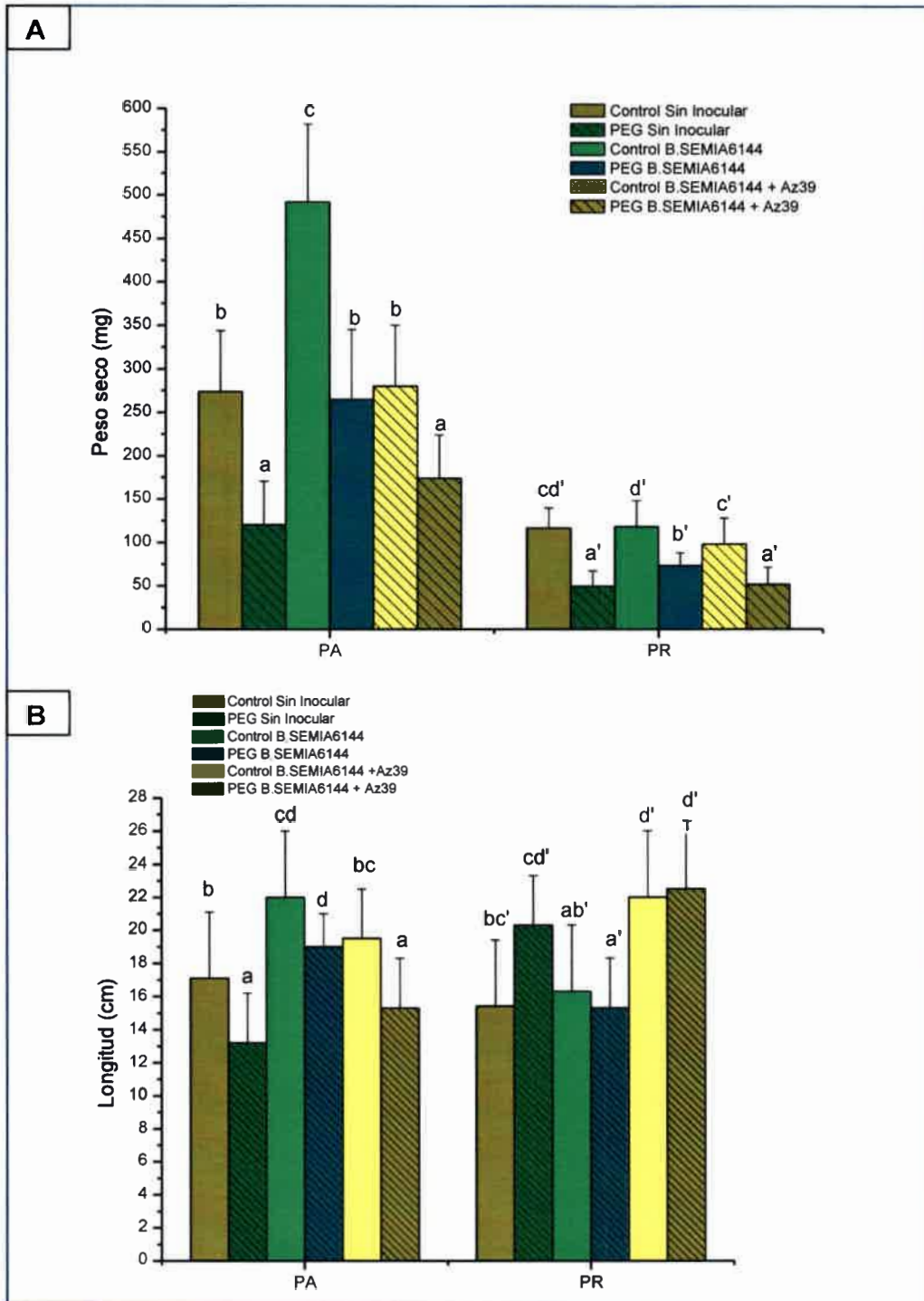


Figura 4.19. Efecto conjunto de la inoculación y el estrés hídrico sobre plantas de maní de 33 días. **PA:** Parte aérea, **PR.** Parte raíz. **A:** Longitud (cm) **B.** Peso seco (mg) de plantas de *A. hypogaea*; luego de 33 días de crecimiento bajo diferentes tratamientos. Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos diferentes, con ensayos de 25 plantas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

El uso de una bacteria “helper” durante la interacción rizobio-leguminosa, se ha estudiado en alfalfa, y se ha observado que induce la temprana nodulación y el incremento en el número de nódulos por planta cuando se coinocula con *S. meliloti* y *Delftia* sp. (Han *et.al*, 2005; Morel *et.al*, 2011; Ubalde *et.al*, 2012). El intercambio de señales moleculares entre *E. meliloti* y *Delftia* durante la interacción demostró que la inoculación doble es mejor que la inoculación con *Ensifer* (*Sinorhizobium*), favoreciendo la inducción de flavonoides inductores de genes *nod*, la producción de AIA, así como el incremento en la secreción de AG insaturados de cadena corta, y de ácidos orgánicos. Todas estas moléculas probablemente están involucradas en la fluidificación de la membrana para preparar la raíz para la colonización de rizobios (Morel *et.al*, 2015).

Vicario *et.al* (2015) estudiaron la inoculación y coinoculación de maní con cepas nativas de *Bradyrhizobium* y *A. brasilense*. Estos autores encontraron que los parámetros de peso seco aéreo, radical, número de nódulos y peso seco de nódulos, resultaron generalmente incrementados en los tratamientos coinoculados. En el caso de otra leguminosa de importancia económica como es la soja, la coinoculación con *A. brasilense* y *B. japonicum*, generó un aumento en la biomasa aérea y radical, así como en el número de nódulos y finalmente en el rendimiento de granos de las plantas tratadas comparadas con las no inoculadas (Chibeba *et.al*, 2015). En nuestro trabajo, nosotros registramos valores superiores en la mayoría de los parámetros de crecimiento de maní, cuando se realizó la inoculación simple con *B. sp.* SEMIA 6144 en comparación con la coinoculación con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39. Sin embargo la coinoculación permitió a la planta desarrollar raíces más largas, lo cual puede favorecer a la planta creciendo en un ambiente de déficit hídrico.

Diversos reportes bibliográficos han informado acerca de las interacciones de las PGPRs con los rizobios en leguminosas (Lucas-Gracia *et.al*, 2004a, 2004b; Askary *et.al*, 2009; Morel *et.al*, 2011; Vicario *et.al*, 2015; Morel *et.al*, 2015) aportando datos relevantes para la selección de una adecuada combinación rizobio-PGPR. Tal es el caso para la combinación *R. trifolii* y *Azospirillum*, cuya interacción resultó ser negativa al verse disminuida la tasa de fijación de nitrógeno cuando se utilizaba el coinoculante frente al inoculante simple del rizobios. Tilak *et.al* (2006) indicaron que las PGPR pueden afectar *in situ* de forma diferencial el crecimiento rizobiano, y como consecuencia alterar la competitividad. Al mismo tiempo la inoculación con rizobios puede modificar la supervivencia y el establecimiento de las otras PGPR en el suelo,

por lo que se precisa de un mayor estudio acerca de las interacciones entre estas bacterias que determinen que efectos pueden ser sinérgicos y cuales antagónicos.

4.4.2. Efecto de la inoculación sobre el contenido de MDA en plantas sometidas a déficit hídrico

Se conoce que los radicales libre generan peroxidación de lípidos de membrana. En el apartado 4.1.4., se analizó el contenido de MDA como un indicador de estrés en hojas y raíces de plántulas de maní sometidas a estrés hídrico. Para dilucidar si la inoculación con *B. sp. SEMIA 6144* y *A. brasilense Az 39* logra mitigar los efectos nocivos del déficit hídrico sobre los niveles de peroxidación de lípidos, se determinó el contenido de MDA en hojas de *A. hypogaea* bajo las condiciones mencionadas (Figura 4.20.). El crecimiento bajo estrés hídrico aumento lo niveles de peroxidación lipídica tanto en plantas de 7 como de 30 días, en comparación al control, sin embargo en plantas estresadas el nivel de peroxidación fue menor a los 30 días respecto a los 7 días. Esto indica que en los estadios tempranos del crecimiento vegetal, el daño provocado por el estrés es mayor. Resultados similares se observaron en *P. vulgaris* sometido a PEG por 7 y 14 días (Turkan *et.al*, 2004).

La inoculación simple (*B. sp. SEMIA 6144*) y la coinoculación (*B. sp. SEMIA 6144* y *A. brasilense Az 39*) causó efecto variable en la peroxidación lipídica. En la figura 4.20., se observa que la inoculación (simple y coinoculación) aumentó la peroxidación lipídica en hojas de plantas creciendo bajo la condición control, respecto a las plantas sin inocular. En plantas de 7 días de crecimiento, el contenido de MDA fue de un 48% superior en plantas inoculadas con *B. sp. SEMIA 6144*, mientras que la coinoculación provocó un aumento de un 60% respecto a la condición control sin inocular. Esto puede estar relacionado con el efecto que desencadena la interacción planta microorganismo. Numerosos reportes indican que al inicio de la interacción, los rizobios pueden ser reconocidos por la planta como microorganismos patógenos, por lo cual se desencadenan especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS están implicadas en el daño oxidativo y la lipoperoxidación, así como también forman parte de una cascada requerida para la iniciación de los primordios nodulares y en señales que contribuyen a estabilizar la FBN. A los 30 días, las plantas inoculadas con *B. sp. SEMIA 6144* presentaron menor contenido de MDA tanto en condición control como bajo déficit hídrico. Este dato

resulta interesante, ya que podría sugerir un efecto benéfico de la inoculación con *B. sp. SEMIA 6144* a nivel del daño oxidativo generado por el déficit hídrico. En plantas coinoculadas no se observó el mismo efecto, ya que el contenido de MDA resultó superior al encontrado en hojas de plantas inoculadas con *B. sp. SEMIA 644*.

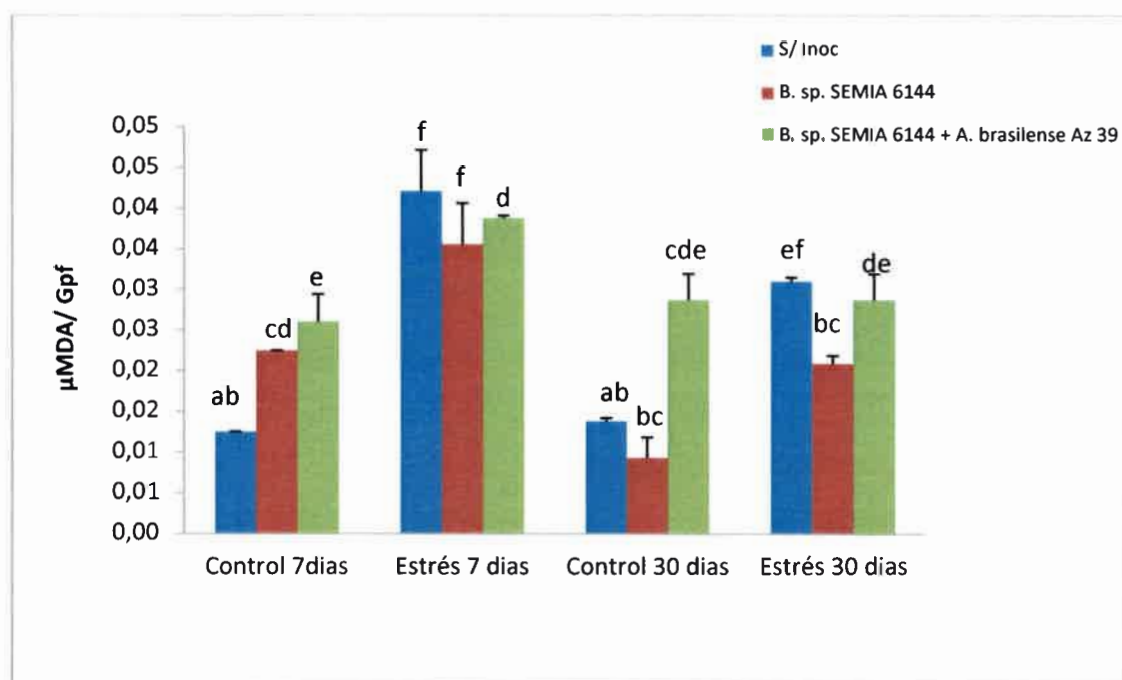


Figura 4.20. Efecto del estrés hídrico y de la inoculación simple y doble en la peroxidación de los lípidos en hojas de *A. hypogaea*. L de 7 y 30 días de crecimiento. Los valores representan la media \pm S.E.M. de siete experimentos independientes. S/Inoc: sin inocular. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.4.3. Efecto del déficit hídrico en la cinética de nodulación de *B. sp. SEMIA 6144* en *A. hypogaea*

Para conocer el efecto del déficit hídrico en la simbiosis *B. sp. SEMIA 6144-A. hypogaea*, así como en la interacción *B. sp. SEMIA 6144-A. hypogaea-A. brasilense* Az 39, analizamos la cinética de nodulación durante 33 días de crecimiento de las plantas de maní. La figura 4.21., muestra la cinética de nodulación de *B. sp. SEMIA 6144* en *A. hypogaea* cuando la planta se desarrolla en condiciones controles como en déficit hídrico, así como cuando se realiza una coinoculación con *A. brasilense* Az 39.

B. sp. SEMIA 6144 mostró una curva típica de cinética de nodulación, los nódulos se desarrollaron entre los días 5 y 7 hasta los 33 días. Las plantas controles inoculadas con *B. sp. SEMIA 6144* alcanzaron un valor promedio de 58 nódulos/planta luego de los 33 días. En presencia de estrés hídrico la curva de cinética de nodulación presentó en los diferentes tiempos analizados, principalmente a partir del día 15, una importante disminución en el número de nódulos por planta comparado con el control, llegando a alcanzar un valor promedio de 33 nódulos/planta al final del ensayo, lo que representa un 43% menos respecto al control. Estos resultados indican que el estrés hídrico afecta la cinética de nodulación, de manera tal que el desarrollo de nódulos/planta es menor (Figura 4.21.). Coincidente con nuestros resultados, Estévez (2007), estudió la cinética de nodulación de *R. tropici* en plantas de *P. vulgaris*. Los nódulos se desarrollaron desde el día 5 hasta el día 28, alcanzando un valor de 128 nódulos/planta a los 28 días. Sin embargo en condiciones de estrés salino (25 mM NaCl) la curva de la cinética disminuyó entre los días 11 y 28, con una reducción del 37% en el número de nódulo/planta a los 28 días.

A diferencia de nuestros resultados, Angelini *et.al* (2005), estudiaron la cinética de nodulación de *B. sp. SEMIA 6144* y a los 30 días pos inoculación, observaron la presencia de 25 nódulos/planta de *A. hypogaea* crecida a pH 7.

Respecto a la coinoculación con *B. sp. SEMIA 6144* y *A. brasilense* Az39, se observó que las plantas controles coinoculadas con ambas cepas alcanzaron un valor promedio de 41 nódulos/planta luego de los 33 días pos-inoculación, menor que el número de nódulos alcanzado con la inoculación simple (Figura 4. 21.). Bajo déficit hídrico se pudo observar en los diferentes tiempos analizados a lo largo de la curva de cinética de nodulación, menor

número de nódulos por planta, alcanzando un valor promedio de 22,6 nódulos/planta al final del ensayo, lo que representa un 49% menos respecto al control coinoculado. Estos resultados indican que el estrés hídrico afecta la cinética de nodulación, de manera tal que el desarrollo de nódulos/planta es menor al que se observa en condición óptima de crecimiento, con la dosis de inoculación empleada en este ensayo. Por otra parte si lo comparamos con los resultados obtenidos de la inoculación simple con *B. sp. SEMIA 6144* podemos inferir que la coinoculación no acelera la cinética de nodulación de *B. sp. SEMIA 6144* en plantas de maní sometidas a déficit hídrico. La inoculación simple con *B. sp. SEMIA 6144* resultó ser más efectiva que la coinoculación desde el punto de vista de la cinética.

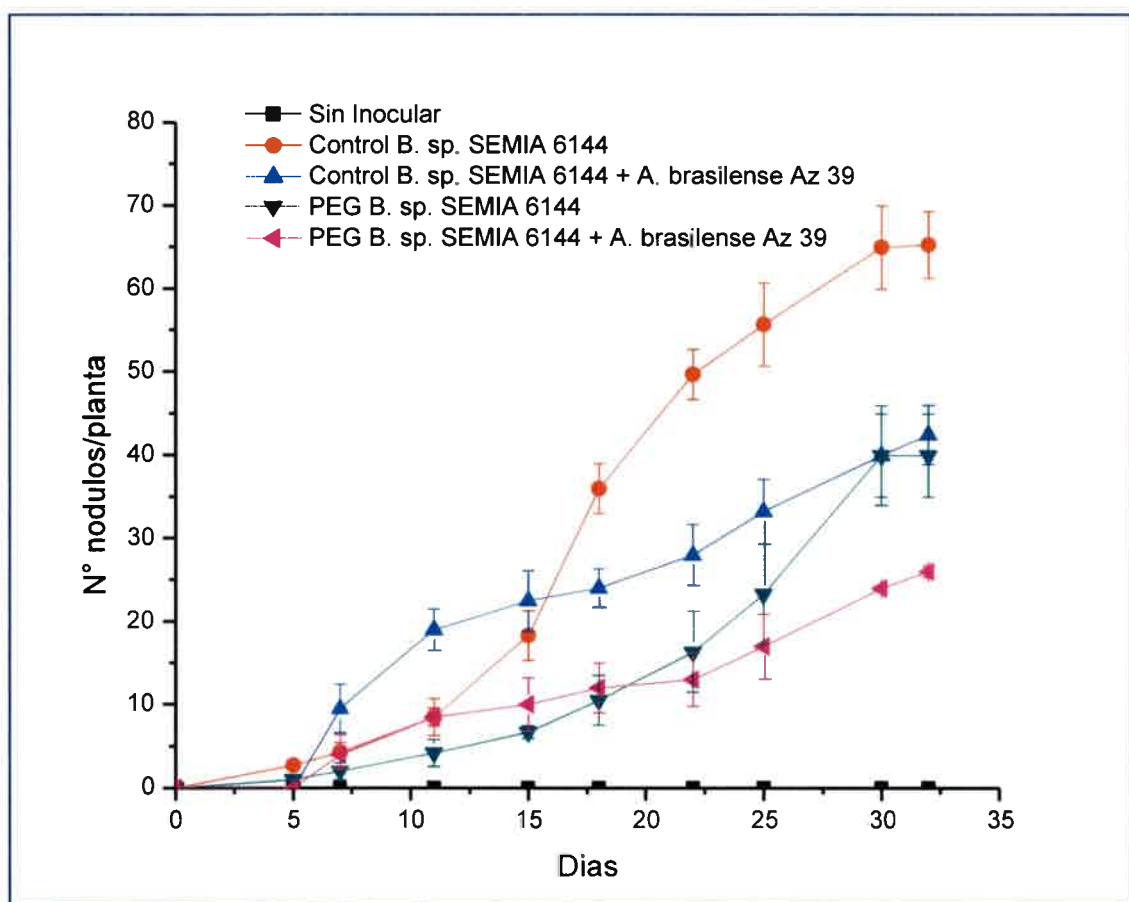


Figura 4.21. Estudio de la cinética de nodulación de *B. sp. SEMIA 6144* en plantas de *A. hypogaea* en ausencia o presencia de estrés hídrico (PEG 15 mM). Se emplearon 20 plantas por tratamiento. Por día de análisis, 2 plantas fueron cosechadas y analizadas por tratamiento. Los valores representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes.

Las etapas iniciales de la nodulación son más sensibles que el resto de las etapas. En planta de guisante se ha observado que el estrés salino inhibe el desarrollo de la infección, y el tamaño y número de nódulos es menor (Borucki y Sujkowska, 2008).

Busse y Bottomley. (1989), estudiaron la influencia del déficit hídrico (PEG) en la nodulación de alfalfa con *E. meliloti* y obtuvieron resultados similares a los nuestros. Bajo estas condiciones la cinética de nodulación de *E. meliloti* mostró que al día 7, el 30% de las plantas no estresadas presentaron nódulos, mientras que las plantas sometidas a estrés hídrico (-1 MPa), fueron noduladas sólo un 10% a partir del día 8. Al décimo día, el 90% de las plantas controles estuvieron noduladas, mientras que las plantas estresadas sólo nodularon el 50%. Un comportamiento similar al descrito se puede observar en la nodulación de *A. hypogaea* con *B. sp.* SEMIA 6144 (Figura 4. 21.).

Estévez Amador (2007), estudió la combinación de *R. tropici* y *C. balustinum* en la leguminosa *P. vulgaris* bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino (NaCl 25 mM) durante 28 días. Bajo la condición de inoculación doble, se registró un mayor número de nódulos que cuando las plantas fueron inoculadas con el inóculo simple bajo condiciones de crecimiento control durante los primeros 18 días. A partir de este punto, los valores fueron similares. Bajo condiciones de estrés salino, observaron un leve efecto de promoción por parte de la PGPR en cuanto al número de nódulos contabilizados cuando las plantas fueron coinoculadas, aunque sin diferencias significativas con respecto plantas inoculadas con inóculo simple.

Chibeba *et.al* (2015) estudiaron la coinoculación de soja con *Bradyrhizobium sp.* y *Azospirillum sp.* Estos autores observaron de manera similar al efecto reportado por Estévez Amador (2007), que la coinoculación adelantó la cinética, obteniéndose al día 15 del ensayo, 15 nódulos/planta para la condición de inoculación simple, y 21 nódulos/planta bajo condiciones de coinoculación. Sin embargo al finalizar el ensayo, en el día 30, el número de nódulos/planta fue de 48 para ambos tratamientos, es decir que se equiparó el efecto que ejerce la PGPR. El efecto benéfico de la inoculación suele ser más evidente en el campo, donde las condiciones limitantes afectan la nodulación, resultando en un pobre establecimiento de la simbiosis (Hungria *et.al*, 2015).

Similar a nuestros resultados, Vicario *et.al* (2015) observaron que el número de nódulos totales en plantas de maní coinoculadas con *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* al día 33, resultó

similar, sin diferencias significativas, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo nuestros resultados no reflejan un efecto promotor de la PGPR sobre la cinética de nodulación.

4.4.4. Efecto del déficit hídrico sobre la morfología del desarrollo nodular de *B. sp.* SEMIA 6144 en *A. hypogaea* en ausencia y presencia de *A. brasilense* Az 39

La observación de las raíces y la detección de los primordios nodulares se realizaron por medio de la tinción con Azul de Metileno 1% y bajo la observación microscópica y de lupa. En la figura 4. 22., y 4. 23., puede observarse el desarrollo de los primordios nodulares y nódulos en raíces de *A. hypogaea* creciendo bajo condiciones controles y de déficit hídrico, previamente inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144, así como coinoculada con *A. brasilense* Az 39, respectivamente.

Respecto a las plantas crecidas en estrés hídrico, se pudo observar a diferencia de las plantas controles, la aparición abundante de pelos radicales en la superficie de las raíces laterales jóvenes (Figura 4. 22., A, B; Figura 4. 23., A, B). Los primordios se observaron como una masa circular de coloración azul ubicados sobre la emergencia de las raíces laterales o sobre la corteza radical. Tal como puede verse en las fotografías obtenidas de la observación microscópica (10X, 40X), durante los días 5-10 pos-inoculación aparecieron los primeros primordios nodulares (Figura 4. 22.,B,C,D,F; Figura 4. 23., A,B,C,D,E,F). Los nódulos fueron de observación macroscópica a partir del día 15. La morfología de los nódulos fue semejante tanto para las plantas controles como las estresadas.

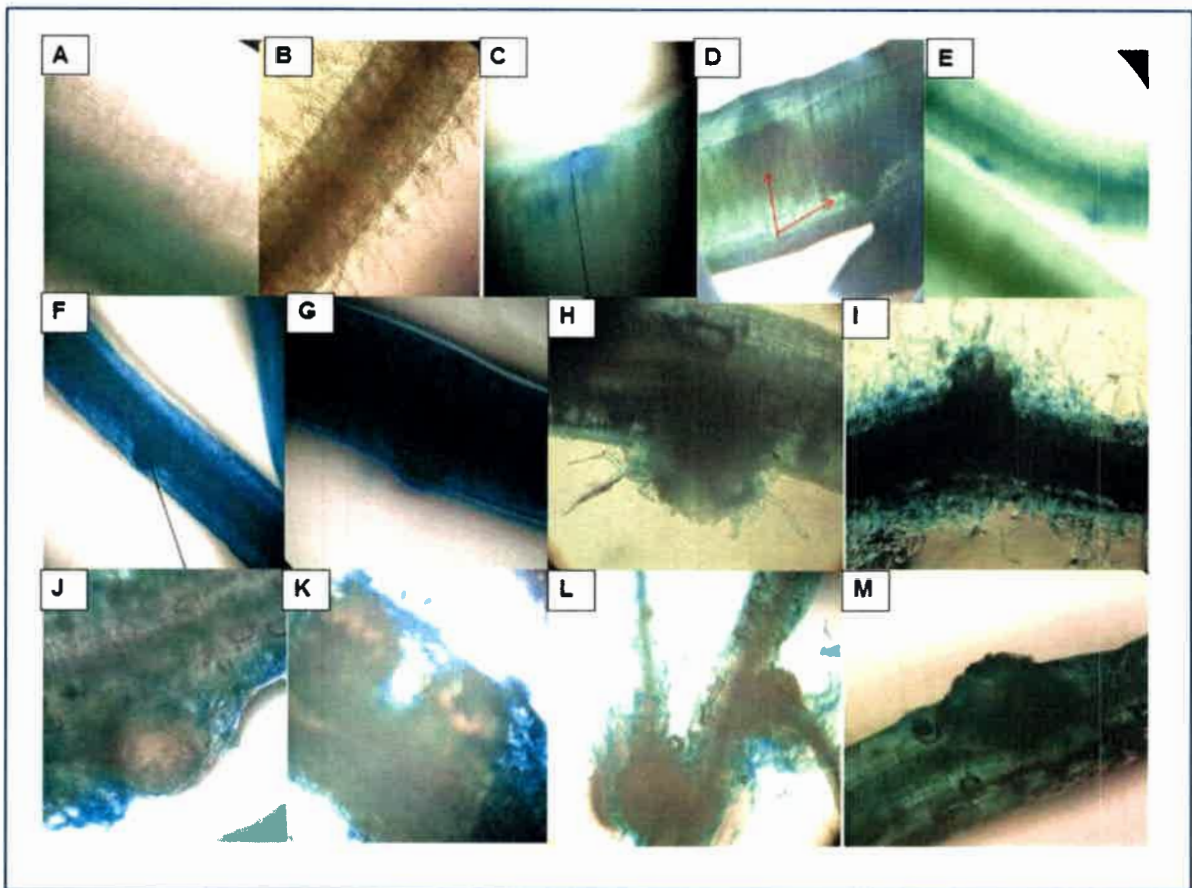


Figura 4.22. Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa *B. sp.* SEMIA 6144 inoculada en plantas de *A. hypogaea* bajo condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM), fotografiadas a diferentes días de crecimiento. Tinción Azul de Metileno 1%. Tratamiento control de 5 (A, C), 7 (D), 10 (F), 15 (H), 18 (J) y 22 (L) días de crecimiento. Tratamiento PEG 15 mM de 5 (B), 7 (E), 10 (G), 15 (I), 18 (K) y 22 (M) días de crecimiento. Imágenes representativas de un experimento de un total de tres. Aumento 10X.

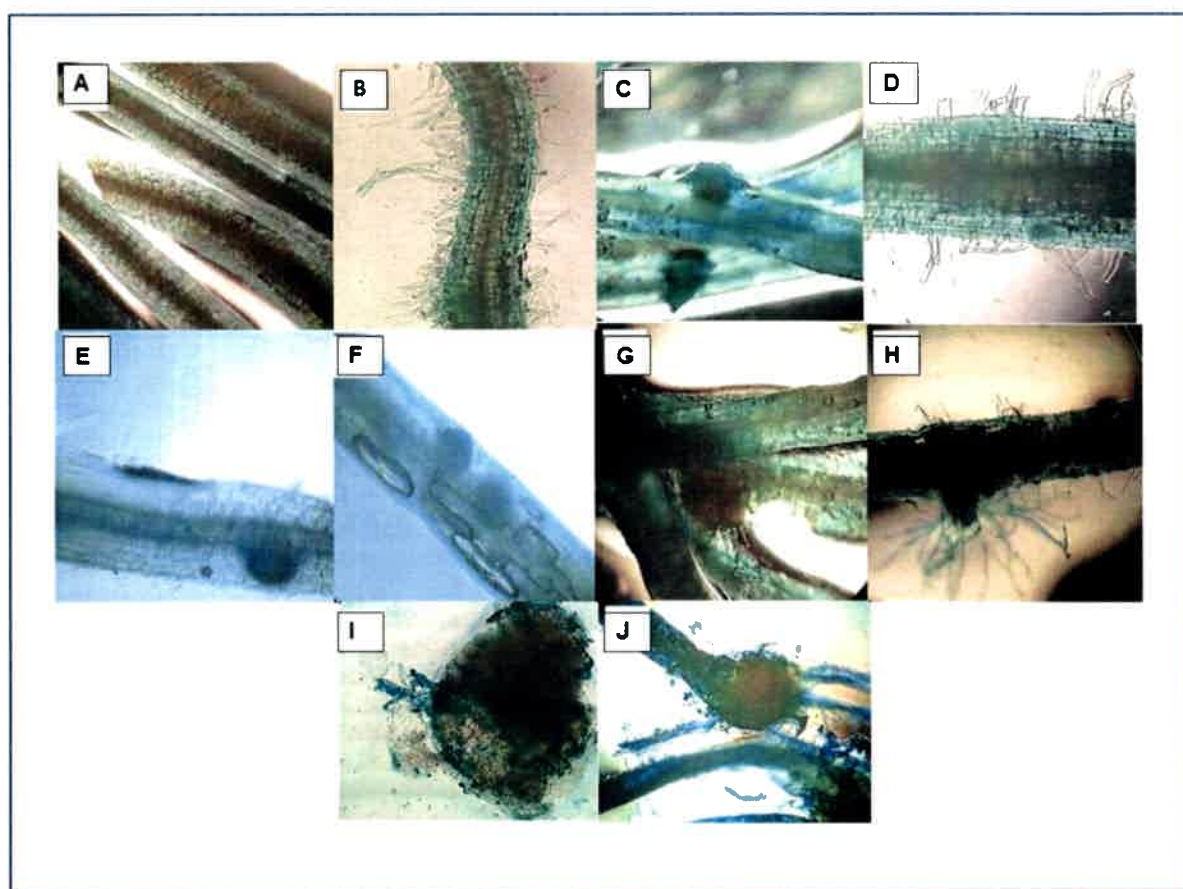


Figura 4.23. Estudio comparativo del desarrollo nodular de la cepa *B. sp.* SEMIA 6144 en plantas de *A. hypogaea* coinoculada con *A. brasilense* Az 39, bajo condiciones de crecimiento control y de déficit hídrico (PEG 15 mM). Las imágenes corresponden a fotografías de raíces teñidas con azul de metileno 1% en diferentes días de crecimiento. Tratamiento control de 5 (A), 7 (C), 11 (E), 15 (G), 22 (I) días de crecimiento. Tratamiento PEG 15 mM de 5 (B), 7 (D), 11 (F), 15 (H), 22 (J) días de crecimiento. Imágenes representativas de un experimento de un total de tres. Aumento 10X.

La formación de los nódulos es afectada por las condiciones sub óptimas del suelo, tales como salinidad, temperaturas extremas, falta de agua, alto o bajo, aplicación de pesticidas, deficiencia de nutrientes (Zahran, 1999; Hungria y Vargas, 2000).

La figura 4.24., muestra el desarrollo de nódulos en plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144, de 22 y 33 días de crecimiento. Se observa un cambio en el patrón de ubicación de los nódulos, en el caso de raíces de maní procedente de las plantas inoculadas en condición control se observó el desarrollo de nódulos preferentemente en raíz principal (Figura

4.24.,A,C). Los nódulos presentes en las plantas estresadas fueron fenotípicamente de morfología normal, ubicándose preponderantemente en las raíces laterales de la planta (Figura 4.24.,B,D)

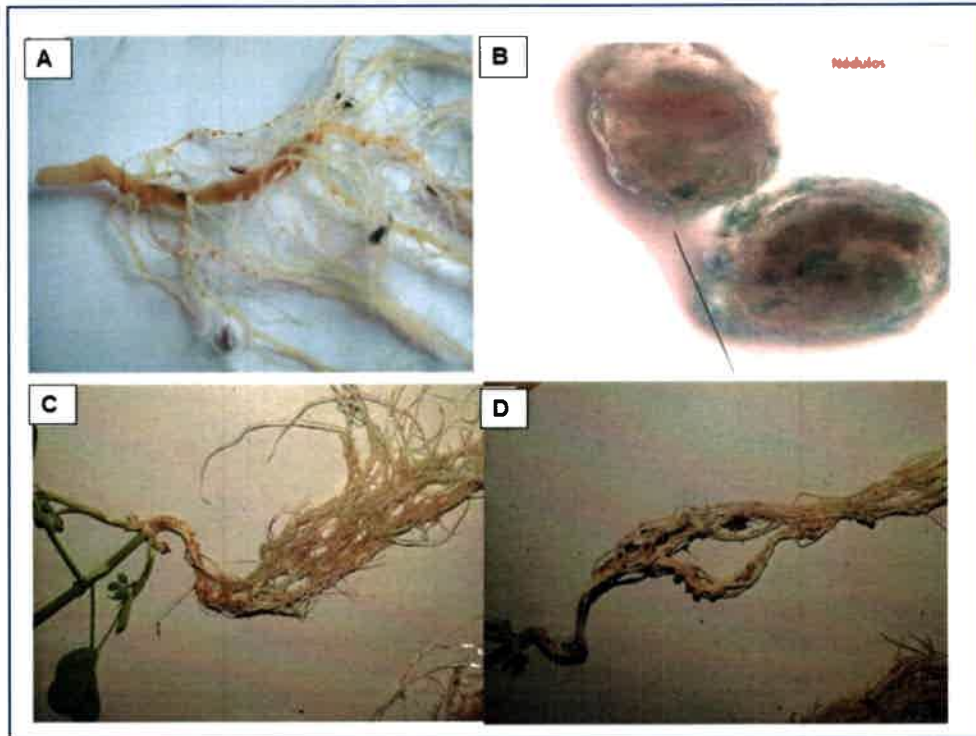


Figura 4.24. Raíces y nódulos de plantas inoculadas de *A. hypogaea* de 22 y 33 días de crecimiento. **A:** nódulos en raíz principal y en raíces laterales de planta control inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144, luego de 22 días de crecimiento; **B:** nódulos extraídos de raíz de planta estresada (PEG 15 mM), observados en microscopio óptico, aumento 5X; **C:** nódulos en raíz principal y en raíces laterales de planta control y **D:** estrés (PEG 15 mM), inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144, a los 33 días de inoculación.

El desarrollo de nodular en plantas de 22 y 33 días de crecimiento coinoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39 puede observarse en la figura 4. 25. A diferencia de lo observado en la inoculación simple, en la coinoculación no se registró un cambio en el patrón de ubicación de los nódulos en las raíces. En el caso de raíces de maní procedente de las plantas coinoculadas en condición de déficit hídrico se observó abundante desarrollo de raíces laterales (Figura 4. 23., D). Los nódulos presentes en las plantas estresadas fueron

fenotípicamente de morfología normal, aunque de menor tamaño, ubicándose preponderantemente en las raíces principales de la planta (Figura 4. 25. C, D)

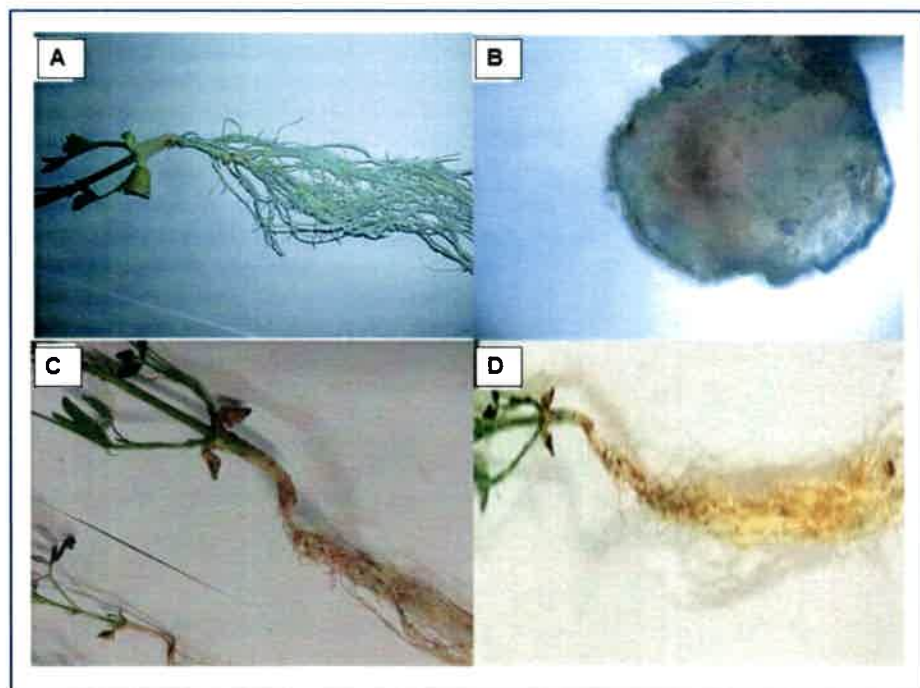


Figura 4.25. Raíces y nódulos de plantas coinoculadas de *A. hypogaea* de 22 y 33 días de crecimiento. **A:** Nódulos en raíz principal y en raíces laterales de planta control coinoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39, luego de 22 días de crecimiento; **B:** Nódulos extraídos de raíz de planta estresada (PEG 15 mM), observados en microscopio óptico, aumento 5X; **C:** Morfología de la raíz principal y laterales de planta control y **D:** Raíz de planta crecida en condición de estrés (PEG 15 mM), coinoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39, a los 33 días de inoculación.

4.4.5. Efecto de la inoculación simple y la coinoculación sobre los parámetros de nodulación de *A. hypogaea*

Luego de 33 días de ensayo, el 100% de las plantas de maní inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 fueron noduladas. Tal como muestra la tabla 1.8., las plantas controles presentaron en promedio 58,6 nódulos/planta, de los cuales el 65,5% se hallaron en la raíz principal. Es importante destacar que en promedio 22 nódulos/planta se ubicaron en la zona del cuello de la

raíz. El déficit hídrico afectó negativamente la interacción *B. sp. SEMIA 6144-A. hypogaea*. Si bien el 95% de las plantas estresadas e inoculadas presentaron nódulos, se observó una disminución significativa en el número de nódulos/planta y en la biomasa seca nodular. Respecto al número de nódulos/planta hallado fue de 33, lo que representa un 43% menos que las planta control. Un dato de interés fue que el 63% de los nódulos presentes en las plantas estresadas se desarrollaron en las raíces laterales, a diferencia de las plantas no estresadas. Como es de esperar la biomasa nodular presente en plantas estresadas se redujo en un 40% (Tabla 1.8.). El Test de Burton arrojó resultados positivos en ambas condiciones (control y estrés hídrico), ya que más del 80% de las plantas fueron noduladas.

Respecto a las plantas coinoculadas, luego de 33 días de ensayo, el 100% de las mismas presentaron nódulos. Tal como muestra la tabla 1.8., plantas controles coinoculadas con ambas cepas presentaron en promedio 43 nódulos/planta, de los cuales el 60,5% se halló en la raíz principal. Es importante destacar que en promedio 14,3 nódulos/planta se ubicaron en la zona del cuello de la raíz. El número de nódulos totales en plantas crecidas bajo condiciones control, comparado el número de nódulos totales, fue menor en el tratamiento coinoculado comparado con el tratamiento de inoculación simple con *B. sp. SEMIA 6144* donde se puede observar que en este último tratamiento el promedio fue de 58,6 nódulos/planta y a pesar de esto, se mantuvo el mismo patrón de distribución espacial de los nódulos en ambos tratamientos.

El déficit hídrico afectó negativamente la triple interacción *B. sp. SEMIA 6144-A. hypogaea-A. brasilense Az 39* en las dosis de inoculación empleadas. Si bien el 98% de las plantas estresadas y coinoculadas presentaron nódulos, se observó una disminución significativa en el número de nódulos/planta y en la biomasa seca nodular. Respecto al número de nódulos/planta hallado fue de 22,6, lo que representa un 48,4% menos que las planta control. Un dato de interés fue que el 81% se halló en la raíz principal a diferencia de las plantas no estresadas que fue del 63%. A diferencia de lo que ocurre en plantas estresadas inoculadas con *B. sp. SEMIA 6144* se observa un incremento en el número de nódulos presentes en las raíces laterales, en el caso de la coinoculación solo el 19% de los nódulos se halló en raíces laterales. Como es de esperar, la biomasa nodular presente en plantas estresadas coinoculadas se redujo en un 43,7%, respecto a la condición control (Tabla 1.8.). Dicho porcentaje de reducción fue

semejante al observado en la inoculación simple, aunque la nodulación resultó más efectiva en este último.

Tabla 1.8. Parámetros de nodulación de *A. hypogaea* en condiciones control y de estrés hídrico (PEG 15 mM) inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 y coinoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az 39.

Tratamientos	% Plantas noduladas	N° total de nódulos (N°/planta)	BS de nódulos (mg/planta)	N° de nódulos RP (N°/planta)	N° de nódulos RL (N°/planta)
Sin Inocular	ND	ND	ND	ND	ND
Inoculado <i>B. sp.</i> SEMIA 6144					
Control	100	58,6 ± 12	13,4 ± 7,3	38,4 ± 10	17 ± 10
PEG 15 mM	95	33 ± 16 *	8 ± 3,3 *	16,6 ± 8,2 *	21 ± 12
Co-Inoculado <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 + <i>A. brasilense</i> Az39					
Control	100	43 ± 16	6,4 ± 2,3	24,8 ± 8,5	14,3 ± 3
PEG 15 mM	98	22,6 ± 10*	3,6 ± 1,6*	18,3 ± 9*	4,3 ± 1*

Los valores representan la media ± S.E.M de tres experimentos diferentes, con ensayos de 10 plantas por tratamiento. BS: Biomasa seca; RP: Raíz principal; RL: Raíz lateral. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores está indicado por un *. Para el caso del Test de Burton se determinó el número de nódulos en la zona del cuello de la raíz principal (cuadrado de 2,5 cm x 2,5 cm). ND: no detectado. BS: biomasa seca. RP: Raíz principal. RL: Raíz lateral.

Posteriormente se compararon los cuatro tratamientos, observando la aparición de nódulos sobre la raíz y realizando un recuento de los mismos en un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, un diámetro de 2,5 cm y una longitud de 2,5 cm. El Test de Burton dio positivo en ambas condiciones (control y estrés hídrico), ya que más del 80% de las plantas

presentaron más de 3 nódulos en la zona analizada de la raíz principal (19 nódulos en plantas controles coinoculadas y 13 nódulos en plantas sometidas a estrés hídrico y coinoculadas, dentro del cilindro imaginario).

La simbiosis maní-rizobio es más sensible al estrés salino que al estrés osmótico. Se ha reportado para maní que bajo la condición de estrés osmótico se han presentado parámetros de nodulación similares al control. Según Elshiekh y Wood (1990), la nodulación y la fijación de N₂ son aparentemente más sensibles a la sal que el mismo crecimiento vegetal (Dardanelli *et.al*, 2009).

El efecto del estrés por NaCl y PEG en la inoculación de *Vicia faba* L. con *R. leguminosarum*, fue estudiada por Zahran y Sprent (1986). En plantas de 45 días de crecimiento observaron la presencia de 100 nódulos/planta (biomasa seca nodular: 60 mg/planta) control inoculada. Ambos estreses redujeron un 50% el número de nódulos/planta (biomasa seca nodular: 22 mg/planta). Dardanelli *et.al* (2009) también estudiaron el efecto del PEG 20 mM sobre la simbiosis *B. sp.* SEMIA 6144-*A. hypogaea* (Blanco Manfredi M68) y en semejanza con nuestros resultados, el estrés hídrico afectó negativamente la simbiosis (38 nódulos/planta) pero no la inhibió. Respecto a la biomasa seca nodular, los nódulos de las plantas controles inoculadas representaron 73 mg/planta, mientras que la biomasa seca de los nódulos procedentes de plantas sometidas al estrés no iónico fue de 37 mg/planta. Estos valores fueron superiores a los nuestros, por lo que no se debe descartar un efecto del cultivar seleccionado para realizar los ensayos.

No hay bibliografía precisa disponible en la que se lleven a cabo estudios sobre la distribución espacial de los nódulos en plantas coinoculadas con Rizobio-PGPR, a diferencia de los efectos de la triple interacción sobre los parámetros de nodulación tanto en plantas leguminosas como no leguminosas, lo cual se encuentra recientemente documentado. Vicario *et.al* (2015) estudiaron el efecto de la coinoculación de plantas de maní (Granoleico) con cepas nativas de suelos argentinos así como con cepas comerciales de *Bradyrhizobium* en combinación con *A. brasilense* Az 39. Estos autores observaron que el número total de nódulos contabilizados en plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 en ausencia de *A. brasilense* Az 39 fue de 80 nódulos/plantas aproximadamente. Ese valor se mantuvo sin modificaciones cuando la planta de maní fue inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 en presencia de *A. brasilense* Az 39. Similar a nuestros resultados ellos observaron una disminución en el

peso seco de los nódulos procedentes de plantas coinoculadas respecto a las procedentes de la inoculación simple. Sin embargo, dicho efecto fue diferente cuando la planta de maní fue inoculada con cepas de *Bradyrhizobium* incluso algunas nativas de suelos argentinos. En este último caso la coinoculación demostró poseer un efecto benéfico sobre los parámetros de nodulación y crecimiento de la planta. Esto nos permite sugerir una dependencia del efecto benéfico de la coinoculación a nivel de las cepas de rizobios utilizadas.

Chibeba *et.al* (2015) observaron que el número de nódulos en raíces de plantas de soja inoculadas con *B. diazoefficiens* en presencia de *A. brasilense* fue un 25% superior que en ausencia de *A. brasilense*. Estévez (2007) observó que las inoculaciones dobles son más efectivas en plantas de soja que en plantas de judía. Similar a nuestros resultados, esta última autora observó que para el caso de *P. vulgaris*, cuando se ensayaron los inóculos dobles (*R. etli* y *C. balustinum*), la tasa de nodulación disminuyó sorprendentemente mientras que se incrementó la parte aérea de la planta, respecto a la inoculación simple (*R. etli*).

En el caso de plantas no leguminosas, tal como el trigo, la coinoculación (*R. meliloti* y *A. brasilense*) incrementó el rendimiento de granos por planta de manera no significativa respecto a la inoculación con *R. meliloti*, sin embargo, se registraron incrementos en el contenido de N, K y P en las plantas coinoculadas respecto a las inoculadas con el rizobio (Askary *et.al*, 2009).

En nuestro caso, observamos que tanto en condiciones óptimas de crecimiento como de estrés hídrico, la inoculación simple resultó más eficiente desde el punto de vista de la nodulación en comparación con la coinoculación.

4.4.6. Cálculos de los parámetros IRPA, RGR y df/dt

La relación entre raíz/parte aérea (IRPA) se considera como un índice de equilibrio del crecimiento de los órganos de una planta. Si una condición produce una mayor variación en el crecimiento de un órgano en relación al otro, esto se reflejará en dicho índice (López-Gómez, 2007). Para el maní, en ausencia de inóculo, y como consecuencia del déficit hídrico aplicado, el índice raíz parte aérea no fue modificado (0,34 y 0,35 respectivamente) debido a que aún en presencia del factor estresante, ambas partes de la planta experimentaron reducciones coordinadas de sus pesos secos (Tabla 1.9.). En el caso de las plantas de maní inoculadas

solamente con *B. sp.* SEMIA 6144, el IRPA disminuyó entre un 29 a un 23% tanto en plantas controles como estresadas respectivamente. En los tratamientos coinoculados, el índice IRPA fue variable tanto en ausencia como en presencia de déficit hídrico. En el caso de las plantas coinoculadas creciendo en óptimas condiciones, el IRPA fue un 15% superior al de las plantas sin inocular. Contrariamente, al analizar el efecto de la coinoculación respecto a las plantas creciendo bajo déficit hídrico, el índice IRPA se redujo un 17% respecto a las estresadas sin inocular (Tabla 1.9.). Estos resultados indicarían un efecto de los inóculos sobre la raíz.

Chibeba *et.al* (2015), reportaron que para plantas de soja de 32 días inoculadas con *Bradyrhizobium spp.* El índice IRPA fue de 0,32. Igual valor fue obtenido en plantas de soja coinoculadas con *Bradyrhizobium sp.* y *A. brasilense*. Este hecho puede ser explicado debido a que la coinoculación produjo de manera proporcionada aumentos en la parte aérea y radical de las plantas de soja.

La Tasa de crecimiento relativo (RGR) indica la fracción de crecimiento por unidad de masa, por día. La inoculación con *B. sp.* SEMIA 6144 produjo un incremento del 85,4% de la RGR de plantas de condición control sin inocular y un 78,6% la RGR de plantas estresadas respecto a las sin inocular en dicha condición de 33 días de crecimiento. Es importante destacar que el efecto positivo de la inoculación durante el déficit hídrico también se logra principalmente durante las etapas tempranas del crecimiento. A los 7 días el valor de RGR de plantas inoculadas y creciendo en déficit hídrico fue un 24% superior al de las plantas estresadas sin inocular (dato no mostrado). El valor de RGR de plantas de 33 días de crecimiento resultó menor al de plántulas de 7 días, esto se debe a que el crecimiento es exponencial durante los primeros días de desarrollo.

La inoculación con *B. sp.* SEMIA 6144 en presencia de *A. brasilense* Az 39 provocó un incremento del 10,2% de la RGR de plantas de condición control sin inocular y de un 15% de la RGR de plantas estresadas respecto a las sin inocular en dicha condición, de 33 días de crecimiento. Es importante destacar que el efecto positivo de la coinoculación durante el déficit hídrico es inferior a los que se encontraron con la inoculación simple con *B. sp.* SEMIA 6144 que generó un incremento en la RGR de un 85% respecto a plantas controles sin inocular y en el caso de las plantas estresadas el incremento fue en un 78%.

Inzé (2014) estudio el efecto de diferentes estresores (manitol, sorbitol, NaCl y H₂O₂) sobre la germinación y crecimiento de semillas de *Arabidopsis Col-0* manitol, luego de 12 y 22

días post aplicación del estrés. Manitol y sorbitol se aplicaron en concentraciones desde 5 a 300 mM para generar un potencial osmótico correspondiente a sorbitol -0,08 to -0,8 MPa. Sus resultados revelaron que la germinación es más sensible a la presencia de NaCl y H₂O₂, mientras que el crecimiento resultó ser el parámetro más sensible para los estreses osmóticos. La PA fue más afectada que la PR. Para obtener nueva información sobre el efecto de estreses osmóticos sobre el crecimiento, se calculó la RGR. Todos los estresores indujeron una respuesta dosis dependiente. Manitol tuvo un efecto drástico en pa PA, a partir de la concentración 5 mM. En altas concentraciones las plantas fueron muy pequeñas, de coloración verde oscuro y compacta. Los efectos negativos del manitol en la RGR de las plantas, se observaron principalmente en los estadios tempranos de crecimiento (plantas de 8 días).

Por otro lado, se calculó el parámetro df/dt , medida que informa cuanto del total de los recursos que utiliza la planta, lo destina a la biomasa radical. La tabla 1.9., muestra que la inoculación favoreció la distribución de los recursos hacia el desarrollo radical (condición control y de estrés hídrico). Plantas controles e inoculadas destinaron un 113% más del total de sus recursos a la biomasa radical respecto a las plantas controles sin inocular, mientras que las plantas estresadas e inoculadas destinaron un 115% más al desarrollo radical que lo que destinaron las plantas estresadas sin inocular. Por otro lado, la coinoculación favoreció la distribución de los recursos hacia el desarrollo radical (condición control y de estrés hídrico). Plantas controles y coinoculadas destinaron un 13% más del total de sus recursos a la biomasa radical respecto a las plantas controles sin inocular, mientras que las plantas estresadas y coinoculadas destinaron un 24% más al desarrollo radical que lo que destinaron las plantas estresadas sin inocular. Tanto la inoculación simple como la coinoculación favoreció la distribución de los recursos hacia el desarrollo radical, sin embargo esta distribución fue más marcada en el caso de la inoculación simple.

Tabla 1.9. Efecto del déficit hídrico (PEG 15 mM) y de la inoculación simple y coinoculación, sobre los parámetros IRPA, RGR y df/dt en plantas de 33 días de crecimiento.

Tratamientos	Parámetros		
	IRPA	RGR (g/g/día)	Df/dt (g/g/día)
Control Sin Inocular	0,34	1,23	0,80
Control + <i>B. sp.</i> SEMIA 6144	0,24	2,28	1,71
Control + <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 + Az 39	0,40	1,37	0,92
PEG 15 mM Sin Inocular	0,35	0,70	0,40
PEG 15 mM + <i>B. sp.</i> SEMIA 6144	0,27	1,25	0,86
PEG 15 mM + <i>B. sp.</i> SEMIA 6144 + Az 39	0,29	0,82	0,53

A diferencia de nuestros resultados, Dardanelli *et.al* (2008), estudiaron el efecto del estrés salino (NaCl 100 mM) y osmótico (PEG 20 mM) y de la inoculación con *Bradyrhizobium sp.* ATCC10317, *Bradyrhizobium sp.* TAL1000 y *Bradyrhizobium sp.* SEMIA6144 en plantas de *A. hypogaea*. Ellos observaron que los valores de peso seco de raíz de maní (ya sea inoculado o no) no mostraron cambios significativos con respecto a las condiciones de control.

4.4.7. Efecto del déficit hídrico y la presencia de *A. brasilense* Az 39 sobre la actividad nitrogenasa de *B. sp.* SEMIA 6144

Para evaluar la funcionalidad de los nódulos bajo estrés hídrico, se determinó la actividad nitrogenasa (Figura 4.26.), la cual fue notablemente reducida bajo estrés hídrico, con una reducción de más del 50% de la tasa de fijación de nitrógeno (NRF) (Figura 4.26., C). La NRF de las plantas coinoculadas resultó menor que el de las plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 creciendo en óptimas condiciones, lo que puede deberse a la disminución en el número de nódulos y por lo tanto de la biomasa de nódulos en plantas coinoculadas. Sin embargo el efecto del déficit hídrico sobre la NRF fue más negativo en plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 que en plantas coinoculadas. Por otra parte, cuando se evaluó la eficiencia de la nitrogenasa mediante el coeficiente de locación electrónica (EAC), todos los

tratamientos presentaron valores óptimos de eficiencia (mayores a 0,8), observándose que en plantas coinoculadas y bajo déficit hídrico presentaron una alta eficiencia de la nitrogenasa, por lo tanto esto indicaría que el déficit hídrico no afectó la actividad de la enzima nitrogenasa, sino que la reducción en la NRF se debe principalmente a la disminución en la biomasa nodular y no a un deterioro de la actividad enzimática. Además, estos datos sugieren que la presencia de *A. brasilense* Az 39 no afectaría la eficiencia de la nitrogenasa. La exposición a estrés hídrico severo reduce la actividad nitrogenasa debido a que disminuye la tasa de fotosíntesis, pérdida de leghemoglobina y se rompe la barrera de difusión de oxígeno (King y Purcell, 2006). Díaz del castillo *et.al* (1999) estudiaron el efecto del estrés hídrico mediante el agregado de manitol (potencial osmótico desde -0,05 hasta -2 MPa) en la simbiosis soja - *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Las plantas sometidas a estrés moderado mostraron una disminución de la TNA de un 52% respecto al control. Se encontró una correlación entre la TNA y el estrés hídrico, dónde los valores más bajos de TNA están asociados a valores más bajos de potencial osmótico. Resultados similares fueron hallados por Gil Quinta *et.al* (2013), donde el análisis proteómico sugiere que el metabolismo del C y de aminoácidos en las plantas, así como la síntesis de proteínas y el crecimiento celular son los procesos más alterados en los nódulos de soja sometidos a estrés hídrico.

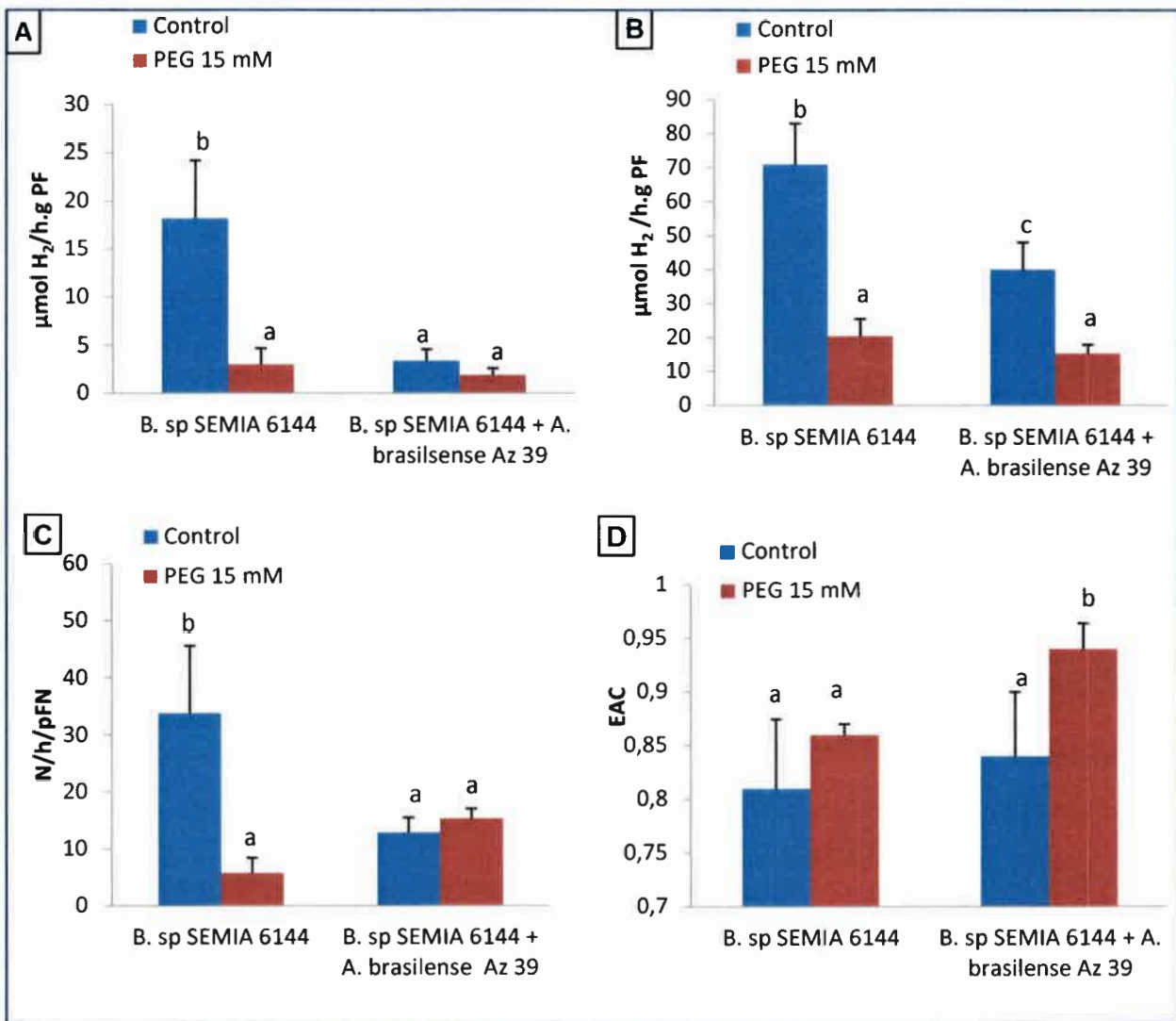


Figura 4.26. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de fijación de Nitrógeno. Actividad nitrogenasa aparente (ANA), actividad nitrogenasa total (TNA), tasa de fijación de nitrógeno (NFR), coeficiente de locación electrónica (EAC). Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos diferentes. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Algunos autores han descrito reducción del 50% en la NRF en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium tropici* y sometidas a estrés salino. Este efecto negativo de la sal sobre la fijación de nitrógeno se ha atribuido al efecto negativo sobre la infección radical así como en la organogénesis y diferenciación de bacteroides en el interior del nódulo (Zahran, 1999; López-Gómez *et.al*, 2014). En nuestro trabajo observamos como el déficit hídrico afectó

negativamente la cinética de nodulación así como también al desarrollo de nódulos, tanto en número como en biomasa nodular. Nuestros datos mostraron una reducción de un 58% en la biomasa nodular de plantas de maní sometidas a déficit hídrico e inoculadas simple y coinoculadas en comparación a plantas creciendo en óptimas condiciones. Esto sugiere que la disminución en la fijación de N_2 (Figura 4.26.) se debe tanto al efecto negativo del estrés sobre el metabolismo nodular así como en la formación del nódulo.

Streeter (2003) evaluó el efecto de la sequía en la fijación de N_2 en soja inoculada con *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Similar a nuestros resultados, el estrés disminuyó la biomasa nodular en un 57% y se registró disminución de un 34% en la fijación de N_2 . El autor sugiere que la reducción de la actividad nitrogenasa registrado se debe al menor desarrollo de nódulos bajo la condición de sequía. Lo mismo sugieren Bianucci *et.al* (2013) quienes estudiaron el efecto del estrés por Cd en *A. hypogaea* inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144. En ese caso, se registró disminución en el número de nódulos y en la tasa de fijación de N_2 debido al efecto del Cd en la infección de la planta por *Bradyrhizobium* y a su efecto en el crecimiento y desarrollo de nódulos.

Se ha reportado en *P. vulgaris* inoculado con *Rhizobium tropici*, sometido a estrés salino (NaCl 100 mM) una reducción del 52% de la ANA y 44% TFN (Palma Martin, 2009).

A pesar que la biomasa nodular por planta declinó significativamente bajo déficit hídrico (Tabla 1.8.), la relación masa nodular/biomasa aérea resultó mayor bajo esta condición comparativamente con el control (0,032 y 0,026 respectivamente). Este dato es consistente con la idea de que ante el déficit hídrico aplicado continúa una adecuada capacidad de fijación de N_2 .

La tasa de FBN en leguminosas rápidamente decrece bajo estrés hídrico debido a la acumulación de ureidos tanto en nódulos como en tallo (Vadez *et.al*, 2000; Charlson *et.al*, 2009) y disminuye la demanda de N en la PA, la tasa de transpiración, y el metabolismo enzimático (Valentine *et.al*, 2011). Numerosos reportes han indicado que el estrés hídrico inhibe la iniciación de nódulos, el crecimiento, desarrollo y actividad de los mismos (Vadez *et.al*, 2000; Streeter, 2003; Valentine *et.al*, 2011). La disminución en la tasa de FBN bajo estrés hídrico está asociada con la reducción en la tasa de fotosíntesis en leguminosas (Ladrera *et.al*, 2007; Valentine *et.al*, 2011).

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

- La adición de PEG6000 15 mM en el sistema de cultivo hidropónico, es capaz de inducir estrés hídrico moderado (-0,28 MPa) en plantas de maní de 7 días de crecimiento. En los primeros estadios del desarrollo, *Arachis hypogaea* sólo tolera niveles bajos de déficit hídrico, ya que si el estrés es moderado-severo (-0,28 MPa) la plántula no desarrolla su parte aérea.
- El déficit hídrico redujo significativamente el contenido de materia seca principalmente en la parte aérea, aunque también afectó a la raíz.
- En rizodeposiciones obtenidas de raíces de maní de 7 días de crecimiento, se encontró amplia diversidad de moléculas implicadas en la interacción con rizobacterias. Entre estas moléculas de importancia se detectaron ácidos grasos, flavonoides, ácidos orgánicos, auxina, triptófano y terpenos. El perfil de exudación se modificó cuando las plantas crecieron bajo déficit hídrico.
- Los AG obtenidos en presencia de estrés hídrico se diferenciaron de los obtenidos en condiciones libres del estrés, principalmente se observó incremento del AG 18:1 Δ^9 en las rizodeposiciones provenientes de plantas estresadas. Se sugiere que estarían involucrados en la interacción suelo-planta en esta condición.
- Los principales flavonoides obtenidos en las rizodeposiciones de plantas de maní de 7 días de crecimiento, provenientes del tratamiento control, fueron genisteína, naringenina y apigenina. El estrés hídrico modificó el patrón de flavonoides liberados por la planta de maní, incrementándose notablemente las flavononas, como lo son naringenina y hesperidina, y disminuyó los niveles detectados de apigenina y genisteína. Por otra parte, se destacó la exudación de Trp por parte de las raíces de las plantas de maní sometidas a déficit hídrico (PEG 15 mM).
- Respecto a los AO, los mayoritarios fueron málico, acético, láctico, cítrico y succínico. Bajo déficit hídrico se incrementaron los niveles de láctico y succínico y disminuyó la concentración de málico y cítrico.
- Las raíces de plántulas de *Arachis hypogaea* de 7 días de crecimiento, exudaron terpenos clasificados como monoterpenos y sesquiterpenos. El estrés hídrico favoreció la producción de monoterpenos con propiedades antioxidantes e indujo la exudación de especies oxigenadas de sesquiterpenos, tal como farnesol y nerodiol ambos con propiedades antioxidantes.
- El estrés hídrico y la interacción de la planta de maní con las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, generaron cambios en el perfil de AG de las

rizodeposiciones de maní de 7 días. La disminución de los AG saturados y aumento en los AG insaturados fue un efecto conjunto del estrés hídrico y de la inoculación. El incremento significativo en el porcentaje del AG 18:1, sugiere que éste AG podría estar implicado como molécula señal en la interacción maní-*Azospirillum/Bradyrhizobium*, y desempeñaría un rol importante en el estrés hídrico.

- El crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39 afectado negativamente por el estrés hídrico, reduciendo sus parámetros de crecimiento. Ambas bacterias se adaptaron al déficit hídrico aplicado, sin embargo los niveles de tolerancia son distintos. Nuestros resultados de la viabilidad de las células, indican que *B.* sp. SEMIA 6144 es menos tolerante al déficit hídrico (PEG 15 mM) respecto a *A. brasilense* Az 39.
- La composición de AG de ambas cepas fue modificada por efecto del PEG 15 mM, generando para las dos cepas es una modificación del grado de insaturación de los AG componentes de los PL, respuesta universal en el mundo viviente para mantener la fluidez de la membrana y la viabilidad celular.
- La presencia de PEG 15 mM generó modificaciones en la biosíntesis de PL y AG, sugiriendo que estos cambios pueden ser respuestas adaptativas al estrés.
- El déficit hídrico afectó la fluidez de la membrana citoplasmática de células de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39. El shock osmótico generado por PEG causó un efecto fluidificante sobre la membrana celular de ambas bacterias. La fluidez óptima retornó luego de 60 min de exposición a PEG 15 mM. La respuesta fue observada a nivel de cambios simultáneos en la biosíntesis de PL y composición de AG de la bicapa lipídica. El incremento en los SFA, disminución de UFA, e incremento en PL formadores de bicapa tal como PC, fueron las principales modificaciones que permitieron estabilizar a la membrana citoplasmática durante el déficit hídrico.
- Respecto a *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, se observaron diferencias comparando la respuestas temprana (shock) y tardías (96 h de crecimiento con PEG). Después de 96 h de crecimiento con PEG, el índice UFA/SFA aumentó de 3,4 a 5, mientras que como respuesta al shock osmótico aplicado durante 60 min, el índice AGI/AGS disminuyó de 4,7 a 3,3. Estas diferencias indican un remodelamiento dinámico de la membrana bacteriana, implicando el turnover de los PL.

- Respecto a *Azospirillum brasilense* Az 39, la respuesta al shock osmótico a nivel de composición de AG de la membrana fue similar a la observada en células crecidas con PEG durante 24 h. Sin embargo, similar a lo observado en *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, se registraron niveles altos de LPE, los cuales no fueron mantenidos durante en crecimiento con PEG 15 mM.
- En ambas rizobacterias se observó como respuesta temprana (shock) al PEG 15 mM, la disminución de PE y el incremento en PC y LPE, ambos PL provienen del metabolismo de PE. Sin embargo los niveles aumentados de LPE no se mantuvieron en la respuesta tardía (crecimiento). Esto se debe al turnover de los PL, e implica una actividad fosfolipasa. Estos resultados indican que la respuesta al efecto que genera el factor estresante sobre la membrana bacteriana es inmediato a fin de lograr mantener los valores óptimos de fluidez, sin embargo dicha composición de AG y PL no es constante, sino que se remodela a lo largo del crecimiento bacteriano a través del turnover de PL.
- Respecto a la movilidad, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 presentó un desplazamiento de tipo swarming y swimming poco desarrollado. El déficit hídrico favoreció la movilidad de tipo swimming. *Azospirillum brasilense* Az 39 mostró escasa movilidad de tipo swarming, mientras que el desplazamiento de tipo swimming fue ampliamente superior a la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. En el caso de *Azospirillum brasilense* Az 39, la condición de déficit hídrico favoreció levemente al desplazamiento tipo swarming. La presencia de una fuente de carbono favoreció la movilidad. Ambas cepas mostraron quimiotaxis hacia los ER de la planta de maní.
- En relación al tamaño celular, en general observamos que la diferenciación de células vegetativas en células de tipo swarm o swimming modificó el tamaño celular, incrementándose la longitud, principalmente en bacterias sometidas a estrés hídrico.
- Respecto a la adhesión de las rizobacterias a las raíces de plántulas de maní, mayor cantidad de células de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 se adhirieron a las raíces de plantas de maní estresadas respecto a las raíces provenientes de plantas controles. El mismo resultado se observó para *Azospirillum brasilense* Az 39.
- *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 no produjo AIA de manera significativa. *Azospirillum brasilense* Az 39 fue productor de AIA por una vía dependiente de Trp. En condiciones de estrés hídrico la producción de AIA se vio incrementada.

- La inoculación de semillas pregerminadas de *Arachis hypogaea* con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, mitigó el efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo aéreo y radical de las plántulas de 7 días.
- Las plantas de maní inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az 39, obtuvieron una tasa de crecimiento relativo (RGR) más elevada y destinaron mayores recursos al desarrollo radical con respecto a las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.
- La inoculación de semillas pregerminadas de *Arachis hypogaea* con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, mitigó el efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo aéreo y radical de las plántulas de 33 días. El desarrollo de biomasa aérea y radical de plantas estresadas inoculadas supero a la de las plantas estresadas no inoculadas.
- El déficit hídrico aplicado induce un estrés oxidativo manifestado por un aumento en los niveles de peroxidación lipídica (medido como contenido de MDA), sobre todo en los estadios temprano de crecimiento (plantas de 7 días). Respecto a la inoculación, al inicio de la interacción se incrementaron los niveles de MDA.
- El estrés hídrico afectó negativamente la cinética de nodulación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 sobre plantas de *Arachis hypogaea*. El porcentaje de plantas noduladas resultó levemente afectado por el estrés hídrico, sin embargo el número de nódulos/planta y por consiguiente la biomasa nodular se redujo respecto al control. A diferencia de las plantas controles, las plantas estresadas mostraron mayor número de nódulos en las raíces laterales.
- La coinoculación de *Arachis hypogaea* con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39, mitigó el efecto del estrés hídrico, aumentando el desarrollo aéreo y radical de las plantas de 33 días.
- El estrés hídrico afectó negativamente la cinética de nodulación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia de *Azospirillum brasilense* Az 39 sobre plantas de *Arachis hypogaea*. La presencia de *Azospirillum brasilense* Az 39 no afectó la capacidad infectiva de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, ya que el 98% de las plantas coinoculadas presentaron nódulos en sus raíces. Sin embargo el número de nódulos/planta y por consiguiente la biomasa nodular resultó disminuido en comparación con la inoculación simple y por el estrés hídrico.
- Respecto a la funcionalidad de los nódulos, la actividad nitrogenasa en condiciones controles resultó óptima en cuanto a los valores de NRF obtenidos, sin embargo la coinoculación disminuyó la misma. Por otra parte, la actividad nitrogenasa fue notablemente

reducida bajo déficit hídrico. Sin embargo el efecto de este estrés sobre la NRF tuvo un impacto más negativo en plantas inoculadas solo con *B. sp.* SEMIA 6144 que en plantas coinoculadas. Por otra parte, EAC obtenidos para nódulos de plantas coinoculadas y bajo déficit hídrico presentaron una alta eficiencia de la nitrogenasa.

- En relación a la fijación de N_2 , nuestros resultados indicaron que el déficit hídrico no afectó la actividad de la enzima nitrogenasa, sino que la reducción en la NRF se debió principalmente a la disminución en la biomasa celular. Además, la presencia de *A. brasilense* Az 39 benefició la fijación de N_2 cuando la planta creció en condiciones de falta de agua.
- El índice IRPA fue igual tanto para la condición de crecimiento óptima como de estrés hídrico. Esto indica que las plantas estresadas mantienen un desarrollo equilibrado. Sin embargo cuando las plantas fueron coinoculadas el índice mostró variaciones, aumentando para la condición control y disminuyendo para las plantas estresadas. Esto resultados estarían indicando un efecto de los inóculos sobre la raíz.
- La coinoculación favoreció el desarrollo de las plantas sometidas a estrés hídrico. Esto se encuentra reflejado en la tasa de crecimiento relativo (RGR), sin embargo podemos inferir que la inoculación simple es más efectiva que la coinoculación bajo las condiciones ensayadas. El índice df/dt , reflejó que la coinoculación indujo la distribución de los recursos de la planta hacia el desarrollo radical sobre todo cuando la planta se desarrolla en condiciones de estrés hídrico.
- Mediante la inoculación simple con *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 se obtuvieron mejores resultados sobre los parámetros de crecimiento analizados en plantas de *Arachis hypogaea* en ausencia o presencia de estrés hídrico, respecto a la coinoculación, bajo las dosis aplicadas.
- El déficit hídrico disminuyó la tasa de fijación de N_2 (NRF). En plantas coinoculadas, la NRF resultó menor que el de las plantas inoculadas con *B. sp.* SEMIA 6144 creciendo en óptimas condiciones (reducción en número y biomasa de nódulos). Sin embargo en plantas coinoculadas, el déficit hídrico no afectó la NRF. Por otra parte, cuando se evaluó la eficiencia de la nitrogenasa mediante el coeficiente de locación electrónica (EAC), todos los tratamientos presentaron valores óptimos de eficiencia (mayores a 0,8), observándose que en plantas coinoculadas y bajo déficit hídrico presentaron una alta eficiencia de la nitrogenasa, estos datos sugieren que la presencia de *A. brasilense* Az 39 así como el déficit hídrico, no

afectarían la eficiencia de la nitrogenasa. Por lo tanto, la reducción en la NRF se debe principalmente a la disminución en la biomasa nodular y no de la actividad enzimática.

- La hipótesis propuesta en nuestro plan de Tesis Doctoral es válida. Los resultados y las conclusiones detalladas anteriormente nos permiten demostrarla y se encuentran resumidos e integrados en la figura 4.27.

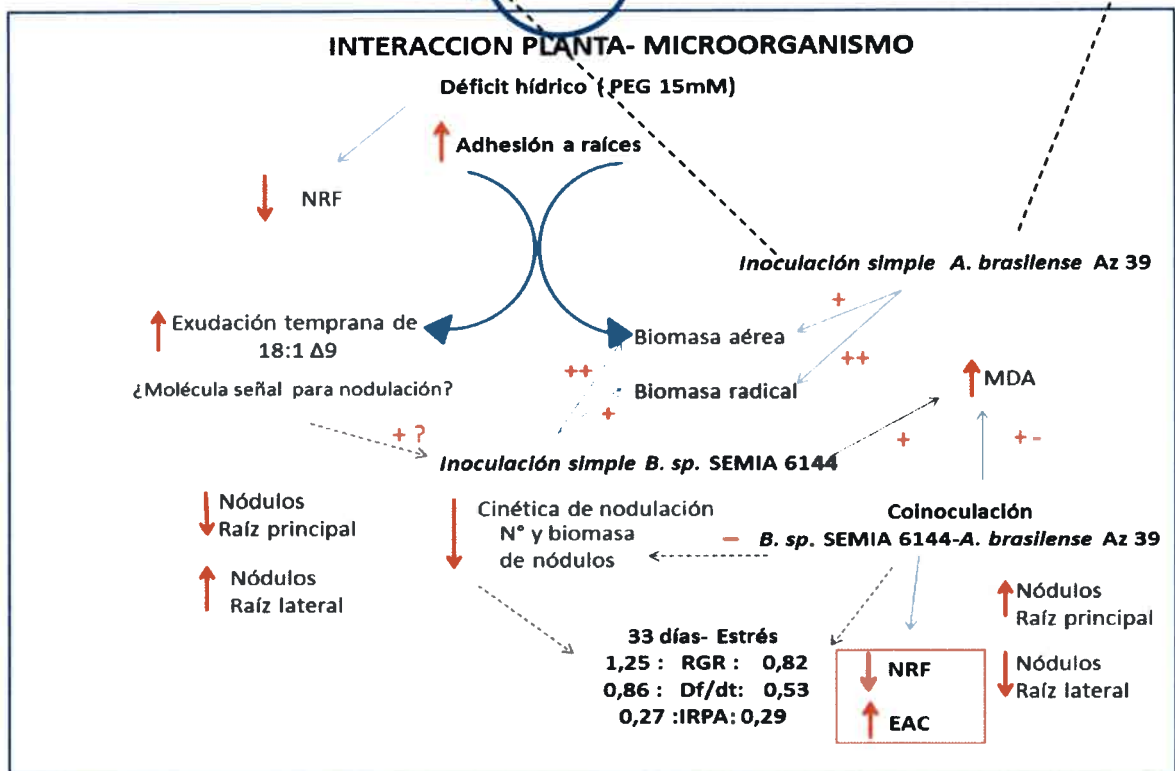
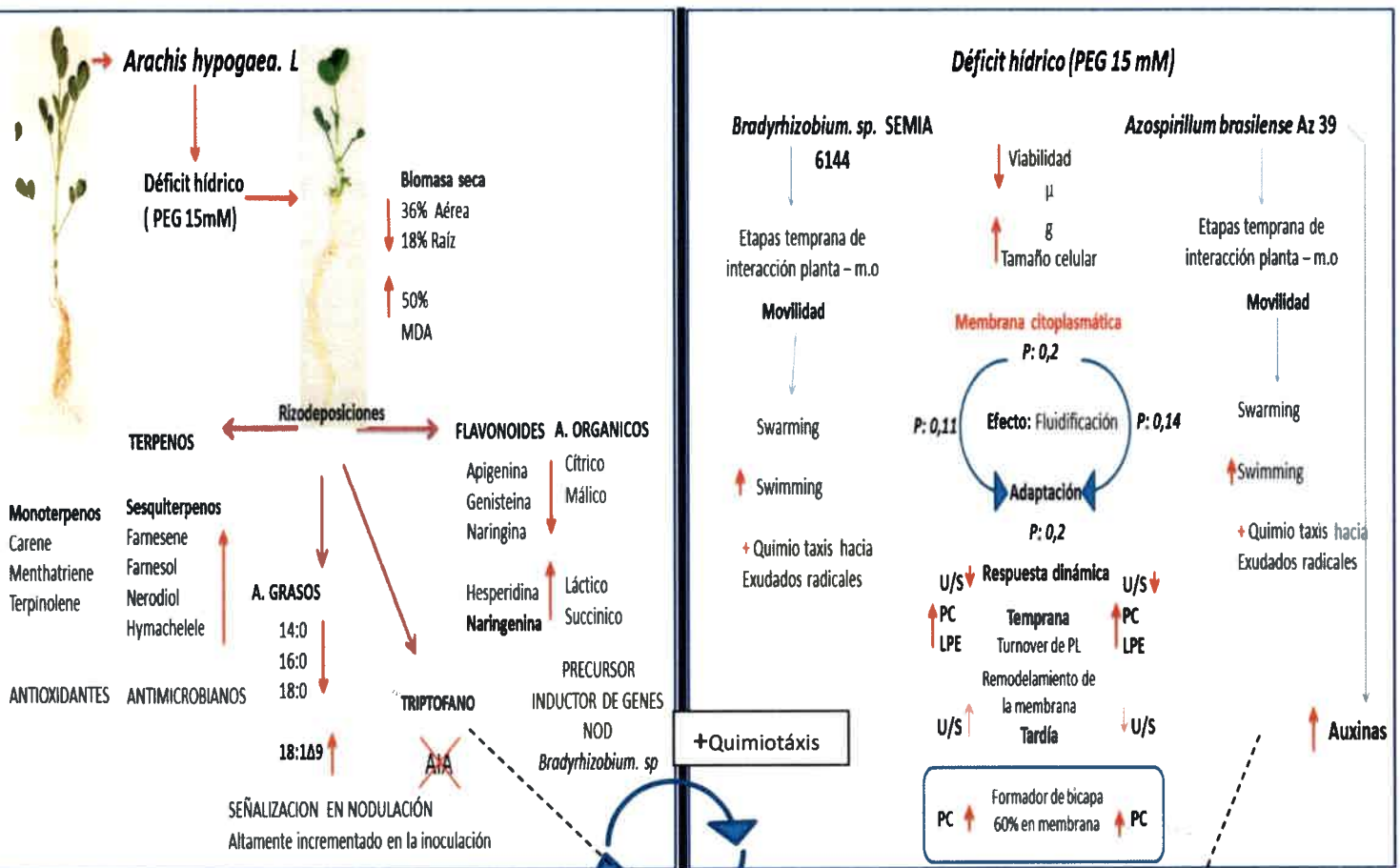


Figura 4.27. Esquema integrador de resultados del efecto del estrés hídrico sobre *A. hypogaea* L. y rizobacterias *B. sp.* SEMIA 6144 y *A. brasilense* Az39 que fueron crecidas por separado y en interacción con la planta, en estrés hídrico (PEG 15 mM). Flechas rojas hacia arriba señalan incremento y hacia abajo disminución de los componentes y parámetros indicados. Línea de puntos: interacción directa. Signo +: estimulación. *P*: valor de fluidez. RGR: tasa de crecimiento relativo. df/dt : destino de los recursos a biomasa radical. B.S: biomasa seca. IRPA: índice raíz/parte aeres. NRF: tasa de fijación de Nitrógeno. EAC: coeficiente de alocaación electrónica. MDA: malondialdehído.

Este trabajo de Tesis Doctoral brinda las primeras evidencias de los cambios fisiológicos y bioquímicos que permiten la adaptación de la leguminosa *Arachis hypogaea* L., así como las rizobacterias *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Azospirillum brasilense* Az 39 a condiciones de déficit hídrico

La adaptación de las rizobacterias al estrés permite el establecimiento de la interacción planta-bacteria, y mitiga los efectos negativos del estrés hídrico, permitiendo así mejor crecimiento de *A. hypogaea* en ambientes que sufren dicha condición ambiental.

De éste trabajo se desprenden múltiples perspectivas:

- Estudios de las moléculas de señalización presentes en rizodeposiciones en presencia de inóculos bacterianos. Este trabajo se ha comenzado recientemente y podemos observar cambios en los perfiles de exudación frente a diferentes condiciones.
- Estudiar la regulación de la síntesis de LPE, fosfolípido involucrado en la respuesta rápida al estrés en ambas rizobacterias, así como también profundizar los estudios respecto a los cambios registrados en la membrana bacteriana a fin de dilucidar la participación de la membrana externa e interna en la adaptación al estrés.
- Investigar la aplicación de bacterias que presenten una membrana adaptada al estrés hídrico sobre semillas de *A. hypogaea*, buscando de éste modo disminuir el impacto negativo que genera el estrés en la cinética de nodulación y sobre los parámetros de nodulación.
- En nuestro trabajo hemos caracterizado moléculas de exudados de maní producidas en estrés hídrico, observando aumento en la producción de naringenina y hesperidina. Por lo tanto dichas moléculas podrían tener un potencial uso tecnológico innovador como podría ser su aplicación en encapsulados, y su posterior empleo en la inducción de la promoción de crecimiento bajo situaciones de estrés.
- Desarrollar un inoculante basado en microorganismos previamente adaptados y moléculas señales inmovilizados en una matriz de alginato, que mejore la promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés hídrico, comparado con los inoculantes tradicionales (Plan Beca Posdoctoral CONICET).

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Adesemoye A, Kloepper J. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology Biotechnology*: 85(1): 1-12.
- Aguilar-Piedras J, Vásquez M, García S, Baca, B. (2008). Producción del indol 3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*: 50 (1): 29-37.
- Aharoni A, Giri A, Deuerlein S, Griepink F, De Kogel W, Verstappen F, Verhoeven H, Jongsma M, Schwab W, Bouwmeester H. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic plants. *Plant Cell*: 15 (12): 2866-2884.
- Albareda M, Dardanelli M, Sousa C, Megías M, Temprano F, and Rodríguez-Navarro. (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiology Letters*: pp: 68-72.
- Ames P., Studdert C, Reiser H, Parkinson J. (2002). Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: pp: 7060-7075.
- Angelini J, Taurian T, Morgante C, Ibáñez F, Castro S, Fabra A. (2005). Peanut nodulation kinetics in response to low pH. *Plant Physiology and Biochemistry*: 43 (8): 754-759.
- Antoun H, Beauchamp C, Goussard N, Chabot R, Lalande R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and soil*: 204 (1): 57-67.
- Arrese-Igor C, Gordon C, González E, Marino D, Ladrera R, Larrainzer E, Gil-Quintana E. (2011). Physiological response of legume nodules to drought. *Plant Stress*: 5 (1): 24-31.
- Askary M, Mostajeran A, Amooaghaei R, Mostajeran M. (2009). Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on Grain Yield and N, P, K Content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*: 5 (3): 296-307.
- Bais H, Park S, Weir T, Callaway R, Vivanco J. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Sciences*: 9 (1): 26-32.
- Barea J, Pozo M, Azcón R, Azcón-Aguilar. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*: 56(417): 1761-1778.
- Bashan L. (2011) Cell-Cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* immobilized in polymer Bead. *Journal of Phycology*: 47 (6): 1350-1359.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 - 2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50 (8): 521 - 77.
- Bashan Y. (1986). Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *Journal of General Microbiology*: 132: 3407-3414.
- Bashan Y. (1999). Interactions of *Azospirillum spp.* in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils*: 29 (3): 246-56.
- Bashan, Y, Harrison S, Whitmoyer R. (1990). Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Applied and Environmental Microbiology*: 56 (3): 769-775.

- Beckett M, Loreto F, Velikova V, Brunetti C, Di Ferdinando M, Tattini M, Calfapietra C, Farrant J. (2012). Photosynthetic limitations and volatile and non-volatile isoprenoids in the *poikilochlorophyllous* resurrection plant *Xerophyta humilis* during dehydration and rehydration. *Plant Cell Environmental*: 35: 2061-2074.
- Bécquer. (2004). Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología*: 18 (1): 9-29.
- Ben Dekhill S, Cahill M, Stackebrandt E, Sly, L. (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*: 20: 72-77.
- Beney L, Simonin H, Mille Y. (2007). Membrane physical state as key parameter for the resistance of the gram-negative *Bradyrhizobium japonicum* to hyperosmotic treatments. *Archives of Microbiology*: 187 (5): 387-396.
- Berry P, Rounsevell M, Harrison P, Audsley E. (2006). Assessing the vulnerability of agricultural land use and species to climate change and the role of policy in facilitating adaptation. *Environmental Science and Policy*: 9 (2): 189-204.
- Bertin C, Yang X, Weston L. (2003). The role of exudates and allelochemical synthesis in the rhizosphere. *Plant Soil*: 256 (1): 67-83.
- Bianucci E, Furlan A, Rivadeneira J, Sobrino-Plata J, Carpena-Ruiz R, Tordable C., Fabra A, Hernández B, Castro S. (2013). Influence of cadmium on the symbiotic interaction established between peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sensitive or tolerant bradyrhizobial strains. *Journal of Environmental Management*: 130: 126-134.
- Bligh E, Dyer W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*: 37 (8): 91-918.
- Bogino P, Banchio E, Bonfiglio C, Giordano W. (2008). Competitiveness of *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia. *Current Microbiology*: 56: 66-72.
- Bolsa de Cereales de Córdoba. (2014). Informe Agrícola N° Número 98. Disponible en: www.bccba.com.ar/Informeagroeeconomico98.pdf.
- Bolton H, Fredrickson J, Elliott L. (1992). Microbial ecology of the rhizosphere. *Soil Microbial Ecology*: pp: 27-63.
- Bonadeo E, Cantero A, Gutierrez A, Bongiovanni M. (2003). Relación entre la resistencia a la penetración, la densidad aparente y el contenido hídrico en un Hapludol típico. *Revista de la UNRC*: 23: (1-2): 13-22.
- Boorged F, Van Rossum D. (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology. Review*: 21: 5-27.
- Borisov I, Schelud'ko A, Petrova L, Katsy E. (2007). Changes in *Azospirillum brasilense* motility and the effect of wheat seedling exudates. *Microbiological Research*: 164 (5):581-585.
- Borucki W, Sujkowska M. (2008). The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativa* L) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*: 30 (3): 293-303.
- Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis R. (1989). Identification of Gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*: 90 (1): 45-47.

- Boumahdi M, Mary P, Hormez J. (1999). Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. *Journal of Applied Microbiological*: 87 (4): 611-619.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*: 72 (1-2): 248-254.
- Braeken K, Daniels R, Vos K, Fauvart M, Bachaspatimayum D, Vanderleyden J, Michiels J. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial Ecology*: 55 (1): 54-64.
- Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky M, Sumner L, Stacey G. (2010). Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*: 153 (4): 1808-1822.
- Broughton W, Zhang F, Perret X, Staehelin C. (2003). Signal exchanged between legumes and rhizobium: agriculture uses and perspectives. *Plant and soil*: 252: 129-137.
- Bullied W, Buss T, Vessey J. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N₂ accumulation in grain legumes: Field studies. *Canadian Journal of Plant Science*: 82: 291-298.
- Busse M, Bottomley P. (1989). Growth and nodulation response of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by Permeating and nonpermeating solutes. *Applied and Environmental Microbiology*: 55 (10): 2431-2436.
- Caballero-Mellado J, López-Reyes L, Bustillos-Cristales R. (1999). Presence of 16S rRNA genes in multiple replicens in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*: 178: 283-288.
- Caetano-Anollés, G. (1997). Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crops Research*: 53: 47-68.
- Cámara Argentina del Maní. <http://www.camaradelmani.com.ar>.
- Carvalhais L, Dennis P, Fedoseyenko D, Hajirezaei M, Borriss R, von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*: 174 (1): 3-11.
- Cassan F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*: 45 (1): 12-19.
- Cawthray, G. (2003). An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *Journal of Chromatography*: 1011(1-2): 233-240.
- Celikkol A, Ercan M, Kavas L, Yildiz C, Yilmaz H, Oktem A, Yucel M. (2010). Drought induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*: 61(1): 21 - 22.
- Cesari A, Paulucci N, Biasutti M, Reguera Y, Gallarato L, Kilmurray C, Dardanelli M. (2016). Reorganization of *Azospirillum brasilense* cell membrane is mediated by lipid composition adjustment to maintain optimal fluidity during water deficit. *Journal of Applied Microbiology*: 120 (1): 185-194.

- Chag Y, Wang J, Wang E, Liu H, Sui X, Chen W. (2011). *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61: 2496-2502.
- Chibeba A, Guimarães M, Rodrigues Brito O, Nogueira M, Araujo R. (2015). Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* Promotes Early Nodulation. *American Journal of Plant Sciences*: 6 (10): 1641-1649.
- Chihib N, Tierny Y, Mary P, Hornez J. (2005). Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *Food Microbiology*: 102 (1): 113-119.
- Cohen A, Bottini R, Pontin M, Berli F, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia C, Piccoli P. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*: 153 (1): 79-90.
- Cohen M, Sakihama Y, Yamasaki S. (2001). Roles of plant flavonoids in interaction with microbes: from protection against pathogens to the mediation of mutualism. *Plant Physiology*: pp: 157-173.
- Covelli J, Althabegoiti M, López M, Lodeiro A. (2013). Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in Microbiology*: 164: (2) 136-144.
- Creus C, Sueldo R, Barassi C. (2005). Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*: 82: 273-281.
- Crowe J, Crowe L. (1992). Membrane integrity in anhydrobiotic organisms: toward a mechanism for stabilizing dry cells. In *Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular, and Molecular Levels*. Somero G, Osmond C, Bolis C. Crans: Springer Science and Business Media: pp: 87-103.
- Curl E, Truelove B. (1986). The rhizosphere. Springer-Verlag, New York. *Advanced Series in Agricultural Sciences, Vol. 15*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York-Tokyo. Hardcover.
- D'Haese W, Holster M. (2002). Nod factor structure, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*: 12 (6): 79-105.
- Dakora F, Phillips D. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245 (1): 35-47.
- Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*: 28 (3): 261-289.
- Dardanelli M, Angelini J, Fabra A. (2003). A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian Journal Microbiology*: 49 (6): 399-405.
- Dardanelli M, Fernández F, Espuny M, Rodríguez Carvajal M, Soria Díaz M, Gil Serrano M, Okon Y, Megías M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*: 40 (11): 2713-2721.
- Dardanelli M, González P, Medeot D (2009). Effects of peanut rhizobia on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. *Symbiosis*: 4 (3): 175 -180.
- Dardanelli M, Manyani H, González-Barroso S, Rodríguez-Carvajal M, Gil-Serrano A, Espuny M, López-Baena F, Bellogín R, Megías M, Ollero F. (2010). Effect of the

presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur 9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and Soil*: 328:483-493.

- Day B, Loh J, Cohn J, Stacey G. (2000). Signal exchange involved in the establishment of the *Bradyrhizobium* legume symbiosis. En Prokaryotic Nitrogen Fixation. A model system of the analysis of a biological process. Triplett, E (ed), Horizon Scientific Presss, Norfolk: pp: 385-425.
- Delauta J, Ribeiro R, Ormeño-Orrillo E, Melo I, Martínez-Romero E, Hungria M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 63: 3342-3351.
- Denich T, Baudette L, Lee H, Trevors J. (2003) Effects of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal in Microbiology Methods*: 52 (2): 149-182.
- Deziel E, Comeau Y, Villemur R. (2001). Initiation of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP Correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and switching motilities. *Journal of Bacteriology*: 183 (4): 1195-204.
- Diaz del Castillo L, Hunt S, Layzell D. (1994). The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiology*: 106: 949-955.
- Dixon R, Paiva N. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*: 7 (7): 1085-1097.
- Dobbelaere A, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek J, Vanderleyden J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in AIA production on wheat. *Plant and Soil*: 212: 155-164.
- Dobreiner J, Day J. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen- fixing sites. En *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*, Vol 2. Washington: Pullman Washington State University Press. Newton, W, Nyman, C (eds).
- Dodd I, Zinovkina N, Safronova V, Belimov A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*: 157: 361-379.
- Dowhan W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids? *Annual Review of Biochemistry*: 66:199-232.
- Drouin P, Prevost D, Antoun H. (2000). Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiology Ecology*: 32:111-120.
- Dumas F, Lebrun M, Tocanne J. (1999) Is the protein/lipid matching principle relevant to membrane organization and function. *FEBS Letters*: 458 (3): 271-277.
- Eckert B, Weber O, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A. (2001). *Azospirillum dobereineriae* sp. nov., a nitrogen -fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Interntional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiolology*: 51:17-26.
- Estévez Amador J. (2007). Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Sevilla. España.

- Fan T, Lane A, Pedler J, Crowley D, Higashi R. (1997). Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*: 251 (1): 57-68.
- FAO: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. (2016-2013). La agricultura en el mundo: hacia 2015/2030. Informe resumido. Recuperado el 15 de Mayo de 2014 en <http://www.fao.org>.
- Faure D, Vereecke D, Leveau J. (2009). Molecular communication in rhizosphere. *Plant and Soil*: 321: 279-303.
- Finean J, Coleman R, Michell R. (1984). Membranes and their cellular functions. Membranes and their cellular functions. Blackwell, Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Fox S, O'Hara G, and Brau L. (2011). Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant and Soil*: 48: 245-254.
- Fraser G, Hughes C. (1999). Swarming motility. *Microbiology*: 2 (6): 630-635.
- Fulchieri M, Lucangeli C, Bottini R. (1993). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant and Cell Physiology*: 34 (8): 1305-1309.
- Fuller N, Rand R. (2001). The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophysic Journal*; 81 (2): 243-254.
- Fumero M (2011). Estudios básicos en las señales de comunicación mutualista entre *Arachis hypogaea* (maní) y bacterias asociadas, aplicables en la tecnología de inoculantes. Tesina para obtener el título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- Fyfe P, McAuley K, Roszak A, Isaacs N, Cogdell R, Jones M. (2001) Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends in Biochemical Science*: 26 (2): 106-111.
- Gastaldi. (2016). Tercera estimación de producción de Maní, campaña 2015/16. Recuperado el 28 de diciembre de 2016 en <http://www.gastaldihnos.com.ar>.
- Geiger O, López-Lara, Sohlenkamp C. (2012). Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1831 (3): 503-513.
- Giayetto O. (2006). El cultivo de maní en Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina: pp. 73-88.
- Gil M, Pontin M, Berli FJ, Bottini R, Piccoli P. (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry*: 77: 89-98.
- Gillette W, Elkan G. (1996). *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. Strain NC92 contains two *nod* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host Plants. *Journal of Bacteriology*: 178 (10): 2757-2766.
- Gillier P, Silvestre P. (1970). El Cacahuete o Maní. España. Ed. Barcelona Blume.
- Gil-Quintana E, Larrainzar E, Seminario A, Díaz-Leal J, Alamillo M, Arrese-Igor C, Wienkoop S, González E. 2013). Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. *Journal of Experimental Botany*: 64 (8): 2171-2182.

- Glickmann and Dessaux. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic Bacteria. *Applied Environmental Microbiology*: 61(2): 793-796.
- Gomes-Germano M, Menna P, Mostasso F, Hungria M. (2006). RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 56: 217-229.
- González L, Argentel L, Zaldívar N, Ramírez R. (2005). Efecto de la sequía simulada con PEG6000 sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. *Cultivos Tropicales*: 26 (4): 49-52.
- González R, Montealegre J, Herrera R. (2004). Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimabus* y *Trichoderma sp.* *Ciencia e Investigación Agraria*: 31:1-5.
- Grant O. (2012). Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer Science Business Media. España. Ahmad P, Prasad MNV (eds).
- Grayston S, Vaughan D, Jones D. (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*. 5 (1): 29.
- Green L, Emerich D. (1999). Light microscopy of early stages in the symbiosis of soybean with a delayed-nodulation mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Experimental Botany*: 50 (339): 1577-1585.
- Gronemeyer J, Chimwamurombe P, Reinhold-Hurek B. (2015). *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 65: 3241-3247.
- Hamed A, Parvaiz A. (2015). Legumes and breeding under abiotic stress: An overview. *Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations*. Estados Unidos de America. Wiley (ed).
- Han J, Su L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, and Song W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain Delftia tsuruhatensis HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*: 28 (1): 66-76.
- Hansen U, Seufert, G. (1999) Terpenoid emission from *Citrus sinensis* L under drought stress. *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere*: 24 (6): 681-687.
- Hartig C, Löffhagen N, Harms H. (2005). Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*: 71 (4): 1915-1922.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, and Ahmed I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*: 60 (4): 579-598.
- Hazel J, Williams E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*: 29 (3): 167-227.

- Heath R, Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 25: 189-198.
- Henrichsen J. (1972). Bacterial Surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*. 36 (4): 478-503.
- Hoagland D, Arnon D. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. Circular California University Agricultural Experiment Station: pp: 347: 1-39.
- Hong-Bo S, Li-Ye Chu D, Cheruth Abdul Jaleel C, Chang-Xing Z. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Plant biology and pathology/Biologie et pathologie végétale*: 33: 215-225.
- Hungria M, Nogueira M and Araujo R. (2015). Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. And *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. *American Journal of Plant Science*: 6 (6): 811-817.
- Informe seminal. Estado de los cultivos. INTA. Recuperado en <http://www.inta.gob.ar>.
- Kalani J, Lee R, Everly M, and Hovis J. (2006) Influence of Lipid Chemistry on Membrane Fluidity: Tail and Headgroup Interactions. *Biophysic Journal*: 91 (10): 3727-3735.
- Kamilova F, Kravchenko L, Shaposhnikov A, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*: 19 (3): 250-256.
- Kates M. (1973). Techniques of lipidology. U.S.A. North Holland Publishing Company. Work, T. y Work, E. (eds).
- Kearns D. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*: 8 (9): 634-636.
- Khammas K y Kaiser P. (1991). Characterization of pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137: 75-79.
- Khorassani R, Hettwer U, Ratzinger A, Steingrobe B, Karlovsky P, and Claassen N. (2011). Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus. *BMC Plant Biology*: pp: 11:121.
- King C, Purcell L. (2005). Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology*: 137 (4): 1389-1396.
- Kloepper J and Schroth M. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*: 286: 885-886.
- Kramer P. (1983). Drought tolerance and water efficiency. *Water Relations of Plants*, Nueva York, Academy Press. Pp: 390-415.
- Krauss T, Hampp E, Grosso M., Basconsuelo S, Malpassi R, Bianco C. (1996). Morfología de sistemas radicales de *Arachis hypogaea* L. en función de las condiciones físicas del suelo. *Reviata. Universidad Nacional de Rio Cuarto*: 16 (1): 41-55.
- Kulkarni S; Nautiyal C. (2000). Effects of salt and pH stress on temperature tolerant *Rhizobium* sp. NBR1330 nodulating *Prosopis juliflora*. *Current in Microbiology*: 40: 221-226.
- Lakowicz J. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd edn. New York, USA: Kluwer Academic.

- Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinin G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M. (2010). *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 60 (12): 2832-2837.
- Laynez-Garsaball J, Méndez-Natera J y Mayz-Figueroa J. (2008). Efecto del potencial osmótico y del tamaño de la semilla sobre la germinación y crecimiento de plántulas de maíz bajo condiciones de laboratorio. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*: 11(1):26-34.
- Lin S, Shen F, Young L, Zhu Z, Chen W, Young C. (2012). *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 62: 1185-1190.
- Lindblom G, Rilfors L. (1989). Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids: possible biological relevance. *Biochimistry Biophysic Acta*: 988 (2): 221 - 256.
- Litman B y Barenholz Y. (1982). Fluorescent probe: Diphenylhexatriene. *Methods in Enzymology*: 81: 678-685.
- López de Vittoria G, Lovell C. (1993). Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*: 59: 2951-2955.
- López Gómez M. (2007). Metabolismo carbonado nodular en *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, *Lotus japonicum*-*Mesorhizobium loti*, en estrés salino: implicación de la trehalosa. Tesis Doctoral. Granada. España.
- Los D, Murata N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1666 (1-2): 142-157.
- Lucas Garcia J, Barbas C, Provanza A, Barrientos M, Gutierrez Manero F. (2001). Low Molecular Weight Organic Acids and Fatty Acids in Root Exudates of Two *Lupinus* Cultivars at Flowering and Fruiting Stages. *Phytochemistry Analysis*: 12: 305-311.
- Magalhães F, Baldani J, Souto S, Kuykendall J, Döbereiner J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*: 55 (3): 417-429.
- Mandal S, Ray B, Dey S, Pati B. (2007). Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Biotechnology Letters*: 29:1271–1275.
- Marasco R, Rolli E, Fusi M, Cherif A, Abou-Hadid A, El-Bahairy U., et al. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *Biomed Research International*: ID 491091.
- Marschner H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Martin J. (1977). Effect of soil moisture on the release of organic carbon from wheat roots. *Soil Biology and Biochemistry*: 9: 303-304.
- Martínez L. (2003). Respuesta bioquímica y molecular de la simbiosis *Phaseolus vulgaris*- *Glomus* intraradices al estrés de agua. Tesis de Doctorado. Universidad de Colombia. Colombia.
- Martínez-Viera R. (1986). Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. La Habana. Editorial Científico-Técnica.

- Masaoka Y, Kojima M, Sugihara S, Yoshihara T, Koshino M, Ichihara A. (1993). Dissolution of ferric phosphates by alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots exudates. *Plant and Soil*: 155 (1): 75-78.
- Matthyse A and McMahan S. (2001). The effect of the *Agrobacterium tumefaciens* attR mutation on attachment and root colonization differs between legumes and other dicots. *Applied and Environmental Microbiology*: 67 (3): 1070-1075.
- Maunoury N, Kondorosi A, Kondorosi E, Mergaert P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*: 24 (11): 153-189.
- Mc Cully M. (1999). Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annual Review of Plant Biology*: 50: 695-718.
- Medeot D, Bueno M, Dardanelli M, García de Lema M (2007) Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Current in Microbiology*: 54: 31-35.
- Medeot, D. (2009). Funcionalidad de moléculas bacterianas en la interacción maní-rizobio. Comportamiento frente a estreses ambientales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. (2007). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 57 (3): 620-624.
- Mhamdi R, Nouairi I, Hammouda T, Mhamdi R, and Mhadhbi H. (2014). Growth capacity and biochemical mechanisms involved in rhizobia tolerance to salinity and water deficit. *Journal of Basic Microbiology*: 54 (4): 1-11.
- Michelena V, Mata A, Pino F. (1996). Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia.
- MINAGRI. (2014). Suelos, producción agropecuaria y cambio climático: avances en la Argentina. 1° ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Recuperado el 2 de Mayo de 2014 en: <http://www.minagri.gob.ar/informes>.
- MINAGRI. (2015). Informe diario del mercado de granos. Recuperado el 17 de Agosto de 2015 en: <http://www.minagri.gob.ar/informes>.
- Mishra P, Mishra S, and Selvakumar G. (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentin (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 25: 753-761.
- Molina-Favero C, Creus C, Simontacchi M, Puntarulo S, and Lamattina L. (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root. *Molecular Plant Microbe Interaction*: 21(7):1001-9.
- Morel M, Cagide Minteguiaga M, Dardanelli M, Castro-Sowinski S. (2015). The Pattern of Secreted Molecules During the Co-Inoculation of Alfalfa Plants With *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield: 28 (2): 134-142.
- Morel M, Ubalde M, Braña V, and Castro-Sowinski S. (2011). *Delftia* sp. JD2: A potential Cr (VI)-reducing agent with plant growthpromoting activity. *Archives of Microbiology*: 193 (1):163-168.
- Morrison W, Smith L. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride. *Journal of Lipid Research*: 5: 600-608.

- Munns R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant cell environmental*: 16: 15-24.
- Mykytczuka N, Trevors J, Leduca L, Ferronic G. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*: 95 (1-3): 60-82.
- Nambiar E. (1976). The uptake of zinc by roots in relation to soil water content and root growth. *Australian Journal of Soil Research*: 14 (1): 67-74.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Recuperado el 15 de Junio de 2012 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>.
- Nejad T, Shoukofar A, Tayebi A. (2011). The use of hormone auxin in the different period growth on yield components of plant vetch. World academy of science, engineering and technology. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*: 5 (12):12-25.
- Neumann G. (2007). Root exudates and nutrient cycling in nutrient cycling in Ecosystems. Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. *Soil Biology*: 10: 123–157.
- Nieves F, Bogino P, Sorroche F and Giordano W. (2012). Detection, characterization, and biological effect of quorum-sensing signaling molecules in peanut-nodulating *Bradyrhizobium*. *Sensors*: 12 (3): 2851-73.
- Nina S, Ludmilaa D, Svetlanab B, Olgab N, Olgaa P, Tamarab S, Valeryc S, Mikhailid B. (2013). Effect of phenol-induced changes in lipid composition on conformation of OmpF-like porin of *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEBS Letters*: 587 (14): 2260-2265.
- Novak K, Chovanec P, Skrdleta V, Kropacova M, Lisa L. (2006). Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany*: 53 (375): 1735-1745.
- Okon Y, Labandera-González. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*: 26 (12): 1591-1601.
- Ormeño E, Vila A, Bousquet-Me'lou S, Greff G, Bonin C, Fernandez C. (2006). Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere*: 67 (2): 276-284.
- Paiva, N. (2000). An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *Plant Biology División*: 19 (2): 132-135.
- Palma Martin F. (2009). Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en la simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino. Tesis doctoral. Granada, España.
- Paulucci N, Medeot D, Dardanelli M and de Lema M. (2011). Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut nodulating rhizobia. *Lipids*: 46 (5): 435-444.
- Paulucci, N. S., Gallarato, L. A., Reguera, Y. B., Vicario, J. C., Cesari, A. B., García de Lema, M. G y Dardanelli, M. S. (2015) *Arachis hypogaea* PGPR isolated from Argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity. *Microbiology Research*: 173:1-9.
- Pedelini R. (2008). Maní: Guía Práctica para su Cultivo. Recuperado el 3 de Junio de 2012 en [http:// inta.gob.ar/sites](http://inta.gob.ar/sites).
- Peng G, Wang H, Zhang G, Hou W, Liu Y, Wang E, Tan Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 56 (6): 1263-1271.
- Pereyra M, Zalazar C and Barassi C. (2006). Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings exposed to water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*: 44 (11-12): 873-879.
 - Piccoli P, Bottini R (2013) Abiotic stress tolerance induced by endophytic PGPR. *Soil Biology*: 37:151-163.
 - Pietrarelli J. (1980). Groundnut production, utilization, research problems and further research needs in Argentina. Plant biology and pathology. India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
 - Ramos J, Gallegos M, Marquéz S, Ramos-Gonzales M, Espinosa-Urgel M, Segura A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*: 4 (2): 166-171.
 - Reddy T, Reddy V, Anbumoshi V. (2003). Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant Growth Regulation*: 41 (1): 75-88.
 - Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J. (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* L). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 37: 43-51.
 - Revista Europaexpress. [http:// www.eleconomista.es.pontevedra](http://www.eleconomista.es.pontevedra). (2013).
 - Rijke, E., Wilfried, M.A, Niessen, Freek Ariese, Cees Gooijer, Brinkman. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Review. Journal of Chromatography*: 1112 (1-2): 31-63.
 - Rodríguez Cáceres E. (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*: 44 (4): 990-991.
 - Rodríguez R, Venturas M, García I, Sánchez L. (2008). Evaluación precoz de la resistencia a la sequía inducida con polietilenglicol en cultivos hidropónicos de especies forestales. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*: 24: 51-56.
 - Rodríguez-Navarro, Dardanelli M, Ruiz-Sainz. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiological Letters*: 271 (2): 127-136.
 - Rosas S, Soria R, Correa N, Abdala, G. (1998). Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Molecular Biology*. 38 (6): 1161-1168.
 - Routaboul J, Fischer S, Browse J. (2000). Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiology*: 124 (4): 1697-705.
 - Rovira A. (1959). Root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant Soil*: 11(2): 53-64.
 - Rovira, A. (1969). Plant Root Exudates. *The Botanical Review*: 35(1): 35-57.
 - Russell N and Fukunaga N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*: 75 (2-3): 171-182.
 - Russell N. (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends in Biochemical Sciences*: 9 (3): 108-112.

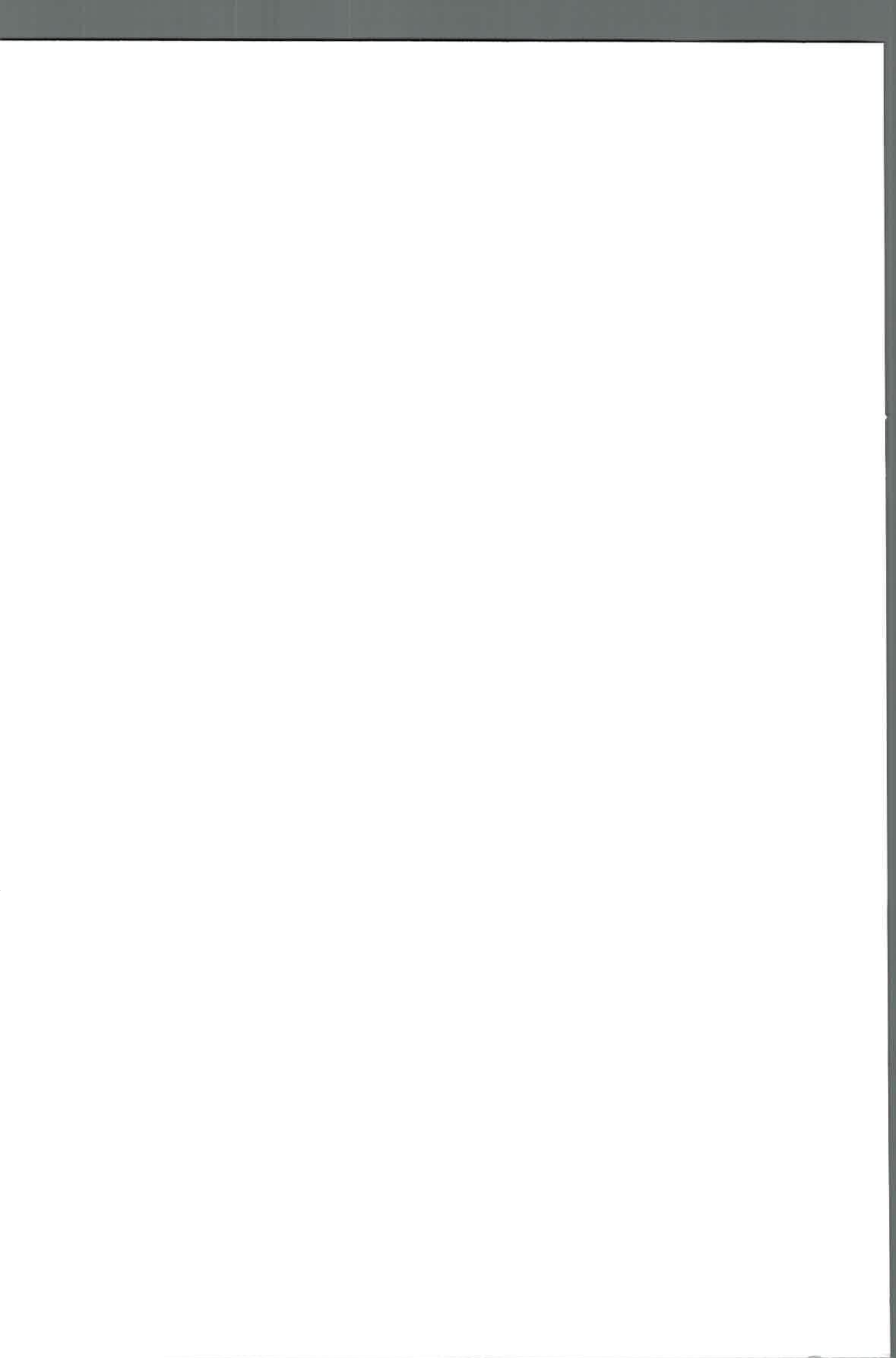
- Sadasivan L. and Neyra C. (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *Journal of Bacteriology*: 163: 716-723.
- Salomon M, Bottini R, Apolina C, Souza Filho, Cohen A, Moreno D, Gil M, Piccoli, P. (2013). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses; induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*: 151(4): 359-74.
- Sandnes A, Eldhuset T and Wollebæk G. (2005). Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch. *Soil Biology and Biochemistry*: 37 (2): 259-269.
- Scheber C, Schottel J y Aksan, A. (2009). Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration and growth recovery. *Biochimistry Biophysic Acta*: 1788 (11): 2427-2435.
- Schelud'ko A, Makrushin K, Tugarova A, Krestinenko V, Panasenko V, Antonyuk L, Katsy. (2006). Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins. *Microbiological Research*: 164 (2): 149-156.
- Shaw L, Morris P, Hooker J. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*: 8 (11): 1867-1880.
- Simmons M, Van Der Bij A, Brand I, Deweger L, Wiffelman C, Lugtenberg B. (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*: 9 (7): 600-607.
- Skerman V, McGowan V, Sneath P. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 30: 225-420.
- Smit G, Kijne J, Lugtenberg B. (1986). Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of bacteriology*: 168 (2): 4294-4301.
- Somasengaran P, Hoben H. (1994). Handbook for rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology. New York. Spring-Verlag, Inc.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. (2009). Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*: 51: 283-320.
- Star L, Matan O, Dardanelli M, Kapulnik Y, Burdman S, and Okon Y. (2012). The *Vicia sativa* spp. *nigra*-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*: 356 (1): 165-174.
- Staudt M, Rambal S, Joffre R, Kesselmeier J. (2002). Impact of drought on seasonal monoterpene emissions from *Quercus ilex* in southern France. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*: 107: 722-730.
- Steendhoudt O and Vanderleyden J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Review*: 24 (4): 487-506.
- Streeter J. (2003). Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. *Plant, Cell Environmental*: 26: 1199-120.
- Subramanian S, Stacey G, Yu O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean nodules. *Journal of Agrarian Assian China*: 48 (2): 20-27.

- Suutari M, Laakso S (1994) Microbial fatty acid and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology*: 20 (4): 285-328.
- Svenningsson H, Sundin N, Liljenberg C. (1990). Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water deficit stress. *Plant cell and environment*: 13 (2): 155-162.
- Tambalo D, Christopher K, Yost, Hynes. (2011). Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *FEMS Research Letters*: 307 (2): 167-170.
- Taurian T, Moron B, Soria-Diaz M, Angelini J, Tejero M, Gil-Serrano A, Megias M, Fabra A. (2008). Signal molecules in the peanut-bradyrhizobia interaction. *Archives of Microbiology*: 189 (4): 345-356.
- Thige S, de Lajudie P, Dipietro K, Lindström K, Nick G, Jarvis B. (2000). Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 50 (2): 787-801.
- Tilak K, Ranganayaki N, Manoharachi C. (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*: 57 (1): 67-71.
- Trevors J. (2003) Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemistry and Biophysic Methods*: 57 (2): 87-103.
- Tumlinson J, Engelberth J. (2008). Fatty acid derived signals that induce or regulate plant defenses against herbivore. Induced Plant Resistance to Herbivory. *Induced Plant Resistance to Herbivory*: pp: 389-407.
- Ubalde M, Braña V, Sueiro F, Morel M, Martínez-Rosales C, Marquez C, and Castro-Sowinski S. (2012). The versatility of *Delftia* sp. Isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Current Microbiology*: 64 (6): 597-603.
- Uheda E, Daimon H, Yoshizako F. (2001). Colonization and invasion of peanut roots by gus-A marked *Bradyrhizobium* sp. *Canadian Journal of Botany*. 79 (6): 733-738.
- Upchurch R. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*: 30 (6): 967-77.
- Van brussel A, Planque K, Quispel A. (1977). The Wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *Journal of General Microbiology*: 101: 51-56.
- Ventimiglia L, Torreus Baudrix L. (2008). Formas de inoculación y carga bacteriana. Resultados de experiencias campaña 2007/08. Ed. INTA. Pergamino pp: 166-168.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J, and Michiels J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*: 16 (10): 496-506.
- Vicario J, Primo E, Dardanelli M, Giordano W. (2015). Promotion of Peanut Growth by Co-inoculation with Selected Strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*: 35 (2): 413-419.
- Vincent J. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Internat. Biol. Progr. Handbook N° 15. UK. Blackwell Scientific Publications Ltd Oxford.
- Vivanco J, Guimaraes R, Flores H. (2002). Underground plant metabolism: The biosynthetic potential of plant roots. *Plant Roots* (3rd ed). Dekker, New York.

- Wang Chang Fu Tia, Feng Qin Wang, Han Wen Feng Chen. (2007). *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region. *FEMS Microbiol Lett*: 285 (2): 146-154.
- Wei A, Shibamoto T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 55 (5): 1737-1742.
- Werner D. (1992). Symbiosis of Plants and Microbes. Chapman and Hall, University Press, Cambridge. U.S.A. Springer.
- Whipps J. (1990). Carbon economy. In *The Rhizosphere*. UK. John Wiley (ed).
- Wilhite D. (2000) Drought as a natural hazard: concepts and definitions. In *Drought: A Global Assessment, Natural Hazards and Disasters Series*. UK. Wilhite DA (ed).
- Witty J, Minchin F. (1998). Method for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root system. *Journal of Experimental Botany*. 49 (323): 1041-1047.
- Xiao-gang Li, Zhang T, Wang X, Zhao L, Han Z. (2013). The Composition of Root Exudates from Two Different Resistant Peanut Cultivars and Their Effects on the Growth of Soil-Borne Pathogen. *International Journal of Biological Sciences*: 9 (2): 164-173
- Xie C, Yokota A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 55 (4): 1435-8.
- Xu L. M. (1995). *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 65 (7): 45:706.
- Ying X, Li X, Xiong Z, Cui L, Zhu W, Li F, Ana L, Chim. (2007). Analysis and determination of estrogen-active compounds in fructus amomi by the combination of high-speed counter-current chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*: 958: 36-42.
- Young C, Hupfer H, Siering C, Ho M, Arun A, Lai W, Rekha P, Shen F, Hung, M, Chen W, Yassin A. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 58 (4): 59-963.
- Young J and K. Haukka. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *Journal of phytology*: 133: 87-94.
- Zahran H. y Sprent J. (1986). Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root- hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plantas by *Rhizobium leguminosarum*. *P. Planta*: 167: 303-309.
- Zhang, X., Nagel, W., and Nagel R. (2006). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. In *Physical Review Letters*. 41 (2): 104 - 113.
- Zhang, Y., Ruyter-Spira, C., and Bouwmeester, J. (2015). Engineering the plant rhizosphere. *Current Opinion in Biotechnology*: 32: 136-142.
- Zhou J, Ashoori F, Susuki S, Nishigaki I, Yagi K. (1993). Protective effect of chlorogenic acid on lipid peroxidation induced in the liver of rats by carbon tetrachloride or Co-irradiation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*: 15 (1): 119-125.

- Zhulin I and Armitage J. (1993). Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*: 175 (4): 952-958.





76700

(5)