



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

Laboratorio de Bioquímica Ecológica

Laboratorio de Ecología Microbiana

**Estudio del efecto de los compuestos volátiles de
Arthrobacter agilis UMCV2 en la modulación del metaboloma
de *Medicago truncatula* en estrés por deficiencia de hierro**

Tesis

Que como requisito para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Opción en Biología Experimental

Presenta

M.C. Idolina Flores Cortez

Director de tesis

D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez

Doctora en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Co-director de tesis

D.C. Eduardo Valencia Cantero

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Morelia, Michoacán, Febrero 2020



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para la D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez por confiar en mí y durante el desarrollo de este trabajo además de asesoría me brindó su amistad.

Al D.C. Eduardo Valencia Cantero por brindarme las facilidades para realizar el doctorado, ser mi co-asesor y permitir que trabajara en su laboratorio.

A mis sinodales, D.C. Martha Isela Ramírez Díaz, D.C. Ana Carmela Ramos Valdivia y D.C. Homero Reyes de la Cruz por sus comentarios y recomendaciones para mejorar el desarrollo de este trabajo y por el tiempo dedicado a los seminarios y revisión del documento de tesis.

Al Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental del CINVESTAV unidad Irapuato, principalmente a Cristina Elizarraraz, D.C. Teresa Carrillo y D.C. Robert Winkler por facilitar el uso del UPLC-MS y por el apoyo brindado para la realización de los análisis. Quiero agradecer al M.C. Daniel Cázares por su tiempo y orientación en el manejo del equipo.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana: Vicente Montejano, Christian Hernández, Ramiro Martínez, Kasandra Real, Martha A. Hernández y Ernesto Vázquez (Pipo), quienes se convirtieron en mis amigos y hemos compartido grandes momentos juntos y aunque algunos ya se hayan ido los recordaré con mucho cariño. Otras personas a quien quiero agradecer por hacer divertida la estancia en el laboratorio son Aura Flores, Raquel Morales y Blanca Pérez.

A mis compañeros de generación, Rosy Espinoza, Reyna Maya, Miguel Contreras y Alejandro Bravo, por brindarme su amistad y hacer más llevadero el posgrado.

Al M.C. Arturo Ramírez por el apoyo brindado en los análisis estadísticos.

A los alumnos y técnicos de los diferentes laboratorios del Instituto por su compañerismo y siempre estar dispuestos a ayudar.

De manera muy especial quiero agradecer a mi familia: a mis padres por tener las palabras adecuadas para mi en cada momento y por comprender que las ausencias a veces se justifican; a mi familia política por el apoyo moral brindado. Por último quiero agradecer a mi esposo Fidel y a mi hijo Adrián por apoyarme en mi desarrollo profesional, acompañarme al laboratorio y siempre estar ahí para escucharme. La vida no tendría sentido sin una familia que nos acompañase en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado.

DEDICATORIA

Para Adrián,

Es posible que en este momento no signifiquen mucho mis palabras, pero un día serás mayor y comprenderás cuanto valoro la compañía y apoyo que me brindaste durante el desarrollo de este trabajo, tu comprensión cuando no podíamos hacer ciertas cosas porque estaba ocupada. Eres mi principal motivación, cuando siento que no puedo más basta con saber que estás ahí para continuar. Estoy agradecida con Dios por tenerte en mi vida y te prometo que me esforzaré por ser un mejor ejemplo para ti. Mientras tanto quiero dedicarte este trabajo que sabes que hice con dedicación, donde participaste y pudiste aprender cosas nuevas; que mejor recompensa para mí que tenerte a mi lado.

Te amo hijo

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Importancia del hierro en la plantas.....	3
2.1.1. Mecanismos para la toma de hierro.....	4
2.1.1.1. Estrategias de adquisición de hierro en plantas.....	5
2.1.1.2. Producción de metabolitos secundarios.....	9
2.2. Brasinoesteroides en la tolerancia al estrés.....	12
2.2.1. Funciones de los brasinoesteroides en plantas.....	12
2.2.2. Brasinoesteroides en la tolerancia al estrés por deficiencia de hierro.....	14
2.3. Interacción planta-microorganismo para la adquisición de hierro.....	16
2.3.1. Mecanismos de los microorganismos para mejorar la nutrición de hierro en las plantas.....	19
2.4. Compuestos volátiles microbianos en la estimulación del crecimiento vegetal.....	26
2.5. <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, una rizobacteria endófito que promueve la adquisición de hierro en las plantas.....	29
2.6. <i>Medicago truncatula</i> , una planta modelo en las interacciones planta-microorganismo.....	31
2.7. Espectrometría de masas, una plataforma analítica para el perfilado metabólico.....	34
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVOS	39
5.1. General.....	39
5.2. Particulares.....	39

6. RESULTADOS	40
6.1. Capítulo I.....	41
Los compuestos volátiles de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 promueven el crecimiento y desarrollo en plántulas de <i>Medicago truncatula</i> en suficiencia y deficiencia de hierro.	
6.2. Capítulo II.....	56
A Mass Spectrometry-Based Study Shows that Volatiles Emitted by <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 Increase the Content of Brassinosteroids in <i>Medicago truncatula</i> in Response to Iron Deficiency Stress.	
6.3. Capítulo III.....	72
Los compuestos volátiles de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 estimulan la exudación radicular de compuestos implicados en la adquisición de hierro en <i>Medicago truncatula</i> .	
7. DISCUSIÓN	103
8. CONCLUSIÓN	113
9. LITERATURA CITADA	114
10. ADENDA	146
10.1. <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 acelera el crecimiento de <i>Pinus devoniana</i>	147
10.2. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 coloniza endofíticamente a <i>Medicago truncatula</i>	153
10.3. Nitrate influx in rose plants during day-night cycle.....	158
10.4. Comunicación bajo tierra.....	164

RESUMEN

El hierro es esencial en procesos redox celulares y biosíntesis de clorofila, su biodisponibilidad es reducida en suelos alcalinos. Las estrategias para la adquisición de hierro en plantas son insuficientes para aliviar el estrés inducido por la deficiencia, evidenciando la importancia de los microorganismos rizosféricos. *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una rizobacteria PGPR que induce mecanismos de adquisición de hierro en plantas. Resultados obtenidos en este estudio demostraron que los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 inducen cambios fisiológicos y morfológicos en las plántulas de *M. truncatula*, por lo que resultó interesante estudiar el tipo de metabolitos que se inducen en respuesta a los compuestos bacterianos y al estrés por deficiencia de hierro. Se utilizaron las plataformas GC-MS, DLI-ESI-MS y UPLC-ESI-MS para determinar si los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulan el metaboloma de *Medicago truncatula* promoviendo la tolerancia de la planta al estrés por deficiencia de hierro. Se realizaron análisis de metabolitos en plántulas de *M. truncatula* crecidas en suficiencia y deficiencia de hierro y en interacción con los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 durante 10 días, en un sistema de compartimentos separados. Este estudio provee evidencia sobre el papel de *A. agilis* UMCV2 en la modulación de compuestos involucrados en la tolerancia al estrés por deficiencia de hierro en plantas de *M. truncatula*, esto mediante la alteración del metabolismo que favorece el incremento de metabolitos involucrados en la respuesta de defensa, movilización de hierro y comunicación planta-microorganismo.

Palabras clave: Deficiencia de Fe, Compuestos volátiles bacterianos, Espectrometría de masas (MS), *Arthrobacter agilis* UMCV2

ABSTRACT

Iron is essential in cell redox reactions and chlorophyll biosynthesis, its bioavailability is usually low in alkaline soils. Strategies for the acquisition of iron in plants are insufficient to alleviate the stress induced by the deficiency, evidencing the importance of rhizospheric microorganisms. *Arthrobacter agilis* UMCV2 is a rhizobacterium PGPR that induces iron acquisition mechanisms in plants. Results obtained in this study showed that the volatile compounds of the UMCV2 strain induce physiological and morphological changes in seedlings of *Medicago truncatula*, so it was interesting to study the type of metabolites that induced in response to bacterial compounds and iron deficiency. The GC-MS, DLI-ESI-MS and UPLC-ESI-MS platforms were used to determine effect of volatile compounds of *A. agilis* UMCV2 on modulation the metabolome of *M. truncatula* promoting the plant's tolerance to iron deficiency stress. The metabolite analyzes were performed on seedlings of *M. truncatula* grown in iron deficiency and deficiency and interacting with volatile compounds of *A. agilis* UMCV2 for 10 days, in a separate compartment system. This study provides evidence on the role of *A. agilis* UMCV2 in the modulation of compounds involved in tolerance to iron deficiency stress in *M. truncatula*, through changes in metabolism that favors the increase of metabolites involved in the defense response, iron mobilization and plant-microorganism communication.

Keywords: Fe deficiency, Volatile microbial compounds, MS, *Arthrobacter agilis* UMCV2

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la demanda por alimentos y la necesidad de incrementar el rendimiento y la calidad de los cultivos, ha conducido a la aplicación de grandes cantidades de productos químicos (fertilizantes y fitohormonas) con la finalidad de incrementar la disponibilidad de nutrimentos y estimular el crecimiento de las plantas (Zaman *et al.*, 2015). La búsqueda de alternativas sustentables para reducir la aplicación de compuestos químicos en los cultivos y producir alimentos libres de químicos, ha hecho que los microorganismos de la rizosfera emerjan como potenciales inductores del crecimiento.

El hierro (Fe) es requerido para procesos que sostienen la vida desde la respiración hasta la fotosíntesis, donde participa en la transferencia de electrones a través de reacciones redox reversibles. Entre los nutrimentos minerales esenciales requeridos por las plantas, el hierro, junto con el P y N, representan las principales limitaciones para la productividad de los cultivos en todo el mundo (Pii *et al.*, 2015; Tsai y Schmidt, 2017).

La exudación de compuestos a través de las raíces es un proceso importante y determinante en la adaptación de las plantas a la deficiencia de hierro en el suelo (Canarini *et al.*, 2019). Así, las estrategias de crecimiento están sincronizadas con la excreción de sustancias al medio; de tal forma que los exudados radiculares se consideran como un mecanismo químico, susceptible de ser modificado con cambios del entorno de la planta.

A su vez, los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la mineralización y transformación de los nutrimentos en la rizosfera (Marschner *et al.*, 2011). Al igual que lo hacen las plantas, los microorganismos son capaces de influenciar la disponibilidad de nutrimentos a través de la secreción de compuestos que solubilizan, quelan, reducen u oxidan.

Arthrobacter agilis UMCV2 es una rizobacteria PGPR que fue aislada en nuestro grupo de trabajo y es endófito de plantas de *M. truncatula* (Aviles-Garcia *et al.*, 2016). *A. agilis* UMCV2 promueve el crecimiento vegetal mediante el incremento de la biodisponibilidad de hierro (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), producción del compuesto volátil dimetilhexadecilamina (DMHDA) (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011) y por la modulación de los mecanismos de adquisición de hierro en plantas estrategia I y II (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013; Cástulo-Rubio *et al.*, 2015; Hernández-Calderón *et al.*, 2018; Montejano-Ramírez *et al.*, 2018).

Si bien, los mecanismos moleculares mediante los cuales la UMCV2 promueve la adquisición de hierro en las plantas y estimula el crecimiento vegetal han sido estudiados previamente, aún se desconoce si los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 inducen la síntesis de metabolitos implicados en la tolerancia al estrés por deficiencia de hierro en las plantas y si modulan la exudación radicular. Para ello, se utilizó como planta modelo a *Medicago truncatula* y se emplearon técnicas de espectrometría de masas como GC-MS, DLI-ESI-MS y UPLC-ESI-MS para realizar el perfilado metabolómico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del hierro en las plantas

El hierro (Fe) es un microelemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El Fe es de especial importancia para las plantas debido a su capacidad redox, característica que lo hace un cofactor responsable para el transporte de electrones y procesos catalíticos (Balk y Schaedler, 2014; Briat *et al.*, 2015). Los centros hierro-azufre son posiblemente el uso más abundante del hierro como cofactor y su participación es clave en la fotosíntesis y respiración.

El Fe es esencial para las plantas debido a su participación en la fijación de CO₂ que utiliza al hierro como un elemento clave en el transporte de electrones a través del complejo PSII-b6f/Rieske-PSI (Briat *et al.*, 2015). En plantas superiores los niveles del fotosistema I (12 Fe) y el complejo I (22 Fe) se regulan negativamente al encontrarse en condiciones de deficiencia de hierro (Vigani *et al.*, 2009). Este microelemento también participa en otros procesos celulares como biosíntesis de clorofila, biogénesis de tilacoides, desarrollo del cloroplasto y transporte de oxígeno (Nishio *et al.*, 1985; Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Los suelos normalmente contienen altas cantidades de hierro, sin embargo, su disponibilidad para las plantas se encuentra restringida debido al pH, el estado redox y la composición del suelo (Brancadoro *et al.*, 1995). Las plantas requieren de 10⁻⁶ a 10⁻⁵ M de hierro para su óptimo crecimiento, en suelos aireados o alcalinos apenas excede 10⁻¹⁰ M (Frossard *et al.*, 2000). Debido a la baja disponibilidad del hierro en el suelo, su deficiencia se ha convertido en un problema alrededor del mundo, donde más de la tercera parte de los suelos arables son potencialmente deficientes en hierro (Guerinot *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el Fe es un factor limitante para la producción de biomasa vegetal, basta mencionar como ejemplos en fitoplancton (Martin y Fitzwater, 1988),

Arabidopsis thaliana (Ravet *et al.*, 2009), tomate (Jin *et al.*, 2009), espinaca (Jin *et al.*, 2013) y arroz (Takahashi *et al.*, 2001). La clorosis inducida por la deficiencia de hierro es un problema serio que conduce a la pérdida de la producción y a una calidad reducida en la producción agrícola (Kim y Guerinot, 2007).

El problema de la baja solubilidad del hierro en ambientes aeróbicos o de pH neutro conlleva a una baja disponibilidad de este elemento para otros organismos, además de las plantas. Éste es un problema que concierne directamente a la nutrición humana, como una consecuencia de una baja ingesta de hierro se tiene anemia, lo que se manifiesta como fatiga y en los bebés puede presentarse tanto retraso en el desarrollo como mental (Ivanov *et al.*, 2012).

Dado que las plantas son una fuente primaria de Fe para los humanos, comprender los mecanismos por los cuales las plantas adquieren eficientemente Fe del suelo, particularmente en condiciones deficientes de Fe, permitiría obtener cultivos con mejor calidad nutricional de Fe, aliviando así la desnutrición de éste mineral en los humanos.

2.1.1 Mecanismos para la toma de hierro

En plantas que crecen en deficiencia de hierro, las hojas más jóvenes son las más afectadas por la condición, presentan amarillamiento intervenal o clorosis. Las plantas difieren en su respuesta al estrés por hierro. La respuesta es adaptativa en la medida en que se producen cambios metabólicos en el planta: (i) los iones de hidrógeno se liberan de las raíces, (ii) aumento de ácidos orgánicos (particularmente cítricos) en la raíz, (iii) la tasa de reducción (Fe^{3+} a Fe^{2+}) aumenta en la raíz, y (iv) compuestos reductores se liberan en solución de las raíces de algunas plantas (Brown y Ambler, 1973).

Las raíces de las plantas afectadas por la deficiencia acidifican el medio a un pH tan bajo como 3.7 (Hether *et al.*, 1984), durante el proceso de acidificación,

sustancias reductoras de hierro son liberadas y movidas hacia la rizosfera. Tanto el proceso de acidificación como el de reducción incrementan la solubilidad de Fe aliviando con esto el estrés impuesto por la deficiencia.

2.1.1.1. Estrategias de adquisición de hierro en plantas

Como fue mencionado con anterioridad, el hierro es un micronutriente esencial para las plantas. En suelos aireados la mayoría del Fe no se encuentra disponible para ser absorbido por las plantas debido a que es muy insoluble (Römheld y Marschner, 1986). Las plantas han evolucionado varios mecanismos de adaptación que movilizan el hierro en la rizosfera.

Existen pocas formas de incrementar la solubilidad del hierro en la rizosfera para incrementar su disponibilidad para las plantas: incremento en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , disminución del pH de la rizosfera y la solubilización de hierro mediante la liberación de compuestos quelantes producidos por las plantas. Estos mecanismos adaptativos o inducibles son suprimidos cuando las necesidades de hierro son satisfechas (Römheld y Marschner, 1986).

De acuerdo a Römheld y Marschner (1986) existen diferencias cualitativas en las plantas entre genotipos para los mecanismos de adaptación a la deficiencia de hierro, estas diferencias pueden ser clasificadas en dos estrategias filogenéticamente distintas. En la actualidad hay trabajos que demuestran la presencia de componentes de la estrategia I en la estrategia II.

En el 2018, Hernández-Calderón *et al.* identificaron al transportador de hierro IRT, el cual está presente en plantas con estrategia I para la adquisición de hierro, en plantas de Sorgo (*Sorghum bicolor*) que pertenece a la estrategia II. Dentro de los resultados, se encontraron dos genes correspondientes a *SbIRT1* y *SbIRT2* los cuales son inducibles por la deficiencia de hierro así como los compuestos volátiles de bacterias benéficas, patógenas y comensales.

En un trabajo previo, Cástulo-Rubio *et al.* (2015) observaron que la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 modula la transcripción de FRO, una férrico quelato reductasa que es componente de la estrategia I, en plantas con estrategia II mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro.

Esto demuestra que existen remanentes de la estrategia I en plantas que sufrieron especiación tiempo después, en el orden poales. De manera general, las plantas pueden clasificarse como Estrategias I y II de acuerdo a su habilidad para la toma de hierro, a continuación se detallan estas estrategias.

a) Estrategia I

Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas son clasificadas como Estrategia I, estas plantas exhiben al menos tres reacciones adaptativas que se basan en la reducción de hierro: 1) incremento en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} en la superficie de la raíz (Chaney *et al.*, 1972), 2) extrusión de protones que promueven la reducción de hierro (Römheld *et al.* 1984), y 3) la liberación de sustancias quelantes por las raíces (Hether *et al.* 1984).

La estrategia I para la adquisición de hierro comprende tres pasos principales: solubilización de hierro, reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} y la internalización del hierro reducido. En *Arabidopsis thaliana*, en condiciones de deficiencia de hierro la solubilización es principalmente mediada por una extrusión de protones (H^+ -ATPasa) resultando en una acidificación local de la rizosfera (Santi y Schmidt, 2009).

En la raíz de *Arabidopsis*, la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} es principalmente llevada a cabo por la enzima Férrico Reductasa Oxidasa 2 (FRO2) de la familia FRO2, este paso ha sido propuesto como limitante en la adquisición de hierro (Robinson *et al.*, 1999). La internalización del hierro reducido es llevado a cabo por el transportador

divalente IRT1 (Iron Regulated Transporter 1) (Vert *et al.*, 2002), el cual pertenece a la familia de transportadores metálicos ZIP (Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein) (Mäser *et al.*, 2001), es expresado en las células epidérmicas de las raíces y se localiza en la membrana plasmática.

Una vez que el hierro es internalizado, éste es cargado al xilema y es transportado hacia la parte aérea de la planta mediante la corriente de transpiración, el Fe se mueve a través del xilema acompañado con el citrato. El citrato es un quelante de hierro necesario para su distribución en la planta; FDR3 es una proteína perteneciente a la familia MATE (Multidrug and Toxin Efflux) que participa en la carga de citrato al xilema y tiene un papel en la regulación de la traslocación del hierro de las raíces a la parte aérea (Green y Rogers, 2004; Durrett *et al.*, 2007).

Regulación transcripcional de la adquisición de hierro en la estrategia I

La regulación de la reducción de Fe³⁺ es un paso obligatorio en el mecanismo de adquisición de hierro por las plantas no gramíneas (Chaney *et al.*, 1972). En *Arabidopsis*, un regulador maestro de la toma de hierro es la proteína FIT (Fe-deficiency Induced Transcription Factor, bHLH29), en condiciones de deficiencia de hierro se ha observado ser esencial para la inducción de altos niveles de los genes de *AHA2*, *FRO2* e *IRT1* (Colangelo y Guerinot, 2004; Ivanov *et al.*, 2012). La red reguladora de FIT comprende otros bHLHs del subgrupo Ib, como bHLH38, bHLH39, bHLH100 y bHLH101, todos ellos tienen funciones redundantes y pueden interactuar con FIT para formar heterodímeros y activar los genes para la toma de hierro (Brumbarova *et al.*, 2015). El regulador transcripcional FIT también controla MYB10 y MIB72, factores transcripcionales esenciales para el crecimiento de la planta en condiciones de baja disponibilidad de hierro (Palmer *et al.*, 2013; Zamioudis *et al.*, 2014, 2015).

FIT es regulado postraduccionalmente mediante la interacción con EIN3 (Ethylene-Insensitive 3), EIL1 (Ethylene-Insensitive 3-Like 1) y la subunidad MED16 del complejo mediador (Yuan *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2012; Sivitz *et al.*, 2011; Lingam *et al.*, 2011; Yang, *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Otra proteína bHLH47 (POPEYE)

regula un conjunto de genes relacionados con hierro que no se cruzan con la ubiquitin ligasa BRUTUS (BTS), ILR3 (IAA-Leucine Resistant 3, bHLH105) Y bHLH115 (Brumbarova *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2010; Selote *et al.*, 2015). BRUTUS regula negativamente la respuesta a deficiencia de hierro por lo que se sugiere que actúa como un sensor de hierro (Kobayashi *et al.*, 2013; Selote *et al.*, 2015).

b) Estrategia II

Las plantas del orden Poales al que pertenecen las gramíneas poseen la estrategia II que basa su capacidad para absorber hierro en la biosíntesis y exudación de fitosideróforos (PS), los cuales tienen una alta afinidad de quelación por Fe^{3+} (Schaaf *et al.*, 2004). Los PS se liberan en la rizosfera a través del transportador de la familia del ácido mugineico TOM1 (Nozoye *et al.*, 2011). El transporte del complejo PS- Fe^{3+} se lleva a cabo a través de la membrana plasmática de las células epidérmicas, vía el transportador YS1 y YSL (Yellow Stripe 1) (Römheld y Marschner, 1986; Kobayashi y Nishizawa, 2012). YS1 codifica para un transportador del complejo PS- Fe^{3+} , una proteína integral de membrana con 12 dominios putativos transmembranales que pertenece a la superfamilia OPT (Oligopeptide transporter) (Kim y Guerinot, 2007).

Los fitosideróforos son aminoácidos no proteínogénicos, la exudación de estos compuestos por los pastos tiene lugar en la punta y zona de elongación de la raíz (Römheld 1991). Los PS pertenecen a la familia del ácido mugineico (MAs), se han identificado nueve tipos de MAs y son sintetizados a través de una ruta conservada a partir de S-adenosil-L-metionina. Esta ruta incluye tres reacciones enzimáticas secuenciales mediadas por la nicotianamina sintasa (NAS), nicotianamina aminotransferasa (NAAT) y ácido deoximugineico sintasa (DMAS), generando ácido 2'-deoximugineico que es precursor de todos los MAs (Kobayashi y Nishizawa, 2012). Cada especie de gramínea produce su propio set de MAs, por lo tanto, la tolerancia a la deficiencia de hierro está correlacionado con las cantidades y los tipos de PS secretados (Marschner, 1995). En la figura 1 se esquematizan los

componentes de integran las estrategias I y II presentes en las plantas superiores para la adquisición de hierro.

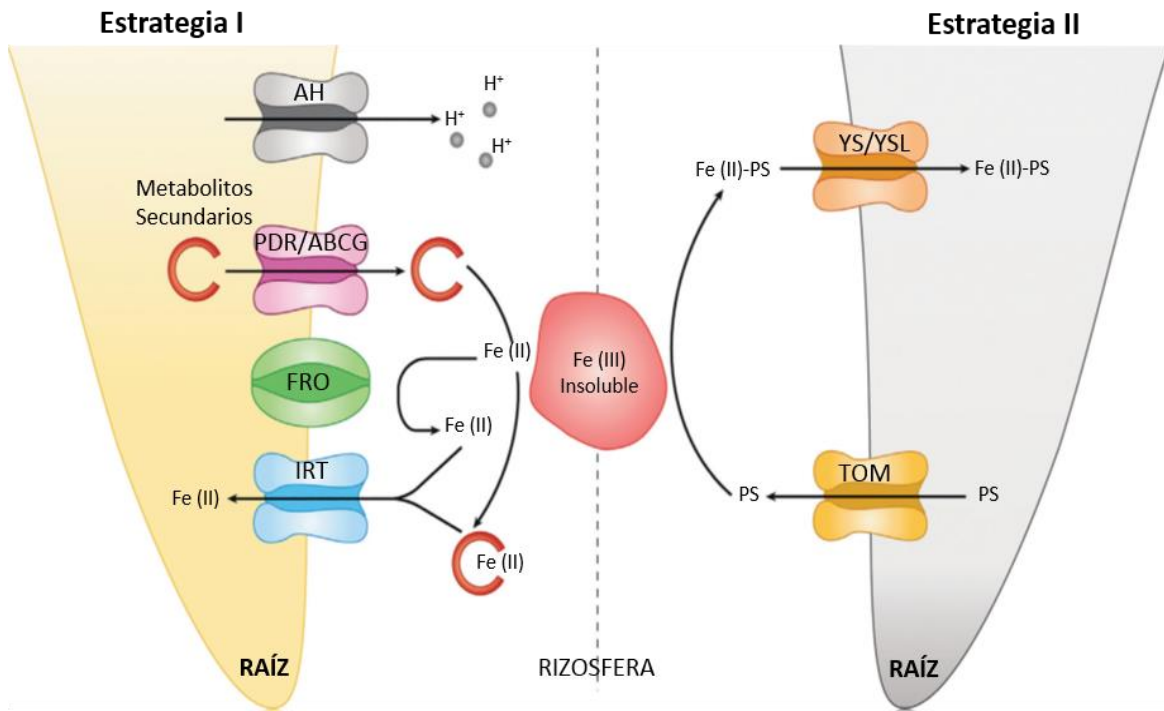


Figura 1. Estrategias de adquisición de hierro en plantas superiores. Estrategia I en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas (izquierda) y Estrategia II en plantas gramíneas (derecha). Modificado de Tsai y Schmidt, 2017

2.1.1.2. Producción de metabolitos secundarios

El hierro sirve como un cofactor para una amplia variedad de procesos en las plantas y la deficiencia de este elemento afecta el comportamiento de la raíz, particularmente la exudación de compuestos orgánicos. Además de la secreción de fitosideróforos en las plantas con estrategia II, la deficiencia de hierro induce la liberación de compuestos reductores y quelantes en plantas con estrategia I, incluyendo compuestos fenólicos, flavinas y ácidos orgánicos (Jin *et al.*, 2007; Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Hace más de cuatro décadas que dio inicio el estudio sobre sustancias de bajo peso molecular liberadas por las raíces de las plantas, compuestos considerados que están involucrados en la adquisición de hierro. Uno de los primeros estudios fue

realizado por Brown y Ambler (1973) donde se analizaron sustancias reductoras excretadas por las raíces, así como su participación en la absorción de hierro por plantas de soya, en este trabajo se observó que las sustancias reductoras actúan mejor a pH bajo (3.9 - 4.5) que a pH más alto (6.4 - 6.8); los compuestos reductores aumentan la liberación de Fe^{2+} de los agentes quelantes y pueden mantener el hierro en estado reducido para que pueda ser transportado hacia la raíz.

Los autores mencionan que esto último podría ser el papel más importante de las sustancias reductoras, en la medida en que su función reductora *per se* no facilitó la absorción de hierro en las plantas de soya, de igual manera dedujeron que dentro de las sustancias reductoras podrían encontrarse compuestos fenólicos, los cuales con base en otros antecedentes, se sabe que funcionan como sustancias solubilizadoras de hierro y parecen no participar en la absorción de este metal.

Las primeras sustancias liberadas por las plantas identificadas como reductoras de hierro fueron el ácido cafeíco (Olsen *et al.*, 1982) y ácido clorogénico (Hether *et al.*, 1984) en exudados de plantas de tomate. Los compuestos de bajo peso molecular liberados por las raíces de las plantas se han asociado con la adquisición de hierro por más de cuatro décadas.

Los compuestos fenólicos liberados por las raíces han sido asociados a las estrategias I y II para la adquisición de hierro. El primer estudio realizado sobre la importancia de los compuestos fenólicos en la adquisición de hierro es el realizado por Jin *et al.* (2007), donde se demuestra que la remoción de compuestos fenólicos del medio de crecimiento causa síntomas de deficiencia de hierro en plantas de trébol, indicando su papel en la movilización del Fe. La remoción de los compuestos fenólicos incrementa la deficiencia de hierro e incrementa otras respuestas como la extrusión de protones y la reducción del Fe^{3+} , lo que indica que la producción y exudación de compuestos fenólicos no se puede compensar por otras respuestas.

La exudación de compuestos fenólicos no está restringida a plantas con estrategia I para la adquisición de hierro, también se ha documentado la presencia de esta clase de compuestos en plantas estrategias II como el arroz (Bashir *et al.*, 2011), donde su exudación no se incrementa por efecto de la deficiencia de hierro. Los cambios en la cantidad de exudación de compuestos fenólicos entre plantas con estrategia I y II puede deberse a una regulación diferente en cuanto a movilización del carbono en condiciones de estrés.

Las cumarinas son compuestos que han sido reportados que podrían ayudar en la adquisición de hierro mediante la quelación y/o reducción del hierro férrico. La exudación de cumarinas es esencial para la adquisición de hierro y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* en sustratos alcalinos (Fourcroy *et al.*, 2014). Un estudio más reciente reportó evidencia de otro grupo de compuestos involucrados en la adquisición de hierro. Sisó-Terraza *et al.* (2016) reportaron que *Beta vulgaris* exuda flavinas, las cuales puede movilizar hierro mediante reducción.

Medicago truncatula exuda flavinas y *Arabidopsis thaliana* cumarinas, dos compuestos con función similar pero de naturaleza química diferente. El fenotipo mutante de *Arabidopsis f6'h1* puede ser rescatado tanto por las cumarinas exudadas por plantas de tipo silvestre como por las flavinas secretadas por *Medicago*, indicando que las funciones fisiológicas de estos dos compuestos son similares, sin embargo, son mutuamente excluyentes (Rodríguez-Celma, 2013).

La razón para la producción de compuestos movilizadores de hierro dependiente de la especie vegetal no está clara, sin embargo, los metabolitos secundarios secretados por la raíz podrían modificarse después en la rizosfera, ya sea por enzimas derivadas de plantas o microbianas. Las poblaciones bacterianas en la rizosfera se definen en gran medida por el tipo de suelo y por la interacción con las plantas, lo que implican que las plantas huésped determinan la colonización de algunos grupos de microorganismos a través de señales metabólicas exudadas. La composición de microorganismos en la rizosfera parece estar sesgada hacia

especies que promueven el crecimiento, por lo tanto, es concebible que los compuestos movilizadores de hierro de origen vegetal se modifiquen en la rizosfera al interactuar con sustancias producidas por microbios del suelo.

2.2. Brasinoesteroides en la tolerancia al estrés

Los brasinoesteroides (BRs) son un grupo de hormonas vegetales de naturaleza esteroide que fueron aisladas por primera vez del polen de *Brassica* hace 40 años. Los brasinoesteroides son la sexta clase de fitohormonas conocidas hasta ahora, se conocen 65 BRs libres y 5 BRs conjugados que han sido aislados o detectados en más de 100 especies de plantas, que van desde algas hasta angiospermas, lo que revela su distribución ubicua en el reino vegetal (Zullo *et al.*, 2002; Bajguz, 2007). Sin embargo, el brasinolido, 24-epibrasinolido y 28-homobrasinolido son los BRs más bioactivos (Anwar *et al.*, 2018).

Los brasinoesteroides son derivados hidroxilados del colestano y sus variaciones estructurales comprenden patrones en los anillos A y B, así como en el C-17 de la cadena lateral. Las rutas del metabolismo de brasinoesteroides producen modificaciones estructurales a los BRs naturales que afectan su actividad, función y transporte en plantas.

Las plantas constantemente se encuentran regulando procesos fisiológicos y del desarrollo afectados por estímulos externos del medio en el que se desarrollan. Algunos estudios han indicado que los procesos biológicos son integrados por múltiples señales hormonales y los diferentes tipos de estrés inducen diferentes rutas de señalización hormonal en la plantas (Teale *et al.*, 2008).

2.2.1. Funciones de los brasinoesteroides en las plantas

Los BRs son hormonas esteroideas que son percibidas por el receptor cinasa BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) de la familia de receptores LRR (repetidos

ricos en leucina), el cual interactúa con el co-receptor BAK1 (BRI1 ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) y desencadena una serie de eventos de fosforilación y desfosforilación para transmitir información hacia el núcleo, información que va a ser traducida en la regulación de la expresión de varios cientos de genes con funciones fisiológicas variadas (Peres *et al.*, 2019).

Los brasinoesteroides son importantes reguladores del crecimiento en diversos procesos del desarrollo, siendo activos en concentraciones que van desde el orden nanomolar a micromolar, incluyendo división y elongación celular, diferenciación vascular, desarrollo reproductivo y modulación de expresión de genes. Otros procesos influenciados por éstas fitohormonas son la germinación de semillas, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y maduración (Bajguz, 2007). Los BRs controlan el crecimiento de la raíz en una manera dosis dependiente y también dependiente del tejido del que se trate (Singh y Savaldi-Goldstein, 2015).

Numerosos estudios han demostrado que la aplicación exógena de BRs mediante varios modos como remojo de semillas (inmersión), tratamientos de raíz (inmersión o en medios de cultivo), la aspersion foliar y la inmersión previa a la siembra de esquejes, podrían mejorar crecimiento y desarrollo de plantas en presencia o ausencia de estrés en una variedad de especies de plantas. Las respuestas fisiológicas observadas durante la aplicación de BRs incluyen biosíntesis de etileno a través del incremento en la síntesis del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (Arteca *et al.*, 1988; Schlagnhauser *et al.*, 1984), hiperpolarización de la membrana debido al incremento de la extrusión de protones (Bajguz *et al.*, 1996; Cerana *et al.*, 1983), incremento de la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Bajguz *et al.*, 2000; Kalinich *et al.*, 1986), incremento en la actividad invertasa (Schilling *et al.*, 1991), estimulación de la actividad fotosintética (Bajguz *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1984; Hayat *et al.*, 2001), y cambios en el balance de otras fitohormonas (Eun *et al.*, 1989).

Algunas observaciones claves en la interacción de los BRs con otras fitohormonas respecto a la elongación del tallo incluyen una respuesta sinérgica con auxinas y un

efecto aditivo con giberelinas (Mandava *et al.*, 1981; Yopp *et al.*, 1981). Los brasinoesteroides inhiben a elongación de la raíz (Roddick *et al.*, 1994), ésta característica podría ser una consecuencia de la inducción de la síntesis de etileno (Arteca *et al.*, 1987). Sin embargo, los BRs pueden promover el desarrollo de las raíces de la corona, ramificación de raíces primarias y secundarias, así como la extensión de la raíz primaria ramificada (Sasse *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la aplicación exógena de BRs mejora la tolerancia al estrés mediante la activación de la transducción de señales y la expresión regulada por BR de genes relacionados con el estrés (Kagale *et al.*, 2007).

2.2.2. Brasinoesteroides en la tolerancia al estrés por deficiencia de Fe

Las plantas son organismos sésiles y de manera inherente poseen ciertos mecanismos para percibir los estímulos ambientales y responder acorde a tales estímulos. El proceso de una planta para responder adecuadamente a las señales del medio ambiente primero requiere que la planta detecte el entorno cambiante. Debido a la naturaleza compleja del estrés, puede predecirse la probable implicación de múltiples sensores para la percepción de señales. Las rutas de transducción que son activadas después de la percepción de señales finalmente activan genes de respuesta a estrés, generando así la respuesta inicial (Sharma *et al.*, 2017).

Actualmente se considera que ciertas respuestas de la planta no se rigen por una sola fitohormona, si no distintas fitohormonas están orquestadas por una o varias señales ambientales que interactúan entre si formando una red de señalización. Fitohormonas como ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA) y BR actúan como señales secundarias iniciando una cascada de señalización que puede seguir con la participación de diferentes componentes (Xiong *et al.*, 2002).

Varios estudios se han llevado a cabo sobre el potencial de los BRs para mejorar la tolerancia al estrés (Zhang *et al.*, 2014; Ahammed *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Hegazi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017), sin embargo, los mecanismos de acción siguen siendo esquivos. Esto podría deberse a la integración de señales de los BRs en muchas otras vías de señalización vinculadas para mitigar el estrés (Divi y Krishna, 2010; Ahammed *et al.*, 2015; Divi *et al.*, 2016). Un ejemplo de la contribución de los BRs a la aminoración de estrés abiótico es el trabajo de Kagale *et al.* (2007), donde aplicaron BRs de manera exógena y observaron una mejora en el efecto inhibitor del estrés salino sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *A. thaliana* y *B. napus*.

Respecto a la participación de los brasinoesteroides en respuesta a la deficiencia de nutrimentos, existe poca información. Uno de los trabajos realizados en plantas con estrategia I para la adquisición de hierro, es el de Wang *et al.* (2012) donde evaluaron la función fisiológica del 24-epibrasinolido (EBR) en la respuesta de plántulas de pepino a la deficiencia de hierro. Los resultados demostraron que en condiciones de suficiencia de hierro el EBR incrementó la actividad férrico quelato reductasa y la acidificación de la rizosfera, mientras que en deficiencia las suprimió. Aunado a los resultados anteriores, se sugiere que los BR pueden regular negativamente el contenido de clorofila en las plantas deficientes de hierro, en contraste, se observó que el EBR suprimió la proporción de contenido de Fe en las raíces con respecto a la de los brotes en condiciones tanto de suficiencia como de deficiencia.

Otro estudio realizado sobre la participación de BRs en la homeostasis del hierro, mostró que la aplicación exógena de EBR incrementa la sensibilidad de plantas de arroz (Estrategia II) a la deficiencia de hierro (incremento en la clorosis de las hojas, expresión constitutiva de los genes asociados con la toma de hierro y bajo nivel de Fe en los plastidios). Sin embargo, una línea mutante de arroz (*d2-1*), que presenta interrumpida la ruta de biosíntesis de BR, presentó una tolerancia incrementada a la deficiencia de hierro la cual podría ser revertida por la complementación con el

EBR (Wang *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que los BRs también se encuentran involucrados en la respuesta de plantas con estrategia II para la adquisición de hierro.

En el trabajo realizado por Wang *et al.* (2015), se observó que el tratamiento con EBR suprimió la expresión de *OsYSL2*, *OsNAS1* y *OsNAS2* en la parte aérea, además, disminuyó el contenido de NA en la parte aérea y con esto se inhibió la traslocación de hierro desde las raíces hacia los brotes. Sin embargo, EBR incrementó significativamente la expresión de *OsIRO2*, un factor transcripcional que modula la toma y traslocación de hierro en arroz, en condiciones de hierro suficiente y deficiente. Por último en este estudio se encontró que la concentración de hierro en la parte aérea fue negativamente regulada por BRS. Wang *et al.* (2015) demostraron que los BRs tienen un papel regulador negativo en el control del transporte y traslocación del hierro de las raíces a los brotes, indirectamente mediante la modulación de *OsIRO2*.

El decremento de la concentración de hierro en la parte aérea mediada por BRs incrementa la clorosis de las hojas, la cual puede retroalimentar a la raíz y activar la expresión de genes relacionados a la homeóstasis del Fe, lo que conduce a la acumulación de hierro en las raíces

2.3. Interacción planta-microorganismo para la adquisición de hierro

Inicialmente se pensaba que las estrategias I y II para la adquisición de hierro por las plantas podían asegurar un crecimiento normal de las plantas en condiciones de deficiencia de hierro, sin embargo, ha surgido evidencia de que estas estrategias por si solas son insuficientes para aliviar el estrés en plantas crecidas en deficiencia de hierro. Un ejemplo es el trabajo de Masalha *et al.* (2000) donde se demostró que plantas de girasol crecidas en condiciones estériles presentaron clorosis, un crecimiento menor y bajo contenido de hierro en comparación con las plantas crecidas en suelo no estéril. Resultados similares presentaron plantas de trébol

crecidas en suelo estéril (Jin *et al.*, 2006). Estos resultados proveen evidencia que la actividad de los microorganismos del suelo desempeña un papel crítico en la adquisición de hierro.

Resulta interesante observar que las plantas que experimentan deficiencia de Fe, además de inducir modificaciones morfológicas y fisiológicas en el sistema radicular, inducen exudación de compuestos a través de las raíces en respuesta al estrés nutricional, no exclusivamente en términos de cantidad, sino que también aumentan la complejidad de las especies moleculares liberadas (Hinsinger *et al.*, 2003).

Se sabe que la composición de los exudados de una planta se encuentra influenciada por varios factores como por ejemplo, el estado fisiológico, la presencia de microbios (Kamilova *et al.*, 2006b; Meharg y Killham, 1995), la presencia de compuestos de rizobacterias (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, zearalenona) (Phillips *et al.*, 2004), y por último el sustrato de crecimiento (Lipton *et al.*, 1987).

Se ha estudiado la composición química de los perfiles de exudados de varias plantas, sin embargo, el perfil de compuestos mejor conocido es probablemente el de tomate. La principal fuente de carbono secretada hacia la rizosfera consiste de ácidos orgánicos (Kamilova *et al.*, 2006a; Kamilova *et al.*, 2006b) seguida de azúcares (Kamilova *et al.*, 2006a; Lugtenberg y Dekkers, 1999; Lugtenberg *et al.*, 1999) y aminoácidos (Simons *et al.*, 1997).

Los exudados radiculares influyen el comportamiento de los microorganismos de la rizosfera, incluidos los hongos patógenos. Kamilova *et al.* (2008) observaron que los exudados de tomate al igual que dos de sus componentes principales (citrato y malato) permitieron la germinación de esporas del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

La composición de los exudados radiculares participa en el reclutamiento de bacterias hacia la rizosfera de las plantas. En el 2002 De Weert *et al.* realizaron un

estudio sobre la quimiotaxis de *P. fluorescens* WCS365 hacia los exudados radiculares de tomate, encontrando que los mayores quimioatrayentes son los aminoácidos (L-leucina) y los ácidos dicarboxílicos (ácido málico y el cítrico), además, observaron que los azúcares son inactivos para este rasgo importante en la colonización. En los exudados de *Arabidopsis thaliana*, el malato es el principal quimioatrayente para la rizobacteria benéfica *Bacillus subtilis* FB17 (Rudrappa *et al.*, 2008).

Como se ha mencionado con anterioridad, el hierro es un elemento fundamental para todos los organismos, incluidos los microorganismos. La biodisponibilidad del hierro es alrededor de 10^{-9} - 10^{-18} M, sin embargo, los microorganismos requieren una concentración cerca de 10^{-8} M para un óptimo crecimiento y llevar a cabo sus procesos fisiológicos y metabólicos vitales (Neilands, 1995; Raymonds 2003).

Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la mineralización y transformación de los nutrientes en la rizosfera (Marschner *et al.*, 2011). Al igual que lo hacen las plantas, los microorganismos son capaces de influenciar la disponibilidad de nutrientes a través de la secreción de compuestos que solubilizan, quelan, reducen u oxidan.

Los microorganismos benéficos de la rizosfera pueden contribuir para mejorar la adquisición de hierro, debido a que algunos de ellos presentan diferente capacidad para inducir respuestas de deficiencia de hierro como por ejemplo la actividad férrico quelato reductasa potenciada, acidificación de la rizosfera, liberación de compuestos fenólicos y flavinas, y modificación del sistema radicular. Estas respuestas son inducidas de una forma similar a las inducidas por la deficiencia de hierro.

2.3.1. Mecanismos de los microorganismos para mejorar la nutrición de hierro en las plantas

a) Producción de sideróforos

En suelos calcáreos muchos microorganismos sintetizan y liberan sideróforos para superar la baja disponibilidad de hierro que tienen los hidróxidos de hierro, con esto se incrementa la solubilidad mediante la quelación, donde se forman complejos sideróforo-Fe. La producción de sideróforos en la rizosfera ha sido propuesta como la actividad clave que beneficia la adquisición de hierro por las plantas.

Los sideróforos (acarreadores de hierro) microbianos son compuestos de bajo peso molecular (<1000 Da) con una alta afinidad por el Fe³⁺, tienen una constante de asociación entre 10¹² - 10⁵² (Neilands, 1982; Glick, 2012) y actúan de manera extracelular como agentes solubilizantes de hierro de compuestos orgánicos y minerales en condiciones limitantes.

Entre los microorganismos existe variación en los tipos de sideróforos que producen en función de la fracción que dona ligandos de oxígeno para la coordinación con el hierro férrico. De acuerdo a la literatura, los sideróforos son sintetizados tanto por bacterias gram-positivas como gram-negativas en condiciones de deficiencia de hierro (Tian *et al.*, 2009; Saharan, 2011).

Existen casi 500 compuestos identificados como sideróforos que pueden ser clasificados como hidroximatos, catecolatos y ácidos hidroxicarboxílicos. Algunos sideróforos comunes son enterobactina (*Streptomyces*), viobriobactina (*Vibrio cholera*), pioquelina (*Pseudomonas aeruginosa*), alcaligina (*Alcaligenes denitrificans*), estafiloferrina (*Staphylococcus* spp.), micobactina (*Mycobacterium tuberculosis*), petrobactina (*Bacillus anthracis*) pioverdina y pioquelina (*Pseudomonas fluorescens*) (Saha, 2012).

Los microorganismos de la rizosfera de plantas en deficiencia de hierro secretan más sideróforos que los de plantas crecidas en suficiencia (Jin *et al.*, 2010), por otro lado, Jin *et al.* (2008) observaron que ciertos microorganismos rizosféricos incrementan la producción de sideróforos cuando son crecidos en presencia de compuestos fenólicos exudados por plantas crecidas en deficiencia de hierro, además, el crecimiento de éstos es favorecido por la presencia de los fenoles. Lo anterior indica que las plantas que crecen en deficiencia de hierro favorecen el reclutamiento de microorganismos rizosféricos que tengan la capacidad de producir sideróforos para con ello incrementar la solubilidad de Fe en la rizosfera.

Se han realizado algunos trabajos donde se han observado los efectos benéficos de los sideróforos microbianos en la nutrición mineral de las plantas. Se ha demostrado que varios complejos Fe-sideróforo sirven como fuente de hierro para las plantas, por ejemplo, Fe-ferrioxamina en avena (Crowley *et al.*, 1991), Fe-pioverdina en *Arabidopsis* (Vansuyt *et al.*, 2007), Fe-erobactina en soya y avena (Chen *et al.*, 1998, 2000), and Fe-rizoferrina en tomate y maíz (Yehuda *et al.*, 2000).

El contenido de hierro en las plantas es mucho más alto cuando la fuente de hierro es adicionada en forma de un complejo Fe-sideróforo que cuando se adiciona la misma concentración pero en forma de Fe-EDTA (Jin *et al.*, 2010). Estos datos indican que los complejos Fe-sideróforo pueden ser incorporados por las raíces de las plantas con estrategia I de una forma más eficiente que otras fuentes, sin embargo, el mecanismo de adquisición del complejo no es claro.

Existen trabajos recientes que demuestran que el sideróforo pioverdina purificado, producido por *Pseudomonas fluorescens*, así como el sideróforo sintetizado por el hongo *Trichoderma asperillum*, acompañado con Fe³⁺, pueden actuar directamente como donante de Fe para plantas, restaurando la condición de deficiencia de hierro en cultivo hidropónico (de Santiago *et al.*, 2009; Nagata *et al.*, 2013).

b) Liberación de protones

La solubilidad del hierro disminuye 1000 veces por cada unidad que se incrementa el pH (Guerinot y Yi, 1994) de manera que la acidificación de la rizosfera tiene un gran impacto en la solubilidad del Fe. En suelos calcáreos los microorganismos asociados con la nitrificación pueden incrementar la solubilidad de hierro mediante la liberación de protones (H^+) y de este modo facilitar la absorción de Fe por la planta (Jin *et al.*, 2014), esto de acuerdo a Van Miegroet y Cole (1984) que mencionan que cuando el amonio y el amoniaco son convertidos a nitrato vía nitrificación se acompaña de la liberación de protones.

Por otro lado podemos encontrar que muchas de las bacterias que solubilizan fosfato (phosphate solubilizing bacteria, PSB) en suelos calcáreos también excretan protones y esto ayuda a la solubilidad del hierro, sin embargo, hay poca información disponible sobre este efecto en la absorción de hierro por las plantas. Además de las bacterias que solubilizan fosfato, las micorrizas también excretan H^+ (Jin *et al.*, 2014).

c) Producción de hormonas

En la última década los fisiólogos de plantas han realizado esfuerzos para descubrir las señales responsables de desencadenar respuestas de deficiencia de hierro en las raíces de las plantas y se han identificado varios compuestos hormonales como elementos de señalización (Jin *et al.*, 2014). Estas fitohormonas incluyen auxinas (Jin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010), óxido nítrico (NO) (Graziano y Lamattina, 2007), etileno (García *et al.*, 2011), citocininas (Se´guela *et al.*, 2008) y brasinoesteroides (Wang *et al.*, 2012); dentro de éstas, las auxinas, NO y etileno son de particular interés para revelar posibles interacciones entre los microorganismos del suelo y la absorción de hierro por las plantas debido a que éstos compuestos pueden ser producidos por microorganismos del suelo.

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más activa en las plantas, está involucrado en procesos de elongación, división y diferenciación celular (Zhao *et al.*, 2010). Algunos microorganismos como *Paenibacillus polymyxa*, *Azospirilla* y *Klebsiella pneumoniae* producen otros compuestos de tipo auxina como ácido indol-3-butírico (IBA), indol-3-etanol (TOL), ácido indol-3-carboxílico e indol-3-aldehído que tienen efectos en las plantas (Hayat *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos producidos por plantas de trébol en deficiencia de hierro, favorecen el crecimiento de microorganismos que producen auxinas (Jin *et al.*, 2006; 2008), lo que sugiere que la deficiencia de hierro favorece el reclutamiento de este tipo de microorganismos, al menos en condiciones *in vitro*.

La adición exógena de auxinas sintéticas incrementa la reducción de hierro, la expresión de FRO2 e IRT1, así como el desarrollo de pelos radiculares y raíces laterales para incrementar el área de absorción de Fe en el suelo (Jin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012); de igual manera los microorganismos aislados del suelo mezclado con compuestos fenólicos de plantas de trébol crecidas en deficiencia de hierro, incrementaron la actividad férrico quelato reductasa en raíces deficientes de hierro (Jin *et al.*, 2006).

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa pequeña, altamente reactiva y permeable en las membranas. El NO ha sido reconocido como una hormona vegetal debido a sus funciones de señalización en numerosos procesos celulares y fisiológicos (Shapiro, 2005; Palmieri *et al.*, 2008; Baudoin, 2011). El NO actúa como una señal potenciadora en la regulación de las respuestas inducibles por deficiencia de hierro. La adición exógena de donador de NO, S-nitrosoglutation (GNSO), promueve la reducción de Fe³⁺ inducida por la deficiencia de hierro, la expresión de FRO2 e IRT1, y el desarrollo de pelos radiculares y raíces laterales, éstas respuestas son similares a las inducidas por las auxinas (Graziano y Lamattina, 2007; Chen *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Meiser *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). De acuerdo a lo anterior, es razonable asumir que la generación de NO por los

microorganismos del suelo pueden incrementar la adquisición de hierro en plantas que crecen en condiciones limitantes de hierro.

El etileno es un constituyente común en la fase gaseosa del suelo, su concentración es lo suficientemente alta para ser biológicamente activo para las plantas (activo desde 10 nL/L). La evidencia señala a los microorganismos como la principal fuente de etileno en el suelo (Jäckel *et al.*, 2004). La acumulación de etileno en el suelo depende del nivel de oxígeno presente, bajas concentraciones de O₂ favorecen la acumulación de etileno (Xu e Inubushi, 2007). En el 2000, López-Millán *et al.* reportaron que las raíces de plantas que crecen en deficiencia de hierro tienen un consumo de oxígeno mayor (hasta 3 veces más), la disminución de O₂ en la rizosfera de plantas deficientes favorece la generación de etileno. Otro estudio reveló que altas concentraciones de Fe²⁺ (>10 mg/kg) pueden inhibir la generación de etileno de manera que, bajos niveles de hierro disponible para las plantas favorece la producción de etileno (Arshad y Frankenberger, 1991).

Similar a las auxinas y al NO, el etileno potencia las respuestas inducibles por deficiencia de hierro. La reducción de hierro férrico, la expresión de FRO2 e IRT1, y el desarrollo de pelos radiculares, se incrementan significativamente cuando se adiciona de manera exógena ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, precursor del etileno) (García *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

d) Interacción simbiótica

La rizosfera es la capa del suelo que es influenciada por las secreciones de las raíces de las plantas, puede contener hasta 10¹¹ células microbianas por gramo de raíz (Egamberdieva *et al.*, 2008). En esta zona se encuentra una mayor densidad de bacterias que en el suelo que la rodea (10-1000 veces más alta), la mayoría de ellas se encuentran en un radio de 50µm de la raíz incrementando su concentración dentro de 10 µm (Lugtenberg y Kamilova, 2009; (Pinton *et al.*, 2001); a esto se le conoce como efecto rizosfera y se origina debido a que un porcentaje del carbono

fijado por las plantas es secretado por las raíces (20-40%) hacia la rizosfera (Badri y Vivanco, 2009). Los microorganismos no tienen una distribución homogénea en la rizosfera, están sujetos a variabilidad temporal y espacial a lo largo de la raíz, dada principalmente por los gradientes de exudación (Pii *et al.*, 2016). La característica mejor estudiada de los microorganismos del suelo es su habilidad para promover el crecimiento de las plantas mediante el incremento en la absorción de nutrimentos.

Dos son las interacciones planta-microorganismo mejor estudiadas, leguminosas-*Rhizobium* y las micorrizas. La interacción leguminosas-*Rhizobium* se lleva a cabo en condiciones deficientes de nitrógeno para la planta, mientras que la simbiosis micorrícica formada entre las raíces de las plantas y un hongo micorrícico incrementa la adquisición de nutrimentos para las raíces de la planta hospedera, principalmente fósforo (Guinel, 2015; Wang *et al.*, 2017).

La nodulación de *Rhizobium* es ubicua en plantas leguminosas y la función más importante de los nódulos es la fijación simbiótica de N₂, un proceso en el cual las proteínas que contienen hierro juegan papeles muy importantes. Las plantas leguminosas que se encuentran noduladas tienen una mayor demanda de hierro, por ello han desarrollado mecanismos para incrementar las respuestas inducidas por la deficiencia de hierro en las raíces. La excreción de protones y compuestos reductores de Fe, e incremento en la actividad férrico quelato reductasa son algunos de los mecanismos observados en plantas noduladas crecidas en deficiencia de hierro (Terry *et al.*, 1988; Soerensen *et al.*, 1988; Deryl y Skorupska, 1992; Jin *et al.*, 2007). Slatni *et al.* (2012) observaron una sobreacumulación de las proteínas ATPasa e IRT1 en las células del cortex de los nódulos de plantas de frijol deficientes de hierro. Estos resultados sugieren que los efectos positivos de la nodulación con *Rhizobium* sobre las respuestas de deficiencia de hierro podrían ser controladas localmente, probablemente por una señal derivada de los nódulos (Jin *et al.*, 2014).

Existen resultados que demuestran que la nodulación con *Rhizobium* mejora sistemáticamente la nutrición con hierro en las plantas mediante la inducción de respuestas de adquisición de Fe. Utilizando un isótopo de Fe (^{55}Fe), Deryl y Skorupska (1992) encontraron que la nodulación con *Rhizobium* promueve el transporte de Fe de las raíces a la parte aérea de plantas de trébol rojo, en otro estudio se observó que el contenido de hierro en plantas de chícharo y lenteja se incrementa con la inoculación de *Rhizobium leguminosarum*-PR1 (Mishra *et al.*, 2011; 2012). La adquisición de hierro y crecimiento de trébol disminuyó significativamente cuando las plantas crecieron en suelo calcáreo estéril, sin embargo, fueron restablecidos por la inoculación con *R. leguminosarum* bv. trifolii ACCC18002 (Jin *et al.*, 2006).

La mayoría de las plantas que se desarrollan en condiciones naturales se encuentran micorrizadas. Es bien sabido que los efectos morfológicos son los mecanismos más importantes por los cuales las micorrizas incrementan la adquisición de nutrimentos en las plantas (Clark y Zeto, 2000). Las hifas de los hongos micorrícicos llegan a medir >100 veces que las propias raíces de las plantas, incrementando con esto el área de exploración y absorción de nutrimentos (Smith y Reed, 1997). Las plantas con raíces micorrizadas tienen acceso a nutrimentos del suelo que las plantas no micorrizadas no tiene, esto gracias a la red de hifas que se forma y que permite la exploración de volúmenes de suelo mayores, dichos efectos morfológicos presenten en las plantas micorrizadas deberían incrementar la adquisición de todos los minerales esenciales para la plantas, incluyendo el hierro (Jin *et al.*, 2014).

Como ya fue mencionado en una sección anterior, las micorrizas excretan H^+ y además compuestos orgánicos quelantes de bajo peso molecular, como ácido cítrico, oxálico, y sideróforos (Li *et al.*, 1991; Winkelmann, 2007; Bharadwaj *et al.*, 2012), que facilitan la movilización del hierro en la rizosfera y teóricamente promueven la adquisición de hierro por las plantas.

Varios estudios se han llevado a cabo para investigar el efecto de la simbiosis micorrícica en la absorción de hierro por las plantas, en algunos de estos trabajos se encontró que las plantas micorrizadas incrementaron la adquisición de hierro y en otros que disminuyó. La discrepancia entre los resultados puede deberse probablemente a las propiedades del suelo y condiciones de crecimiento de las plantas entre los estudios (Jin *et al.*, 2014).

Adicional a las interacciones arriba mencionadas, en la rizosfera podemos encontrar microorganismos mutualistas que pueden mejorar la nutrición a través de diferentes mecanismos como la liberación de compuestos que solubilizan nutrientes o tienen la capacidad de modificar la fisiología y arquitectura de la raíz (Romera *et al.*, 2019).

Recientemente, se ha encontrado que algunos microbios del suelo pueden inducir respuestas fisiológicas y morfológicas en plantas dico y monocotiledóneas similares a las inducidas por la deficiencia de hierro (Zhang *et al.*, 2009; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Zamioudis *et al.*, 2014, 2015; Zhao *et al.*, 2014; Pii *et al.*, 2016b; Zhou *et al.*, 2016; Martínez-Medina *et al.*, 2017; Verbon *et al.*, 2017, Montejano-Ramírez, *et al.*, 2018; Castulo-Rubio *et al.*, 2015; Hernández-Calderón, *et al.*, 2018).

2.4. Compuestos volátiles microbianos en la estimulación del crecimiento vegetal

Los microorganismos del suelo, tanto hongos como bacterias, son muy diversos y abundantes en la rizosfera de las plantas (Van Dam y Bouwmeester, 2016). Los microorganismos habitan la rizosfera debido a que es una zona rica en compuestos orgánicos que son exudados por las plantas, los cuales pueden utilizar como fuente de carbono (metabolitos primarios, metabolitos secundarios, mucilagos, proteínas, agua, iones y oxígeno), estos exudados se conocen como rizodepositos y pueden llegar a constituir del 20–40% del carbono fijado por la planta (Philippot *et al.*, 2013; Venturi y Keel, 2016).

Los microorganismos secretan diversos metabolitos no volátiles que tienen efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas mediante mecanismos directos e indirectos (Dotaniya y Meena, 2015). Ryu *et al.* (2003) reportaron por primera vez un nuevo mecanismo de promoción del crecimiento en plantas mediado por compuestos orgánicos volátiles (VOCs), donde los compuestos volátiles liberados por *Bacillus subtilis* GB03 indujeron el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*, siendo esta la primera evidencia de que los VOCs pueden modular el crecimiento, estrés y nutrición en las plantas.

Los VOCs microbianos son moléculas señal de bajo peso molecular (<300 g/mol), presentan bajo punto de ebullición, alta presión de vapor (0.01kPa a 20°C) y de naturaleza lipofílica que les puede facilitar actuar como infoquímicos para la modulación de procesos fisiológicos y dispersarse a través de aire, agua y suelo (Kanchiswamy *et al.*, 2015). Son de naturaleza química muy variada.

Han sido muchos los estudios sobre el efecto de los compuestos volátiles microbianos realizados desde el primer antecedente de Ryu *et al.* (2003) a la fecha. Varios estudios realizados en este aspecto han utilizado el sistema con los mismos organismos, con variaciones en el tiempo de exposición pero los resultados son similares, se obtiene una promoción del crecimiento de *A. thaliana* por efecto de los VOCs de la cepa GB03. Zhang *et al.* (2009) observaron un incremento del 84% en la concentración de clorofila en la interacción antes mencionada, este parámetro es importante debido a que indica el estado nutrimental en el que se encuentra la planta.

En el 2010, Kwon *et al.* demostraron que la cepa GB03 incrementa significativamente la biomasa de la parte aérea y de la raíz de *A. thaliana* después de 6 días de inoculación. VOCs de otras especies de *Bacillus* han sido probados sobre la promoción del crecimiento. Diferentes especies de *Bacillus* probadas por Gutiérrez-Luna *et al.* (2010) modifican la arquitectura de la raíz, favoreciendo un

incremento en el peso fresco, longitud de la raíz primaria, número y longitud de raíces laterales en *A. thaliana*.

Además de *Bacillus* sp. otras especies gram positivas como *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Penibacillus polymyxa* E681 modulan el crecimiento de plantas mono y dicotiledóneas (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013; Cástulo-Rubio *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012). El efecto de promoción del crecimiento por volátiles bacterianos no es exclusivo de bacterias gram positivas, géneros de bacterias gram negativas como *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Serratia* y *Chromobacterium* (Blom *et al.*, 2011), *Escherichia coli* (Bailly *et al.*, 2014), *Pseudomonas fluorescens* (Park *et al.*, 2015) y *P. simiae* (Vaishnav *et al.*, 2015) tienen efecto promotor del crecimiento en plantas. Además de bacterias, ciertos hongos ha sido reportados que emiten compuestos volátiles que pueden promover el crecimiento y desarrollo de plantas.

La emisión de compuestos volátiles con perfiles específicos depende de manera significativa del ambiente en el que el microorganismo crece. Se han realizado experimentos donde se ha reportado que incluso en condiciones controladas, una cepa bacteriana puede inducir o inhibir el crecimiento dependiendo del medio en el que crece (Asari *et al.*, 2016; Blom *et al.*, 2011; Velázquez-Becerra *et al.*, 2011). En este sentido, *A. agilis* UMCV2 produce el compuesto dimetilhexadecilamina, cuya concentración en el pool de volátiles corresponde al 2.14% cuando la bacteria crece en agar nutritivo y disminuye a 0.8% cuando la cepa crece en medio Lb (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

Los compuestos volátiles microbianos pueden inducir el crecimiento de plantas por cuatro mecanismos: modulación de nutrimentos, balance hormonal, metabolismo y concentraciones de azúcares; y a nivel de regulación genética (estructura celular, respuesta al estrés y proteínas) (Fincheira y Quiroz, 2018; Zhang *et al.*, 2007).

2.5. *Arthrobacter agilis* UMCV2, una rizobacteria endófito que promueve la adquisición de hierro en plantas

En nuestro grupo de trabajo se aisló una bacteria que forma colonias de color rosa oscuro brillante de la rizosfera de maíz (*Zea mays*) crecido en suelo ligeramente ácido, la cual al secuenciar su gen 16S rRNA, fue clasificada como *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). Los miembros del género *Arthrobacter* son Gram-positivos y pertenecen al phylum Actinobacteria, consisten principalmente de estirpes procedentes del suelo, y su ciclo biológico alterna entre formas bacilares durante el crecimiento exponencial y cocáceas en la fase estacionaria (Madigan *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2016). Dentro del género *Arthrobacter* se ha reportado varias especies que ejercen un efecto promotor del crecimiento vegetal (Manzanera *et al.*, 2015).

Algunas características generales de *Arthrobacter agilis* son las siguientes: su ADN contiene un contenido de GC de 67-69%, quimioorganotrófica, saprofítica, su metabolismo es respiratorio, aerobia, no forma esporas, presenta uno o tres flagelos aunque puede haber cepas que no sean móviles, presenta un buen crecimiento entre 20 y 30°C, puede habitar agua, suelo y piel humana (Koch *et al.*, 1995). Además posee atributos que la hacen una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), se ha reportado que podría solubilizar fósforo y zinc, producir ácido indol acético y amonio, producir enzimas activas en frío como lipasa, amilasa, proteasa, quitinasa y β -galactosidasa (Singh *et al.*, 2016).

La clasificación taxonómica de *A. agilis* UMCV2 se muestra a continuación (Singh *et al.*, 2016; Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

Dominio: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Familia: Micrococcaceae

Género: *Arthrobacter*

Especie: *Arthrobacter agilis* Ali-Cohen

Cepa: UMCV2

Arthrobacter agilis UMCV2 es una rizobacteria PGPR que coloniza plantas leguminosas del género *Medicago* en condiciones óptimas de crecimiento, así como en deficiencia de hierro y nitrógeno (Onofre-Ortega, 2013; Aviles-Garcia *et al.*, 2016), de igual manera incrementa el crecimiento de plantas a través de diferentes mecanismos. La cepa UMCV2 estimula el crecimiento vegetal mediante el incremento de la biodisponibilidad de hierro (Valencia-Cantero, *et al.*, 2007), producción del compuesto volátil dimetilhexadecilamina (DMHDA) (Velazquez-Becerra *et al.*, 2011) y por la modulación de los mecanismos de adquisición de hierro en plantas estrategia I y II (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013; Cástulo-Rubio *et al.*, 2015; Hernández-Calderón *et al.*, 2018; Montejano-Ramírez *et al.*, 2018).

Se han realizado trabajos con *A. agilis* UMCV2 en especies con interés forestal como *Pinus devoniana*, donde se ha analizado el impacto que tiene sobre la germinación y el crecimiento de las plantas. Los resultados muestran que la cepa UMCV2 promueve el crecimiento de *P. devoniana* en la primera etapa de desarrollo (primeros 65 días) incrementando la talla de la parte aérea y la proliferación de raíces laterales, además incrementa el índice de germinación (Montejo-Mayo *et al.*, 2016). En un trabajo previo se mostró la habilidad de *A. agilis* UMCV2 para mejorar significativamente la velocidad de crecimiento de *P. devoniana* en condiciones de vivero (Valencia-Cantero *et al.*, 2015), las variables promovidas fueron la altura, grosor del tallo, peso fresco y contenido de clorofila. El compuesto DMHDA indujo un incremento en la concentración de clorofila.

El compuesto volátil DMHDA producido por *A. agilis* UMCV2 tiene una actividad inhibitoria del crecimiento de organismos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi* (Velázquez-Becerra, *et al.*, 2013), otras aminos

producidas por la cepa UMCV2 también presentan actividad antifúngica contra hongos xilófagos (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015).

Las habilidades que presenta *A. agilis* UMCV2 para promover el crecimiento de plantas, hace que sea considerada como una rizobacteria PGPR con potencial para ser utilizada como bioinoculante. Esta rizobacteria fue seleccionada para el presente estudio con base en su relevancia agrícola para contribuir al crecimiento de plantas y su habilidad para inducir mecanismos de adquisición de hierro incluso en condiciones donde no es un elemento limitante.

2.6. *Medicago truncatula*, una planta modelo en las interacciones planta-microorganismo

Las leguminosas son el segundo cultivo más importante en el mundo y una de las fuentes primarias de consumo humano y animales (Cook, 1999; Graham y Vance, 2003). Este tipo de cultivo suele ser popular específicamente porque requieren poca fertilización y usado de una forma apropiada puede servir como fertilizante a otros cultivos, aportando nitrógeno al suelo (Cañas y Beltrán, 2018).

Las plantas leguminosas son un grupo muy utilizado para estudios de biología básica y aplicada, particularmente en el área de interacciones planta-microorganismo, donde se tiene la oportunidad de estudiar la fijación simbiótica de nitrógeno, interacciones micorrícicas e interacciones con patógenos. La inusual capacidad para fijación simbiótica de nitrógeno resalta la importancia de las leguminosas como una fuente de proteína en la dieta humana y de nitrógeno en ecosistemas naturales y agrícolas, además, son reconocidas como una fuente invaluable de metabolitos secundarios (Choi *et al.*, 2004).

Todos los factores antes mencionados han favorecido el incremento de investigaciones en plantas leguminosas. *Medicago truncatula*, es una planta leguminosa descrita por Joseph Gaertner, un médico, micólogo y botánico alemán.

M. truncatula es conocida como barril médico y es nativa de la cuenca mediterránea, su taxonomía es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotiledónea

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Trifolieae

Género: *Medicago*

Especie: *Medicago truncatula* Gaertn

Medicago truncatula es una planta ampliamente utilizada en estudios de genómica funcional y estructural, gracias a los atributos que presenta incluyendo su genoma diploide relativamente pequeño (~375 Mpb, 2n=16) se encuentra secuenciado, autofecundación, producción prolífica de semillas, un rápido tiempo de generación y fácil transformación (Cook, 1999, Cañas y Beltrán, 2018).

Existen diferentes ecotipos (líneas de acceso) de *M. truncatula* con amplias variaciones genéticas (Ellwood *et al.*, 2006). Entre los ecotipos de *M. truncatula* se pueden mencionar dos que son los más utilizados, el ecotipo Jemalong A17 fue utilizado para el proyecto de secuenciación del genoma (Choi *et al.*, 2004), mientras que el ecotipo R108 es frecuentemente utilizado para transformación genética esto debido a que presenta una regeneración *in vitro* superior (Hoffmann *et al.*, 1997).

Existen reportes que muestran que A17 y R108 difieren en sus fenotipos así como en sus respuestas a estrés biótico y abiótico. El metil jasmonato y el etileno inducen una resistencia parcial en el ecotipo Jemalong A17 contra *Macrophomina phaseolina*, respuesta que no fue observada en R108 de acuerdo a lo reportado por Gaige *et al.* (2012). *M. truncatula* A17 es más tolerantes al estrés salino que R108, genes potencialmente asociados con la respuesta celular a este tipo de estrés

fueron expresados en el genotipo más tolerante incluso en ausencia del estímulo (de Lorenzo *et al.*, 2007).

En otro estudio, se comparó la tolerancia de los ecotipos Jemalong A17 y R108 al estrés hídrico donde se observó que A17 tiene una mayor respuesta de adaptación mediante varios mecanismos, por ejemplo, A17 tiene una mayor sensibilidad al ácido abscísico que se manifestó por un mayor cierre estomático y una pérdida de agua más lenta, se observó una menor marchitez y un mayor contenido de agua en estrés hídrico (Luo *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2014) realizaron un estudio comparativo entre los ecotipos A17 y R108 de *M. truncatula* en condiciones de deficiencia de hierro. Los resultados muestran que las plantas A17 presentan una mayor actividad de FRO que R108, mientras que la expresión de gen fue similar entre los dos ecotipos. Además, la expresión del *MtIRT* y *MtFRD3* incrementó significativamente en el ecotipo A17 en comparación con R108. Estos resultados sugieren que *M. truncatula* A17 y R108 difieren en su respuesta y adaptación a la deficiencia de hierro, donde el etileno puede jugar un papel importante en el incremento en la tolerancia del ecotipo Jemalong A17 a la deficiencia de Fe.

Además de los estudios arriba mencionados *M. truncatula* produce una gran variedad de productos naturales que tienen impacto en el mutualismo así como en la defensa contra enfermedades. Ésta leguminosa ha sido utilizada para estudiar las rutas de fenilpropanoides, isoflavonoides y flavonoides (Farag *et al.*, 2008; Mouradov y Spangenberg, 2014), respuestas de defensa (Yang *et al.*, 2008), y arquitectura de la raíz (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006).

2.7. Espectrometría de masas, una plataforma analítica para el perfilado metabolómico.

El papel de la espectrometría de masas en el análisis de biomoléculas se ha convertido importante en las últimas décadas. La enorme diversidad química y el amplio rango de metabolitos son los principales desafíos analíticos en la actualidad. Si bien no existe una plataforma que pueda capturar todos los metabolitos en las diversas muestras biológicas, la metabolómica basada en la espectrometría de masas (MS) proporciona la mejor herramienta. Un enfoque analítico comprensivo debería ser llevado cabo para separar y cuantificar componentes del metaboloma entero. El uso combinado de múltiples enfoques incrementa la cobertura del metaboloma, proveyendo características sensibles y confiables de los metabolitos.

El principal objetivo de la metabolómica es analizar tantos compuestos como sea posible en una sola corrida, sin embargo, la plataforma analítica elegida determina la clase de compuestos que pueden ser detectados (Sumner *et al.*, 2015).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) es una de las técnicas más comúnmente usadas para la determinación de metabolitos volátiles y no polares. Los metabolitos a analizar podrían ser separados por gradientes de temperatura en una columna capilar, dichos compuestos son detectados y medidos por una serie de analizadores de masas incluidos cuadrupolo sencillo (SQ), triple cuadrupolo (QQQ), tiempo de vuelo (TOF) y orbitrap. GC-MS presenta una ventaja, la ionización por impacto electrónico cuenta con una gran librería de espectros de masas, además las condiciones de ionización son fáciles de estabilizar y tienen buena reproducibilidad (Luan *et al.*, 2017).

Un estudio de metabolómica no dirigida en exudados radiculares con GC-MS fue el realizado por Watson *et al.* (2015), donde gracias a esta plataforma encontraron que

existe un metabolismo especializado en las células border de la raíz de *M. truncatula*, detectando aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, beta alanina y urea.

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) ha sido ampliamente utilizada en estudios metabolómicos. Los principales analitos para LC-MS incluyen compuestos polares, compuestos no volátiles y compuestos termoestables. De acuerdo a la polaridad de los compuestos de interés puede utilizarse cromatografía líquida de fase reversa o cromatografía de interacción hidrofílica. En esta plataforma pueden utilizarse los siguientes analizadores: QQQ-MS, LTQ-MS, TOF-MS, QTOF-MS y Orbitrap-MS. Para las reacciones en tándem (MS/MS) suele utilizarse Orbitrap o QTOF-MS (Luan *et al.*, 2017).

El listado de estudios realizados con esta plataforma para el análisis de exudados es muy amplio al igual que las especies sobre las que se ha trabajado. Se han analizado exudados de *Arabidopsis thaliana* (Strehmel *et al.*, 2014), *Beta vulgaris* (Khorassani *et al.*, 2011), *Eperua falcata* (Michalet *et al.*, 2013), *Heracleum mantegazzianum* (Jandová *et al.*, 2015), *Medicago truncatula* (Watson *et al.*, 2015), *Solanum lycopersicum* (Escudero *et al.*, 2014), *Zea mays* (Marti *et al.*, 2013).

Espectrometría de masas por imagen

Espectrometría de masas por imagen (IMS) ha sido desarrollada y aplicada para analizar la distribución espacial de composiciones químicas con sus masas moleculares, esta plataforma ha emergido como una herramienta metabolómica atractiva. La aplicación de IMS no necesita conocimiento previo de las muestras a analizar y proporciona alto rendimiento en los metabolitos con precisión en la masa, la cual diferente de las técnicas de imagen tradicionales como la radioquímica e inmunoquímica (Luan *et al.*, 2017).

En adición al uso extensivo de las técnicas de MS anteriormente mencionadas, algunas plataformas han hecho avances significativos como por ejemplo inserción de líquidos directa y electroforesis capilar (CE-MS) (Ramautar *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad microbiana del suelo juega un papel importante en la absorción de hierro por las plantas. *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una bacteria que se aisló en nuestro grupo de trabajo, tiene la capacidad de reducir hierro y sus compuestos orgánicos volátiles inducen mecanismos de adquisición de este elemento en plantas, sin embargo, se desconoce si estos compuestos volátiles bacterianos modulan el metabolismo de las plantas en respuesta al estrés por deficiencia de hierro.

Este estudio tiene la finalidad de determinar si los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 pueden modular el metaboloma de *M. truncatula* crecida en deficiencia de hierro y promover la tolerancia de la planta al estrés, además, analizar el efecto de los cambios metabolómicos sobre el perfil químico de los exudados radiculares.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulan el metaboloma de *Medicago truncatula* contribuyendo a la tolerancia de la planta al estrés por la deficiencia de hierro.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar si los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulan el metaboloma de *Medicago truncatula* promoviendo la tolerancia de la planta al estrés por deficiencia de hierro.

5.2. Particulares

1. Determinar el efecto de la deficiencia de hierro y de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento y desarrollo de *M. truncatula*.
2. Analizar el perfil químico de metabolitos de plantas crecidas en deficiencia de hierro y expuestas a los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2.
3. Determinar si los compuestos volátiles de emitidos por la bacteria *A. agilis* UMCV2 modulan la exudación radicular en plantas de *M. truncatula* crecida en estrés por deficiencia de hierro.

6. RESULTADOS

6.1. Capítulo I

Los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 promueven el crecimiento y desarrollo en plántulas de *Medicago truncatula* en suficiencia y deficiencia de hierro

6.2. Capítulo II

A Mass Spectrometry-Based Study Shows that Volatiles Emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 Increase the Content of Brassinosteroids in *Medicago truncatula* in Response to Iron Deficiency Stress.

6.3. Capítulo III

Los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 modifican el perfil químico de exudación de *Medicago truncatula* en suficiencia y deficiencia de hierro

6.1. Capítulo I

LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Arthrobacter agilis* UMCV2 PROMUEVEN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN PLÁNTULAS DE *Medicago truncatula* EN SUFICIENCIA Y DEFICIENCIA DE HIERRO

RESUMEN

El hierro es un microelemento esencial para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas. La deficiencia de hierro produce clorosis férrica, limita el crecimiento vegetal y disminuye la producción de los cultivos. Los microorganismos benéficos del suelo facilitan la adquisición de hierro en las plantas; tal es el caso de la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 que modula los mecanismos de toma de hierro en plantas de *Medicago truncatula* en suficiencia y deficiencia de este nutriente. El objetivo de este estudio fue determinar si los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 promueven el crecimiento y desarrollo de plántulas de *M. truncatula* crecidas en deficiencia de hierro. La carencia del nutriente afectó negativamente el crecimiento y de desarrollo de las plántulas; sin embargo los volátiles de la cepa UMCV2 contribuyeron al incremento de la biomasa en la condición de suficiencia y modularon en forma positiva parámetros asociados a la estructura de la raíz en las plántulas crecidas en deficiencia de Fe. Por lo tanto, los volátiles de *A. agilis* UMCV2 promueven el crecimiento y desarrollo vegetal aún en condiciones adversas de crecimiento como lo es la deficiencia de hierro.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para crecimiento y desarrollo de las plantas, este elemento está involucrado en varios procesos metabólicos como fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno, síntesis de ADN, producción de hormonas y biosíntesis de clorofila (Guerinot y Yi, 1994). El Fe es un microelemento abundante en los suelos, sin embargo, en condiciones alcalinas su biodisponibilidad es limitada lo que resulta en una clorosis férrica que se manifiesta como un amarillamiento de las hojas más jóvenes, una clorosis intervenal y la reducción en el crecimiento y producción vegetal (Prasad, 2003). Esto se debe a que la forma predominante en estas condiciones es la férrica (Fe^{+3}) mientras la forma asimilable por las plantas es la ferrosa (Fe^{+2}). Los síntomas de la deficiencia de hierro en soya son tan pronunciados que la mayoría de los estudios publicados sobre la clorosis férrica son referidos a esta especie.

La principal reacción de las plantas dicotiledóneas para contrarrestar la deficiencia de hierro es llevar a cabo una estrategia basada en la reducción del metal y así incrementar su disponibilidad. Esta estrategia es conocida como estrategia I y es llevada a cabo por todas las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y consta de tres pasos, i) acidificación de la rizosfera por proteínas H^+ -ATPasa, ii) reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} por una férrico quelato reductasa (FRO) y iii) absorción de Fe^{+2} por el transportador IRT1 (Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Se ha reportado que rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) mediante sus compuestos volátiles bacterianos pueden modular tanto el crecimiento como el desarrollo de plantas (Ryu *et al.*, 2003). Además, en condiciones de carencia de hierro, los volátiles bacterianos pueden regular mecanismos de adquisición de hierro en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2009).

Arthrobacter agilis UMCV2 es una bacteria rizosférica que fue aislada por nuestro grupo de trabajo (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). *A. agilis* UMCV2 presenta ciertas

características que la hacen un buen modelo de estudio, en trabajos previos se ha observado que mediante sus compuestos volátiles promueve el crecimiento de plantas con estrategia I y II para la adquisición de hierro (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013; Cástulo-Rubio *et al.*, 2015).

En el caso particular de la interacción de *A. agilis* UMCV2 con *M. truncatula* se ha observado un incremento en la expresión de genes MtFRO (férico quelato reductasa) (Montejano-Ramírez *et al.*, 2018). Cuando la interacción es mediada por compuestos volátiles de UMCV2 y las plantas son crecidas en suficiencia y transplantadas a un medio con baja disponibilidad de hierro, se ha documentado que el contenido de hierro y la actividad reductasa se incrementan, al igual que la acidificación de la rizosfera (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013). Por lo que resulta interesante esclarecer si los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 promueven el crecimiento y desarrollo vegetal en plantas crecidas de forma permanente en condiciones de deficiencia de hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Para este estudio, las semillas de *M. truncatula* fueron escarificadas con ácido sulfúrico durante 8 min, desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 12% por 2 min y enjuagadas varias veces con agua desionizada estéril. Las semillas estériles fueron vernalizadas durante 4 días a 4°C en placas de agar con 0.6% de agar (Agar Plant, grado micropropagación) y 0.6% de sacarosa.

Las semillas vernalizadas fueron llevadas a una cámara de crecimiento a 22°C con fotoperiodo de 16h luz/ 8h oscuridad y 6100 lx para su germinación. Para el montaje del experimento se utilizaron plántulas de tres días de germinadas, las cuales fueron colocadas en frascos de vidrio con 35 ml de medio Hoagland solidificado con 0.6% de agar y pH 6.5. En todos los tratamientos se colocaron tres plantas por frasco.

El medio Hoagland base fue preparado con las siguientes concentraciones de sales: 1020 ppm KNO₃, 492 ppm Ca(NO₃)₂×4H₂O, 230 ppm NH₄H₂(PO₄), 490 ppm MgSO₄×7H₂O, 2.80 ppm H₃BO₃, 1.81 ppm MnCl₂×2H₂O, 0.08 ppm CuSO₄×5H₂O, 0.22 ppm ZnSO₄×5H₂O y 0.09 ppm Na₂MoO₄×H₂O. La adición de FeSO₄ a una concentración final de 20 µM correspondió al tratamiento +Fe y su ausencia al tratamiento -Fe. Las plantas se dejaron crecer en cámara de crecimiento (Percival) durante 21 días en condiciones controladas de luz y temperatura (22°C, 16h luz / 8h oscuridad y 6100 lx).

Arthrobacter agilis UMCV2 (CECT_7743) fue crecida en agar nutritivo (3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona y 15 g/L de agar bacteriológico) a 22°C. La rizobacteria comensal *Bacillus* sp L264 fue utilizada como control (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010; Hernández-Calderón *et al.*, 2018). La cepa L264 fue crecida en condiciones similares a *A. agilis* UMCV2.

Sistema de interacción *M. truncatula* - *A. agilis* UMCV2

El sistema de interacción utilizado fue de compartimentos separados de acuerdo a lo reportado por Orozco-Mosqueda *et al.*, (2013), para lo cual se empleó un vial de vidrio de 4 mL donde se agregaron 2 mL de agar nutritivo. Posteriormente, el vial fue introducido a un frasco con medio Hoagland, previo al trasplante de las plántulas. Tres plántulas fueron transferidas a cada frasco, se dejaron crecer durante dos días y se adicionaron 50 µL del inóculo bacteriano al vial. Las plantas crecieron en interacción con los volátiles bacterianos durante 10 días en cámara de crecimiento con las condiciones controladas previamente mencionadas y al finalizar ese tiempo se registraron las variables de acumulación de biomasa, longitud de la raíz principal, número de raíces laterales, altura y contenido de clorofila con un medidor CCM-200.

RESULTADOS

Efecto de la deficiencia de hierro sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *M. truncatula*

Las Figs. 1a y b muestran fotografías representativas de plántulas de *M. truncatula* de 21 días de crecimiento. El desarrollo de las plantas no mostró cambios en la parte aérea, se presentaron tres hojas trifoliadas bien desarrolladas con suficiencia (+Fe) y deficiencia de hierro (-Fe). El fenotipo clorótico fue evidente en las plantas del tratamiento -Fe. Adicionalmente, la deficiencia de hierro afectó de manera significativa el sistema radicular (Figs. 2c, d).

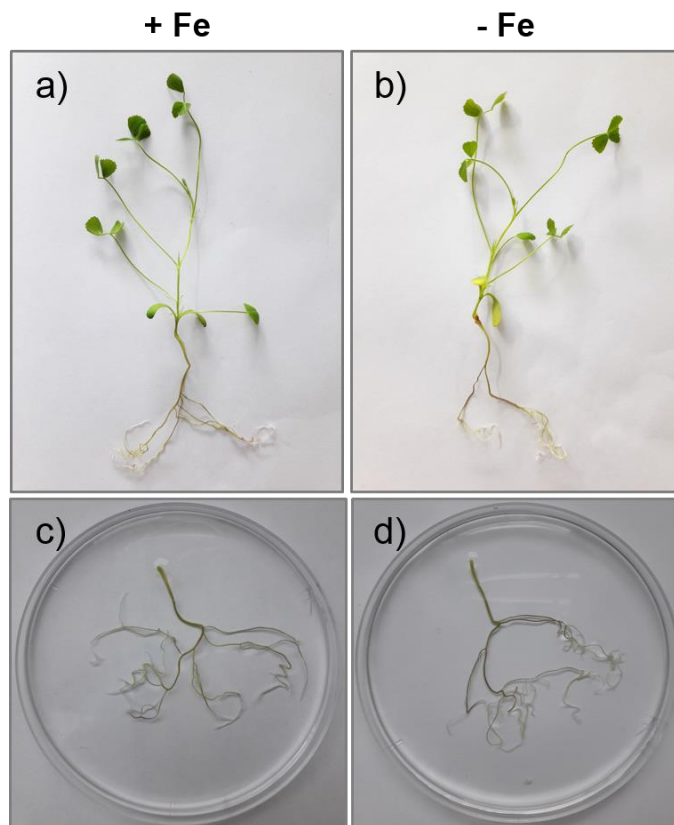


Figura 1. Plántulas de *Medicago truncatula* crecidas 21 días en diferente disponibilidad de hierro en el medio. a) Plántulas crecidas en suficiencia de hierro (+Fe) y b) deficiencia de hierro (-Fe). c) Raíz desarrollada en +Fe y raíz de 21 días en -Fe (d).

La clorosis es un indicativo de deficiencia de hierro y la variable más común para medir este parámetro es el contenido de clorofila, un pigmento importante involucrado en el proceso de fotosíntesis. En la Fig. 2f se muestra el contenido de clorofila medido en la última hoja bien desarrollada de las plántulas de *M. truncatula*, donde se observa una disminución significativa del 25.8% en el contenido de este pigmento en las plantas crecidas en deficiencia de hierro (-Fe).

Algunos parámetros de crecimiento como la biomasa y la altura, se suelen afectar cuando una planta se encuentra sometida a algún tipo de estrés. En este estudio la deficiencia de hierro disminuyó significativamente la biomasa del follaje y de las raíces de las plantas (Figs. 2a, b), de igual manera la altura se afectó negativamente (Fig. 2e). El sistema radicular fue afectado en cuanto a la cantidad de raíces laterales (Fig. 2d), la longitud de la raíz primaria fue similar entre las dos condiciones de disponibilidad de hierro (Fig. 2c).

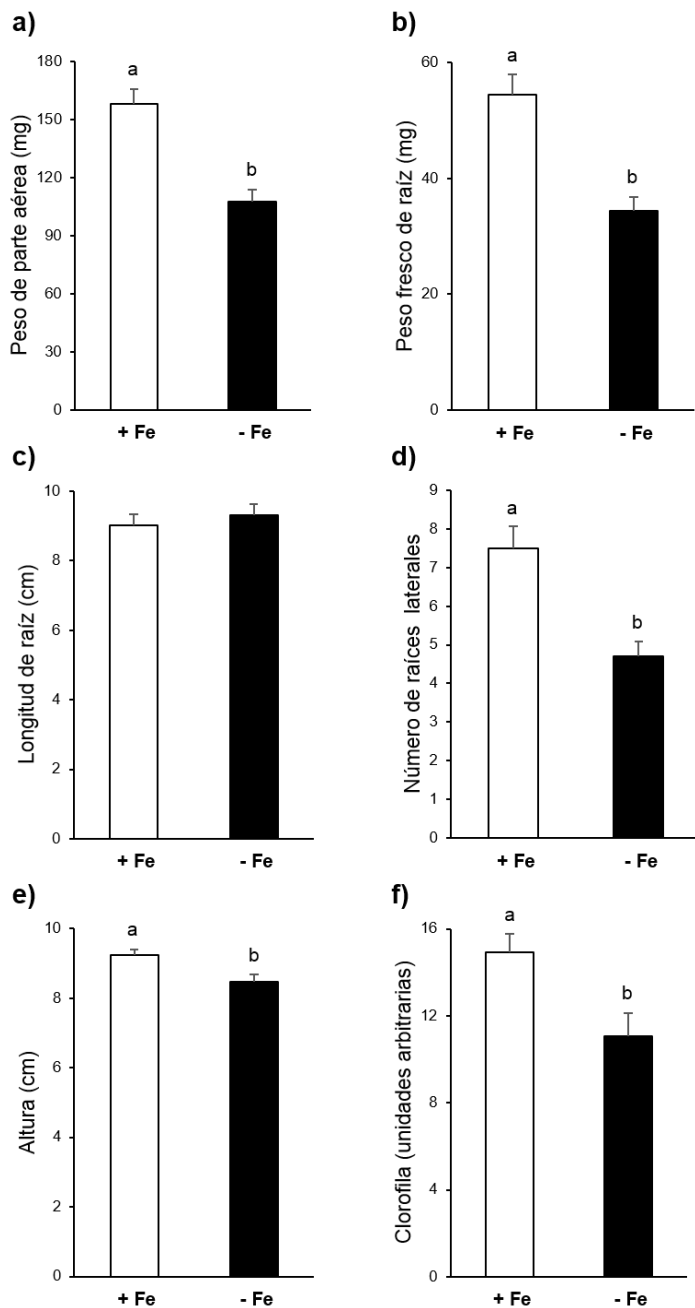


Figura 2. Parámetros de crecimiento y desarrollo de plántulas de *M. truncatula* crecida 21 días con diferente disponibilidad de hierro en el medio. Los datos representan la media de 10 plantas \pm error estándar, letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por ANOVA seguida de la prueba de medias Tukey HSD.

Efecto de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 en plántulas de *M. truncatula* crecidas en deficiencia de hierro

Las plántulas de *M. truncatula* crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro se desarrollaron en interacción con los volátiles bacterianos de las cepas UMCV2 y L264 durante 10 días. Debido a que a los 10 días de crecimiento las plantas mostraron evidencia visual del efecto del estrés por deficiencia de hierro, el registro de las variables de crecimiento y desarrollo se realizó en ese tiempo.

Para la condición control, es decir, sin exposición a volátiles bacterianos, los resultados indicaron que el peso fresco de la parte aérea tiende a disminuir en el tratamiento -Fe (Fig. 3a), pero el peso de la raíz no se afectó en plantas de esa edad (Fig. 2b). Por otro lado, se observó una diferencia significativa en la altura de la planta (Fig. 4a), la longitud de la raíz principal (Fig. 4b) y el número de raíces laterales (Fig. 4c). En plántulas de *M. truncatula* crecidas durante 10 días en deficiencia de hierro se observaron efectos similares a las plantas de 21 días en esta condición.

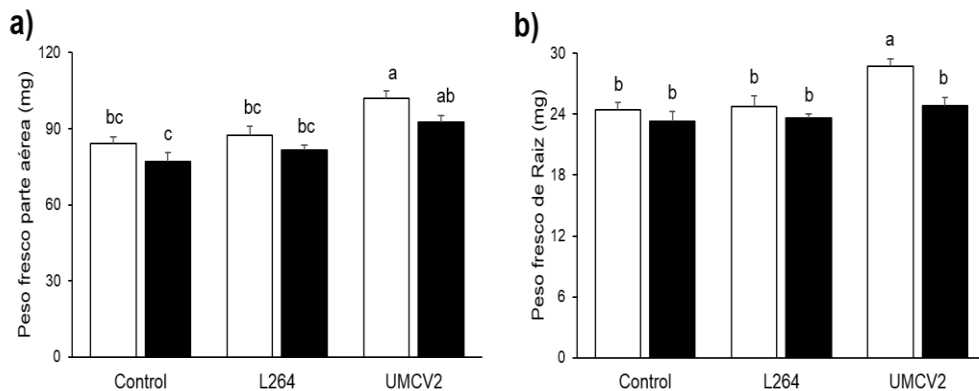


Figura 3. Efecto de los volátiles bacterianos de *A. agilis* UMCV2 y *Bacillus* sp. L264 en la biomasa de plántulas de *M. truncatula* en suficiencia y deficiencia de hierro a los 10 días de interacción. Barras blancas indican suficiencia de hierro y barras negras deficiencia. Los datos representan la media de 20 plantas \pm error estándar, letras distintas indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por ANOVA factorial seguida de Tukey HSD.

En cuanto a la condición de suficiencia (+Fe) se observó que la exposición de las plántulas a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 incrementó la biomasa aérea y radicular de manera significativa (Figs. 3a, b). Los compuestos volátiles de la cepa L264 no tuvieron efecto sobre el peso del follaje ni de la raíz.

Por otro lado, los volátiles de UMCV2 no promovieron la altura ni la longitud de la raíz principal, pero se observó una tendencia al incremento en el número de raíces laterales (Figs. 3a, b, c) en la condición de suficiencia de hierro. Interesantemente, los compuestos de la cepa L264, tienden a disminuir la longitud de la raíz principal en la condición de suficiencia de hierro (Fig 3b).

En cuanto a la condición de deficiencia de hierro, la exposición de las plantas a los volátiles bacterianos aminoró el efecto de la carencia nutrimental sobre el peso fresco de la parte aérea (Fig. 3a), la altura de la planta (Fig. 4a) y específicamente en el caso de la UMCV2, el número de raíces laterales (Fig. 4c).

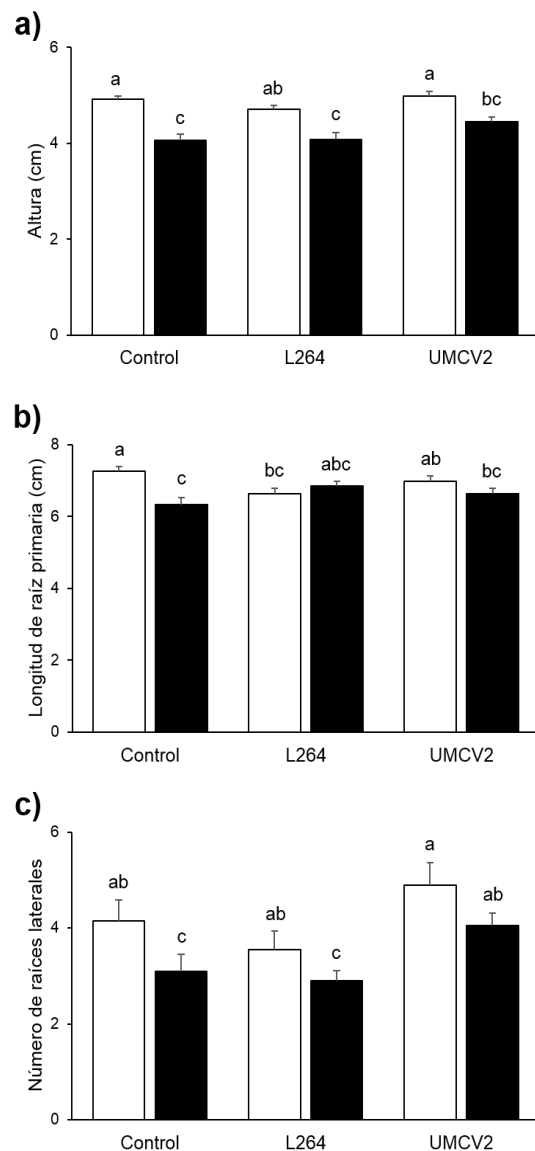


Figura 4. Efecto de los volátiles bacterianos producidos por *A. agilis* UMCV2 y *Bacillus* sp L264 sobre distintos parámetros de desarrollo de *M. truncatula* crecida suficiencia y deficiencia de. Plantas de 10 días de interacción. Barras blancas indican suficiencia de hierro y barras negras deficiencia. Los datos representan la media de 20 plantas \pm error estándar, las letras indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por ANOVA factorial seguida de Tukey HSD.

DISCUSIÓN

El hierro (Fe) es un metal abundante en la corteza terrestre pero en condiciones alcalinas su biodisponibilidad disminuye, debido a esto su carencia se ha convertido en un problema alrededor del mundo, donde más de la tercera parte de los suelos arables son potencialmente deficientes en hierro (Guerinot *et al.*, 2007).

En este estudio la carencia de hierro en el medio de cultivo de las plantas de *M. truncatula* a los 10 y 21 días del tratamiento tuvo un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo de la plantas. Se ha demostrado que el hierro es un factor limitante para la producción de biomasa y semillas en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Ravet *et al.*, 2012) así como en cultivos de tomate (Jin *et al.*, 2009), espinaca (Jin *et al.*, 2013) y arroz (Takahashi *et al.*, 2001).

Las raíces de las plantas son el órgano que perciben las deficiencias nutrimentales y responden con modificaciones en su estructura para adaptarse a las nuevas condiciones. Los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 incrementaron el número de raíces laterales (Fig. 4c) contribuyendo con esto a aminorar el estrés impuesto por la deficiencia de hierro, favoreciendo el área de exploración de la raíz.

En plantas control de 10 días de estrés (-Fe), la longitud de la raíz primaria disminuyó significativamente (Fig. 4b). Lo mencionado anteriormente indica que la longitud de la raíz primaria se altera por efecto de la carencia de hierro en el medio en los primeros estadios de desarrollo de la planta, posteriormente, como un mecanismo de adaptación al estrés ésta se desarrolla para incrementar la exploración en búsqueda del nutrimento (Fig. 2c).

Es importante mencionar que la cepa *Bacillus* sp. L264 ha sido reportada con anterioridad por Hernández-Calderón *et al.* (2018) como una cepa neutra en cuanto a su efecto sobre la exudación en plantas de Sorgo (*Sorghum bicolor*, planta estrategia II para la adquisición de hierro); con los resultados obtenidos en este trabajo se observa que la cepa L264 no tiene una contribución significativa sobre la tolerancia al estrés por hierro, proveyendo datos similares al control negativo utilizado (agua) para el caso del estudio de interacción.

Arthrobacter agilis UMCV2 modula positivamente algunos parámetros de crecimiento en las plántulas del género *Medicago*, efecto ya reportado con

anterioridad. Velázquez-Becerra *et al.* (2011) crecieron plántulas de *Medicago sativa* en interacción con los compuestos volátiles de UMCV2 en condiciones de suficiencia de hierro, en este estudio se evaluó el efecto de la presencia de los volátiles en la planta sobre el tiempo. Los resultados mostraron que a las 48 h de exposición, parámetros como biomasa, longitud de la raíz y longitud del tallo se incrementaron significativamente con respecto a las plantas control.

Además, Orozco-Mosqueda *et al.* (2013) crecieron plántulas de *M. truncatula* en condiciones óptimas de crecimiento (medio MS completo y 100 μM de Fe) y posteriormente fueron transferidas a medio con baja disponibilidad de Fe (1 μM) y con la presencia de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 durante 48 h. Los resultados reportados fueron un incremento significativo en la biomasa de la plántula en condiciones de suficiencia y baja disponibilidad de hierro, así como en otros parámetros asociados a la toma de hierro por la planta en comparación con las plantas control.

Es importante mencionar con base en los trabajos previos realizados sobre el efecto de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 en plántulas de *Medicago* sp., que las plantas estuvieron expuestas a los volátiles microbianos por un periodo corto de tiempo (48 h) y en este estudio la presencia de los compuestos volátiles fue por un tiempo más prolongado (10 días) y además las plántulas estuvieron expuestas a las dos condiciones de disponibilidad de hierro a partir de la germinación. Entonces, los resultados generados en este estudio demuestran que los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 inducen cambios fisiológicos en las plántulas de *M. truncatula* que aminoran el efecto de la deficiencia de hierro aún cuando las plantas se encuentran crecidas de forma permanente en condiciones de deficiencia de hierro, por lo que resultaría interesante estudiar el tipo de metabolitos que se inducen en respuesta a los compuestos bacterianos y al estrés por deficiencia de hierro.

LITERATURA CITADA

Cástulo-Rubio, D.Y.; Alejandre-Ramírez, N.A.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Santoyo, G.; Macías-Rodríguez, L.I.; Valencia-Cantero, E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription in vitro. *J. Plant Growth Regul.* 2015, 34:611-623.

Guerinot, M.L.; Yi, Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol.* 1994, 104:815-820.

Gutiérrez-Luna, F.M.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Valencia-Cantero, E.; Reyes-de la Cruz, H.; Macías-Rodríguez, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 2010, 51, 75-83.

Hernández-Calderón, E.; Aviles-Garcia, M.E.; Castulo-Rubio, D.Y.; Macías-Rodríguez, L.; Montejano-Ramírez, V.; Santoyo, G.; López-Bucio, J.; Valencia-Cantero, E. Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant Mol. Biol.* 2018, 96:291-304.

Jin, C.W.; Du, S.T.; Chen, W.W.; Li, G.X.; Zhang, Y.S.; Zheng, S.J. Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under iron-limited conditions in tomato. *Plant Physiol.* 2009, 150:272-280.

Jin, C.W.; Liu, Y.; Mao, Q.Q.; Wang, Q.; Du, S.T. Mild Fe-deficiency improves biomass production and quality of hydroponic-cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem.* 2013, 138:2188-2194.

Kobayashi, T.; Nishizawa, N. K. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev Plant Biol.* 2012, 63:131-152.

Montejano-Ramírez, V.; Martínez-Cámara, R.; García-Pineda, E.; Valencia-Cantero, E. Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of *FRO* genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant* 2018, 40:138.

Orozco-Mosqueda, M.C.; Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; Santoyo, G.; Flores-Cortez, I.; Alfaro-Cuevas, R.; Valencia-Cantero, E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 2013, 362:5166.

Prasad, P.V.V. Plant nutrition: iron Chlorosis. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*; Thomas, B., Murphy, D.J., Murray, B.G., Eds.; Elsevier: London, UK, 2003; pp. 649-656.

Ravet, K.; Reyt, G.; Arnaud, N.; Krouk, G.; Djouani, E.B.; Boucherez, J.; Briat, J.F.; Gaymard, F. Iron and ROS control of the DownStream mRNA decay pathway is essential for plant fitness. *EMBO J.* 2012, 3:175-186.

Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Pare, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS* 2003, 100:4927-4932.

Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Kawasaki, S.; Nishizawa, N.K.; Mori, S. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19:466-469.

Valencia-Cantero, E.; Hernández-Calderón, E.; Velázquez-Becerra, C.; López-Meza, J.E.; Alfaro-Cuevas, R.; López-Bucio, J. Role of dissimilatory fermentative

iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* 2007, 291:263-273.

Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Flores-Cortez, I.; Valencia-Cantero, E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 2011, 339:329-340.


Zhang, H.; Sun, Y.; Xie, X.; Kim, M.S.; Dowd, S.E.; Paré, P.W. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009, 58:568-577.

6.2. Capítulo II



Article

A Mass Spectrometry-Based Study Shows that Volatiles Emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 Increase the Content of Brassinosteroids in *Medicago truncatula* in Response to Iron Deficiency Stress

Idolina Flores-Cortez ¹, Robert Winkler ² , Arturo Ramírez-Ordorica ¹, Ma. Isabel Cristina Elizarraraz-Anaya ², María Teresa Carrillo-Rayas ², Eduardo Valencia-Cantero ¹ and Lourdes Macías-Rodríguez ^{1,*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria, Morelia 58030, Michoacán, Mexico

² Department of Biotechnology and Biochemistry, Cinvestav Unidad Irapuato, Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Guanajuato 36824, Mexico

* Correspondence: lmacias@umich.mx; Tel.: +52-443-3223500 (ext. 4237); Fax: +52-443-3265788 (ext. 103)

Received: 6 July 2019; Accepted: 10 August 2019; Published: 20 August 2019



Abstract: Iron is an essential plant micronutrient. It is a component of numerous proteins and participates in cell redox reactions; iron deficiency results in a reduction in nutritional quality and crop yields. Volatiles from the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 induce iron acquisition mechanisms in plants. However, it is not known whether microbial volatiles modulate other metabolic plant stress responses to reduce the negative effect of iron deficiency. Mass spectrometry has great potential to analyze metabolite alterations in plants exposed to biotic and abiotic factors. Direct liquid introduction-electrospray-mass spectrometry was used to study the metabolite profile in *Medicago truncatula* due to iron deficiency, and in response to microbial volatiles. The putatively identified compounds belonged to different classes, including pigments, terpenes, flavonoids, and brassinosteroids, which have been associated with defense responses against abiotic stress. Notably, the levels of these compounds increased in the presence of the rhizobacterium. In particular, the analysis of brassinolide by gas chromatography in tandem with mass spectrometry showed that the phytohormone increased ten times in plants grown under iron-deficient growth conditions and exposed to microbial volatiles. In this mass spectrometry-based study, we provide new evidence on the role of *A. agilis* UMCV2 in the modulation of certain compounds involved in stress tolerance in *M. truncatula*.

Keywords: legumes; microbial volatiles; Fe deficiency; DLI-ESI-MS

1. Introduction

Mass spectrometry (MS) is gaining considerable popularity for profiling metabolites in complex biological samples. The increased applications have led to the improvement of MS technology in sample introduction, ionization source, mass analyzer, ion detection, and data acquisition and processing. Direct liquid introduction-electrospray ionization-mass spectrometry (DLI-ESI-MS, the acronym recommended by the Analytical Methods Committee [1]) is a rapid and high-throughput analytical tool that has been successfully applied in medicine and food and biological sciences [2–5]. DLI-ESI-MS does not require preliminary sample separation, and it can be applied to multiple biological

matrices. The straightforward sample introduction allows for simultaneous fingerprinting of a vast number of metabolites from different samples within a single period. In addition, different studies support the repeatability of DLI-ESI-MS data, and the quantification of the intensity of the ion signals (m/z) with a larger variance in plants because of environment, physiological state, or the genotype can also be performed [5–7]. High analytical performance (sensitivity, selectivity) allows it to be used for untargeted metabolomics screening approaches for different plant extracts; thus it offers an excellent cost-benefit ratio compared to other analytical platforms such as near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), and GC-MS, which are slow and expensive to use for routine plant biochemistry studies [2]. Due to the various benefits reported for DLI-ESI-MS, we decided to conduct a study to determine its usefulness in microbial ecology research, as DLI-ESI-MS provides robust chemical information, is bioinformatically easy to handle, and could help us understand the chemical response of plants to abiotic or biotic factors.

Iron (Fe) is an essential micronutrient for plant growth and crop productivity. Plants acquire Fe mainly from the rhizosphere; therefore, the mechanisms that regulate Fe acquisition and homeostasis in the plant are of interest. The role of specific metabolites such as nitric oxide, ferritin, phenolic compounds, and brassinosteroids (BRs) have been highlighted in Fe-deficient growth conditions, indicating that plants undergo significant metabolic changes during Fe-adaptive processes [8–17].

In an attempt to make agriculture a viable component of a healthy and pleasant ecosystem, the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to enhance Fe uptake and transport in plants is an excellent biotechnology strategy. PGPR are soil bacteria that colonize the rhizosphere of plants, stimulating plant growth and health through different mechanisms, such as phosphorus solubilization or nitrogen-fixation, and the production of phytohormones or siderophores to capture Fe from the environment in biologically useful forms [18]. In 2003, Ryu et al. reported that some PGPR can modulate the growth and development of plants without physical contact with them. This mechanism involves the production of volatile compounds such as, acetoin and 2,3-butanediol, which modulate the mechanisms of phytohormone signaling and therefore stimulate morphogenesis programs in plants [19]. Six-years later, Zhang et al. (2009) noted, that the same microbial volatiles can modulate Fe uptake in *Arabidopsis* via deficiency-inducible mechanisms [20].

The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 used in this study, was isolated from the rhizosphere of maize (*Zea mays*) [21]. It emits a pool of volatiles that promotes the growth of leguminous and monocotyledonous plants with different levels of available Fe [22–24]. Notably, in *Medicago truncatula*, the UMCV2 strain increased the expression of genes involved in Fe uptake (*MtFRO1*, *MtFRO2*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, and *MtFRO5*) under Fe-sufficient and -deficient conditions [25]. Nevertheless, those studies focused on elucidating the molecular mechanisms involved in the modulation of Fe acquisition responses. Thus, one question remaining is whether microbial volatiles modulate the production of other primary or secondary metabolites in plants to ameliorate Fe-deficiency stress.

Here, we used a DLI-ESI-MS method as an untargeted mass spectrometry strategy to study the metabolic profiles of *M. truncatula* seedlings grown under Fe-sufficient and -deficient conditions. We focused on the detection of significant differences among MS profiles to determine whether volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2 alleviate plant stress and stimulate the accumulation of metabolites involved in abiotic stress tolerance; in addition, we used a complementary GC-MS method to confirm the identification of brassinolide, which is involved in Fe-adaptive processes in plants.

2. Results

2.1. DLI-ESI-MS in the Analysis of Fe Deficiency in *Medicago truncatula* Seedlings and Response to Bacterial Volatiles

Under conditions of Fe deficiency, plants adjust their metabolism to maintain cellular Fe homeostasis. Some visual symptoms of Fe deficiency, such as leaf yellowing (Figure 1d–f) and decreased plant size (Figure 1g) were observed in our experiments in comparison to plants grown

under Fe sufficiency (Figure 1a–c). Additionally, we studied plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2, a rhizobacterium that induces Fe acquisition in plants (Figure 1c,f), and plants exposed to volatiles from *Bacillus* sp. L264, a commensal rhizobacterium (Figure 1b,e). As we expected, volatiles from the UMCV2 strain, had a stimulatory effect on plant growth under Fe-sufficient and -deficient growth conditions (Figure 1g).

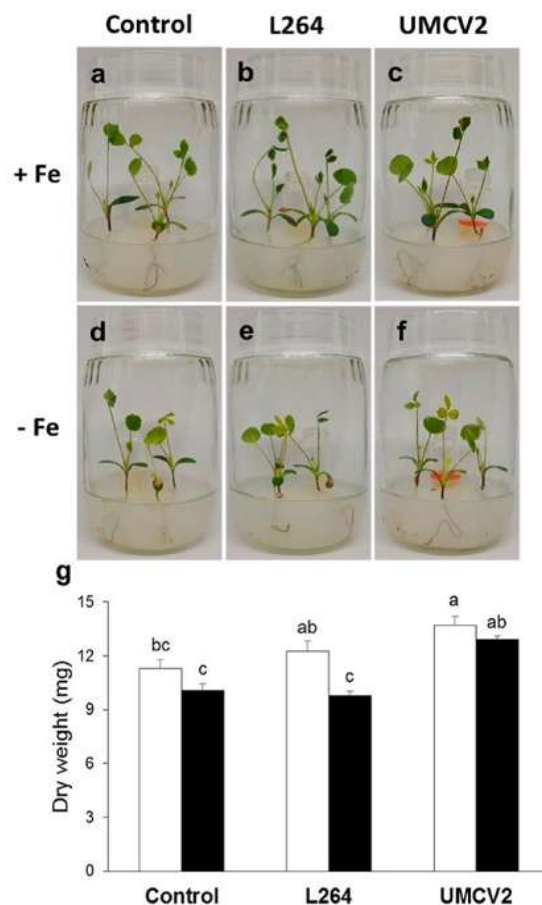


Figure 1. Interaction between *Medicago truncatula* and rhizobacteria through the emission of volatile compounds. A 4 mL glass vial with 2 mL nutritive agar medium was inserted in each system; in the control system, 20 μ L water was added into the vial instead of the bacterial inoculum. The interaction lasted for 10 days. Uninoculated 12-day-old plants grown under conditions of iron (Fe) sufficiency (a) and deficiency (d). (b) Plants were inoculated with the commensal strain *Bacillus* sp. L264 grown under Fe-sufficient and -deficient conditions (e). Inoculated plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2 and under Fe-sufficient (c) and -deficient conditions (f). (g) Dry weights of control plants and plants during interactions with bacterial volatile compounds. Data shown are means \pm standard error (n = 15). White and black bars indicate Fe-sufficient and -deficient growth conditions, respectively. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments determined with two-way ANOVA and Tukey’s test.

These plants were further analyzed by DLI-ESI-MS. The quadrupole analyzer allowed the collection of MS data with satisfactory spectral quality. Typical mass spectra of the broad range of molecular weights of compounds that are produced when plants undergo Fe stress, and microbial volatiles exposure are shown in Figure 2a,b, respectively. In total, 737 ions were obtained, mainly within the range 55.90–1592.52 m/z . All metabolite signals were extracted from a database with the

MALDIquant package in the RStudio interface. Following purification, alignment, and normalization, a principal component analysis (PCA) was performed (Figure 3). The PCA (highly significant results $p < 0.001$, by permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) showed that control plants grown under conditions of Fe sufficiency and those exposed to volatiles from L264 had similar mass spectra, since treatments were grouped together. Similarly, plants grown under Fe-deficiency stress and those exposed to volatiles from L264 had the same metabolic fingerprinting, and both treatments presented an overlap, indicating that only the absence of Fe affected the metabolic profile of the plants. The ion profiles of plants grown under conditions of Fe sufficiency and deficiency, and following exposure to UMCV2 volatiles were similar, indicating that UMCV2 promotes metabolic changes in plants under both growing conditions.

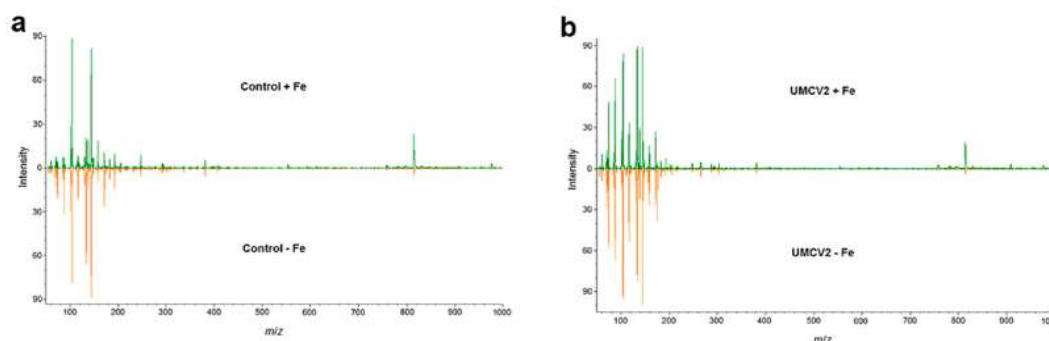


Figure 2. Non-targeted metabolomic profiling normalized from leaves of *Medicago truncatula* obtained by DLI-ESI-MS. (a) Control plants grown under Fe-sufficient (green) and -deficient conditions (orange). (b) Plants exposed to volatile compounds from *A. agilis* UMCV2 for 10 days and grown under iron-sufficient (green) and -deficient conditions (orange).

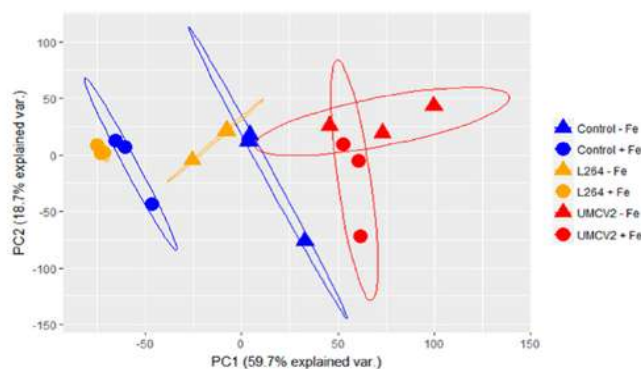


Figure 3. Principal component analysis (PCA) obtained from DLI-ESI mass spectra of *Medicago truncatula* leaves under Fe-sufficient and -deficient conditions and following exposure to microbial volatiles. Blue indicates control plants, orange represents plants exposed to volatiles emitted by L264 strain, and red shows the plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2. Circles (O) and triangles (Δ) indicate Fe sufficiency and deficiency, respectively. The ellipses represent 95% confidence intervals. Differences between groups were compared with a PERMANOVA test ($p < 0.001$).

2.2. Classification of Random Forest Model for Differentiating Plants Grown under Two Different Fe Conditions and Rhizobacterial Inoculation

In order to reduce data complexity, the Random Forest (RF) algorithm was used to generate decision trees and extract the 30 most important ions, defining whether seedling samples were Fe-sufficient or -deficient (Figure 4a). Ions with the greatest mean decrease in Gini index were putatively identified using the PlantCyc database and SpiderMass software. The m/z from each ion was

compared to the monoisotopic mass (Da) of metabolites previously reported for *M. truncatula*, which provided knowledge about participating metabolites in response to Fe-deficiency stress. Among the most important ions, we identified compounds involved in riboflavin metabolism at 185.22 m/z (1-deoxy-L-glycero-tetrol-4-phosphate), 299.18 m/z [5-amino-6-(D-ribitylamino) uracil], and 808.38 m/z (flavin adenine dinucleotide, FAD); lipid metabolism at 797.49 m/z (1-18:3-2-18:3-monogalactosyldiacylglycerol), 859.98 m/z (butanoyl-CoA); and chlorophyll metabolism at 222.07 m/z (phosphonothreonine), 613.36 m/z (protochlorophyllide a) [11,26,27]. In addition, compounds that alleviate abiotic stresses in plants were also identified at 189.26 m/z (norspermine), 269.06 m/z ((+)-marmesin), 300.18 m/z ((S)-N-methylcochlorine), 314.26 m/z (9,10-epoxy-18-hydroxystearate), 351.23 m/z (crocetin), and 371.07 m/z (chelerythrine) (Table 1). Of these ions, 185.22, 189.26, 222.07, 269.06, 299.18, and 351.23 m/z (Figure 5a) were detected at a higher intensity under Fe deficiency conditions. The remaining 17 ions selected by the RF algorithm for the Fe condition could not be identified.

The RF model also helped to identify the 30 most important ions including those that differentiated uninoculated seedlings, and those inoculated with L264 or UMCV2 strains (Figure 4b). Twenty ions were identified (Table 2). Six of these, 87.41 m/z (3-pentanone), 88.08 m/z (pyruvate), 88.33 m/z (4-aminobutanal), 97.83 m/z (glycolate), 98.04 m/z (N-monomethylethanolamine), and 287.19 m/z (kaempferol) showed stronger detectable signal intensities under UMCV2 treatment (Figure 5b), suggesting that these ions are responsible for the discrimination between the sample groups, and revealing the associated chemical modulations made by the UMCV2 strain. Thus, DLI-ESI-MS displays great potential for determining whether volatiles emitted from other rhizobacteria are able to modulate the production of primary or secondary metabolites in plants. According to previously reported literature, the increased signals have different roles in alleviating Fe deficiency stress in plants [12,28–33]. Other identified compounds included those involved in plant primary metabolism, at 88.08 m/z (pyruvate), 97.83 m/z (glycolate), 790.06 m/z (coenzyme A) [34]; brassinosteroid metabolism, at 397.20 m/z (5-dehydroepisterol), 419.15 m/z (6-deoxocathasterone), and 467.07 m/z (6- α -hydroxycastasterone) [35–38]; compounds with antioxidant roles in plants, at 266.20 m/z (thiamine), 366.17 m/z (galactinol), and 933.53 m/z (notoginsenoside R1) [39–41], and some flavonoids with antioxidant capacity, which act as chemotactic signals for symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes, at 275.13 m/z (fustin), 287.19 m/z (kaempferol), and 291.15 m/z (formononetin) [10,42–45] (Table 1).

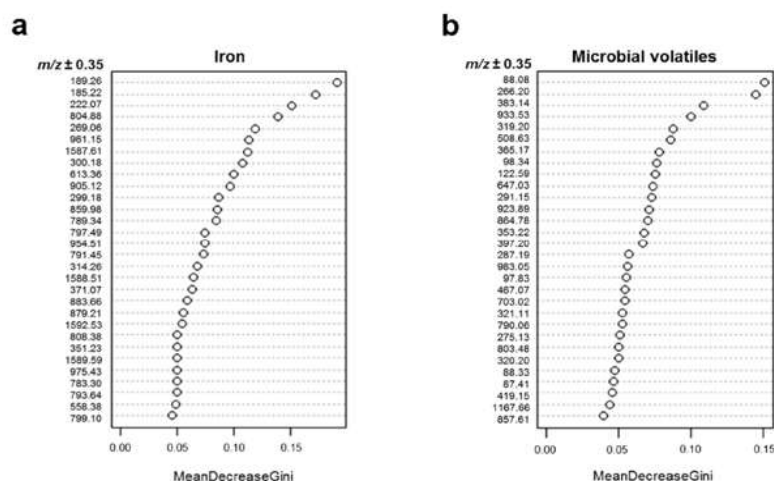


Figure 4. Ion importance ranking obtained by Random Forest model for differentiating between sample treatments with DLI-ESI mass spectra data. The thirty most important ions are shown for discriminating between Fe growth conditions (a) and the effect of microbial volatiles (b). Ntrees = 500, OOB error = 0% for Fe growth conditions and 43.75% for volatiles.

Table 1. The most important compounds detected in *Medicago truncatula* seedlings by DLI-ESI-MS and putatively identified by the SpiderMass software, which were able to differentiate between samples grown under Fe-sufficient and -deficient growth conditions.

<i>m/z</i>	Monoisotopic Mass (Da)	Ionization Mode	Compound Name	Function
189.26	188.20	[M + H] ⁺	Norspermine	Stress
185.22	184.01	[M + H] ⁺	1-Deoxy- <i>l</i> -glycero-tetrolose 4-phosphate	Riboflavin biosynthesis
222.07	199.03	[M + Na] ⁺	<i>l</i> -Histidinol-phosphate	Histidine biosynthesis
269.06	246.09	[M + Na] ⁺	(+)-Marmesin	Stress
300.18	299.15	[M + H] ⁺	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylcochlorine	Stress
613.36	612.22	[M + H] ⁺	Protochlorophyllide a	Chlorophyll biosynthesis
299.18	276.11	[M + Na] ⁺	5-Amino-6-(<i>D</i> -ribitylamino) uracil	Riboflavin biosynthesis
859.98	837.16	[M + Na] ⁺	Butanoyl-CoA	Fatty acid beta oxidation
797.49	774.53	[M + Na] ⁺	1-18:3-2-18:3-Monogalactosyldiacylglycerol	Chloroplast membrane lipid
314.26	313.24	[M + H] ⁺	9,10-Epoxy-18-hydroxystearate	Cutin biosynthesis
371.07	348.12	[M + Na] ⁺	Chelerythrine	Stress
808.38	785.16	[M + Na] ⁺	Dioleoylphosphatidylcholine	Membranes lipid
351.23	328.17	[M + Na] ⁺	Croctetin	Stress

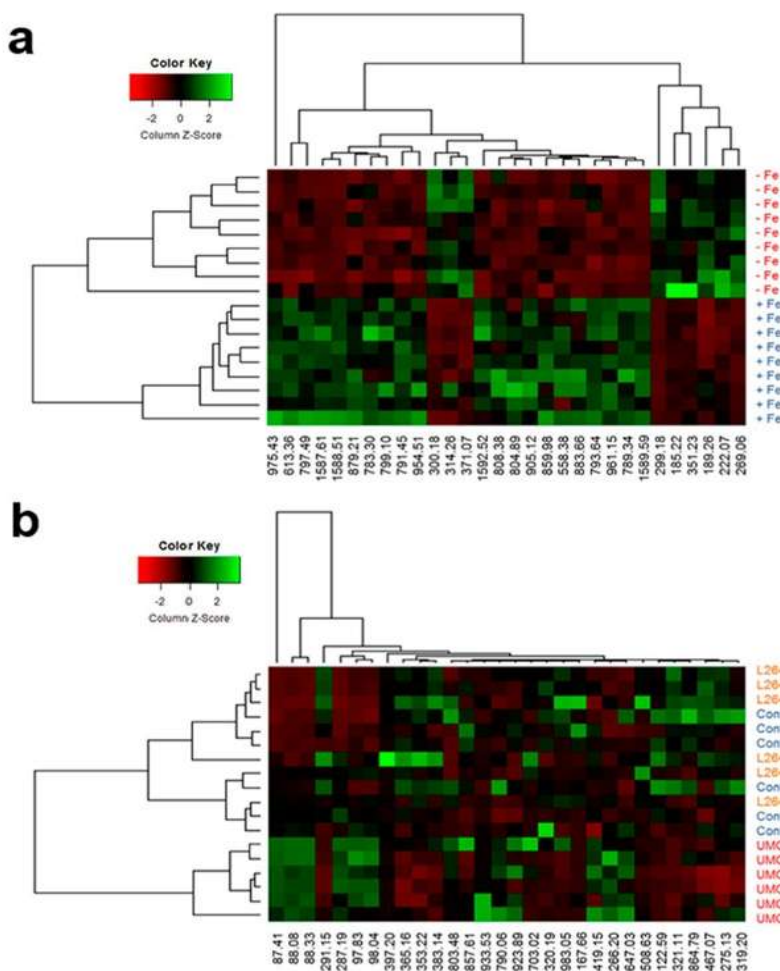


Figure 5. Metabolomic heatmap generated with the 30 most important ions detected by the Random Forest model for Fe availability (a) and bacterial volatiles (b). Heatmap combined with an analysis of cluster hierarchical using Euclidean distance between experimental units and Ward’s algorithm for classification by ion (along x-axis) and by treatment (along y-axis).

Table 2. The most important compounds detected by DLI-ESI-MS in *Medicago truncatula* seedlings and putatively identified by the SpiderMass software that could differentiate between samples exposed to volatiles from L264, UMCV2 strains, and control.

<i>m/z</i>	Monoisotopic Mass (Da)	Ionization Mode	Compound Name	Function
88.08	87.01	[M + H] ⁺	Pyruvate	Energy
266.20	265.11	[M + H] ⁺	Thiamine	Stress
383.14	360.14	[M + Na] ⁺	7-Deoxyloganate	Stress
933.53	932.53	[M + H] ⁺	Notoginsenoside R1	Stress
319.20	296.31	[M + Na] ⁺	Phytol	Constituent of chlorophyll
365.17	342.12	[M + Na] ⁺	Galactinol	Stress
98.34	75.07	[M + Na] ⁺	N-Monomethylethanolamine	Choline biosynthesis
291.15	268.07	[M + Na] ⁺	Formononetin	Stress
353.22	352.18	[M + H] ⁺	16-Hydroxytabersonine	Indole alkaloid biosynthesis
397.20	396.34	[M + H] ⁺	5-Dehydroepisterol	Brassinosteroid biosynthesis
287.19	286.05	[M + H] ⁺	Kaempferol	Stress
97.83	75.01	[M + Na] ⁺	Glycolate	Photorespiration
467.07	466.37	[M + H] ⁺	6-Hydroxycastasterone	Brassinosteroid biosynthesis
321.11	320.09	[M + H] ⁺	4-Coumaroylshikimate	Flavonoid and phenylpropanoid biosynthesis
790.06	767.12	[M + Na] ⁺	Coenzyme A	Fatty acid beta oxidation
275.13	274.08	[M + H] ⁺	Fustin	Stress
320.20	297.24	[M + Na] ⁺	18-Hydroxyoleate	Cutin, suberin and wax biosynthesis
88.33	87.07	[M + H] ⁺	4-Aminobutanol	Stress
87.41	86.07	[M + H] ⁺	3-Pentanone	Stress
419.15	418.38	[M + H] ⁺	6-Deoxocastasterone	Brassinosteroid biosynthesis

Although DLI-ESI-MS provides the possible composition of the compounds with minimal sample preparation, the exact metabolite identification is limited by the lack of fragmentation data or device accuracy (~0.3 Da) [6]. Therefore, mass spectrometry coupled with a separation technique such as GC, can provide identification with a high level of confidence based on the comparison of the retention time with the appropriate standard, and in addition, it allows calculation of the concentration of the compounds in the sample. In our study, we observed variations in the intensity of many ions in the mass spectra obtained from plants treated with UMCV2. Three of the *m/z* ions were putatively identified as components of the BRs biosynthesis (Table 2); we observed that the signal 419.15 *m/z*, which is a direct precursor of brassinolide [37] mainly increased in plants inoculated with the UMCV2 strain. Thus, we decided to confirm by GC-SIM-MS whether the volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2, stimulate the production of brassinolide in *M. truncatula*, as it is the most bioactive form of BRs in plants. For this, we acetylated the molecule to change the analyte properties, which improved the identification capability of brassinolide (Figure 6a–c).

BRs are endogenous plant hormones that are essential for plant growth and development. Additionally, BRs are involved in sensing and responding to mineral deficiency stress. A factorial analysis showed that Fe deficiency stress, as well as microbial volatile factors significantly increased the content of epibrassinolide in the plant ($p = 0.0039$ and $p = 0.0036$, respectively); and the interaction of both factors was also statistically significant ($p = 0.0153$). Plants grown in Fe-deficient conditions and inoculated with UMCV2 showed a ten-fold higher accumulation of brassinolide relative to controls (Figure 6d). This result suggests that *A. agilis* induce the synthesis of brassinolide in the plant as a part of the mechanism for Fe stress tolerance; thus, the quantification of this phytohormone in the plants may serve as a reference of the beneficial effects of rhizobacterium to plants.

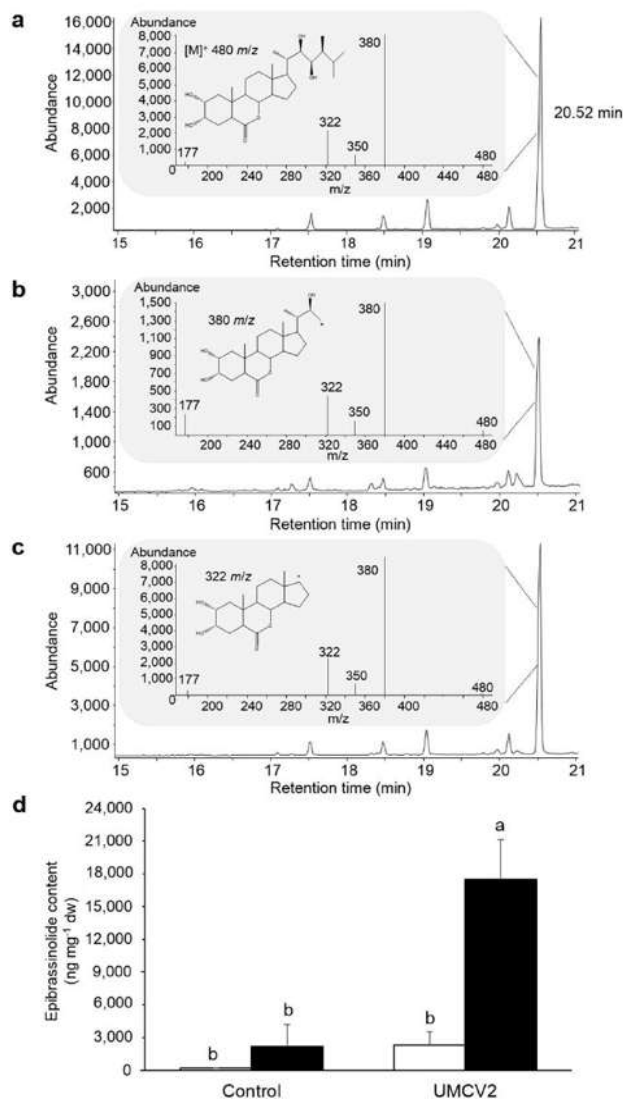


Figure 6. Identification of brassinolide in *Medicago truncatula* by GC-MS. (a) Total ion chromatogram of the epibrassinolide standard, indicating the retention time of the phytohormone and the electron impact mass spectrum during the SIM analysis. (b) Total ion chromatogram and mass spectrum obtained from the control plants grown under conditions of iron (Fe) deficiency. (c) Total ion chromatogram and mass spectrum obtained from plants grown under conditions of Fe deficiency and exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2. (d) Brassinolide content in plants grown under Fe-sufficient (white bars) and -deficient (black bars) growth conditions. Data shown are means \pm standard error ($n = 3$). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments determined with two-way ANOVA followed by a Tukey's test.

To summarize the information obtained in this study, a hierarchical cluster analysis was constructed for each treatment (Figure 5a,b). The metabolic heat maps based on DLI-ESI-MS data visually displayed differences between samples in the intensity of the selected m/z ions. Remarkably, two sets of ions were identified that accumulated under conditions of Fe deficiency, one of them was composed of the following ions 299.18, 185.22, 351.23, 189.26, 222.07, and 269.06 m/z , and the other was set by 300.18, 314.26, and 371.07 m/z whereas the remaining ions on the heat map diminished (Figure 5a); therefore, these ions could be considered as biomarkers of the plants' Fe nutritional status.

Conversely, differences were observed in the metabolite profiling of plants exposed to microbial volatiles. Uninoculated plants and those inoculated with the L264 strain shared the same conglomerate, verifying that the volatiles from the commensal bacterium did not have an effect on the overall profile of plant metabolites produced in response to inoculation. Ions obtained from plants inoculated with the UMCV2 strain formed a separate conglomerate, and ions 87.41, 88.08, and 88.33 m/z presented the strongest differences, suggesting an important role during the interaction between *M. truncatula* and *A. agilis* UMCV2 (Figure 5b).

3. Discussion

Fe is an important metal in photosynthesis. Additionally, Fe is used ubiquitously in oxidation-reduction processes [13]. These important roles make Fe an essential micronutrient for plant fitness. As a consequence, Fe deficiency is a major constraint for agricultural quality and production, eventually affecting human health via the food chain [16]. Fe scarcity leads to the activation of sophisticated mechanisms to maintain cellular Fe homeostasis. Legumes are classified as Strategy I plants, which undergo biochemical changes to increase the capacity for Fe uptake via the roots and Fe solubility in the soil [11]. In this study, we used DLI-ESI-MS and putatively identified several compounds in plants that are commonly accepted to be associated with biochemical responses and adaptation strategies under Fe deficiency conditions. Furthermore, this analytical tool showed sensitivity in discriminating plants grown under Fe-sufficient or -deficient conditions, providing evidence that the plants used in the study were metabolically stressed due to a lack of Fe. For example, we found that the mass spectra from Fe-deficient plants presented decreased signals for protochlorophyllide a (613.36 m/z) compared with control plants. The lower concentration of chlorophylls caused leaf yellowing, which is an important visible symptom of Fe deficiency in plants. In addition, the signal for 1-18:3-2-18:3-monogalactosyldiacylglycerol (797.49 m/z) also decreased. Monogalactosyldiacylglycerol is a major lipid component of chloroplast membranes and acts directly in several important plastid roles, particularly during photosynthesis [26,27]. Fe deficiency decreased the signals of other lipids including, phospholipid dioleoylphosphatidylcholine (808.38 m/z), which is a component of cell membranes, and 9,10-epoxy-18-hydroxystearate (314.26 m/z), which is involved in cutin biosynthesis [46,47].

In addition, we found that six signals were increased due to Fe deficiency which, according to the heat map, could be used as biomarkers to distinguish between Fe treatments. Two of these are precursors for riboflavin biosynthesis, 1-deoxy-D-glycero-tetralose 4-phosphate (185.22 m/z) and 5-amino-6-(D-ribitylamino) uracil (299.18 m/z), which are subsequently transformed into FAD. Accumulation of riboflavin was observed in *M. truncatula* plants grown under Fe-deficient conditions, with or without CaCO_3 as a source of alkaline pH stress. The root protein profile showed the de novo accumulation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRLs) and GTP cyclohydrolase II (GTPcII); these proteins are involved in riboflavin biosynthesis, suggesting that the riboflavin biosynthetic pathway is upregulated under conditions of Fe deficiency [11]. Since flavin compounds are exported and accumulate in Fe-deficient roots, different roles have been proposed for riboflavin, including as an electron donor either for enzymatic Fe (III) reduction, as a cofactor, or as a metal chelator [8,11].

Increased signaling was also observed for compounds of different families such as polyamines, coumarins, and terpenes; all of which have different roles in the adaptation of plants to the environment and for overcoming stress conditions. One signal corresponded to norspermine (189.26 m/z), a polyamine previously identified in *Medicago* plants [48], which accumulated in response to Fe deficiency, inducing ferric-chelate reductase activity and the expression of genes related to Fe uptake [49]. The coumarin (+)-marmesin (269.06 m/z) has antioxidant properties [50], as well as the tetraterpenoid crocetin (351.23 m/z) [14], which may protect plants from damage induced by oxidative stress in response to Fe deficiency [9]. Finally, the signal for the putative ion identified as L-histidinol phosphate (222.07 m/z) also increased. This compound is a precursor of histidine; however, its role in plants under stress caused by Fe deficiency has not been fully explored. The chemical properties of the imidazole side

group allow this amino acid to participate in acid-base catalysis, and in the co-ordination of metal ions [51].

PGPR application has become an increasingly common practice as part of an agricultural strategy to alleviate plant abiotic stresses in the field. The use of PGPR will help to address the challenges of producing food for a growing human population in a sustainable and environmentally friendly manner. From this perspective, we have studied the effects of volatiles from the rhizobacterium *A. agilis* UMCV2 on the growth and development of *M. truncatula* in Fe-sufficient and -deficient growth media [23]. In a previous study, we found that the UMCV2 strain induces iron acquisition mechanisms in this Strategy I plant, including rhizosphere acidification, ferric chelate reductase activity, and Fe content in plants. In the present study, using DLI-ESI-MS and the RF model, we found that volatiles from the UMCV2 strain favor the accumulation of flavonoids in leaves under conditions of Fe sufficiency and deficiency, particularly kaempferol (287.19 *m/z*). Legumes are a source of flavonoids and have a beneficial effect on human health [52]; however in plants, flavonoids have diverse roles; for example, flavonoids reduce Fe (III) to Fe (II), reduce the production of reactive oxygen species (ROS), quench ROS, have antifungal activity, chelate ions of transition metals, and quench cascades of free-radical reactions in lipid peroxidation. Besides, due to their low redox potential, they can also reduce potent free radicals (superoxides, alkyl radicals, hydroxyl radicals) [45]. Last, they are involved in plant-microbe interactions signaling, in particular, in symbiotic bacteria stimulating root colonization [10,42–44].

Besides kaempferol, five other signals, 87.41, 88.08, 88.33, 97.83, and 98.04 *m/z*, which correspond to 3-pentanone, pyruvate, 4-aminobutanal, glycolate, and *N*-monomethylethanolamine, respectively, were grouped in the same conglomerate in the heat map, indicating that these compounds are metabolite markers that are specifically produced in response to the presence of the UMCV2 strain, compared with uninoculated plants and those treated with the commensal rhizobacteria L264. These compounds have previously been reported in plants subjected to different kinds of abiotic stresses, acting as signaling molecules that regulate many cellular processes, such as plant growth/development and acclimation responses to stress [12,28–33]. Thus, these results suggest that a complex network of signaling events is activated during the interaction of *M. truncatula* with *A. agilis* UMCV2 via the emission of volatile compounds; this stimulates iron acquisition mechanisms and mediates cellular activity to alleviate plant stress.

Finally, of the 30 most important ions shown in the RF model, we identified three compounds (5-dehydroepisterol, 6-deoxocathasterone, and 6-hydroxycastasterone) related to BRs synthesis [35–38]. These phytohormones regulate the growth and development of plants, and their involvement in the detection and response to Fe deficiency in plants has only recently emerged [15,17,53]. The exogenous application of BRs to stressed plants induces stress-tolerance mechanisms. Thus, it would be timely to conduct a detailed study to ascertain whether microbial volatiles can modulate BRs signaling pathways in plants grown under conditions of Fe sufficiency and deficiency, since we found that volatiles from *A. agilis* UMCV2 promote the growth and the synthesis of BRs in plants grown under Fe-sufficient and -deficient growth conditions.

In summary, our findings show the usefulness of DLI-ESI-MS for studying the metabolic disturbances induced by Fe deficiency in plants; and also, it provided an integrated view of the cellular processes that occur following inoculation with PGPR and different metabolite markers could be identified as possible subjects for further studies. The combination of both mass spectrometry techniques allowed us to show that plants effectively sense the volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2 and reconfigure their metabolic networks accordingly. It is probable that multiple mechanisms, including brassinosteroid production, are activated during plant-microbe interactions, either simultaneously or in succession to ameliorate plant stress. Currently, we are investigating the role of volatiles from *A. agilis* UMCV2 in the protection against oxidative stress and the production of certain flavonoids and BRs to mediate Fe stress responses.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Material and Growth Conditions

In this study, seeds of *M. truncatula* ecotype Jemalong A17 were scarified with 2 mL of concentrated sulfuric acid for 8 min and then rinsed with five washes of sterile deionized water to remove excess acid [54]. Later, seeds were superficially disinfected with 12% sodium hypochlorite for 2 min and rinsed five times with sterile deionized water. Seeds were placed on 0.6% agar plates (Phytotechnology, Shawnee Mission, KS, USA) with 0.6% sucrose and vernalized at 4 °C for 3 days. Germination was performed in a Percival growth chamber with a photoperiod of 16 h light/8 h dark, a luminous intensity of 6100 lx and a constant temperature of 22 °C.

After 3 days of germination, three seedlings were transferred to each 170 mL glass flask with 35 mL of Hoagland medium and 0.6% agar. The Hoagland base medium was supplemented with the following salts: 1020 ppm KNO₃, 492 ppm Ca(NO₃)₂ × 4H₂O, 230 ppm NH₄H₂(PO₄), 490 ppm MgSO₄ × 7H₂O, 2.80 ppm H₃BO₃, 1.81 ppm MnCl₂ × 2H₂O, 0.08 ppm CuSO₄ × 5H₂O, 0.22 ppm ZnSO₄ × 5H₂O and 0.09 ppm Na₂MoO₄ × H₂O. For the Fe-sufficient treatment, Hoagland medium was supplemented with 20 µM FeSO₄, and for the Fe-deficient treatment, no source of Fe was added.

The UMCV2 strain (CECT-7743, Spanish Type Culture Collection, Valencia, Spain) was grown on nutrient agar (3 g L⁻¹ of meat extract, 5 g L⁻¹ peptone, and 1.5% bacteriological agar) at 22 °C. Also, we used the commensal rhizobacterium *Bacillus* sp. L264 as a control [55,56]. The L264 strain was maintained under similar conditions to UMCV2.

4.2. Plant-Bacteria Interaction through the Emission of Volatiles

A system with separate compartments was used (Figure 1a–f). Two days after transferring the plants to Hoagland media, 20 µL of each rhizobacteria (0.05 D.O._{595nm}) was inoculated into a glass vial with 2 mL nutritive agar medium. For the treatment of the uninoculated plants, 20 µL of water was added instead of bacterial inoculum. Then, seedlings were allowed to grow in the growth chamber under the controlled conditions of light and temperature mentioned above. After 10 days, the seedlings were carefully removed from the medium, and the trifoliolate leaves were harvested, immediately frozen with liquid nitrogen, and maintained at –80 °C. Other plants were dried to a constant weight at 68 °C for 7 days. Dry weight was analyzed using a factorial design, comprising of two factors (Fe availability with two levels and bacterial volatiles with three levels), followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

4.3. Metabolite Extraction from *M. truncatula* Leaves

Frozen leaves were lyophilized and 3 mg of dry tissue was ground in a Mixer Mill (MM 400-Retsch, Verder Scientific GmbH & Co. KG; Haan, Germany) at 30 Hz for 30 s. The extraction was carried out with 500 µL 75% methanol grade HPLC acidified with 0.5% formic acid, and samples were then sonicated for 30 min, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C, and filtered with a 4 mm syringe filter sterile through a 0.22 µm pore size hydrophilic nylon membrane. The samples were directly injected into the DLI-ESI mass spectrometer without further pre-treatment.

4.4. Non-Targeted Metabolic Profiling by DLI-ESI Mass Spectrometry

The samples were analyzed on a SQ-Detector 2 spectrometer (ESI/APCI/ESCI, multimode, Waters, Milford, MA, USA) with the fabricant software MassLynx 4.1. The measurements were made with electrospray ionization in positive mode, a capillary voltage of 3 kV, a cone voltage of 30 V and an extractor voltage of 3 V, source temperature of 135 °C, desolvation temperature and flow of 250 °C and 250 L h⁻¹, respectively, and cone gas flow of 50 L h⁻¹. The RF lens was set to 2.5 V. In the analyzer section, a resolution LM and HM of 10 and 14.6, respectively, and an energy ion of –0.1 were used. The samples were injected with a flow rate of 10 µL min⁻¹. The spectra were collected within the range 50–2000 *m/z*, the duration of the run was 1 min, and one scan was obtained per second.

The spectra obtained were converted from the raw extension to mzXML using MSConverte 3.0 from the ProteoWizard Library open-source initiative (<https://proteowizard.sourceforge.net>). The software mMass version 5.5.0 [57] was used to subtract the noise from the spectra, normalize the base peak, and obtain an average mass spectrum. Using the R language (Version 3.4.1 <https://www.rstudio.com/>) and the MALDIquant package [58], a database was obtained in text format with the ions present in the mass spectra. The database was used for statistical analyses.

The chemical profiles of the leaves were compared using the hierarchical cluster analysis (HCA) approach and by generating heatmaps with the ion intensities. To determine the contribution of each ion, the Rattle packet [59] was used in the R interface to generate a Random Forest (RF) model for each variable (iron and bacterial volatiles). The RF algorithm consisted of training, validation, and test steps using m/z ions. To obtain the most important ions in the study, 500 decision trees were created using 70% of the samples; the remaining samples were used for validation (15%) and testing (15%). The importance of the ion variable was determined by measuring the mean decrease by the Gini index.

4.5. Identification of Significant Ions

The most important ions, according to the RF algorithm, were putatively identified using SpiderMass software [60] and a *M. truncatula* metabolite database (PlantCyc database, <https://www.plantcyc.org/>) with a tolerance of ± 0.35 m/z .

4.6. Brassinosteroids Determination

The presence of BRs in the samples was confirmed by GC-MS (Agilent, Foster City, CA, USA) analysis. Each treatment consisted in three composed samples of three plants. The extracts were evaporated to dryness under a stream of nitrogen in a reaction vial. Then, they were treated with acetic anhydride (1.5 mL) and dichloromethane (1 mL), and heated at 75 °C for 90 min. Acetylation decreases the boiling point of the phytohormone, improves the thermal stability in the GC injection port and allows a better chromatographic separation. After cooling, the acetylated sample was diluted with chloroform (2 mL) and washed with deionized water (4 mL) three times. The organic phase was recovered, dried over anhydrous Na_2SO_4 , evaporated and re-dissolved in 50 μL chloroform for GC-selected ion monitoring-MS analysis (GC-SIM-MS). The molecular ion of the acetylated compound at 652 m/z was very weak and sometimes not observed. Thus, the fragmented ions used for the SIM-MS method were 480, 380, 350, 322, and 177 m/z . These ions have previously been reported as characteristic ions for the structural determination of brassinolide rings, which have been analyzed by electron impact MS detector [61]. In addition, the phytohormone was further confirmed by comparing the retention time in the extract to a pure epibrassinolide standard (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA, catalog no. E1641). The standard was also acetylated and to estimate the amount of the compound in the sample, we constructed a calibration curve ($R^2 = 1$).

The phytohormone (2 μL) was analyzed using an Agilent 6850 Series II gas chromatograph equipped with an Agilent MS detector (model 5973) (Agilent) and a 5% phenyl methyl silicone capillary column (HP-5 MS) (30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 mm film thickness). The operating conditions were 1 mL min^{-1} of helium as the carrier gas, 300 °C as the detection temperature, and 270 °C as the injection temperature. The column was held for 3 min at 180 °C and programmed at 5 °C min^{-1} to reach a final temperature of 300 °C for 12 min. The ions were monitored after electron impact ionization (70 eV).

Brassinolide concentration was analyzed using a factorial design, which comprised of two factors (Fe-rich and -deficient media, and the presence and absence of volatiles from *A. agilis* UMCV2), followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Author Contributions: Conceptualization, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Methodology, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Validation, L.M.-R. and I.F.-C.; Formal analysis, I.F.-C., A.R.-O., M.T.C.-R. and M.I.C.E.-A.; Investigation, I.F.-C., A.R.-O., M.T.C.-R. and M.I.C.E.-A.; Resources, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Writing—Original Draft Preparation, I.F.-C., A.R.-O. and L.M.-R.; Writing—Review & Editing, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Supervision, L.M.-R.; Project Administration, L.M.-R. and R.W. Funding Acquisition, L.M.-R. and R.W.

Funding: This research was funded by the Fronteras project 2015-2/814, the bilateral grant CONACyT-DFG 2016/277850, and the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH) (grant number 2.24). I. Flores-Cortez is indebted to CONACyT for providing a PhD fellowship (grant number 164395).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Analytical Methods Committee AMCTB No. 81. A “periodic table” of mass spectrometry instrumentation and acronyms. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 5086–5090.
- García-Flores, M.; Juárez-Colunga, S.; García-Casarrubias, A.; Trachsel, S.; Winkler, R.; Tiessen, A. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1042–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gamboa-Becerra, R.; Montero-Vargas, J.; Martínez-Jarquín, S.; Gálvez-Ponce, E.; Moreno-Pedraza, A.; Winkler, R. Rapid classification of coffee products by data mining models from direct electrospray and plasma-based mass spectrometry analyses. *Food Anal. Methods* **2016**, *10*, 1359–1368. [[CrossRef](#)]
- González-Domínguez, R.; Sayago, A.; Fernández-Recamales, A. High-throughput mass-spectrometry based-metabolomics to characterize metabolite fingerprints associated with Alzheimer’s disease pathogenesis. *Metabolites* **2018**, *8*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Montero-Vargas, J.; Casarrubias-Castillo, K.; Martínez-Gallardo, N.; Ordaz-Ortiz, J.; Délano-Frier, J.; Winkler, R. Modulation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by jasmonic acid. *Plant. Sci.* **2018**, *277*, 155–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García-Flores, M.; Juárez-Colunga, S.; Montero-Vargas, J.M.; López-Arciniega, J.A.I.; Chagolla, A.; Tiessen, A.; Winkler, R. Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 1658–1660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rendón-Anaya, M.; Montero-Vargas, J.M.; Saburido-Álvarez, S.; Vlasova, A.; Capella-Gutierrez, S.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Aguilar, O.M.; Vianello-Brondani, R.P.; Santalla, M.; Delaye, L.; et al. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biol.* **2017**, *18*, 60. [[CrossRef](#)]
- González-Vallejo, E.B.; Susín, S.; Abadía, A.; Abadía, J. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma* **1998**, *205*, 163–168. [[CrossRef](#)]
- Salama, Z.; El-Beltagi, H.; El-Hariri, D.M. Effect of Fe deficiency on antioxidant system in leaves of three flax cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* **2009**, *37*, 122–128.
- Jin, C.W.; Li, G.X.; Yu, X.H.; Zheng, S.J. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 835–841. [[CrossRef](#)]
- Rodríguez-Celma, J.; Lattanzio, G.; Grusak, M.A.; Abadía, A.; Abadía, J.; López-Millán, A.F. Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: Changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2590–2601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fariduddin, Q.; Varshney, P.; Yusuf, M.; Ahmad, A. Polyamines: Potent modulators of plant responses to stress. *J. Plant. Interact.* **2013**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)]
- Ravet, K.; Pilon, M. Copper and iron homeostasis in plants: The challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* **2013**, *19*, 919–932. [[CrossRef](#)]
- Baba, S.A.; Malik, A.H.; Wani, Z.A.; Mohiuddin, T.; Shah, Z.; Abbas, N.; Ashraf, N. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *S. Afr. J. Bot.* **2015**, *99*, 80–87. [[CrossRef](#)]
- Wang, B.; Li, G.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in Fe homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 2749–2761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, W.; Lan, P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front. Plant. Sci.* **2017**, *8*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lima, M.D.R.; Barros Junior, U.O.; Batista, B.L.; da Silva Lobato, A.K. Brassinosteroids mitigate iron deficiency improving nutritional status and photochemical efficiency in *Eucalyptus urophylla* plants. *Trees* **2018**, *32*, 1681–1694. [[CrossRef](#)]

18. Pérez-Montaño, F.; Alías-Villegas, C.; Bellogín, R.A.; del Cerro, P.; Espuny, M.R.; Jiménez-Guerrero, I.; López-Baena, F.J.; Ollero, F.J.; Cubo, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 325–336. [[CrossRef](#)]
19. Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Pare, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 4927–4932. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, H.; Sun, Y.; Xie, X.; Kim, M.S.; Dowd, S.E.; Paré, P.W. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant. J.* **2009**, *58*, 568–577. [[CrossRef](#)]
21. Valencia-Cantero, E.; Hernández-Calderón, E.; Velázquez-Becerra, C.; López-Meza, J.E.; Alfaro-Cuevas, R.; López-Bucio, J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant. Soil.* **2007**, *291*, 263–273. [[CrossRef](#)]
22. Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Flores-Cortez, I.; Valencia-Cantero, E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant. Soil.* **2011**, *339*, 329–340. [[CrossRef](#)]
23. Orozco-Mosqueda, M.C.; Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; Santoyo, G.; Flores-Cortez, I.; Alfaro-Cuevas, R.; Valencia-Cantero, E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant. Soil.* **2013**, *362*, 51–66. [[CrossRef](#)]
24. Castulo-Rubio, D.Y.; Alejandro-Ramírez, N.A.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Santoyo, G.; Macías-Rodríguez, L.I.; Valencia-Cantero, E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription in vitro. *J. Plant. Growth Regul.* **2015**, *34*, 611–623. [[CrossRef](#)]
25. Montejano-Ramírez, V.; Martínez-Cámara, R.; García-Pineda, E.; Valencia-Cantero, E. Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of *FRO* genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* **2018**, *40*, 138. [[CrossRef](#)]
26. Shimojima, M.; Ohta, H. Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 258–266. [[CrossRef](#)]
27. Aronsson, H.; Schottler, M.A.; Kelly, A.A.; Sundqvist, C.; Dormann, P.; Karim, S.; Jarvis, P. Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant. Physiol.* **2008**, *148*, 580–592. [[CrossRef](#)]
28. McNeil, S.D.; Nuccio, M.L.; Ziemak, M.J.; Hanson, A.D. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 10001–10005. [[CrossRef](#)]
29. Mohamed, A.A.; Aly, A.A. Iron Deficiency Stimulated Some Enzymes Activity, Lipid Peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced in vitro. *Int. J. Agri. Biol.* **2004**, *6*, 179–184.
30. Sperotto, R.A.; Boff, T.; Duarte, G.L.; Fett, J.P. Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. *Plant. Cell Rep.* **2008**, *27*, 183–195. [[CrossRef](#)]
31. Vigani, G.; Zocchi, G. The fate and the role of mitochondria in Fe-deficient roots of Strategy I plants. *Plant. Signal. Behav.* **2009**, *4*, 375–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bitrián, M.; Zarza, X.; Altabella, T.; Tiburcio, A.F.; Alcázar, R. Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites* **2012**, *2*, 516–528. [[CrossRef](#)]
33. Voss, I.; Sunil, B.; Scheibe, R.; Raghavendra, A.S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant. Biol.* **2013**, *15*, 713–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Leonardi, R.; Zhang, Y.M.; Rock, C.O.; Jackowski, S. Coenzyme A: Back in action. *Prog Lipid Res.* **2005**, *44*, 125–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fujioka, S.; Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev. Plant. Biol.* **2003**, *54*, 137–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Bishop, G.J.; Nomura, T.; Yokota, T.; Harrison, K.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Jones, J.D.G.; Kamiya, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1761–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nomura, T.; Sato, T.; Bishop, G.J.; Kamiya, Y.; Takatsuto, S.; Yokota, T. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocatasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 171–178. [[CrossRef](#)]
38. Clouse, S.D. Brassinosteroids. *Arab. Book* **2002**, *1*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Goyer, A. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1615–1624. [[CrossRef](#)]
40. Nishizawa, A.; Yabuta, Y.; Shigeoka, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant. Physiol.* **2008**, *147*, 1251–1263. [[CrossRef](#)]
41. He, N.W.; Zhao, Y.; Guo, L.; Shang, J.; Yang, X.B. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen. *J. Med. Food.* **2012**, *15*, 350–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wasson, A.P.; Pellerone, F.I.; Mathesius, U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by *Rhizobia*. *Plant. Cell* **2006**, *18*, 1617–1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Maj, D.; Wielbo, J.; Marek-Kozaczu, M.; Skorupska, A. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol. Res.* **2010**, *165*, 50–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Abdel-Lateif, K.; Bogusz, D.; Hocher, V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant. Signal. Behav.* **2012**, *7*, 636–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19*, 16240–16265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Meyerowitz, E.M.; Somerville, C.R. *Arabidopsis*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 1994; p. 1270.
47. Pollard, M.; Beisson, F.; Li, Y.; Ohlrogge, J.B. Building lipid barriers: Biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant. Sci.* **2008**, *13*, 236–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rodriguez-Garay, B.; Phillips, G.C.; Kuehn, G.D. Detection of norspermidine and norspermine in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant. Physiol.* **1989**, *89*, 525–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhu, X.F.; Wang, B.; Song, W.F.; Zheng, S.J.; Shen, R.F. Putrescine alleviates iron deficiency via NO-dependent reutilization of root cell-wall Fe in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **2016**, *170*, 558–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bourgaud, F.; Hehn, A.; Larbat, R.; Doerper, S.; Gontier, E.; Kellner, S.; Matern, U. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 293–308. [[CrossRef](#)]
51. Ingle, R.A. Histidine biosynthesis. *Arab. Book* **2011**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
52. Velazquez, E.; Silva, L.R.; Peix, A. Legumes: A healthy and ecological source of flavonoids. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 109–144. [[CrossRef](#)]
53. Wang, B.; Li, Y.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in response of cucumber (*Cucumis sativus*) to iron deficiency. *Ann. Bot.* **2012**, *110*, 681–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Boisson-Dernier, A.; Andriankaja, A.; Chabaud, M.; Niebel, A.; Journet, E.P.; Barker, D.G.; de Carvalho-Niebel, F. *MtENOD11* Gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *MPMI* **2005**, *18*, 1269–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gutiérrez-Luna, F.M.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Valencia-Cantero, E.; Reyes-de la Cruz, H.; Macías-Rodríguez, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **2010**, *51*, 75–83. [[CrossRef](#)]
56. Hernández-Calderón, E.; Aviles-García, M.E.; Castulo-Rubio, D.Y.; Macías-Rodríguez, L.; Montejano-Ramírez, V.; Santoyo, G.; López-Bucio, J.; Valencia-Cantero, E. Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant. Mol. Biol.* **2018**, *96*, 291–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Strohalm, M.; Hassman, M.; Košata, B.; Kodíček, M. mMass data miner: An open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 905–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gibb, S.; Strimmer, K. MALDIquant: A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2270–2271. [[CrossRef](#)]
59. Williams, G.J. *Data Mining with Rattle and R: The Art of Excavating Data for Knowledge Discovery*; Springer: New York, NY, USA, 2011; p. 374.
60. Winkler, R. SpiderMass: Semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50*, 538–541. [[CrossRef](#)]
61. Ikekawa, N.; Takatsuto, S. Microanalysis of brassinosteroids in plants by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **1984**, *32*, 55–70. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6.3. Capítulo III

LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE *A. agilis* UMCV2 ESTIMULAN LA EXUDACIÓN RADICULAR DE COMPUESTOS IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO EN *Medicago truncatula*

RESUMEN

Las plantas al ser organismos sésiles están expuestas a una serie de factores estresantes, por ejemplo la deficiencia de nutrientes. Una manera de contrarrestar el estrés inducido es modificar el perfil químico de los compuestos liberados a través de las raíces hacia la rizosfera. Los exudados radiculares juegan un papel importante en la adquisición de nutrientes y en el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos rizosféricos. Se han reportado compuestos específicos que son exudados por las plantas en respuesta a la deficiencia de hierro, un ejemplo de ellos son los compuestos fenólicos y las cumarinas cuya función es quelar y solubilizar el metal en cuestión. El objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre el perfil de exudación de *Medicago truncatula* crecida en deficiencia de hierro, para ello se realizó un perfilado no dirigido de los exudados radiculares mediante LC-ESI-MS. Observaciones anteriores demostraron que la cepa UMCV2 tiene un impacto positivo sobre el metaboloma y sobre mecanismos de adquisición de hierro en plantas de *M. truncatula* crecida en deficiencia de hierro. Los resultados muestran que la deficiencia de hierro *per se* induce cambios en el perfil químico de los exudados. La exposición de las plantas a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 modificó de manera significativa los metabolitos exudados. Se identificaron dos compuestos, i) conferona, su abundancia relativa es inducida por la deficiencia de hierro y ii) ononina, una isoflavona que se incrementa significativamente por efecto de los volátiles bacterianos de UMCV2. De este estudio se concluye que los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 modifican el perfil químico de exudación de plántulas de *M. truncatula* en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro,

incrementando la exudación de compuestos relacionados con la movilización de hierro y comunicación planta-bacteria.

INTRODUCCIÓN

El sistema radicular es la parte oculta de las plantas, su función es brindar anclaje y proveer de nutrimentos y agua. Las raíces de las plantas interactúan y modifican el entorno del suelo que las rodea mediante la exudación de carbono (C). Las raíces secretan una amplia variedad de compuestos al suelo circundante, esta área se denomina rizosfera (Lynch, 1987). La exudación de las plantas puede llegar a comprender entre el 20 y el 40% del carbono fijado fotosintéticamente (Badri y Vivanco, 2009).

El proceso de exudación maximiza la compensación entre la inversión y el retorno de energía, agua, C y nutrimentos, lo que determina en última instancia el crecimiento, la supervivencia e interacción de las plantas con su microbiota. La exposición a diferentes tipos de estrés como competencia, disponibilidad de nutrientes y/o la limitación de agua, causa una serie de respuestas en las plantas que modifican la distribución de C para garantizar los nutrimentos, lo que a su vez estimula la actividad microbiana y media las reservas de C en el suelo a corto y largo plazo (Rasse *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2011; Canarini *et al.*, 2019).

La cantidad y tipo de exudado es determinado por la especie vegetal, el estadio de desarrollo y diversos factores externos (estrés biótico y abiótico). Dentro de los exudados de raíz se pueden encontrar iones (H⁺), ácidos inorgánicos, oxígeno, agua y principalmente compuestos orgánicos (Uren, 2000; Bais *et al.*, 2006). Los compuestos orgánicos secretados pueden clasificarse en dos grupos: i) compuestos de bajo peso molecular que incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y una variedad de metabolitos secundarios y ii) compuestos de alto peso molecular como proteínas y mucílago (Badri y Vivanco, 2009).

El hierro es uno de los micronutrientes esenciales para las plantas y es requerido en mayor abundancia, este microelemento participa en procesos importantes incluyendo fotosíntesis, respiración y biosíntesis de clorofila. El hierro es componente de los grupos hemo de numerosas proteínas.

El hierro sirve como un cofactor para una amplia variedad de procesos en las plantas y la deficiencia de este elemento induce modificaciones morfológicas y fisiológicas en la raíz, particularmente en la exudación de compuestos orgánicos. La deficiencia de hierro induce la liberación de compuestos reductores y quelantes en las plantas con estrategia I para la adquisición de hierro, la exudación se modifica en cantidad y en complejidad de las especies moleculares liberadas, incluyendo compuestos fenólicos, flavinas y ácidos orgánicos (Hinsinger *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2007; Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Los exudados radiculares median interacciones en la rizosfera. Las interacciones son positivas cuando incluyen asociaciones simbióticas con microorganismos benéficos como micorrizas y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs por sus siglas en inglés). Uno de los aspectos mejor estudiados de la interacción entre plantas y microorganismos rizosféricos es su habilidad para inducir efectos positivos en el crecimiento de la planta mediante el incremento en la absorción de nutrimentos, las rizobacterias tienen la capacidad de incrementar la movilidad del hierro mediante la liberación de compuestos quelantes llamados sideróforos (Saha *et al.*, 2013).

Las interacciones negativas incluyen asociación con plantas parásitas, microorganismos patógenos e invertebrados herbívoros (Badri y Vivanco, 2009). De manera que, las raíces de las plantas se encuentran frecuentemente expuestas a una amplia variedad de estreses ambientales, a lo cual responden secretando una mezcla de sustancias químicas para protección.

Se ha reportado en la literatura que la deficiencia de nutrimentos incrementa la exudación de ciertos metabolitos, particularmente de aquellos que contribuyen a mejorar la disponibilidad de éstos para la absorción por las raíces (Jones, 1998). Chutia *et al.* (2019) observaron que las cumarinas de tipo catecol y los fenilpropanoides derivados de 2-benzopiranonas incrementan su concentración en las raíces y en los exudados de *Arabidopsis thaliana* para facilitar la adquisición de hierro. Cuando las plantas crecieron en combinación de deficiencia de hierro y fósforo, la generación de los perfiles de cumarinas dependió considerablemente de la disponibilidad de hierro presente en el medio (Chutia *et al.*, 2019).

El establecimiento de las interacciones benéficas planta-microorganismo depende del intercambio de señales (Lopez-Baena *et al.*, 2016). La composición de los exudados de raíz de las plantas influencia un intercambio de señales entre las plantas y los microorganismos (Greer-Phillips *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2017). Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico proveen de este elemento a las plantas, mientras que los exudados de las plantas leguminosas que contienen una gran variedad de compuestos orgánicos (ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos) son un excelente nicho para ellas, jugando de esta manera los exudados un papel importante en la interacción entre microorganismos y plantas (Hartmann *et al.*, 2009; Zhalnina *et al.*, 2018).

Recientemente se reportó que los volátiles producidos por la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, promueven el crecimiento y desarrollo en *Medicago truncatula*, activan mecanismos de defensa en las plantas, modulan los genes involucrados en la toma de hierro y la producción de metabolitos involucrados en la tolerancia al estrés por deficiencia de hierro en follaje (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013, Cástulo-Rubio *et al.*, 2015, Hernández-Calderón *et al.*, 2018; Flores-Cortez *et al.*, 2019). Por lo que el objetivo de este estudio fue analizar si los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 también estimulan la exudación de compuestos que participan en la toma de hierro en condiciones de deficiencia de hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *Medicago truncatula* ecotipo Jemalong A17, las cuales fueron escarificadas y desinfectadas superficialmente, con ácido sulfúrico concentrado (8 min) e hipoclorito de sodio (12%, 2 min), finalmente se enjuagaron cinco veces con agua desionizada estéril. Posterior a la desinfección, las semillas fueron colocadas en placas de agar (0.6%, Agar Plant) con sacarosa (0.6%) para su vernalización durante tres días a 4°C.

Transcurrido el tiempo de vernalización las placas con las semillas fueron llevadas a una cámara de crecimiento para su germinación (fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 6100 lx y 22°C). Después de tres días de germinación, las plántulas fueron transferidas a frascos de vidrio con 35 mL de medio Hoagland con 0.6% de agar. Previo a la preparación del medio, los frascos fueron lavados varias veces con jabón libre de fosfatos, enjuagados en repetidas ocasiones con agua desionizada y esterilizados 2 veces previo al vaciado del medio de cultivo.

El medio Hoagland base fue preparado con las siguientes concentraciones de sales: 1020 ppm KNO_3 , 492 ppm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 230 ppm $\text{NH}_4\text{H}_2(\text{PO}_4)$, 490 ppm $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2.80 ppm H_3BO_3 , 1.81 ppm $\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 ppm $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 ppm $\text{ZnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.09 ppm $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$. En este estudio se trabajó con dos condiciones de disponibilidad de hierro en el medio de cultivo, suficiencia que estuvo dada por la adición de 20 μM de FeSO_4 (tratamiento +Fe) y deficiencia donde no se adicionó fuente de hierro al medio de cultivo de las plantas (tratamiento -Fe).

La rizobacteria PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2 (CECT-7743) se cultivó a 22°C en agar nutritivo (extracto de carne 0.3%, peptona 0.5% y de agar bacteriológico 1.5%), se utilizó de 48 hrs de crecimiento.

Interacción planta – bacteria

Se utilizó un sistema de compartimentos separados, permitiendo la interacción de los organismos solo mediante los compuestos volátiles. El sistema fue montado de la siguiente manera, al momento de preparar los frascos con el medio Hoagland con las dos condiciones de disponibilidad de hierro anteriormente mencionadas, se insertó un vial de vidrio con 2 mL de agar nutritivo. A cada frasco se transfirieron tres plántulas y pasados dos días de crecimiento en suficiencia o deficiencia, se agregó un inóculo de 20 μ L de una densidad óptica de 0.05 (595 nm) de la cepa UMCV2. Para las plantas control se agregaron 20 μ L de agua desionizada estéril. A partir de la adición del inóculo, las plántulas crecieron en interacción con los compuestos volátiles bacterianos en condiciones de luz y temperatura controladas.

Colecta de exudados de raíz

Después de 10 días de interacción, las plántulas fueron removidas cuidadosamente del medio de cultivo y las raíces fueron enjuagadas tres veces con agua estéril para eliminar los restos de medio. Viales ambar de 2 mL fueron utilizados para la colecta de los exudados, en ellos se colocó 1 mL de agua estéril. Las plantas con las raíces enjuagadas fueron colocadas en viales de manera individual y éstos colocados en frascos de vidrio para mantener la esterilidad del sistema (Fig. 1). La colecta de los metabolitos se llevó a cabo durante 24 hrs en una cámara de crecimiento a 22°C con fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad e intensidad luminosa de 6100 lx.

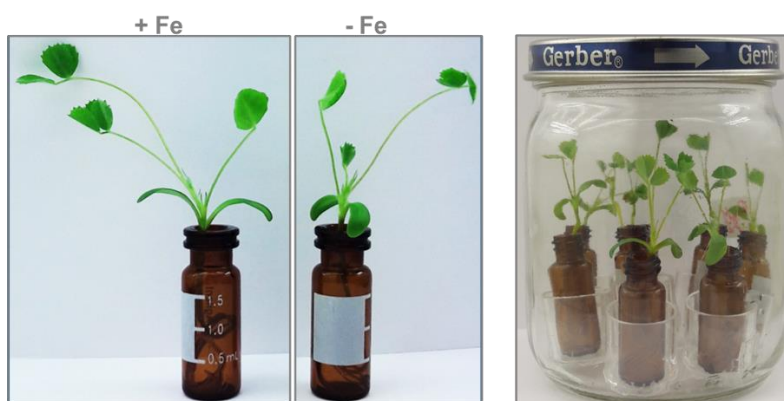


Fig.1. Sistema de colecta de exudados de *M. truncatula*

Los exudados colectados fueron mantenidos en congelación a -70°C , posteriormente fueron liofilizados a -52°C y 0.110 mBar y nuevamente mantenidos en refrigeración hasta su análisis.

Análisis metabolómico de exudados radiculares mediante LC-ESI-MS

Preparación de la muestra

Los exudados de raíz liofilizados fueron resuspendidos con metanol al 75% acidificado con ácido fórmico (0.5%) y concentrados 100 veces. Posteriormente, los concentrados fueron sonicados 30 min, filtrados con membrana de nylon con tamaño de poro $0.22\ \mu\text{m}$ y mantenidos a -20°C . Se analizaron tres muestras biológicas compuestas para cada uno de los tratamientos.

Perfilado metabolómico

La cromatografía se llevó a cabo en un UPLC Accela, utilizando una columna Hypersil Gold C18 (Thermo, $50 \times 2.1\ \text{mm}$, $1.9\ \mu\text{m}$ tamaño de partícula) a 40°C con un flujo de $550\ \mu\text{L}/\text{min}$, el volumen de inyección fue de $10\ \mu\text{L}$ de los exudados concentrados. Las fases móviles fueron agua desionizada (miliQ) acidificada con ácido fórmico (0.1%) (solvente A) y metanol acidificado con ácido fórmico (0.1%) (solvente B). El gradiente de solventes utilizado fue el siguiente: 0-1 min 97% de A y 3% de B, 1.1-8 min 60% de A y 40% de B, 8.1 -20 min 40% de A y 60% de B, 20.1-22.9 min 100% de B y finalmente del min 23-25 de nuevo 97% de A y 3% de B.

El UPLC estuvo acoplado a un espectrómetro de masas LCQ Fleet Ion Trap. Los espectros fueron adquiridos con polaridad positiva, centroide y en un rango de 50 - 2000 m/z . Los parámetros de ionización fueron los siguientes (ESI): Temperatura del capilar 280°C , voltaje del capilar 33 V, voltaje de la fuente 4.5 kV y voltaje de la lente del tubo 120 V.

Procesamiento de cromatogramas

Los archivos RAW obtenidos fueron convertidos a .mzXML con el programa MSConvert. Con el programa MZmine 2.0 se realizó la corrección de la línea base, después la detección de picos se llevó a cabo con GridMass con una tolerancia de 0.35 m/z . Se realizó alineamiento con RANSAC con tolerancia de 0.35 m/z , llenado de huecos y la normalización máxima intensa (deisotoping). El ruido y los valores faltantes fueron removidos. Finalmente se obtuvo una base de datos con 1565 features o iones (valores de m/z asociados a un tiempo de retención).

Se realizó un análisis de los iones presentes en los picos más abundantes de los cromatogramas con la ayuda de los programas MZmine, TOPPView y mMass, los cuales permitieron analizar y comparar los scans de los cromatogramas de cada uno de los tratamientos, para así determinar la intensidad de los iones.

La contribución de los iones presentes en los cromatogramas al estudio fue determinada utilizando el paquete Rattle en la plataforma R (<http://www.rproject.org>), generando un modelo conocido como Random Forest (RF). Para este modelo se construyeron 500 árboles de decisión con el 70% de las muestras, 15% para la validación y 15% para la prueba; la importancia de los iones fue determinada mediante el índice de Gini. El algoritmo RF fue aplicado para las dos variables utilizadas en este estudio, disponibilidad de hierro y volátiles bacterianos.

Con los 30 iones extraídos con RF para cada una de las variables se analizó la variación entre los perfiles químicos de los exudados de los diferentes tratamientos mediante análisis de componente principal (PCA), análisis de cluster jerárquicos (HCA) y se generaron mapas de calor con las intensidades de los iones.

Identificación de metabolitos

Datos independientes de MS2 (UPLC-MS/MS) fueron adquiridos en modo positivo y centroide en UPLC-MS (Accela LCQ Fleet Ion trap). Se realizó una mezcla de los

exudados concentrados para llevar a cabo la refragmentación de los iones más abundantes presentes en las muestras. La m/z y tiempo de retención fue indicado en Xcalibur para fragmentar los picos con intensidad relativa mayor de 10^3 con 30 eV. Los fragmentos hijos fueron analizados en TOPPView y utilizados para la identificación en la base de datos MassBank (<http://www.massbank.jp/>). Los iones determinados por el modelo Random Forest fueron identificados mediante la comparación de su m/z en el software SpiderMass (Winkler, 2015) y MassBank.

Análisis estadístico

Para la generación de gráficas con las intensidades de los iones se utilizó el paquete estadístico STATISTICA (versión 10). El análisis fue un diseño factorial que comprendió dos factores, disponibilidad de hierro (+ Fe y - Fe) y volátiles bacterianos (Control y UMCV2) seguido de la prueba de medias de Tukey con $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los estudios metabolómicos en el campo de la ecología son cada vez más populares. En primer lugar, el metabolismo es a menudo la primera línea de respuesta ante cambios ambientales, por lo que el conocer las respuestas del metaboloma de las plantas ante un factor abiótico o bien en las relaciones planta-simbionte, planta-patógeno o planta-herbívoro, entre otros, permitiría ahondar más en la comprensión sobre la adaptación de las plantas a su entorno. En este estudio se analizó el efecto de la deficiencia de hierro y de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 sobre el perfil químico de compuestos exudados por *M. truncatula*. Los análisis se realizaron mediante Cromatografía de Líquidos de alto ultra rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas con ionización por Electrospray (UPLC-ESI-MS).

Los resultados obtenidos por UPLC-ESI-MS indicaron diferencias entre los distintos tratamientos. Las regiones de mayor variación en los cromatogramas se identificaron a los tiempos de retención de 4.4 a 5 y 8.55 a 8.85 min.

En la condición de suficiencia (+Fe) en el tiempo de 4.4 a 5 min, se observó que la intensidad relativa del ion 379.3388 m/z en la región del espectro que va de 100 a 600 m/z fue del 25%, mientras que en la condición de deficiencia (-Fe) la intensidad se incrementó. Al graficar la abundancia relativa del ion con respecto a la abundancia del ion de mayor intensidad en el espectro de masas, se observó que los compuestos volátiles bacterianos inducen la abundancia de este ion de manera significativa cuando las plantas son sometidas al estrés por la deficiencia del nutriente; esto de acuerdo al análisis de varianza factorial llevado a cabo donde el factor hierro tiene un efecto significativo con un valor de $p = 0.000623$ (Fig. 2a).

En el tiempo de 8.55 a 8.85 min se destaca la variación en la intensidad del ion 517.1754 m/z , donde en la condición control corresponde a los exudados de plantas del tratamiento +Fe y que no fueron expuestas a volátiles bacterianos, la intensidad relativa fue del 40%, mientras que en el tratamiento donde las plantas fueron expuestas a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2, la intensidad fue del 100% (Fig. 2b); así mismo, en el histograma se muestra que la abundancia del ion se incrementa significativamente por la presencia de la bacteria en las dos condiciones de disponibilidad de hierro ($p = 0.008554$, ANOVA factorial).

La refragmentación de los iones 379.3388 y 517.1754 m/z se llevó a cabo mediante LC-MS/MS y los patrones de masas MS2 obtenidos permitieron la búsqueda de la identidad de estos metabolitos en la base de datos MassBank.

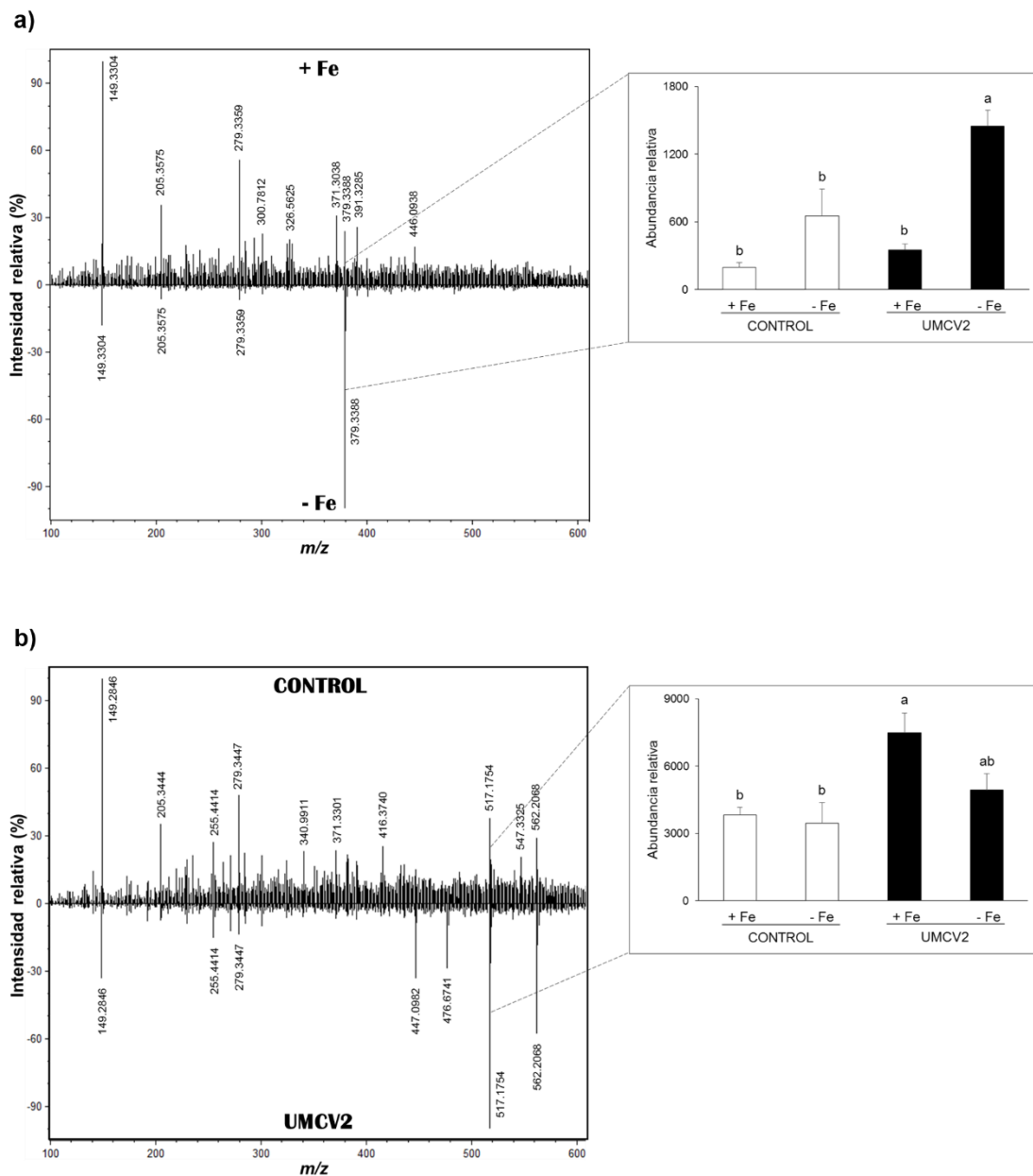


Fig. 2. Espectros de masa obtenidos del análisis de los exudados radiculares de *M. truncatula* por LC-ESI-MS. a) Comparación del perfil de iones en los exudados de plantas de los tratamientos con suficiencia (+Fe) y deficiencia de hierro (-Fe). La abundancia del ion 379.3388 m/z tiende a incrementarse en la condición -Fe y se intensifica de manera significativa cuando las plantas fueron expuestas a los compuestos volátiles de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2. b) Efecto de los volátiles bacterianos sobre el perfil de iones en los exudados radiculares. La abundancia del ion 517.1754 m/z se incrementa en la condición +Fe y en presencia de los compuestos que emite la UMCV2. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), ANOVA factorial seguida de Tukey (HSD) con $n = 3$.

La refragmentación del ion 517.1754 m/z arrojó los fragmentos 254.0573 m/z , 269.0854 m/z , 269.8922 m/z , 431.2032 m/z , 499.1088 m/z y 517.9043 m/z , que con

un score de 0.85, se identificó como formononetina-7-O-glucósido (ononina), que es una isoflavona presente en las plantas leguminosas que se forma por la adición de glucosa al grupo hidroxilo 7' en el anillo A de la formononetina. La ononina es un compuesto con potencial de eliminación de radicales libres (compuesto antioxidante), además se ha reportado que tiene propiedades antimicrobianas (Wang *et al.*, 2018).

La comparación de los fragmentos para el ion 379.3388 *m/z* arrojó scores muy bajos por lo que solo se realizó una identificación putativa basada en la masa del ion obtenida por ESI-MS. El resultado de la comparación en MassBank indicó la presencia de conferona, una cumarina sesquiterpenoide de la clase benzopiranoide.

Las cumarinas participan en la adquisición de hierro mediante quelación o reducción de Fe⁺³ y se producen en respuesta a la deficiencia de hierro. Las cumarinas son comúnmente llamadas cumarinas movilizadoras de hierro (IMCs, por sus siglas en inglés). Fourcroy *et al.* (2016) observaron que las cumarinas secretadas por *A. thaliana* no rescatan el fenotipo mutante de *fro2*, lo que indica que las cumarinas pueden desempeñar otras funciones en la rizosfera además de movilizar hierro.

Debido a la complejidad de los datos obtenidos en estudios metabolómicos es conveniente el uso de algoritmos que permiten extraer datos importantes o representativos del experimento. Para reducir la cantidad de variables obtenidas en este estudio, se utilizó el modelo Random Forest que proporciona los 30 iones más importantes para cada una de las variables estudiadas, que en este caso fueron: disponibilidad de hierro (Fig. 3a) y volátiles bacterianos (Fig. 3b).

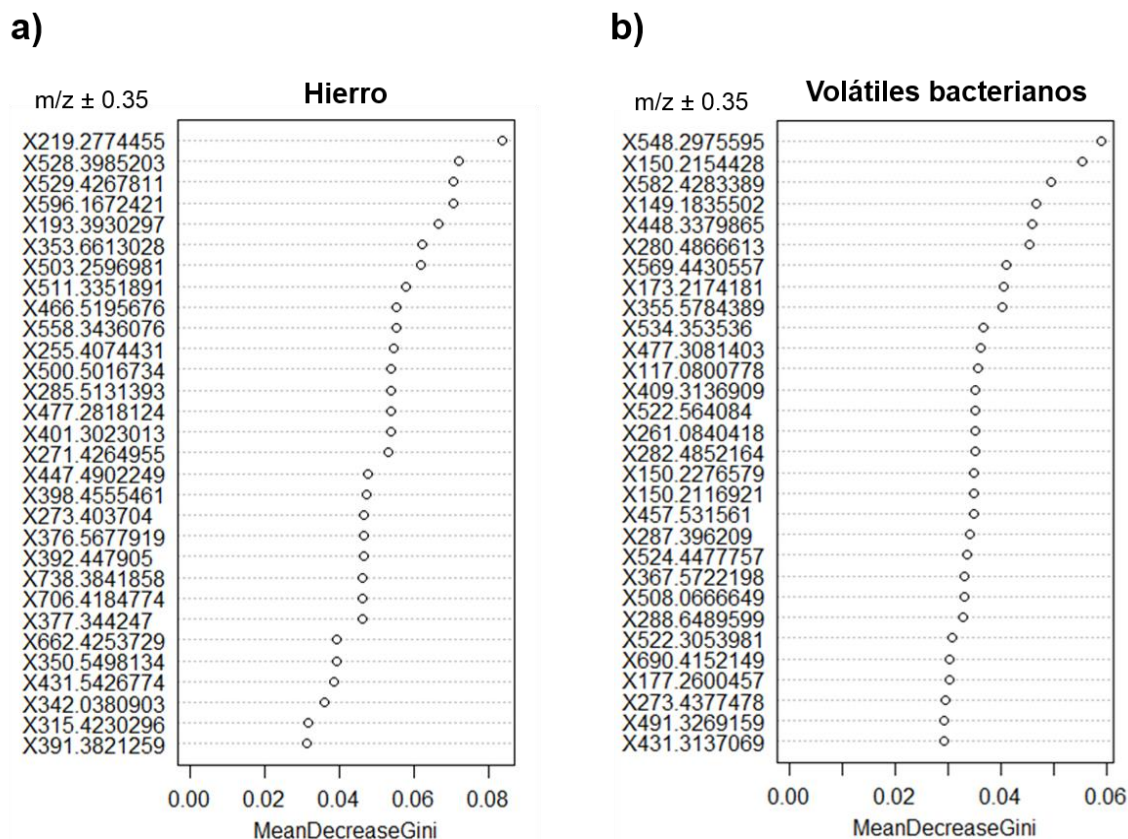


Fig. 3. Clasificación de iones obtenidos por el modelo Random Forest para diferenciar los exudados de raíz de *M. truncatula* entre tratamientos de acuerdo a los patrones de masas obtenidos por LC-ESI-MS. Los 30 iones más importantes discriminan entre la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo (a) y la exposición a compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 (b). Árboles de decisión = 500, error OOB para hierro = 0% y para volátiles bacterianos = 16.67%.

A partir de la información obtenida por Random Forest se realizó un análisis estadístico no paramétrico que se muestra en la Fig. 4. El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) mostró que las plantas de *M. truncatula* crecidas en deficiencia de hierro exudan compuestos que las diferencian de las crecidas en condiciones de suficiencia de hierro.

Con anterioridad se ha reportado que la deficiencia de hierro afecta el perfil de exudación de las plantas, lo que nos confirma el efecto observado en este estudio y validez sobre el estrés impuesto a las plantas. El perfil químico de los exudados modulado por la deficiencia de hierro es explicado por el componente principal 1

con un 55.5% de la variación, el cual claramente diferencia entre las dos condiciones de disponibilidad de hierro (+Fe y -Fe) (Fig. 4).

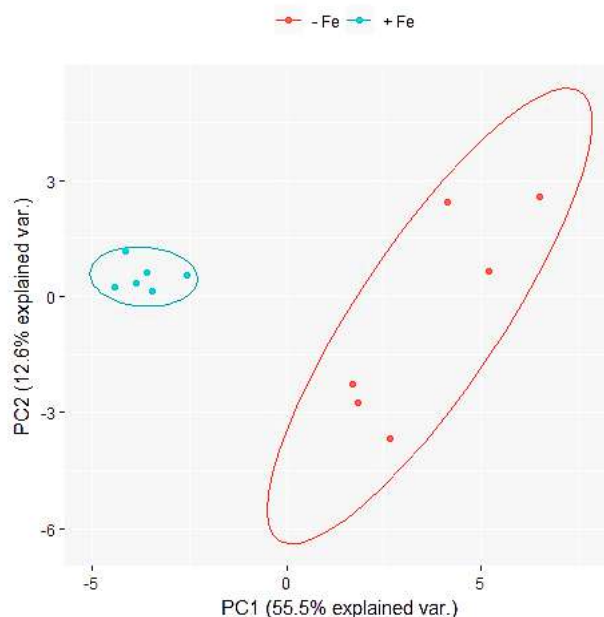


Fig. 4. Análisis de componentes principales construido con los 30 iones más importantes obtenidos del modelo Random Forest para el factor disponibilidad de hierro. El color azul muestra los perfiles químicos de los exudados de plantas crecidas en condiciones de suficiencia de hierro y el color rojo indica los exudados de plantas crecidas en deficiencia de hierro. Las diferencias entre grupos fueron contrastadas con una prueba PERMANOVA indicando que los grupos son estadísticamente diferentes ($p = 0.004$).

Posteriormente con los iones que presentaron los valores más altos en el índice de Gini, se construyó un PCA para la variable volátiles bacterianos. Este análisis permite observar que los perfiles químicos de los exudados de las plantas que fueron expuestas a los compuestos volátiles bacterianos de la cepa UMCV2 son estadísticamente diferentes, de acuerdo a la prueba PERMANOVA realizada ($p = 0.005$), a los de las plantas control (Fig. 5). Lo anterior indica que en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, la cepa UMCV2 está llevando a cabo una modulación del metabolismo de la planta que se ve reflejado en el patrón de exudación.

Debido a la evidencia tan clara de que los volátiles microbianos modulan la exudación radicular de acuerdo a lo observado en el PCA de la Fig. 5, se construyó

un mapa de calor (Heat Map, HM) que permitió tener una representación gráfica de las intensidades de los iones extraídos para la variable volátiles bacterianos (Fig.6)

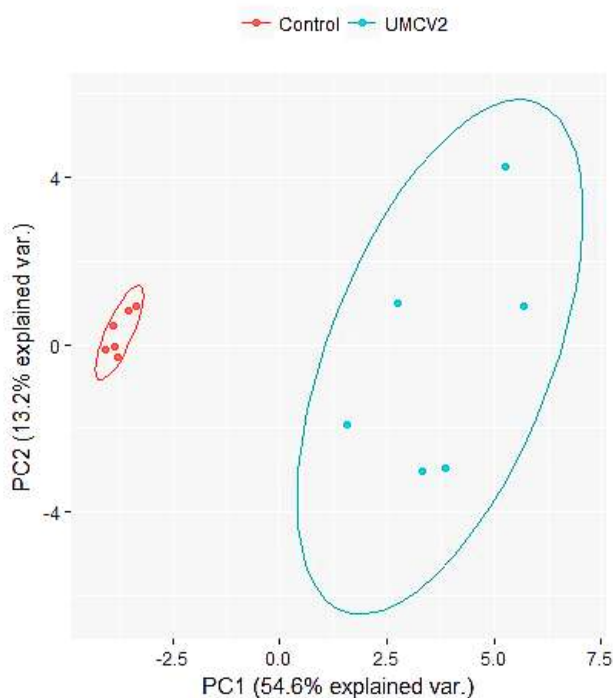


Fig. 5. Análisis de componentes principales construido con los iones más importantes obtenidos por el modelo Random Forest para el factor volátiles bacterianos. El color azul muestra los perfiles químicos de los exudados de plantas crecidas en presencia de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 y el rojo las plantas control. Las diferencias entre grupos fueron contrastadas con una prueba PERMANOVA ($p = 0.005$).

En la Fig. 6 se muestra el resultado del análisis de clasificación o clusters, donde se puede observar que se agrupó en una sola rama al control-Fe y UMCV2+Fe e interesantemente, la intensidad de la mayoría de los iones para el tratamiento UMCV2+Fe se intensifica en respuesta a los volátiles bacterianos comparado con la condición control-Fe, lo que sugiere que los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 en condiciones de suficiencia de hierro inducen cambios en el perfil de exudados emulando la existencia de un estrés abiótico por deficiencia nutrimental de Fe en las plantas. En una rama más externa se ubica UMCV2-Fe, e igualmente, la intensidad de la mayoría de los iones se intensificó cuando las plantas en deficiencia de hierro fueron expuestas a los volátiles de la UMCV2.

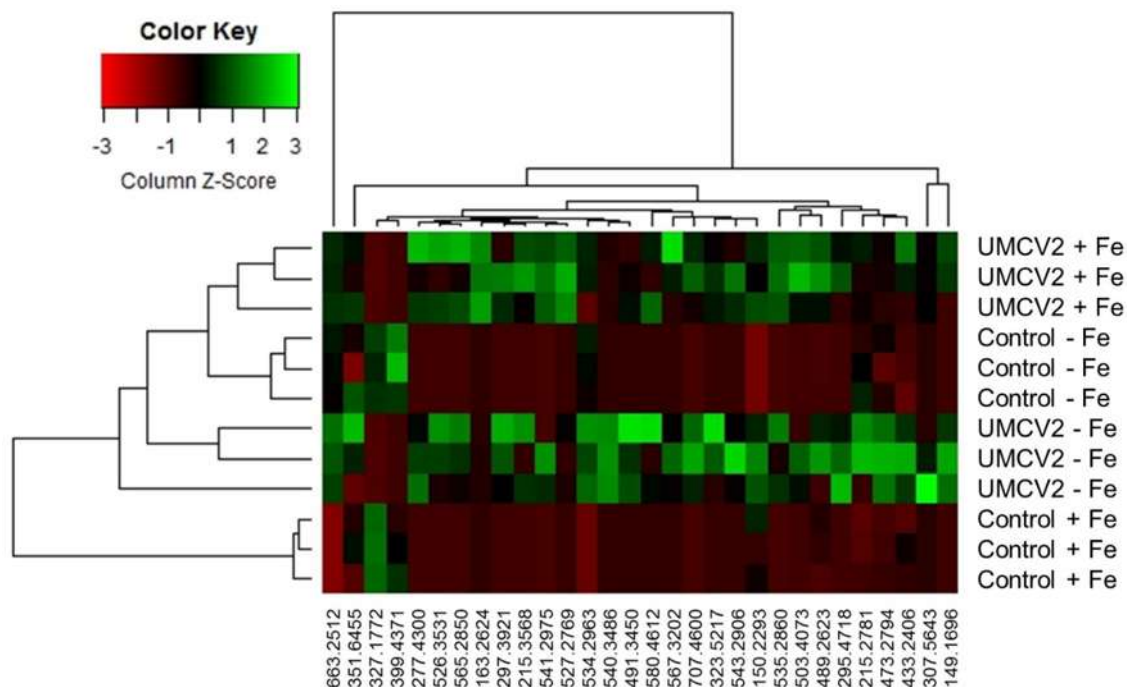


Fig.6. Mapa de calor generado con los 30 iones más importantes obtenidos del modelo Random Forest para la variable volátiles bacterianos. Al mapa de calor se agregó un análisis de cluster jerárquico utilizando distancia euclidiana y el algoritmo de Ward para la clasificación de los iones (eje x) y tratamiento (eje y).

Por otro lado, el análisis jerárquico clasificó a los perfiles químicos de exudados de las plantas control crecidas en suficiencia de hierro (control+Fe) como diferentes al resto de los tratamientos, ubicándolos en una rama completamente externa, esta diferencia es dada por la ausencia del metabolito de m/z 623.2512 principalmente (Fig.6).

Del mapa de calor también se destaca que los iones 327.1772 y 399.4371 m/z solo se encuentran presentes en los tratamientos control -Fe y +Fe, es decir, los compuestos volátiles bacterianos reprimieron su exudación. Otros iones que fueron exudados de manera exclusiva por las plantas que crecieron en presencia de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 fueron 540.3486 m/z para la condición -Fe, y 163.2624 y 527.2768 m/z para +Fe. Lo que indica la presencia de compuestos clave en respuesta a la exposición de los compuestos volátiles de la bacteria.

Se realizó la identificación putativa de los iones más importantes de acuerdo al modelo Random Forest para la variable volátiles bacterianos, se identificaron siete de los 30 iones extraídos con el software SpiderMass y la base de datos MassBank (Tabla 1).

Tabla 1. Metabolitos más importantes de acuerdo al modelo Random Forest en los exudados de *M. truncatula*, los cuales permiten discriminar entre plantas en interacción con los volátiles de *A. agilis* UMCV2 y controles. La identificación se realizó de forma putativa con el software SpiderMass y MassBank.

<i>m/z</i>	Masa monoisotópica (Da)	Modo de ionización	Nombre del compuesto	Función
163.262	162.032	[M+H] ⁺	Umbeliferona	Antimicrobiano
295.472	272.250	[M+Na] ⁺	Ent-isokaureno	Biosíntesis de kauralexinas
399.437	398.504	[M+H] ⁺	Asacumarina B	Quelante y reductor de Fe
473.279	472.355	[M+H] ⁺	Hederagenina	Antimicrobiano
540.349	539.526	[M+H] ⁺	Oleuropeina	Defensa, antioxidante
623.251	622.190	[M+H] ⁺	Pectolarina	Defensa, antioxidante
707.460	684.548	[M+Na] ⁺	2-Metoxi-6-all trans-octaprenil-2-metoxi-1,4-benzoquinol	Transformación redox de Fe

Los metabolitos que separan de forma significativa los tratamientos control de aquellos expuestos a los volátiles bacterianos de *A. agilis* UMCV2 principalmente tienen actividad de defensa, ya sea como antimicrobiano o antioxidante. Cabe resaltar, que dentro de los exudados radiculares de las plantas crecidas en interacción con la bacteria se encontraron compuestos involucrados en la quelación y reducción de hierro (asacumarina B 399.437 *m/z* y 2-metoxi-6-all trans-octaprenil-2-metoxi-1,4-benzoquinol 707.460 *m/z*).

DISCUSIÓN

El hierro es un elemento que está involucrado en muchos procesos importantes para la planta, de los cuales depende su crecimiento y desarrollo. El problema de la solubilidad del hierro en ambientes aeróbicos o de pH alcalino conlleva a una baja biodisponibilidad de este elemento para las plantas, por ello han desarrollado una diversidad de estrategias para aminorar el problema.

La exudación radicular de metabolitos con propiedades quelantes o reductoras de hierro por las plantas, inducida por la deficiencia de hierro ha sido poco estudiada en comparación con el mecanismo por reducción enzimática.

Sin embargo, los metabolitos secundarios que movilizan hierro pueden volverse cruciales para la adquisición de este elemento cuando la biodisponibilidad para las plantas cae por debajo de un umbral crítico como en el caso de los suelos alcalinos (Tsai y Schmidt, 2017).

Aunado a lo anterior, la exudación radicular es un proceso determinante en la interacción planta-microorganismo. Los microorganismos del suelo llevan a cabo un papel importante en la mineralización y transformación de nutrientes en la rizosfera (Marschner *et al.*, 2011). Al igual que las plantas, los microorganismos modifican su ambiente circundante con la secreción de moléculas con capacidad solubilizadora, quelante, reductora y/u oxidante.

Además, los microorganismos benéficos de la rizosfera pueden contribuir para mejorar la adquisición de hierro, debido a que algunos de ellos presentan diferente capacidad para inducir respuestas de deficiencia de hierro como por ejemplo la actividad férrico quelato reductasa potenciada, acidificación de la rizosfera, liberación de compuestos fenólicos y flavinas, y modificación del sistema radicular (Hinsinger *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2007; Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Los estudios ómicos, como los metabolómicos, se encuentran directamente relacionados con el fenotipo de las plantas, lo que permite tener una visión integral de la fisiología y correlacionar las rutas metabólicas con el establecimiento de la tolerancia al estrés. Los resultados producto de la metabolómica muestran el funcionamiento de la planta a nivel sistémico, lo que brinda una oportunidad para analizar los procesos fisiológicos que ocurren durante el estrés y en los procesos de adaptación.

Varios son los estudios llevados a cabo donde se relaciona la exudación radicular con la movilización de nutrimentos en la rizosfera. Sin embargo, en el presente estudio además de analizar los cambios generados en el perfil químico de exudados por la deficiencia de hierro en plántulas de *M. truncatula*, se analizó la modulación de la exudación por efecto de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2.

Previamente, Orozco-Mosqueda *et al.* (2013) observaron que la exposición de plantas de *M. truncatula* a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 inducía cambios en la acidificación de la rizosfera, lo que podría ser generado por la extrusión de protones como parte de la estrategia de adquisición de hierro o por la exudación de metabolitos con la misma finalidad, sin embargo, la acidificación de la rizosfera se llevó a cabo en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro.

Los resultados anteriores indican que la bacteria *A. agilis* UMCV2 de alguna manera modifica el proceso de exudación de la planta. De aquí surgió una pregunta, ¿Los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 modula la producción y exudación de metabolitos primarios y secundarios en plantas de *M. truncatula* para contrarrestar el estrés por deficiencia de hierro?

Como resultado del estudio realizado mediante UPLC-ESI-MS a exudados radiculares de plántulas de *M. truncatula*, se observó que el perfil químico de los compuestos exudados por las plantas crecidas en deficiencia de hierro es significativamente diferente del perfil de las plantas desarrolladas en suficiencia

($p=0.004$) (Fig. 4); ha sido reportado que plantas que experimentan deficiencia de hierro incrementan la exudación en respuesta al estrés nutrimental, y que los cambios en la exudación no solo están dados por la cantidad sino también por la complejidad de los metabolitos liberados (Hinsinger *et al.*, 2003).

Además, se analizaron los exudados de plantas crecidas en interacción con compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 durante 10 días en suficiencia y deficiencia de hierro. Los perfiles químicos de los exudados entre plantas control y plantas con volátiles de la cepa UMCV2 son estadísticamente diferentes ($p = 0.005$) (fig. 5), indicando que la interacción microbiana modula el proceso de exudación de las plantas de manera independiente de la disponibilidad de hierro en el medio.

Acorde a los resultados obtenidos en este estudio, Pii *et al.* (2015) realizaron un análisis de exudados radiculares en plantas de pepino crecidas hidropónicamente o en condiciones alcalinas, se encontró que las plantas responden diferencialmente dependiendo del estatus nutrimental por hierro. Adicionar un inóculo de *Azospirillum brasilense* al suelo permitió una recuperación más rápida de los síntomas de deficiencia de hierro de las plantas, entre ellos se observó un incremento en la clorofila, biomasa y contenido de Fe en las hojas. Sin embargo, se observó un decremento en la exudación de ácidos orgánicos en plantas inoculadas y en el caso de los aminoácidos estos se incrementaron por efecto de la deficiencia de hierro incluso en las plantas inoculadas.

Lo anterior muestra que microorganismos benéficos de la rizosfera pueden modificar los compuestos exudados por las plantas generando cambios significativos.

Los exudados de plantas de *M. truncatula* en interacción con los volátiles de UMCV2 incrementaron la exudación de los compuestos identificados como ent-isokaureno (295.472 m/z) y 2-metoxi-6-all trans-octaprenil-2-metoxi-1,4-benzoquinol (707.460 m/z), ambos fueron encontrados en las dos condiciones de disponibilidad de hierro,

sin embargo, su abundancia se incrementa en la condición de deficiencia de hierro (Fig. 6). El ent-isokaureno está involucrado en la síntesis de kauralexinas, diterpenoides asociados a compuestos de defensa, las kauralexinas han sido reportadas como necesarias para la resistencia de plantas de maíz a la pudrición del tallo causada por *Fusarium* (Schmelz *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2019), estos compuestos se producen en respuesta a estrés biótico, sin embargo, en presencia de los volátiles de la cepa UMCV2 se induce su exudación. 2-metoxi-6-all trans-octaprenil-2-metoxi-1,4-benzoquinol es un compuesto que debido a su naturaleza química pudiera estar participando en procesos redox en la rizosfera, como aquellos involucrados en los cambios de pH o en transformación de metales como el hierro (Husson, 2013; Jiang *et al.*, 2015).

Las plantas crecidas en suficiencia de hierro y en exposición a los volátiles de la cepa UMCV2 presentaron iones exclusivos dentro del pool de exudados, 163.262 y 527.277 *m/z*, los cuales no fueron detectados en el resto de los tratamientos. El metabolito de *m/z* 163.262 fue identificado putativamente como umbeliferona (7-hidroxycumarina), el cual ha sido reportado como un compuesto con actividad antimicrobiana (Simkovitch *et al.*, 2015; Yang, *et al.*, 2018). Stringlis *et al.* (2018) mencionan que las cumarinas que tienen un efecto antimicrobiano pueden participar en el establecimiento del microbioma de las plantas mediante la eliminación de microorganismos patógenos para los cuales dichos compuestos son tóxicos.

La interacción de los factores deficiencia de hierro y los volátiles bacterianos, provocó la exudación de hederagenina (473.279 *m/z*) y oleuropeina (540.349 *m/z*), compuestos antimicrobiano y antioxidante respectivamente (Petridis *et al.*, 2012; Paskovic *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019), ambos metabolitos se encuentran involucrados en la defensa de plantas. La oleuropeina se incrementa por efecto de estrés hídrico y deficiencia nutrimental por Mn, como un mecanismo adaptativo para reducir el daño oxidativo inducido por el estrés.

Como parte de los cambios inducidos por los volátiles bacterianos en el perfil de exudados de las plantas de *M. truncatula*, los iones 327.177 y 399.437 m/z , solo fueron detectados en los tratamientos control. El ion 399.437 m/z presenta una mayor abundancia en los exudados del tratamiento control-Fe y corresponde a asacumarina B (cumarina sesquiterpenoide), de acuerdo a MassBank, como ha sido mencionado con anterioridad, éstos compuestos están involucrados en el proceso de solubilización del hierro en la rizosfera en condiciones de deficiencia. Finalmente en el mapa de calor se detectó un ion que puede ser considerado como el responsable de la clasificación de los exudados control+Fe, 623.251 m/z , identificado putativamente como pectolarina, una flavona con actividad antimicrobiana y antioxidante (Nazaruk y Jakoniuk, 2005).

Los cambios en el contenido de metabolitos en respuesta a la deficiencia de hierro en las plantas de *M. truncatula* y por interacción con los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 pueden llevar a la planta a procesos adaptativos para mantener la homeostasis del Fe.

Durante el análisis de los cromatogramas obtenidos de UPLC-ESI-MS se detectaron cambios en cuanto a la intensidad de ciertos picos en determinados tiempos de retención, en un análisis más profundo se determinó que los cambios estaban dados por los iones 379.3388 m/z y 517.1754 m/z , estos iones fueron identificados en MassBank y corresponden a conferona y ononina respectivamente.

La ononina o formononetina-7-O-glucósido es una isoflavona presente en las plantas leguminosas, este metabolito incrementó significativamente en los exudados de la plantas por efecto de la interacción con los compuestos volátiles bacterianos. De acuerdo a un trabajo de Wang *et al.* (2017) la ononina tiene efecto antimicrobiano contra bacterias gram positivas (*S. aureus* y *E. faecium*) y gram negativas (*P.aeruginosa*, *S. pneumonia* and *E. coli*).

La ononina es un flavonoide y como tal esta reportado que tiene actividad antioxidante. Pi *et al.* (2019) realizaron un estudio en plantas de soya inoculadas con *Sinorhizobium fredii*, dentro de los resultados encontraron que los niveles endógenos de 19 flavonoides se incrementaron y 16 presentaron una marcada disminución. Dentro de los flavonoides que disminuyeron se encuentra la ononina, esta isoflavona tuvo un comportamiento similar cuando se agregó estrés salino al experimento, indicando que podría jugar un papel significativo en las rutas de respuesta a la inoculación con el rizobio y al estrés salino. Concluyendo que en este estudio la ononina podría actuar como un efector en otros procesos fisiológicos más que en proteger las células contra el estrés oxidativo.

La propiedad antioxidante de los flavonoides es bien conocida (Yamasaki *et al.*, 1997), sin embargo, su impacto fisiológico no han sido abordado adecuadamente a nivel de toda la planta. La base química de la propiedad antioxidante de los flavonoides ha sido atribuida a los grupos hidroxilo en su estructura, los compuestos que tienen dos grupos hidroxilo en el anillo B son más eficientes para reducir ROS comparado con los que solo presentan uno (Agati *et al.*, 2012). La ononina solo tiene un grupo hidroxilo en el anillo B.

Los derivados glicosilados de flavonoides se ha observado que son donadores de electrones o átomos de hidrógeno en las reacciones antioxidantes (Hernandez, *et al.*, 2009). Los flavonoides tienen estructuras diversas al igual que sus funciones fisiológicas, por ejemplo la formononetina es un intermediario esencial de fitoalexinas de leguminosas y tiene un papel importante en la simbiosis rhizobium-leguminosa (Zhang *et al.*, 2009; Agati *et al.*, 2012). Flavonoides monohidroxilados en el anillo B, como 7,4'-dihydroxiflavona, son moléculas señal en la simbiosis rhizobia-leguminosas y además puede interactuar con un amplio rango de bacterias en la rizosfera favoreciendo su reclutamiento (Szoboszlay *et al.*, 2016).

De lo anterior se deduce que la ononina dentro de los exudados radiculares de plantas expuestas a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2, pudiera tener un

papel de molécula señal para el reclutamiento, probablemente, de la cepa productora de los volátiles inductores de la misma. Es probable que la ononina esté involucrada en la colonización de plantas de *M. truncatula* con la cepa UMCV2 (bacteria endófito de leguminosas); en la figura 1b se muestra graficada la intensidad de este metabolito y puede observarse que en la condición de deficiencia de hierro la abundancia es menor en comparación con la condición de suficiencia, esto se correlaciona directamente con la colonización encontrada en las plantas, es decir, la deficiencia de hierro disminuye significativamente la colonización (datos no mostrados) al igual que el contenido de ononina.

El ion 379.3388 m/z , se identificó en la base de datos MassBank como conferona, una cumarina sesquiterpenoide de la clase benzopiranoide. La abundancia relativa de esta metabolito se incrementa significativamente por efecto de la deficiencia de hierro. Se ha observado en varios estudios que las cumarinas participan en la respuesta adaptativa a la deficiencia de hierro (Tsai y Schmidt, 2017). Las cumarinas podrían ayudar en la adquisición de hierro mediante quelación o reducción de Fe^{+3} , estos compuestos se producen en respuesta a la deficiencia de hierro. Las cumarinas son comúnmente llamadas cumarinas movilizadoras de hierro (IMCs, por sus siglas en inglés).

La capacidad de las cumarinas para quelar y movilizar hierro son variables y depende de la presencia de un grupo catecólico en su estructura. Un grupo catecólico se caracteriza por la presencia de dos grupos hidroxilo adyacentes en el anillo de benceno de la estructura de la cumarina, que se asemeja a la estructura de los sideróforos microbianos que participan en la quelación y absorción de Fe por los microbios que los secretan (Neilands, 1995; Verbon *et al.* 2017).

Recientemente, Stringlis *et al.* (2018) reportaron la participación de las cumarinas en la interacción planta-microorganismo. Previo a llevarse a cabo la colonización de una planta por microorganismos del suelo, es necesario competir por el nicho y tener la capacidad de utilizar los exudados radiculares como fuente de carbono. Sin

embargo, los exudados de las raíces son una mezcla compleja de metabolitos de los cuales algunos pueden ser utilizados como alimento y otros son perjudiciales para los microorganismos (Bais *et al.*, 2006). En este sentido, las cumarinas son actores importantes en el reclutamiento del microbioma de la raíz. Con todo lo anterior, se puede concluir que los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 modifican el perfil químico de exudación de plántulas de *M. truncatula* crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, incrementando la exudación de compuestos relacionados con la movilización de hierro y la comunicación planta-bacteria.

LITERATURA CITADA

Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 2012, 196:67-76.

Badri, D.V.; Vivanco, J.M. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 2009, 32, 666–681.

Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S; Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2006, 57:233-266.

Canarini, A.; Kaiser, C.; Merchant, A.; Richter, A.; Wanek, W. Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. *Front. Plant Sci.* 2019, 10:157.

Chutia, R.; Abel, S.; Ziegler, J. Iron and Phosphate Deficiency Regulators Concertedly Control Coumarin Profiles in *Arabidopsis thaliana* Roots During Iron, Phosphate, and Combined Deficiencies. *Front. Plant Sci.* 2019, 10:113.

Ding, Y.; Murphy, K.M.; Poretsky, E.; Mafu, S.; Yang, B.; Char, S.N.; Christensen, S.A.; Saldivar, E.; Wu, M.; Wang, Q.; Lexiang Ji, L.; Schmitz, R.J.; Kremling, K.A.; Buckler, E.S.; Shen, Z.; Briggs, S.P.; Bohlmann, J.; Sher, A.; Castro-Falcon, G.; Hughes, C.C.; Huffaker, A.; Zerbe, P.; Schmelz, E.A. Multiple genes recruited from hormone pathways partition maize diterpenoid defences. *Nat. Plants* 2019, 5:1043-1056.

Du, Y.; Chu, H.; Chu, I.K.; Lo, C. CYP93G2 Is a Flavanone 2-Hydroxylase Required for C-Glycosylflavone Biosynthesis in Rice. *Plant Physiol.* 2010, 154:324-333.

Flores-Cortez, I.; Winkler, R.; Ramírez-Ordorica, A.; Elizarraraz-Anaya, M.I.C.; Carrillo-Rayas, M.T.; Valencia-Cantero, E.; Macías-Rodríguez, L. A mass spectrometry-based study shows that volátiles emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 increase the content of Brassinoesteroids in *Medicago truncatula* in response to iron deficiency stress. *Molecules* 2019, 24:3011.

Fourcroy, P.; Tissot, N.; Gaymard, F.; Briat, J.F.; Dubos, C. Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root Fe²⁺ transport system. *Mol. Plant* 2016, 9:485-488.

Greer-Phillips, S.E.; Stephens, B.B.; Alexandre, G. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 2004, 186:6595-6604.

Hartmann, A.; Schmid, M.; van Tuinen, D.; Berg, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 2009, 321:235-257.

Hernandez, I.; Alegre, L.; Van Breusegem, F.; Munne-Bosch, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci.* 2009, 14:125-132.

Hinsinger, P.; Plassard, C.; Tang, C.; Jaillard, B.; Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 2003, 248:43e59.

Husson, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 2013, 362:389-417.

Jiang, C.; Garg, S.; Waite, T.D. Hydroquinone-Mediated Redox Cycling of Iron and Concomitant Oxidation of Hydroquinone in Oxidic Waters under Acidic Conditions: Comparison with Iron-Natural Organic Matter Interactions. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49:14076-14084.

Jin, C.W.; You, G.Y.; Tang, C.X.; Wu, P.; Zheng, S.J. Iron-deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Physiol.* 2007, 144:278-285.

Jones D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 1998, 205:25-44.

Kobayashi, T.; Nishizawa, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2012, 63:131-152.

Lopez-Baena, F.J.; Ruiz-Sainz, J.E.; Rodriguez-Carvajal, M.A.; Vinardell, J.M. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-Soybean symbiosis. *Int J Mol Sci* 2016, 17: 755.

Liu, Y.; Chen, L.; Wu, G.; Feng, H.; Zhang, G.; Shen, Q.; Zhang, R. Identification of root-secreted compounds involved in the communication between cucumber, the beneficial *Bacillus amyloliquefaciens*, and the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe* 2017, 30:53-62.

Liu, Q.; Khakimov, B.; Cárdenas, P.D.; Cozzi, F.; Olsen, C.E.; Jensen, K.R.; Hauser, T.P.; Bak, S. The cytochrome P450 CYP72A552 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores. *New Phytol* 2019. doi:10.1111/nph.15689.

Lynch, J.M. 1987. *The Rhizosphere*. Wiley Interscience, Chichester, UK.

Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic. 1995 2nd ed.

Marschner, P.; Crowley, D., Rengel, Z., Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. *Soil Biol. Biochem.* 2011, 43:883e894.

Nazaruk, J.; Jakoniuk, P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 102:208–212.

Neilands, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:26723-26726.

Orozco-Mosqueda, M.C.; Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; Santoyo, G.; Flores-Cortez, I.; Alfaro-Cuevas, R.; Valencia-Cantero, E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 2013, 362:51-66.

Pasković, I.; Herak Ćustić, M.; Pecina, M.; Bronić, J.; Ban, D.; Radić, T Poščic, F.; Špika, M.J.; Soldo, B.; Palcic, I.; Goreta Ban, S. Manganese soil and foliar fertilization of olive plantlets: the effect on leaf mineral and phenolic content and root mycorrhizal colonization. *J Sci Food Agric* 2019, 99:360-367.

Petridis, A.; Therios, I.; Samouris, G.; Koundouras, S.; Giannakoula, A. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 2012, 60:1-11.

Pii, Y.; Penn, A.; Terzano, R.; Crecchio, C.; Mimmo, T.; Cesco, S. Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2015, 87:45e52

Pi, E.; Xu, J.; Huihui Li¹, Fan, W.; Zhu, C.; Zhang, Y.; Jiang, J. He, L.; Lu, H.; Wang, H.; Poovaiah, B.W.; Du, L. Enhanced salt tolerance of rhizobia-inoculated soybean correlates with decreased phosphorylation of the transcription factor GmMYB183 and altered flavonoid biosynthesis. *Mol Cell Proteomics* 2019, <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001704>

Rasse, D.P.; Rumpel, C., Dignac, M.F. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 2005, 269:341-356.

Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R.S.; Bestervelt, L.L.; Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 2013, 53:303e317.

Schmelz, E.A.; Kaplan, F.; Huffaker A.; Dafoe, N.J.; Vaughan M.M.; Ni, X.; Roca, J.R.; Alborn H.T.; Teal, P.E. Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *PNAS* 2011, 108:5455-5460.

Schmidt, M.W.I.; Torn, M.S.; Abiven, S.; Dittmar, T.; Guggenberger, G.; Janssens, I.A.; Kleber, M.; Kögel-Knabner, I.; Lehmann, J.; Manning, D.A.C. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 2011, 478:49-56.

Schmidt H, Günther C, Weber M, Spörlein C, Loscher S, Böttcher C, Schobert R, Clemens S. 2014. Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *PLoS One* 9, 102444.

Simkovitch, R.; Huppert, D. Photoprotolytic Processes of Umbelliferone and Proposed Function in Resistance to Fungal Infection. *J. Phys. Chem. B* 2015, 119:14683-14696.

Stringlis, I.A.; Yu, K.; Feussner, K.; de Jonge, R.; Van Bentum, S.; Van Verk, M.C.; Roeland L. Berendsen, R.L.; Bakker, P.A.H.M.; Feussner, I.; Pieterse, C.M.J. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115:E5213-E5222.

Szoboszlay, M.; White-Monsant, A.; Moe, L.A. The Effect of Root Exudate 7,4-Dihydroxyflavone and Naringenin on Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE* 2016, 11: e0146555.

Tsai, H.H.; Schmidt, W. Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends Plant Sci.* 2017, 22:538-548.

Uren N.C. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (eds R. Pinton, Z. Varanini & P. Nannipieri), 2000, pp. 19–40. Marcel Dekker, New York, NY, USA.

Verbon, E.H.; Trapet, P.L.; Stringlis, I.A.; Kruijs, S.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. Iron and immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017, 55:355-375.

Wang, T.; Liu, Y.; Li, X.; Xu, Q.; Feng, Y.; Yanga, S. Isoflavones from green vegetable soya beans and their antimicrobial and antioxidant activities. *Sci Food Agric* 2018; 98:2043-2047.

Winkler, R. SpiderMass: Semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *J. Mass Spectrom.* 2015, 50:538-541.

Yamasaki, H.; Sakihama, Y.; Ikehara, N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol. Biochem.* 1997, 115:1405-1412.

Yang, L.; Wu, L.; Yao, X.; Zhao, S.; Wang, J.; Li, S.; Ding, W. Hydroxycoumarins: New, effective plant-derived compounds reduce *Ralstonia pseudosolanacearum* populations and control tobacco bacterial wilt. *Microbiological Research* 2018, 215:15-21.

Zhalnina, K.; Louie, K.B.; Hao, Z.; Mansoori, N.; da Rocha, U.N.; Shi, S.; Cho, H.; Karaoz, U.; Loqué, D.; Bowen, B.P.; Firestone, M.K.; Northen, T.R.; Brodie, E.L. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial. *Nat Microbiol* 2018, 3:470-480.

Zhang, J.; Subramanian, S., Stacey, G.; Yu, O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J.* 2009, 57:171-183.

7. DISCUSIÓN

El hierro (Fe) es un metal abundante en la corteza terrestre pero en condiciones alcalinas su biodisponibilidad disminuye, debido a esto su carencia se ha convertido en un problema alrededor del mundo, donde más de la tercera parte de los suelos arables son potencialmente deficientes en hierro (Guerinot *et al.*, 2007). El Fe es un micronutriente importante en la dieta humana y frecuentemente deficiente, se estima que dos billones de personas en el mundo pueden llegar a presentar carencia, en este contexto, la biofortificación es una forma posible de alimentar a los humanos de manera segura con suficiente hierro directamente en la dieta (Murgia *et al.*, 2012).

La absorción de hierro por las plantas es el resultado de interacciones complejas entre la planta y la rizosfera. La solubilidad del hierro depende de factores dependientes del suelo que determinan su biodisponibilidad como por ejemplo la especiación del Fe en la solución, las reacciones redox en la solubilización y la función de los quelatos en la raíz de la planta (Lindsay, 1995).

En este estudio, la escasez de hierro durante 21 días causó limitación en la producción de biomasa aérea y de raíz, sin embargo, las plantas respondieron modificando la longitud de la raíz primaria como mecanismo de adaptación al estrés. En contraste, cuando las plantas crecieron en interacción con los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 durante 10 días, se incrementó la biomasa de la parte aérea y se observó una tendencia a favorecer la altura y la longitud de la raíz primaria en condiciones de deficiencia de hierro. El número de raíces laterales se incrementó de forma significativa en las plántulas por efecto de la exposición a los volátiles de UMCV2. Éstos efectos fenotípicos son consistentes con las modificaciones del sistema radicular de las plantas para maximizar la superficie de raíz para incrementar el área de búsqueda y absorción de nutrientes (Marschner, 2011).

La deficiencia de hierro altera la síntesis de clorofila, lo que explica el amarillamiento en las hojas de *M. truncatula* y la consecuente disminución en el contenido de clorofila, asociado a esto las hojas presentaron disminución en la intensidad de lípidos componentes del cloroplasto como el ion 797.49 *m/z* identificado putativamente como 1-18:3-2-18:3-monogalactosildiacilglicerol. La plasticidad de las membranas de los tilacoides en respuesta a la deficiencia de hierro es evidenciada mediante análisis proteómicos del cloroplasto (Timperio *et al.*, 2007; Laganowsky *et al.*, 2009). La condición de deficiencia de Fe también modifica el transporte de electrones en el PSI y PSII de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Msilini *et al.*, 2013; Andaluz *et al.*, 2006).

El hierro es un constituyente de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias y cloroplastos, la deficiencia de Fe genera cambios redox a nivel celular, resultando en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler *et al.*, 2004). Se sabe que los grupos hemo de las proteínas sufren degradación cuando son expuestos a estrés oxidativo, siendo oxidados a su forma férrica hemina (Müllebner *et al.*, 2015), que es también un pro-oxidante (Lu *et al.*, 2012).

Se ha observado que las plantas deficientes en hierro son productoras de ROS, probablemente debido a que el grupo hemo también se encuentra presente en algunas de las enzimas encargadas de detoxificar a estas especies, de manera que niveles bajos de hierro conducen a la acumulación de ROS (Busch y Montgomery, 2015). Para contrarrestar el estrés oxidativo y regular los niveles de ROS, las plantas han desarrollado un sistema antioxidante que comprende dos niveles de regulación, mediados por: i) enzimas (superóxido dismutasa SOD, catalasa CAT, peroxidasa POX, ascorbato peroxidasa APX, glutatión reductasa GR, guaiacol peroxidasa GPX, monodehidriascorbato reductasa MDHAR y dehidroascorbato reductasa DHAR) y ii) metabolitos como ascorbato (ASC), glutatión (GSH) compuestos fenólicos y carotenoides (Spirt *et al.*, 2010; Mittler *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2014).

En el presente estudio mediante DLI-ESI-MS se analizó el efecto de la deficiencia de hierro y de los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2 en el metaboloma de hojas de *M. truncatula* crecida en suficiencia y deficiencia de hierro. La deficiencia de hierro modificó el metabolismo de las hojas, el perfil químico fue estadísticamente diferente al control con suficiencia de hierro. Utilizando el algoritmo Random Forest se extrajeron los 30 iones más importantes del estudio para la variable volátiles bacterianos. Los resultados muestran que la presencia de los volátiles de la cepa UMCV2 modifica significativamente el perfil químico de las hojas de las plantas de *M. truncatula* en comparación con los tratamientos control (cepa L264 y control).

Mediante el software SpiderMass, se identificaron varios metabolitos que participan en el proceso de contrarrestar el estrés por deficiencia de hierro en las hojas de *M. truncatula*. Algunos de ellos incrementaron su abundancia en respuesta a la condición deficiente, particularmente los relacionados a la biosíntesis de riboflavina (1-Deoxi-l-glicero-tetrulosa 4-phosphate y 5-Amino-6-d-ribitilamino uracilo), nospermina (poliamina) y marmesina (precursor de cumarinas). Se han reportado estudios donde se sugiere que la ruta biosintética de la riboflavina es sobrerregulada en condiciones de deficiencia de hierro, esto debido a que los compuestos flavin son exportados y se acumulan en las raíces carentes de Fe. Además, la riboflavina ha sido propuesta como donadora de electrones para las reacciones de reducción de Fe⁺³, como cofactor o como agente quelante de hierro (González-Vallejo *et al.*, 1998; Rodríguez-Celma *et al.*, 2011).

Las poliaminas son compuestos que son conocidos por su participación en la regulación de procesos de crecimiento y desarrollo, así como en respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas; el grupo al que pertenece el otro compuesto que se modifica por efecto de la deficiencia de hierro en las hojas es el de las cumarinas, estos compuestos participan en la respuesta adaptativa a la deficiencia de hierro, mecanismo que podrían llevar a cabo mediante la quelación o reducción de hierro férrico (Wuddineh *et al.*, 2017; Tsai y Schmidt, 2017).

Las rizobacterias PGPRs participan en la adaptación o aminoración del estrés en plantas. Algunas PGPRs contribuyen a reducir el daño por estrés abiótico mediante la modulación del contenido de metabolitos como aminoácidos y carbohidratos (Curzi *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012). *Arthrobacter agilis* UMCV2 modula mecanismos de adquisición de hierro en plantas mono y dicotiledóneas en condiciones tanto de suficiencia como de deficiencia de hierro (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013, Cástulo-Rubio *et al.*, 2015; Hernández-Calderón *et al.*, 2018; Montejano-Ramírez *et al.*, 2018).

Como resultado de la interacción de las plántulas de *M. truncatula* con *A. agilis* UMCV2, la planta realizó una modulación química del contenido de metabolitos. Los volátiles de la cepa UMCV2 favorecieron la acumulación de flavonoides en las hojas en la condición de suficiencia y deficiencia de hierro, particularmente el kaempferol (287.19 *m/z*), otros compuestos identificados que se incrementaron en intensidad incluyen aquellos involucrados en el metabolismo primario de las plantas como piruvato (88.08 *m/z*), glicolato (97.83 *m/z*) y coenzima A (790.06 *m/z*).

En el presente estudio, como método de validación de la técnica DLI-ESI-MS empleada y la identificación putativa llevada a cabo con el software SpiderMass se realizó la determinación y cuantificación del brasinolido (BR) mediante GC-SIM-MS, utilizando como estándar de referencia el 24-epibrasinolido. Las fitohormonas y moléculas mensajeras como las auxinas, etileno y óxido nítrico han sido reportadas que participan en la regulación de los procesos fisiológicos inducidos por la deficiencia de hierro (Römheld y Marscher, 1986; Ivanov *et al.*, 2012).

El brasinolido fue considerado debido a que en la identificación putativa que se realizó sobre los iones clasificadores, se identificaron a tres precursores de la ruta de biosíntesis de brasinoesteroides (5-dehidroepisterol 397.20 *m/z*, 6-hidroxicastasterona 467.07 *m/z* y 6-deoxocastasterona 419.15 *m/z*), además existen reportes sobre el potencial de los BRs para mejorar la tolerancia al estrés (Zhang *et al.*, 2014; Ahammed *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Hegazi *et al.*, 2017;

Wang *et al.*, 2017), y evidencia que soporta que ésta fitohormona participa en otros procesos fisiológicos como crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la respuesta a estrés biótico (Sasse, 2003).

Los resultados muestran que la deficiencia de hierro incrementa la concentración del BR en plantas de *M. truncatula*, la concentración de la fitohormona se incrementa significativamente (>10 veces) cuando además de la deficiencia de Fe, las plantas son expuestas a los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2, observándose un efecto sinérgico. Respecto a la participación de los BRs en la respuesta a la deficiencia de nutrimentos, existe poca información. Uno de los trabajos donde se analizó el efecto de BRs sobre los mecanismos de adquisición de hierro es el realizado por Wang *et al.* (2012), donde agregaron de manera exógena 24-epibrasinolido (EBR) a plántulas de pepino. Los resultados del estudio demuestran que el EBR tiene un efecto similar a la deficiencia de hierro sobre la actividad férrico quelato reductasa (FRO) y acidificación de la rizosfera, sin embargo, este efecto no se observa en plántulas crecidas en deficiencia de hierro.

La aplicación del EBR incrementó la clorosis de las hojas y redujo el contenido de clorofila en las plántulas deficientes de hierro; resultados similares fueron observados en el presente estudio, donde las hojas de las plántulas que fueron expuestas a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 por un periodo de tiempo de 10 días presentaron una disminución del contenido de clorofila en las dos condiciones de disponibilidad de hierro, siendo mayor la disminución en las plantas crecidas en deficiencia de hierro. Por lo tanto, el contenido de clorofila es inversamente proporcional al contenido de BR en las hojas, sugiriendo que los BRs pueden regular negativamente el contenido de clorofila en las plantas.

Es importante mencionar que el contenido de clorofila es un indicativo del status de hierro que presenta la planta. En el trabajo de Wang *et al.* (2012) analizaron el contenido de hierro en las hojas y raíces de las plántulas de pepino, los resultados mostraron una disminución del contenido de Fe en las hojas pero un incremento en

las raíces de las plantas que fueron expuestas al EBR en suficiencia y deficiencia de hierro, indicando que el EBR puede probablemente incrementar la absorción de hierro y/o suprimir la traslocación de este elemento de las raíces a la parte aérea.

Presumiblemente este efecto fue el observado como resultado de la exposición de las plántulas de *M. truncatula* a los compuestos volátiles de *A. agilis* UMCV2, apoyando lo anteriormente mencionado se encuentran los trabajos de Orozco Mosqueda *et al.*, (2013), Cástulo-Rubio *et al.*, (2015) y Hernández-Calderón *et al.*, (2018) donde se ha demostrado que los VOCs de esta cepa estimulan los mecanismos de adquisición de hierro en plantas crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. Resultados similares a los observados en plántulas de pepino fueron demostrados en plantas de arroz, planta con estrategia II para la adquisición de hierro, en dicho estudio se encontró que la concentración de hierro en la parte aérea fue negativamente regulada por BRS (Wang *et al.*, 2015).

La aplicación exógena de EBR suprimió la expresión de *OsYSL2*, encargado de la carga de Fe desde el floema a las células del mesófilo, conduciendo a una baja concentración de hierro en los protoplastos y una incrementada clorosis en las hojas. Estos resultados implican que los BRs puede estar involucrados en la regulación del transporte y traslocación de hierro de la raíces a los brotes. El decremento de la concentración de hierro en la parte aérea mediada por BRs incrementa la clorosis de las hojas, la cual puede retroalimentar a la raíz y activar la expresión de genes relacionados a la homeóstasis del Fe, lo que conduce a la acumulación de hierro en las raíces. En 2006, Lucerna *et al.* mostraron que la respuesta a la deficiencia de hierro no es únicamente dependiente del contenido de Fe en las raíces, hay señales de la parte aérea que pueden estar involucradas. En este contexto, se han sugerido señales sistémicas para jugar papeles en las respuestas inducidas por la deficiencia de hierro (Romera *et al.*, 1992; Vert *et al.*, 2003).

Por otro lado, la agricultura moderna exige sistemas sostenibles que pueden mantener la productividad mientras se reducen insumos y pérdidas, aumentando la biodiversidad de agroecosistemas. En este contexto, entender las interacciones que se llevan a cabo bajo tierra que determinan la competencia y facilitación de las estrategias para la búsqueda de nutrimentos es esencial (Giles *et al.*, 2017).

La exudación de compuestos a través de las raíces es un proceso importante y determinante en las interacciones de la planta con el suelo. El proceso de distribución del carbono y su adaptabilidad es de vital importancia para las plantas para responder exitosamente a las condiciones ambientales cambiantes (Canarini *et al.*, 2019).

Los microorganismos del suelo también afectan el proceso de exudación de la raíz. Algunos microorganismos pueden liberar compuestos secundarios para estimular la exudación de aminoácidos en la raíz (Phillips *et al.*, 2004), otros microorganismos del suelo han demostrado que pueden modificar la composición de metabolitos de la planta entera (Curzi *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012). Lo anterior resalta la influencia bidireccional entre las raíces y sus comunidades microbianas rizosféricas, por lo tanto, las estrategias de las plantas para la búsqueda de nutrimentos puede ser afectada por la población microbiana asociada a ella (Pii *et al.*, 2015a; Alegria Terrazas *et al.*, 2016).

Como parte del objetivo 3 de este estudio se analizaron los exudados de plantas de *M. truncatula* en interacción con los compuesto volátiles de *A. agilis* UMCV2, con la finalidad de analizar si la modulación del metabolismo que lleva cabo la cepa UMCV2 en el follaje de la planta influencia la proceso de exudación, favoreciendo compuestos que pudieran contribuir con la aminoración del estrés por deficiencia de hierro.

Los exudados radiculares de plántulas de *M. truncatula* fueron colectados de forma axénica y fueron concentrados 100 veces previo a su análisis mediante UPLC-ESI-

MS. Los resultados obtenidos demostraron que la deficiencia de hierro altera el perfil químico de exudación de las plantas, el cual fue estadísticamente diferente a los exudados de las plantas crecidas en suficiencia de hierro. La liberación de moléculas hacia la rizosfera está reportado como un componente importante de la respuesta de la planta a estreses ambientales (Badri y Vivanco, 2009). Los exudados que se colectaron de plantas que se desarrollaron en interacción con los compuestos volátiles de UMCV2 fueron estadísticamente diferentes a sus respectivos controles de acuerdo a la prueba de PERMANOVA realizada ($p = 0.005$), indicando que los compuestos volátiles de UMCV2 modulan el metabolismo de la planta lo que se refleja en el patrón de exudación. La modificación de metabolismo de la planta por efecto de microorganismos del suelo ha sido reportado con anterioridad (Curzi *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012).

Los exudados radiculares pueden funcionar como compuestos aleloquímicos o alterar el medio circundante. Una fracción importante de los exudados de plantas con estrategia I para la adquisición de hierro crecida en deficiencia de hierro son compuestos fenólicos incluidos los flavonoides (Cesco *et al.*, 2010). En este sentido, los metabolitos derivados de la ruta de los fenilpropanoides se encuentran generalmente involucrados en defensa química o estructural (Stringlis *et al.*, 2019). Flavonoides, antocianinas y taninos participan en aspectos de adaptación al estrés ambiental (Vogt, 2010). Los flavonoides han emergido en la literatura como mediadores importantes en la comunicación química entre plantas leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno.

En el análisis de los exudados radiculares se encontraron variaciones en ciertos iones abundantes dentro de los cromatogramas. El ion 379.34 m/z es modulado significativamente por la deficiencia de hierro, es decir, se encuentra de forma abundante en los exudados de las plantas de *M. truncatula* desarrollada en condiciones deficientes de hierro. Este ion fue identificado mediante la base de datos MassBank, correspondiendo a conferona, una cumarina sesquiterpenoide de la clase benzopiranoide. Se ha reportado ampliamente desde la década pasada que

las cumarinas participan en la movilización del hierro y que son exudadas por plantas crecidas en condiciones carentes de hierro, recientemente se reportó que están involucradas en interacciones planta-microorganismo (Stringlis *et al.*, 2019).

Se mencionó con anterioridad en este apartado que los compuestos volátiles de la cepa UMCV2 indujeron cambios en la exudación de plántulas de *M. truncatula*, uno de los cambios más evidentes corresponde al ion 517.175 *m/z*, dicho ion fue identificado con base en la información MS2 obtenida. El ion corresponde a formononetina-7-O-glucósido (ononina), la cual presentó un incremento del 60% en los exudados colectados de plantas crecidas en exposición a los compuestos volátiles de la cepa UMCV2. En el capítulo 2 de este trabajo se identificó a la formononetina como un compuesto importante que se modula en las hojas de las plantas por efecto de la presencia de volátiles bacterianos de la cepa UMCV2, en el mapa de calor correspondiente puede observarse que este compuesto está ausente en el tratamiento con UMCV2.

La formononetina al glucosilarse se convierte en ononina, un flavonoide monohidroxilado en el anillo B, al igual que 7,4'-dihydroxiflavona (molécula señal en la simbiosis rizobia-leguminosas), de manera que las plantas que crecen en interacción con la cepa UMCV2 favorecen la exudación de este compuesto, donde estaría realizando un papel de molécula señal para el reclutamiento, probablemente, de la cepa productora de los volátiles inductores de la misma o de otros microorganismos ya que puede interactuar con un amplio rango de bacterias en la rizosfera favoreciendo su reclutamiento (Szoboszlay *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado en el capítulo 3, los exudados se agruparon de manera diferencial de acuerdo a su tratamiento. Dentro del análisis de la información de los exudados se logra identificar ciertos metabolitos que pueden considerarse como marcadores de la presencia de los volátiles de la cepa UMCV2.

El ion 540.349 m/z es exclusivo de los exudados colectados de plantas crecidas en exposición a los volátiles de UMCV2 en condiciones deficientes de hierro; de acuerdo a la base datos MassBank, es un compuesto fenólico llamado oleuropeína, este compuesto ha sido reportado en plantas de oliva donde tiene una función antioxidante y suele incrementarse por efecto de la exposición a ciertos tipos de estrés abiótico como un mecanismo de adaptación para reducir el daño oxidativo inducido por el estrés (Petridis *et al.*, 2012; Paskovic *et al.*, 2018).

Otros iones exclusivos en los exudados de plantas de *M. truncatula* en interacción con los volátiles de UMCV2 en suficiencia de hierro son 163.262 y 527.277 m/z , los cuales no fueron detectados en el resto de los tratamientos. Dentro del análisis también pudieron encontrarse compuestos cuya exudación fue inhibida por presencia de los volátiles bacterianos, iones 327.177 y 399.437 m/z . El ion 399.437 m/z presenta una mayor abundancia en los exudados del tratamiento control con deficiencia de hierro y corresponde a asacumarina B (cumarina sesquiterpenoide). Finalmente en el mapa de calor se detectó un ion que se considera responsable de la clasificación de los exudados control con suficiencia de hierro, 623.251 m/z , este ion corresponde al metabolito pectolarina, una flavona con actividad antimicrobiana (Nazaruk y Jakoniuk, 2005). Los compuestos antimicrobianos en la rizosfera modulan el microbioma de la planta, probablemente favoreciendo el nicho para el establecimiento de PGPRs y de esta manera beneficiar la inmunidad y promover el desarrollo de la planta.

8. CONCLUSION

Los compuestos volátiles de *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulan el metaboloma de *Medicago truncatula*, lo que conduce a un incremento de la abundancia de metabolitos que contribuyen a la tolerancia de la planta al estrés por la deficiencia de hierro.

9. LITERATURA CITADA

Ahammed, G. J.; Li, X.; Xia, X.J.; Shi, K.; Zhou, Y.H.; Yu, J.Q. Enhanced photosynthetic capacity and antioxidant potential mediate brassinosteroid-induced phenanthrene stress tolerance in tomato. *Environ. Pollut.* 2015, 201:58-66.

Alegria Terrazas, R.; Giles, C.; Paterson, E.; Robertson-Albertyn, S.; Cesco, S.; Mimmo, T.; Pii, Y.; Bulgarelli, D. Plant-microbiota interactions as a driver of the mineral turnover in the rhizosphere. *Adv Appl Microbiol.* 2016, 95:1-67

Andaluz, S.; López-Millán, A.F.; De la Rivas, J.; Aro, E.M.; Abadía J.; Abadía, A. Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynth. Res.* 2006, 89:141-155.

Anwar, A.; Liu, Y.; Dong, R.; Bai, L.; Xianchang Yu, X.; Li, Y. The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biol. Res.* 2018, 51:46.

Arshad, M.; Frankenberger, W.T.Jr. Effects of soil properties and trace elements on ethylene production in soils. *Soil Sci.* 1991, 151:377-386.

Arteca, R.N.; Bachman, J.M. Light inhibition of brassinosteroid-induced ethylene production. *J. Plant Physiol.* 1987, 129:13-18.

Arteca, R.N.; Bachman, J.M.; Mandava, N.B. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *J. Plant Physiol.* 1988, 133: 430-435.

Asari, S.; Matzén, S.; Petersen, M.; Bejai, S.; Meijer, J. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016, 92:fiw070.

Aviles-Garcia, M.A.; Flores-Cortez, I.; Hernández-Soberano, C.; Santoyo, G.; Valencia-Cantero, E. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Rev Argent Microbiol.* 2016, 48:342-346.

Badri, D.V.; Vivanco, J.M. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 2009, 32:666-681.

Bailly, A.; Groenhagen, U.; Schulz, S.; Geisler, M.; Eberl, L.; Weisskopf, L. The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signaling. *Plant J.* 2014, 80:758-771.

Bajguz, A.; Czerpak R. Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J. Plant Growth Regul.* 1996, 15:153-156.

Bajguz, A.; Czerpak, R. Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J. Plant Growth Regul.* 1998, 17:131-139.

Bajguz, A. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 2000, 38:209-215.

Bajguz, A. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2007, 45:95-107.

Balk, J.; Schaedler, T.A. Iron cofactor assembly in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014, 65:125-153.

Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Shimo, H.; Kakei, Y.; Senoura, T.; Takahashi, R.; Nishizawa, N.K. Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role in solubilizing apoplasmic iron. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2011, 57:803-812.

Baudoin, E. The language of nitric oxide signaling. *Plant Biol.* 2011, 13:233-242.

Bharadwaj, D.P.; Alström, S.; Lundquist, P.O. Interactions among *Glomus irregulare*, arbuscular mycorrhizal spore-associated bacteria, and plant pathogens under in vitro conditions. *Mycorrhiza* 2012, 22:437-447.

Blom, D.; Fabbri, C.; Connor, E.; Schiestl, F.; Klauser, D.; Boller, T.; Eberl, L.; Weisskopf, L. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 2011, 13:3047-3058.

Briat, J.F. Dubos C.; Gaymard, F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends Plant Sci.* 2015, 20:33-40.

Brancadoro, L.; Rabotti, G.; Scienza, A.; Zocchi, G. Mechanisms of Fe-efficiency in roots of *Vitis* spp. in response to iron deficiency stress L. *Plant Soil* 1995, 171:229-234.

Braun, P.; Wild, A. The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. *J. Plant Physiol.* 1984, 116:189-196.

Brown, J.C.; Ambler, J.E. Reductants released by roots of Fe-deficient soybeans. *Agron. J.* 1973, 65:311-314.

Brumbarova, T.; Bauer, P.; Ivanov, R. Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends Plant Sci.* 2015, 20:124-133.

Busch, A.W.U.; Montgomery, B.L. Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response. *Redox Biol.* 2015, 4, 260-271.

Canarini, A.; Kaiser, C.; Merchant, A.; Richter, A.; Wanek, W. Root Exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Front. Plant Sci.* 2019, 10:157.

Cañas, L.A.; Beltrán J.P. Functional genomics in *Medicago truncatula*: methods and protocols, methods in molecular biology 2018, Vol 1822, Springer Science Business Media, LLC, part of Springer Nature.

Castulo-Rubio, D.Y.; Alejandre-Ramírez, N.A.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Santoyo, G.; Macías-Rodríguez, L.I.; Valencia-Cantero, E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *J. Plant. Growth Regul.* 2015, 34:611-623.

Cerana, R.; Bonetti, A.; Marré, M.T.; Romani, G.; Lado, P.; Marré, E. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls. *Physiol. Plant.* 1983, 59:23-27.

Cesco, S.; Neumann, G.; Tomasi, N.; Pinton, R.; Weiskopf, L. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant Soil* 2010, 329:1-25.

Chen, L.M.; Dick, W.A.; Streeter, J.G.; Hoitink, H.A.J. Fe chelates from compost microorganisms improve Fe nutrition of soybean and oat. *Plant Soil* 1998, 200:139-147.

Chaney, R.L.; Brown, J.C.; Tiffin, L.O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 1972, 50:208-213.

Chen, L.M.; Dick, W.A.; Streeter, J.G. Production of aerobactin by microorganisms from a compost enrichment and soybean utilization. *J. Plant Nutr.* 2000, 23:2047-2060.

Chen, W.W.; Yang, J.L.; Qin, C.; J, C.W.; Mo, J.H.; Ye, T.; Zheng, S.J. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2010, 154:810-819.

Choi, H.K.; Mun, J.H.; Kim, D.J.; Zhu, H.Y.; Baek, J.M.; Mudge, J, Roe, B.; Ellis, N.; Doyle, J.; Kiss, G.B.; Young, N.D.; Cook, D.R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 2004, 101:15289-15294.

Clark, R.B.; Zeto, S.K. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* 2000, 23:867-902.

Colangelo, E.P.; Guerinot, M.L. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 2004, 16:3400-3412.

Cook, D.R. *Medicago truncatula* a model in the making! Commentary. *Curr Opin Plant Biol* 1999, 2:301-304.

Crowley, D.E.; Wang, Y.C.; Reid, C.P.P.; Szaniszlo, P.J. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 1991, 130:179-198.

Curzi, M.J.; Ribaudó, C.M.; Trincheró, G.D.; Curá, J.A.; Pagano, E.A. Changes in the content of organic and amino acids and ethylene production of rice plants in

response to the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Plant Interact.* 2008, 3:163-173.

Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Env. Sci.* 2014, 2:53.

De Lorenzo, L.; Merchan, F.; Blanchet, S.; Megias, M.; Frugier, F.; Crespi, M.; Sousa, C. Differential expression of the TFIIIA regulatory pathway in response to salt stress between *Medicago truncatula* genotypes. *Plant physiol.* 2007, 145:1521-1532.

De Santiago, A.; Quintero, J.M.; Avilés, M.; Delgado, A. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biol. Biochem.* 2009, 41:2453-2459.

De Weert, S.; Vermeiren, H.; Mulders, I.H.; Kuiper, I.; Hendrickx, N.; Bloemberg, G.V.; Vanderleyden, J.; De Mot, R.; Lugtenberg, B.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2002, 15:1173-1180.

Deryl, M.; Skorupska, A. Rhizobial siderophore as an iron source for clover. *Physiol. Plant.* 1992, 85:549-553.

Dessaux, Y.; Grandclément, C.; Faure, D. Engineering the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 2016, 21:266-278.

Divi, U. K.; Krishna, P. Brassinosteroids confer stress tolerance in plant stress biology: from genomics to systems biology, ed. H. Hirt (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA). 2010. doi: 10.1002/9783527628964.ch6

Divi, U.K.; Rahman, T.; Krishna, P. Gene expression and functional analyses in brassinosteroid-mediated stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 2016, 14:419-432.

Dotaniya, M.L.; Meena, V.D. Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 2015, 85: 1-12.

Durrett, T.P.; Gassmann, W.; Rogers, E.E. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 2007, 144:197-205.

Egamberdieva, D.; Kamilova, F.; Validov, S.; Gafurova, L.; Kucharova, Z.; Lugtenberg, B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ. Microbiol.* 2008, 10:1-9.

Ellwood, S.R.; D'Souza, N.K.; Kamphuis, L.G.; Burgess, T.I.; Nair, R.M.; Oliver, R.P. SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theor. Appl. Genet.* 2006, 112:977-983.

Escudero, N.; Marhuenda-Egea, F.C.; Ibanco-Cañete, R.; Zavala-Gonzalez, E.A., Lopez-Llorca, L.V. A metabolomic approach to study the rhizodeposition in the tritrophic interaction: tomato, *Pochonia chlamydosporia* and *Meloidogyne javanica*. *Metabolomics* 2014, 10:788-804.

Eun, J.S.; Kuraishi, S.; Sakurai, N. Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide. *Plant Cell Physiol.* 1989, 30:807-810.

Farag, M.A.; Huhman, D.V.; Dixon RA.; Sumner, L.S. Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* 2008, 146:387-402.

Fernandez, O., Theocharis, A., Bordiec, S., Feil, R., Jacquens, L., Clément, C., Florence Fontaine, F.; Barka, E.A. *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012, 25:496-504.

Fincheira, P.; Quiroz, A. Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiol. Res.* 2018, 208:63-75.

Fourcroy, P.; Sisó-Terraza, P.; Sudre, D.; Savirón, M.; Reyt, G.; Gaymard, F.; Abadía, A.; Abadia, J.; Alvarez-Fernández, A.; Briat, J.F. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 2014, 201:155-167.

Frossard, E.; Bucher, M.; Mächler, F.; Mozafar, A.; Hurrell, R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80:861-879.

Gaige, A.R.; Doerksen, T.; Shuai, B. *Medicago truncatula* ecotypes A17 and R108 show variations in jasmonic acid/ethylene induced resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Can. J. Plant Pathol.* 2012, 34:98-103.

García, M.J.; Suárez, V.; Romera, F.J.; Alcántara, E.; Pérez-Vicente R. A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2011, 49:537-544.

Giles, C.D.; Brown, L.K.; Adu, M.O.; Mezeli, M.M.; Sandral, G.A.; Simpson, R.J.; Wendler, R.; Shand, C.A.; Menezes-Blackburn, D.; Darch, T.; Stutter, M.I.; Lumsdon, D.G.; Zhang, H.; Blackwell, M.S.A.; Wearing, C.; Cooper, P.; Haygarth, P.M.; George, T.S. Response-based selection of barley cultivars and legume species for complementarity: root morphology and exudation in relation to nutrient source. *Plant Sci.* 2017, 255:12-28.

Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Sci.* 2012. Article ID 963401.

Gonzalez-Rizzo, S.; Crespi, M.; Frugier, F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 2006, 18:2680-2693.

González-Vallejo, E.B.; Susín, S.; Abadía, A.; Abadía, J. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma* 1998, 205:163-168.

Graham, P.H.; Vance, C.P.; Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003, 131:872-877.

Graziano, M.; Lamattina L. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J.* 2007, 52:949-960.

Guerinot, M.L.; Yi, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 1994, 104:815-820.

Guerinot, M.L. It's elementary: Enhancing Fe³⁺ reduction improves rice yields. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104:7311-7312.

Guinel, F.C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Front. Plant Sci.* 2015, 6:1121.

Gutiérrez-Luna, F.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Valencia-Cantero, E.; Reyez, H.; Macías-Rodríguez, L. Plant growth- promoting rhizobacteria modulate root- system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 2010, 51:75-83.

Hayat, S.; Ahmad, A.; Mobin, M.; Fariduddin, Q.; Azam, Z.M. Carbonic anhydrase, photosynthesis, and seed yield in mustard plants treated with phytohormones. *Photosynthetica* 2001, 39:111-114.

Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U.; Khalid, R.; Ahmed, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 2010, 60:579-598.

Hegazi, A. M.; El-Shraiy, A.M.; Ghoname, A.A. Mitigation of salt stress negative effects on sweet pepper using arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Bacillus megaterium* and brassinosteroids (BRs). *Gesunde Pflanz.* 2017, 2:91-102.

Hernández-Calderón, E.; Aviles-Garcia, M.E.; Castulo-Rubio, D.Y.; Macías-Rodríguez, L.; Montejano-Ramírez, V.; Santoyo, G.; López-Bucio, J.; Valencia-Cantero, E. Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant. Mol. Biol.* 2018, 96:291-304.

Hether, N. H.; Olsen, R. A.; Jackson, L. L. Chemical identification of iron reductants exuded by plant roots. *J. Plant Nutr.* 1984, 7:667-676.

Hinsinger, P.; Plassard, C.; Tang, C.; Jaillard, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 2003, 248:43e59.

Hoffmann, B.; Trinh, T.H.; Leung, J.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E. A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1997, 10:307-315.

Ivanov, R.; Brumbarova, T.; Bauer, P. Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Mol. Plant* 2012, 5:27-42.

Jäckel, U.; Schnell, S.; Conrad, R. Microbial ethylene production and inhibition of methanotrophic activity in a deciduous forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 2004, 36:835-840.

Jandová, K.; Dostál, P.; Cajthaml, T.; Kameník, Z. Intraspecific variability in allelopathy of *Heracleum mantegazzianum* is linked to the metabolic profile of root exudates. *Ann. Bot.* 2015, 115:821-831.

Jin, C.W.; He, Y.F.; Tang, C.X.; Wu, P.; Zheng, S.J. Mechanisms of microbially enhanced iron uptake in red clover. *Plant Cell Environ.* 2006, 29:888-897.

Jin, C.W.; You, G.Y.; Tang, C.X.; Wu, P.; Zheng, S.J. Iron-deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Physiol.* 2007, 144:278-285.

Jin, C.W.; You, G.Y.; Zheng, S.J. The iron deficiency-induced phenolics secretion plays multiple important roles in plant iron acquisition underground. *Plant Signal. Behav.* 2008, 3:60-61.

Jin, C.W.; Du, S.T.; Chen, W.W.; Li, G.X.; Zhang, Y.S.; Zheng, S.J. Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under iron-limited conditions in tomato. *Plant Physiol.* 2009, 150:272-280.

Jin, C.W.; Li, G.X.; Yu, X.H.; Zheng, S.J. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microorganisms in the rhizosphere. *Ann. Bot.* 2010, 105:835-841.

Jin, C.W.; Du, S.T.; Shamsi, I.H.; Luo, B.F.; Lin, X.Y. NO synthase-generated NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 2011, 62:3875-3884.

Jin, C.W.; Liu, Y.; Mao, Q.Q.; Wang, Q.; Du, S.T. Mild Fe-deficiency improves biomass production and quality of hydroponic-cultivated spinach plants (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem.* 2013, 138:2188-2194.

Jin, C.W.; Ye, Y.Q.; Zheng, S.J. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Ann. Bot.* 2014, 113:7-18.

Kagale, S.; Divi, U.K.; Krochko, J.E.; Keller, W.A.; Krishna, P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 2007, 225:356-364.

Kalinich, J.F.; Mandava, N.B.; Todhunter, J.A. Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced responses in beans, *J. Plant Physiol.* 1986, 125: 345-353.

Kamilova, F.; Kravchenko, L.V.; Shaposhnikov, A.I.; Azarova, T.; Makarova, N.; Lugtenberg, B.J.J. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact* 2006a, 19:250-256.

Kamilova, F.; Kravchenko, L.V.; Shaposhnikov, A.I.; Makarova, N.; Lugtenberg, B.J.J. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006b 19:1121-1126.

Kamilova, F.; Lamers, G.; Lugtenberg, B. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* 2008, 10:2455-2461.

Kanchiswamy, C.N.; Malnoy, M.; Maffei, M.; Chemical diversity of microbial volátiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 2015, 6:151.

Khorassani, R.; Hettwer, U.; Ratzinger, A.; Steingrobe, B.; Karlovsky, P.; Claassen, N. Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus. *BMC Plant Biol.* 2011, 11:121.

Kim, S.A; Guerinot, M.L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 2007, 581:2273-2280.

Kobayashi, T.; Nishizawa, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012, 63:131-152.

Kobayashi, T.; Nagasaka, S.; Senoura, T.; Itai, R.N.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. Iron-binding haemerythrin RING ubiq-uitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Commun.* 2013, 4:2792

Koch, C.; Schumann, P.; Stackebrandt E. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Mi-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and

emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995, 45: 837-839.

Kwon, Y.S.; Ryu, C.M.; Lee, S.; Park, H.B.; Han, K.S.; Lee, J.H.; Chung, W.S.; Jeong, M.J.; Kim, H.K.; Bae, D.W. Proteome analysis of *Arabidopsis* seedlings exposed to bacterial volatiles. *Planta* 2010, 232:1355-1370.

Laganowsky, A.; Gómez, S.M.; Whitelegge, J.P.; Nishio, J.N. Hydroponics on a chip: analysis of the Fe deficient *Arabidopsis* thylakoid membrane proteome. *J. Proteomics* 2009, 72:397-415.

Lee, D.H.; Kim, Y.S.; Lee, C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 2001, 158:737-745.

Lee, B.; Farag, M.A.; Park, H.B.; Kloepper, J.W.; Lee, S.H.; Ryu, C.M.. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* 2012, 7:e48744.

Li, G.; Wang, B.; Tian, Q.; Wang, T.; Zhang, W.H. *Medicago truncatula* ecotypes A17 and R108 differed in their response to iron deficiency. *J. Plant Physiol.* 2014, 171:639-647.

Lindsay, W.L. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. In *Iron in Plants and Soils* (Abadia, J., ed.) Kluwer Academic 1995, pp. 7-14.

Lipton, D.S.; Blanchar, R.W.; Blevins, D.G. Citrate, malate, and succinate concentration in P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.* 1987, 85:315-317.

López-Millán, A.F.; Morales, F.; Andaluz, S.; Gogorcena, Y.; Abadía, A.; Rivas, J.D.L.; Abadía, J. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol.* 2000. 124: 885-897.

Lu, N.; Chen, W.; Zhu, J.; Peng, Y.Y. Enhancement of nitrite on heme-induced oxidative reactions: A potential toxicological implication. *Toxicol. Vitro.* 2012, 26:81-85.

Luan, H.; Wang, X.; Cai, Z. Mass spectrometry-based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders. *Mass Spec Rev.* 2017, 1-12.

Lugtenberg, B.J.J.; Dekkers, L.C. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environ. Microbiol.* 1999, 1:9-13.

Lugtenberg, B.J.J.; Kravchenko, L.V.; Simons, M. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* 1999, 1:439-446.

Lugtenberg, B.; Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2009, 63:541-556.

Luo, S.S.; Sun, Y.N.; Zhou, X.; Zhu, T., Zhu, L.S.; Arfan, M.; Zou, L.J.; Lin, H.H. *Medicago truncatula* genotypes Jemalong A17 and R108 show contrasting variations under drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2016, 109:190-198.

Madigan, M.T; Martinko, J.M.; Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos.* Décima edición. Pearson Prentice Hall. Madrid 2004, 1011pp.

Mandava, N.B.; Sasse, J.M.; Yopp, J.H. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. *Physiol. Plant.* 1981, 53:453-461.

Manzanera, M.; Narváez-Reinaldo, J.J.; García-Fontana, C.; Vílchez, J.I.; González-López, J. Genome Sequence of *Arthrobacter koreensis* 5J12A, a Plant Growth- Promoting and Desiccation-Tolerant Strain. *Genome Announc.* 2015, 3:e00648-15.

Marti, G.; Erb, M.; Boccard, J.; Glauser, G.; Doyen, G.R.; Villard, N.; Robert, C.A.M.; Turlings, T.C.J. Rudaz, S.; Wolfender, J.L. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant Cell Environ.* 2013, 36:621-639.

Mäser, P.; Thomine, S.; Schroeder, J.I.; Ward, J.M.; Hirschi, K.; Sze, H.; Talke, I.N.; Amtmann, A.; Matthuis, F.J.M.; Sanders, D.; Harper, J.F.; Tchieu, J.; Gribskov, M.; Persans, M.W.; Salt, D.E.; Kim, S.A.; Guerinot, M.L. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2001, 126:1646-1667.

Marschner, P.; Crowley, D.; Rengel, Z.; Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. *Soil Biol. Biochem.* 2011, 43:883e894.

Martin, J.H.; Fitzwater, S. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* 1988, 331:341343.

Martínez-Medina, A.; Van Wees, S.C.M.; Pieterse, C.M.J. Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ.* 2017, 40:2691-2705.

Masalha, J.; Kosegarten, H.; Elmaci, Ö.; Mengel, K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soils* 2000, 30:433-439.

Meharg, A.A.; Killham, K. Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. *Plant Soil* 1995, 170:345-349.

Meiser, J.; Lingam, S.; Bauer, P. Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix–loop–helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide. *Plant Physiol.* 2011, 157:2154-2166.

Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 2013, 37:634-663.

Michalet, S.; Rohr, J.; Warshan, D.; Bardon, C.; Roggy, J.C.; Domenach, A.M.; Sonia Czarnes, S.; Pommier, T.; Combourieu, B.; Guillaumaud, N.; Bellvert, F.; Comte, G.; Poly, F. Phytochemical analysis of mature tree root exudates in situ and their role in shaping soil microbial communities in relation to tree N-acquisition strategy. *Plant Phys. Biochem.* 2013, 72:169-177.

Mishra, P.K.; Bisht, S.C.; Ruwari, P.; Joshi, G.K.; Singh, G.; Bisht, J.K.; Bhatt, J.C. Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 2011, 47:35-43.

Mishra, P.K.; Bisht, S.C.; Mishra, S.; Selvakumar, G.; Bisht, J.K.; Gupta, H.S. Coinoculation of *Rhizobium leguminosarum*-PR1 with a cold tolerant *Pseudomonas* SP. improves iron acquisition, nutrient uptake and growth of field pea (*Pisum sativum* L.). *J. Plant Nutr.* 2012, 35:243-256.

Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 2004, 9:490-498.

Montejano-Ramírez, V.; Martínez-Cámara, R.; García-Pineda, E.; Valencia-Cantero, E. Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of FRO genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* 2018, 40:138.

Montejo-Mayo, W.; Valencia-Cantero, E.; López-Albarrán, P.; Velázquez-Becerra, C. Effect of *Arthrobacter agilis* UMCV2 on germination and growth of *Pinus devoniana* Lindley. *Polibotánica* 2016, 41:79-90.

Mouradov, A.; Spangenberg, G. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front Plant Sci* 2014, 5:620.

Msilini, N.; Essemine, J.; Zaghdoudi, M.; Harnois, J.; Lachaâl, M.; Ouerghi, Z.; Carpentier, R. How does iron deficiency disrupt the electron flow in photosystem I of lettuce leaves? *J. Plant Physiol.* 2013, 170:1400-1406.

Müllebner, A.; Moldzio, R.; Redl, H.; Kozlov, A.V.; Duvigneau, J.C. Heme degradation by heme oxygenase protects mitochondria but induces ER stress via formed bilirubin. *Biomolecules* 2015, 5:679-701.

Murgia, I.; Arosio, P.; Tarantino, D.; Soave, C. Biofortification for combating 'hidden hunger' for iron. *Trends Plant Sci.* 2012, 17:47-55.

Nagata, T.; Oobo, T.; Aozasa, O. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *J. Biosci. Bioeng* 2013, 115, 686-690.

Nazaruk, J.; Jakoniuk, P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Flowers. J. Ethnopharmacol. 2005, 102:208-212.

Neilands, J.B. Microbial envelope proteins related to iron. Annu. Rev. Microbiol. 1982, 36:285-309.

Neilands, J.B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 1995, 270:26723-26726.

Nishio, J.N.; Abadia, J.; Terry, N. Chlorophyll-proteins and electron transport during iron nutrition-mediated chloroplast development. Plant Physiol. 1985, 78:296-299.

Nozoye, T.; Nagasaka, S.; Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Sato, Y.Y.; Uozumi, N.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. J. Biol. Chem. 2011, 286:5446-5454.

Olsen, R.A.; Brown, J.C.; Bennett, J.H.; Blume, D. Reduction of Fe³⁺ as it related to Fe chlorosis. J. Plant Nutr. 1982, 5:433-445.

Onofre-Ortega, P. Efectos de la co-inoculación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 con *Arthrobacter agilis* UMCV2 en *Medicago sativa*. Tesis de Licenciatura. 2013. UMSNH.

Orozco-Mosqueda, M.C.; Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; Santoyo, G.; Flores-Cortez, I.; Alfaro-Cuevas, R.; Valencia-Cantero, E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. Plant Soil. 2013, 362, 51-66.

Orozco-Mosqueda, M.C.; Valencia-Cantero, E. López-Albarrán, P.; Martínez-Pacheco, M.; Velázquez-Becerra, C. La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y

diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Rev Argent Microbiol.* 2015, 47:219-228.

Palmer, C.M.; Hind, M.N.; Schmidt, H.; Clemens, S.; Guerinot, M.L. MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* 2013, 9:e1003953.

Palmieri, C.; Sell, S.; Huang, X.; Scherf, M.; Werner, T.; Durner, J.; Lindermayr, C. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* 2008, 59:177-186.

Park, Y.; Dutta, S.; Ann, M.; Raaijmakers, J.; Park, K. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 461:361-365.

Pasković, I.; Herak Ćustić, M.; Pecina, M.; Bronić, J.; Ban, D.; Radić, T Poščic, F.; Špika, M.J.; Soldo, B.; Palcic, I.; Goreta Ban, S. Manganese soil and foliar fertilization of olive plantlets: the effect on leaf mineral and phenolic content and root mycorrhizal colonization. *J Sci Food Agric.* 2019, 99:360-367.

Peres, A.L.G.L.; Soares, J.S.; Tavares, R.G.; Righetto, G.; Zullo, M.A.T.; Mandava, N.B.; Menossi, M. Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: A molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20:331.

Petridis, A.; Therios, I.; Samouris, G.; Koundouras, S.; Giannakoula, A. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 2012, 60:1-11.

Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Van der Putten, W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11:789-799.

Phillips, D.A.; Fox, T.C.; King, M.D. Bhuvaneshwari TV, Teuber LR. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiol.* 2004, 136:2887-2894.

Pieterse, C.M.J.; Zamioudis, C.; Berendsen, R.L.; Weller, D.M.; Van Wees, S.C.M.; Bakker, P.A.H.M. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014, 52:347-375.

Pii, Y.; Mimmo, T.; Tomasi, N.; Terzano, R.; Cesco, S.; Crecchio, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol. Fertil. Soils* 2015, 51: 403-415.

Pii, Y.; Marastoni, L.; Springeth, C.; Fontanella, M.C.; Beone, G.M.; Cesco, S.; Mimmo, T. Modulation of Fe acquisition process by *Azospirillum brasilense* in cucumber plants. *Environ. Exp. Bot.* 2016, 130:216-225.

Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In: Pinton, R.; Vranini, Z.; Nannipieri, P. (eds) *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, 2001, New York, pp 1-17.

Ramautar, R.; Somsen, G.W.; de Jong, G.J. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2014–2016. *Electrophoresis* 2017, 38:190-202.

Ravet, K.; Touraine, B.; Boucherez, J.; Briat, J.F.; Gaymard, F.; Cellier, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2009, 57:400-412.

Raymond, K.N.; Dertz, E.A.; Kim, S.S. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci* 2003, 100:3584-3588.

Robinson, N.J.; Procter, C.M.; Connolly, E.L.; Guerinot M.L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 1999, 397:694-697.

Roddick, J.G. Comparative root growth inhibitory activity of four brassinosteroids. *Phytochemistry* 1994, 37:1277-1281.

Rodríguez-Celma, J.; Lattanzio, G.; Grusak, M.A.; Abadía, A.; Abadía, J.; López-Millán, A.F. Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: Changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J. Proteome Res.* 2011, 10:2590-2601.

Rodríguez-Celma, J. Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2013, 162:1473-1485.

Romera, F.J.; Alcántara, E., De la Guardia, M.D. Role of roots and shoots in the regulation of the Fe deficiency responses in sunflower and cucumber. *Physiol. Plant.* 1992. 85:141-146.

Romera, F.J.; García, M.J.; Lucena, C.; Martínez-Medina, A.; Aparicio, M.A.; Ramos, J.; Alcántara, E.; Angulo, M.; Pérez-Vicente, R. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front. Plant Sci.* 2019, 10:287.

Römheld, V.; Muller, C.; Marschner, H. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant. Physiol.* 1984, 76:603-606.

Römheld, V.; Marschner, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv. Plant Nutr.* 1986, 2:155-204.

Römheld, V. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: an ecological approach. *Plant Soil* 1991, 130:127-134.

Rudrappa, T.; Czymmek, K.J.; Paré, P.W.; Bais, H.P. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 2008, 148:1547-1556.

Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Paré, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS* 2003, 100:4927-4932.

Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R.S.; Bestervelt, L.L. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 2013, 53:303e317.

Saharan, B.S.; Nehra, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res* 2011, 2011:1-30.

Sasse, J.M. Physiological actions of brassinosteroids: an update. *J. Plant Growth Regul.* 2003, 22:276-288.

Santi, S.; Schmidt, W. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 2009, 183:1072-1084.

Schilling, G.; Schiller, C.; Otto, S. Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants, in: H.G. Cutler, T. Yokota, G. Adam

(Eds.), *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, American Chemical Society, Washington,DC, 1991, pp. 208-219.

Schlagnhaufer, C.; Arteca, R.N.; Yopp, J.H. A brassinosteroid-cytokinin interaction on ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiol. Plant.* 1984, 60:347-350.

Schaaf, G.; Ludewig, U.; Erenoglu, B.E.; Mori, S.; Kitahara, T.; von Wirén, N. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J. Biol.* 2004, 279:9091-9096.

Séguéla, M.; Briat, J.F.; Vert, G.; Curie, C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J.* 2008, 55:289-300.

Selote, D.; Samira, R.; Matthiadis, A.; Gillikin, J.W.; Long, T.A. Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiol.* 2015, 167:273-286.

Shapiro, A.D. Nitric oxide signaling in plants. *Vitam. Horm.* 2005, 72:339-398.

Sharma, I.; Bhardwaj, R.; Pati, P.K. Exogenous application of 28-Homobrassinolide modulates the dynamics of salt and pesticides induced stress responses in an elite rice variety Pusa Basmati-1. *J. Plant Growth Regul.* 2015, 34:509-518.

Sharma, I.; Kaur, N.; Pati, P.K. Brassinosteroids: A Promising Option in Deciphering Remedial Strategies for Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Front. Plant Sci.* 2017, 8:2151.

Shi, Q.; Ding, F.; Wang, X.; Wei, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2007, 45:542-550.

Simons, M.; Permentier, H.P.; deWeger, L.A.; Wijffelman, C.A.; Lugtenberg, B.J.J. Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant Microbe Int.* 1997, 10:102-106.

Singh, A.P.; Savaldi-Goldstein, S. Growth control: brassinosteroid activity gets context. *J. Exp. Bot.* 2015, 66:1123-1132.

Singh, R.N.; Gaba, S.; Yadav, A.N.; Gaur, P.; Gulati, S.; Kaushik, R.; Anil K. Saxena, A.K. First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77. *Stand Genomic Sci.* 2016, 11:54.

Sisó-Terraza, P.; Rios, J.J.; Abadía, J.; Abadía, A.; Álvarez-Fernández, A. Flavins secreted by roots of iron-deficient *Beta vulgaris* enable mining of ferric oxide via reductive mechanisms. *New Phytol.* 2016, 209:733-745.

Sivitz, A.; Grinvalds, C.; Barberon, M.; Curie, C.; Vert, G. Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses. *Plant J.* 2011, 66:1044-1052.

Slatni, T.; Dell'Orto, M.; Salah, I.B.; Vigani, G.; Smaoui, A.; Gouia, H.; Zocchi, G.; Abdellya, C. Immunolocalization of H⁺-ATPase and IRT1 enzymes in N₂-fixing common bean nodules subjected to iron deficiency. *J. Plant Physiol.* 2012, 169:242-248.

Smith, K.G.; Reed, D.J. Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press 1997, 589-590.

Soerensen, K.U.; Twrny, R.E.; Jolley, V.D.; Brown, J.C.; Vargas, M.E. The interaction of iron-stress response and root nodules in iron efficient and inefficient soybeans. *J. Plant Nutr.* 1988, 11:853-865.

Spirit, S.; Lutter, K.; Stahl, W. Carotenoids in Photooxidative Stress. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2010, 6:36-43.

Strehmel, N. Böttcher, C.; Schmidt, S.; Scheel, D. Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2014, 108:35-46.

Stringlis, I.A.; de Jonge R.; Pieterse, C.M.J. The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol.* 2019, 60:1405-1419.

Sumner, L.W.; Lei, Z.; Nikolau, B.J.; Saito, K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Nat. Prod. Rep.* 2015, 32:212-229.

Szoboszlay, M.; White-Monsant, A.; Moe, L.A. The Effect of Root Exudate 7,4-Dihydroxyflavone and Naringenin on Soil Bacterial Community Structure. *PLoS ONE* 2016, 11:e0146555.

Takahashi, M.; Nakanishi, H.; Kawasaki, S.; Nishizawa, N.K.; Mori, S. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19:466-469.

Teale, W.D.; Ditengou, F.A.; Dovzhenko, A.D.; Li, X.; Molendijk, A.M.; Ruperti, B.; Paponov, I.; Palme, K. Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Mol. Plant* 2008, 1:229-237.

Terry, R.E.; Hartzook, A.; Jolley, V.D.; Brown, J. Interactions of iron nutrition and symbiotic nitrogen fixation in peanuts. *J. Plant Nutr.* 1988, 11:811-820.

Tian, F.; Ding, Y.; Zhu, H.; Yao, L.; Du, B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz J Microbiol* 2009, 40:276-284.

Timperio, A.M.; D'Amici, G.M.; Barta, C.; Loreto, F.; Zolla, L. Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 2007, 58:3695-3710.

Tsai, H.H.; Schmidt, W. Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends Plant Sci.* 2017, 22:538-548.

Vaishnav, A.; Kumari, S.; Jain, S.; Varma, A.; Choudhary, D.K. Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L: Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 119:539-551.

Valencia-Cantero, E.; Hernández-Calderón, E.; Velázquez-Becerra, C.; López-Meza, J.E.; Alfaro-Cuevas, R.; López-Bucio, J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common vean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* 2007, 291:263-273.

Valencia-Cantero, E.; Flores-Cortez, I.; Ambriz-Parra, J.; P Lopez-Albarran, P.; Velazquez-Becerra, C. *Arthrobacter agilis* UMCV2 acelera el crecimiento de *Pinus devoniana*. *FYTON* 2015, 84:64-69.

Van Dam, N.M.; Bouwmeester, H.J. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci.* 2016, 21:256-265.

Van Miegroet, H. The impact of nitrification on soil acidification and cation leaching in red alder ecosystem. *J. Environ. Qual.* 1984, 13:586-590.

Vansuyt, G.; Robin, A.; Briat, J.F.; Curie, C.; Lemanceau, P. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, 20, 441e447.

Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Flores-Cortez, I.; Valencia-Cantero, E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 2011, 339:329-340.

Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; López-Bucio, J.; Flores-Cortez, I.; Santoyo, G.; Hernández-Soberano, C.; Valencia-Cantero, E. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma* 2013, 250:1251-1262.

Venturi, V.; Keel, C. Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 2016, 21:187-198.

Verbon, E.H.; Trapet, P.L.; Stringlis, I.A.; Kruijs, S.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. Iron and immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017, 55:355-375.

Vert, G.; Grotz, N.; Dédaldéchamp, F.; Gaymard, F.; Guerinot, M.L.; Briat, J.F.; Curie, C. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 2002, 14:1223-1233.

Vert, G.; Briat, J.F.; Curie, C. Dual regulation of the *Arabidopsis* high affinity, root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol.* 2003, 132:796-804.

Vogt, T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* 2010, 3:2-20.

Wang, B.; Li, Y.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in response of cucumber (*Cucumis sativus*) to iron deficiency. *Ann. Bot.* 2012, 110:681-688.

Wang, B.; Li, G.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in Fe homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 2015, 66:2749-2761.

Wang, W.; Shi, J.; Xie, Q.; Jiang, Y.; Yu, N.; Wang, E. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant* 2017, 10:1147-1158.

Wang, X.; Teng, Y.; Zhang, N.; Christie, P.; Li, Z.; Luo, Y.; Wang, J. Rhizobial symbiosis alleviates polychlorinated biphenyls-induced systematic oxidative stress via brassinosteroids signaling in alfalfa. *Sci. Total Environ.* 2017, 592:68-77.

Watson, B.S.; Bedair, M.F.; Urbanczyk-Wochniak, E.; Huhman, D.V.; Yang, D.S.; Allen, S.N.; Li, W.; Tang, Y.; Sumner, L.W. Integrated metabolomics and transcriptomics reveal enhanced specialized metabolism in *Medicago truncatula* root border cells. *Plant Physiol.* 2015, 167:1699-1716.

Winkelmann, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* 2007, 20:379-392.

Winkler, R. SpiderMass: Semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *J. Mass Spectrom.* 2015, 50:538-541.

Wu, J.; Wang, C.; Zheng, L.; Wang, L.; Chen, Y.; Whelan, J.; Shou, H. Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron acquisition-related genes in *Oryza sativa*. *J. Exp. Bot.* 2011, 62:667-674.

Wu, T.; Zhang, H.T.; Wang, Y.; Jia, W.S.; Xu, X.F.; Zhang, X.Z.; Han, Z.H. Induction of root Fe(III) reductase activity and proton extrusion by iron deficiency is mediated

by auxin-based systemic signalling in *Malus xiaojinensis*. *J. Exp. Bot.* 2012, 63: 859-870.

Wuddineh, W.; Minocha, R.; Minocha, S.C. Polyamines in the Context of Metabolic Networks. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1694:1-23.

Xiong, L.M.; Schumaker, K.S.; Zhu, J.K.; Xiong, L.M.; Schumaker, K.S.; Zhu, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 2002, 14:165-183.

Xu, X.K.; Inubushi, K. Production and consumption of ethylene in temperate volcanic forest surface soils. *Eur. J. Soil Sci.* 2007, 58:668-679.

Yang, D.L.; Li, Q.; Deng, Y.W.; Lou, Y.G.; Wang, M.Y.; Zhou, G.X.; Zhang, Y.Y.; He, Z.H. Altered disease development in the *eui* mutants and *Eui* overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. *Mol. Plant* 2008, 1:528-537.

Yang, Y., Ou, B.; Zhang, J.; Si, W.; Gu, H.; Qin, G.; Qu, L.J. The *Arabidopsis* Mediator subunit MED16 regulates iron homeostasis by associating with EIN3/EIL1 through subunit MED25. *Plant J.* 2014, 77:838-851.

Yehuda, Z.; Shenker, M.; Hadar, Y.; Chen, Y.N. Remedy of chlorosis induced by iron deficiency in plants with the fungal siderophore rhizoferrin. *J. Plant Nutr.* 2000, 23:1991-2006.

Yopp, J.H.; Mandava, N.B.; Sasse, J.M. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays, *Physiol. Plant.* 1981, 53:445-452.

Yuan, Y.X.; Zhang, J.; Wang, D.W.; Ling, H.Q. AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell Res.* 2005, 15:613-621.

Zaman, M.; Kurepin, L.; Catto, W.; Pharis, R. Enhancing crop yield with the use of N-based fertilizers co-applied with plant hormones or growth regulators. *J. Sci. Food Agric.* 2015, 95:1777-1785.

Zamioudis, C.; Hanson, J.; Pieterse, C.M.J. b-Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 2014, 204:368-379.

Zamioudis, C.; Korteland, J.; Van Pelt, J.A.; van Hamersveld, M.; Dombrowski, N.; Bai, Y.; Hanson, J.; Van Verk, M.C.; Ling, H.Q.; Schulze-Lefert, P.; Pieterse, C.M.J. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate *MYB72* expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015, 84:309-322.

Zhang, H.; Kim, M.; Krishnamachari, V.; Payton, P.; Sun, Y.; Grimson, M.; Farag, M.A.; Ryu, C.M.; Allen, R.; Melo, I.S.; Paré, P.W. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 2007, 226:839-851.

Zhang, H.; Sun, Y.; Xie, X.; Kim, M.S.; Dowd, S.E.; Paré, P.W. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency inducible mechanisms. *Plant J.* 2009, 58:568-577.

Zhang, X.W.; Dong, Y.J., Qiu, X.K.; Hu, G.Q.; Wang, Y.H.; Wang, Q.H. Exogenous nitric oxide alleviates iron-deficiency chlorosis in peanut growing on calcareous soil. *Plant Soil Environ.* 2012, 58:111-120.

Zhang, Y.; Wu, H.; Wang, N.; Fan, H.; Chen, C.; Cui, Y.; Liu, H.; Ling, H.Q. Mediator subunit 16 functions in the regulation of iron uptake gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 2014, 203:770-783.

Zhang, C.; Bai, M.Y.; Chang, K. Brassinosteroid-mediated regulation of agronomic traits in rice. *Plant Cell Rep.* 2014, 33:683-696.

Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010, 61:49-64.

Zhao, L.; Wang, F.; Zhang, Y.; Zhang, J. Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. *J. Basic Microbiol.* 2014, 54:S115-S124.

Zhou, C.; Guo, J.; Zhu, L.; Xiao, X.; Xie, Y.; Zhu, J.; Ma, Z.; Wang, J. *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated iron acquisition mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 2016, 105:162-173.

Zullo, M.A.T.; Adam, G. Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol.* 2002, 14:143-181.

10. ADDENDA

- 10.1. Valencia-Cantero, E.; Flores-Cortez, I.; Ambriz-Parra, J.; P López-Albarrán, P.; Velázquez-Becerra, C. *Arthrobacter agilis* UMCV2 acelera el crecimiento de *Pinus devoniana*. FYTON 2015, 84:64-69.
- 10.2. Aviles-Garcia, M.A.; Flores-Cortez, I.; Hernández-Soberano, C.; Santoyo, G.; Valencia-Cantero, E. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. Rev Argent Microbiol. 2016, 48:342-346.
- 10.3. Cárdenas-Navarro, R.; Castellanos-Morales, V.C.; López-Pérez, L.; Peña-Cabriales, J.J.; Vargas-de la Cruz, F.; Flores-Cortez, I. Nitrate influx in rose plants during day-night cycle. J. plant nutrition 2017, 40:486-491.
- 10.4. Flores-Cortez, I. Comunicación bajo tierra. Saber Más, revista de divulgación. UMSNH. 2019, No. 43.

Arthrobacter agilis UMCV2 acelera el crecimiento de *Pinus devoniana*

Arthrobacter agilis UMCV2 accelerates growth of *Pinus devoniana*

Valencia-Cantero E², I Flores-Cortez², J Ambriz-Parra¹, P López-Albarrán¹, C Velázquez-Becerra¹

Resumen. *Pinus devoniana* es una de las especies de *Pinus* más distribuida en México y posee una gran importancia económica y ecológica. En este trabajo determinamos el efecto de la inoculación de plantas de *P. devoniana* en etapas juveniles con la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y su compuesto dimetilhexadecilamina en condiciones de invernáculo. Nuestros resultados mostraron que *A. agilis* UMCV2 promovió el crecimiento de *P. devoniana* medido como incremento de la altura, grosor del tallo, peso fresco e incremento en la concentración de clorofila. Bajo nuestras condiciones experimentales, el compuesto bacteriano dimetilhexadecilamina produjo un incremento en la concentración de clorofila. Estos datos muestran la viabilidad del uso de *A. agilis* para mejorar significativamente la velocidad de crecimiento de *P. devoniana* en condiciones de vivero.

Palabras clave: *Arthrobacter agilis* UMCV2; Dimetilhexadecilamina; *Pinus devoniana*; Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Abstract. *Pinus devoniana* is one of the most widely distributed species of *Pinus* in Mexico, and has a relevant economic and ecological importance. In this work, the effect of inoculating juvenile *P. devoniana* plants with the rhizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, and its dimethylhexadecylamine compound was studied under greenhouse conditions. Our results showed that *A. agilis* UMCV2 promoted growth of *P. devoniana* as a result of increases on height and stem diameter, fresh weight and chlorophyll concentrations. Under our experimental conditions, the bacterial dimethylhexadecylamine compound produced an increase in the concentration of chlorophyll. These data show the feasibility of using *A. agilis* UMCV to significantly enhance the growth rate of *P. devoniana* at a greenhouse scale.

Keywords: *Arthrobacter agilis* UMCV2; Dimethylhexadecylamine; *Pinus devoniana*; PGPRs.

¹ Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio D, Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B5, Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

Address Correspondence to: Crisanto Velázquez-Becerra, e-mail: cvelazquez@umich.mx, Tel: 5.443.3223500 Ext. 3099; Fax: 5.443.3260379.

Recibido / Received 14.III.2014. Aceptado / Accepted 10.IV.2014.

INTRODUCCIÓN

El género *Pinus* incluye aproximadamente 110 especies y es el género de coníferas más extendido en el hemisferio norte (Eckert, 2006; Liston, 1999), especialmente en México. En México una de las especies que se destacan por su amplia distribución e importancia económica es *P. devoniana* Lindley, también conocida como *P. michoacana* Martínez (Perry, 1991). *P. devoniana* es endémico de México y Guatemala. En México está distribuido en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Veracruz, Zacatecas, y Chiapas (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997). La madera de *P. devoniana* se destina a la industria de la celulosa y el aserrío, obteniéndose de ellos diferentes productos de un alto valor económico (Perry, 1991; Flores-Velázquez et al., 2007). *Pinus devoniana* requiere de un largo periodo de tiempo para poder ser aprovechado, ya que tarda al menos 10 años en alcanzar la talla necesaria para su explotación comercial (Zepeda y Acosta, 2000).

Algunas bacterias que habitan en torno a las raíces de las plantas (rizobacterias) pueden promover el crecimiento de éstas. A dichas bacterias se las denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en idioma Inglés) (Ortiz-Castro et al., 2013). Una estrategia para incrementar la velocidad de crecimiento de *P. devoniana* y otras especies arbóreas ha sido la utilización de PGPR (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Las PGPR pueden promover el crecimiento mediante mecanismos de biofertilización que incluyen la fijación de nitrógeno (Hassan, 2013), solubilización del fosfato (Ramos et al., 2007) y de hierro (Valencia-Cantero et al., 2007), producción de fitohormonas (Barriuso et al., 2005; Ortiz-Castro et al., 2008), inhibición de actividad fúngica y producción de compuestos orgánicos volátiles que actúan como moléculas señal (Velázquez-Becerra et al., 2011 y 2013).

Las PGPR naturalmente presentes en la rizósfera de plantas han logrado incrementar el crecimiento en el porte arbóreo. Así por ejemplo, la inoculación de *Bacillus licheniformis* CECT 5106 y *B. pumilus* CECT 5105 promueven el crecimiento de *P. pinea* y *Quercus ilex* induciendo cambios en la comunidad microbiana rizosférica (Probanza et al., 2002; Domenech et al., 2004). La inoculación de especies forestales con PGPR ha sido propuesta como estrategia para mejorar el crecimiento de las plántulas con fines de reforestación (Chanway, 1997). Previamente se había sugerido a *Arthrobacter citreus* L62, aislada de la rizósfera de *Pinus pinaster*, como candidata para promover el crecimiento de plántulas de pinos por su capacidad para producir auxinas y sideróforos (Barriuso et al., 2005). Así mismo, *Arthrobacter oxydans* N74 (aislada de *Pseudotsuga menziesii* ecotipo Williams Lake) fue capaz de promover el crecimiento de dicho ecotipo, pero falló en promover el crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* ecotipo Chilliwick (Chanway y Holl, 1994).

Por otro lado, el empleo de PGPRs como bioinoculantes no siempre consiguen promover el crecimiento de las plantas (Castellanos et al., 1995). Entre los factores que afectan el éxito de los bioinoculantes está la competencia con bacterias nativas y la predación efectuada por los protozoarios (Castellanos et al., 1995; Jousset et al., 2008). Estudios a nivel de microcosmos han mostrado que generar un disturbio como el calentamiento del suelo, mejora la posibilidad del establecimiento de bacterias inoculadas en nuevos ambientes (Liu et al., 2012).

En nuestro grupo de trabajo hemos mostrado que la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 se comporta como PGPR, promoviendo el crecimiento de plantas leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* y *M. truncatula* (Valencia-Cantero et al., 2007; Velázquez-Becerra et al., 2011; Orozco-Mosqueda et al., 2013a). Mediante un análisis cromatográfico del perfil de compuestos volátiles se encontró que *A. agilis* UMCV2 produce dimetilhexadecilamina (DMA16), molécula que por sí sola es capaz de promover el crecimiento de la planta y estimularla para que active sus mecanismos de solubilización y absorción de hierro (Orozco-Mosqueda et al., 2013a). La DMA16 ya se ha reportado en el perfil de compuestos volátiles de otras PGPR como *B. subtilis* G8 (Liu et al., 2008) y *Sinorhizobium meliloti* (Orozco-Mosqueda et al., 2013b).

En el presente trabajo buscamos evaluar el efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 y la adición del compuesto DMA16, sobre el crecimiento de la especie arbórea *P. devoniana* en etapas tempranas de su desarrollo, en un ambiente de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Se usaron árboles juveniles de *P. devoniana* de aproximadamente 12 meses de edad que se obtuvieron de la Comisión Forestal del Estado de Michoacán, México (COFOM).

Cepa Bacteriana. Se empleó la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero et al., 2007), donada por el laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, Morelia Michoacán México.

Influencia de *A. agilis* UMCV2 y la DMA16 sobre *P. devoniana*. Los árboles juveniles de *P. devoniana* previamente crecidos en vivero (COFOM), fueron transportados a nuestro laboratorio. Las raíces se lavaron minuciosamente con agua estéril, y los juveniles fueron resembrados en macetas (un ejemplar por maceta) de 15 cm de diámetro y 25 cm de altura. Cada maceta contuvo una mezcla de sustrato (3 kg): 60% peat moss, 20% agrolita y 20% vermiculita.

Se diseñaron tratamientos en los cuales las plántulas de pinos fueron expuestas a la bacteria UMCV2 y al compues-

Tabla 1. Descripción de los tratamientos empleados en este estudio
Table 1. Description of treatments used in this study.

Tratamiento/Condición	Sustrato esterilizado	Sustrato inoculado con <i>A. agilis</i> UMCV2	Sustrato adicionado con DMA16 100 µM
CONTROL (n=12)			
SNE-UMCV2 (n=12)		X	
SE-UMCV2 (n=12)	X	X	
SNE DMA16 (n=12)			X
SE-DMA16 (n=12)	X		X

to DMA16 en condiciones de sustrato estéril y no estéril de acuerdo a la Tabla 1.

Los tratamientos SNE-UMCV2 y SE-UMCV2 fueron inoculados al inicio del experimento con 250 mL de una suspensión que contenía *A. agilis* UMCV2 (1×10^9 ufc/mL). La cepa se hace crecer previamente por 5 días en medio Agar Nutritivo (AN) a 25 °C en oscuridad (incubadora microbiológica); posteriormente, se recuperan las células con agua esterilizada (Velázquez-Becerra et al., 2011).

El compuesto dimetilhexadecilamina (DMA16) fue obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (CAS: 112-69-6). Este fue aplicado en el sustrato de los tratamientos SNE-DMA16 y SE-DMA16 como agua de riego también desde el inicio del experimento (a una concentración final de 100 µM). Cada 8 días se repitió la aplicación. La esterilización del sustrato para nuestros tratamientos SE-UMCV2 y SE-DMA16 se efectuó en un autoclave a 1,4 kg/cm² y 120 °C durante 20 min por 3 días consecutivos.

En nuestros tratamientos, cada de 21 días durante 126 días, se calculó el porcentaje de crecimiento de las plántulas de pinos de la siguiente manera: [(Valor final - valor inicial) / valor inicial] x 100. Las mediciones efectuadas en las plántulas fueron: Longitud tallo, grosor de la base del tallo y grosor del tallo a su altura media. Después de 126 días se registraron los pesos frescos de las partes aérea y raíz, además de la concentración de clorofila. La concentración de clorofila en las acículas se determinó siguiendo a Steubing et al. (2002) con mínimas modificaciones: Se (1) trituró una muestra de aproximadamente 1 g de acículas de *P. devoniana* con nitrógeno líquido, (2) aforó a 5 mL con acetona al 80%, (3) dejó incubar por 12 h y (4) filtró en papel filtro (Whatman No. 4). Se determinó la absorbencia de la muestra en un espectrofotómetro a 664 y 646 nm. La concentración de clorofila se calculó de acuerdo a las fórmulas: Clorofila a = $(11.96 \times A_{664}) - (1.93 \times A_{646})$; Clorofila b = $(20.36 \times A_{646}) - (5.50 \times A_{664})$; Concentración de clorofila total en µg/g = (mL acetona x concentración de clorofilas a+b) / peso de la muestra.

Análisis estadístico. Se usó el paquete estadístico STATISTICA 7.0 de statsoft, aplicando ANOVA y una prueba

de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher (significancia de 0,05%).

RESULTADOS

La inoculación de *A. agilis* UMCV2 en etapas juveniles de *Pinus devoniana*, o la adición de DMA16, produjo un incremento en el crecimiento de las plántulas. Este incremento fue mayor cuando las plántulas crecieron en sustrato no esterilizado, y se observó principalmente en la longitud del tallo de las plántulas (Fig. 1A). Desde la primera mediación realizada (día 21) las plántulas tratadas mostraron un crecimiento muy superior a las plántulas control. Esta estimulación de crecimiento se mantuvo (aunque de forma menos intensa) durante el resto del tiempo que duró el experimento. Al finalizar el mismo (126 días), las plántulas inoculadas con *A. agilis* UMCV2, y a las que se agregó DMA16, crecieron en promedio 70 y 62%, respectivamente, respecto a su tamaño inicial, comparado con un 22% de crecimiento que experimentaron las plántulas control. El crecimiento en grosor en la base del tallo fue estimulado solo por inoculación con UMCV2 y fue más discreto (Fig. 1B). A partir del día 63 del experimento, el tratamiento con UMCV2 en el sustrato no esterilizado se separó del resto de los tratamientos, que tuvieron un crecimiento similar al control. Al finalizar el experimento, el tratamiento con UMCV2 en sustrato no esterilizado tuvo un incremento de 53% en el grosor de la base del tallo respecto de su grosor inicial, mientras que crecimiento en grosor en la base del tallo fue de aproximadamente 32% en el resto de los tratamientos.

Las plántulas crecidas en sustrato esterilizado adicionadas con DMA16 tuvieron una estimulación del incremento en grosor de la parte media del tallo. Dicho incremento alcanzó un 90% al finalizar el experimento respecto a su grosor inicial. El resto de los tratamientos, incluido el control, tuvieron un incremento de alrededor del 25% (Fig. 1C).

Las plántulas crecidas en sustrato no esterilizado e inoculadas con *A. agilis* UMCV2 produjeron una biomasa área estadísticamente superior, y tuvieron una clara tendencia de tener una mayor concentración de clorofila, en comparación con los controles no tratados (Figs. 2A y B). Las plantas tratadas con

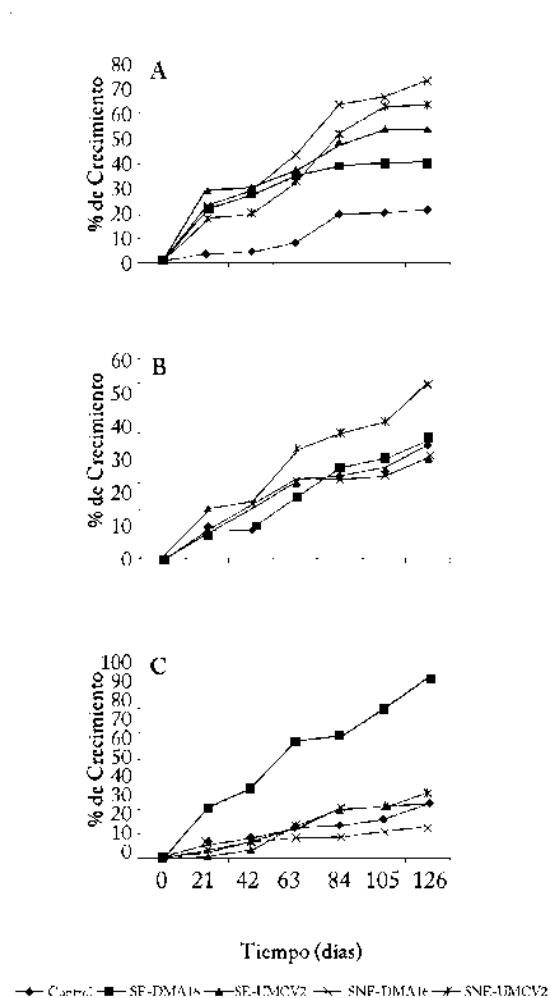


Fig. 1. Incremento (%) del crecimiento del tallo de plántulas de *P. devoniana* medidas en diferentes fechas respecto al valor inicial. (A) Longitud de tallo; (B) Grosor en la base de tallo; (C) Grosor en la parte media del tallo. Los tratamientos mostrados son Control, sustrato esteril adicionado con DMA16 (SE-DMA16) o inoculado con *A. agilis* UMCV2 (SE-UMCV2), sustrato no esteril adicionado con DMA16 (SNE-DMA16) o inoculado con *A. agilis* UMCV2 (SNE-UMCV2).

Fig. 1. Increase (%) of stem growth on seedlings of *P. devoniana* measured at different dates with respect to the initial value. (A) Stem length; (B) width at the stem base; (C) width at the intermediate portion of the stem. Treatments include Control; sterile substrate with DMA16 (SE-DMA16) or inoculated with *A. agilis* UMCV2 (SE-UMCV2); non sterile substrate with DMA16 (SNE-DMA16) or inoculated with *A. agilis* UMCV2 (SNE-UMCV2).

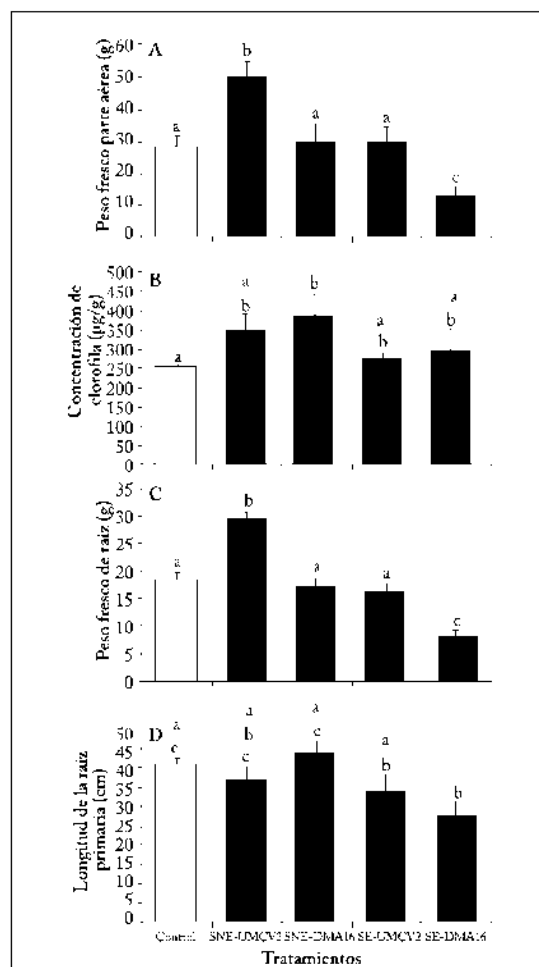


Fig. 2. Efecto de la inoculación con *A. agilis* UMCV2 y la dimetil hexadecilamina (DMA16) sobre *P. devoniana*. A) Peso fresco de la parte aérea (g); B) Concentración de clorofila (µg/g); C) Peso fresco de la raíz (g); D) Longitud de la raíz (cm). Los tratamientos mostrados son Control, sustrato esteril adicionado con DMA16 (SE-DMA16) o inoculado con *A. agilis* UMCV2 (SE-UMCV2), sustrato no esteril adicionado con DMA16 (SNE-DMA16) o inoculado con *A. agilis* UMCV2 (SNE-UMCV2). Las barras con la misma letra son estadísticamente similares.

Fig. 2. Effect of inoculation with *A. agilis* UMCV2 and dimethylhexadecylamine (DMA16) on *P. devoniana*. A) Fresh weight of the aerial part (g); B) Chlorophyll concentration (µg/g); C) Root fresh weight (g); D) Root length (cm). Treatments are Control, sterile substrate with DMA16 (SE-DMA16) or inoculated with *A. agilis* UMCV2 (SE-UMCV2), non sterile substrate with DMA16 (SNE-DMA16) or inoculated with *A. agilis* UMCV2 (SNE-UMCV2). Histograms followed by the same letter are statistically similar.

A. agilis UMCV2 en sustrato no esterilizado produjeron raíces de longitud estadísticamente similar a las plantas control, pero con una diferencia estadísticamente superior en el peso fresco (Figs. 2C y D).

Las plántulas crecidas en sustrato esterilizado y adicionadas con DMA16 fueron inhibidas respecto a la producción de biomasa. Dichas plántulas produjeron 50% menos de biomasa aérea, y 58% menos de biomasa de raíz (estadísticamente menor), y raíces 35% más cortas que los controles no tratados (también estadísticamente inferiores al control) (Figs. 2A, 2C y 2D). La concentración de clorofila no fue afectada ($p > 0,05$) (Fig. 2B).

Las plantas tratadas con *A. agilis* UMCV2 en sustrato esterilizado y con DMA16 en sustrato no esterilizado no mostraron diferencias significativas con respecto al control. La excepción correspondió a la concentración de clorofila que fue incrementada por el tratamiento con DMA16 en sustrato esterilizado (Fig. 2B).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se mostró que la inoculación de plántulas juveniles de *P. devoniana* con la PGPR *A. agilis* UMCV2, aislada de la rizósfera de *Zea mays* (Valencia-Cantero et al., 2007), incrementó el crecimiento de las plántulas. Se probaron dos condiciones de inoculación, plántulas crecidas en sustrato no esterilizado y en sustrato esterilizado. Este último tratamiento fue incluido bajo la hipótesis de que al eliminar a las poblaciones bacterianas nativas en torno a la raíz de *P. devoniana*, darían una ventaja competitiva a la bacteria *A. agilis* para su implantación en la raíz del pino; como resultado, se incrementarían los efectos de la bacteria sobre la plántula. Sin embargo, la esterilización del sustrato, lejos de mejorar el crecimiento de la plántula, lo limitó; los mayores efectos de la bacteria se dieron en sustrato sin esterilizar. Es posible que: i) al ser esterilizado el sustrato se hayan producido compuestos tóxicos, y ii) en el sustrato existieran otros microorganismos capaces de promover el crecimiento del pino que fueron eliminados con el procedimiento de esterilización.

Es conocido que algunos microorganismos promueven la movilización de N, P, K o Fe, y frecuentemente no son los mismos microorganismos los que movilizan los distintos nutrientes (Ortíz-Castro et al., 2013). De cualquier forma, este trabajo mostró que *A. agilis* no requirió de la eliminación o de la atenuación de la flora bacteriana nativa de las raíces de *P. devoniana* para poder ejercer un efecto promotor en el crecimiento del pino, que fue muy notable [70% más de acumulación de biomasa; más del doble de elongación de la parte aérea respecto a las plántulas control (Figs. 1 y 2)].

La inoculación de *A. agilis* también produjo una tendencia al incremento en la concentración de clorofila en plántulas crecidas en sustrato no esterilizado (Fig. 2B). Desde que la

concentración de clorofila es un parámetro indicativo del nivel nutricional de hierro, es posible que la presencia de *A. agilis* UMCV2 mejore la nutrición por hierro de las plántulas de *P. devoniana*, como sucede en *M. truncatula* (Orozco-Mosqueda et al., 2013a).

Las plántulas en sustrato no esterilizado adicionadas con DMA16 tuvieron un crecimiento más rápido e incrementaron la concentración de clorofila en comparación con el control no tratado. Sin embargo, cuando la DMA16 se adicionó a plántulas crecidas en sustrato esterilizado, el efecto fue negativo en todos los parámetros medidos, excepto la concentración de clorofila. Previamente se había mostrado *in vitro* que concentraciones superiores a 16 μM de DMA16 en el medio de cultivo producían inhibición en el crecimiento vegetal de plántulas de *M. sativa* (Velázquez Becerra et al., 2011), pero concentraciones de 100 μM no producían daños en los folíolos de *Fragaria ananassa* (fresa) también *in vitro* (Velázquez-Becerra et al., 2013). Sin embargo, no había ningún antecedente de plantas crecidas en suelo.

El presente trabajo mostró que una concentración relativamente alta de DMA16 (100 μM) suministrada a los pinos en el agua de riego una vez por semana, produjo una mejoría en la concentración de clorofila, sin tener efectos adversos en otras variables, sólo si el sustrato tenía su microflora nativa. Es probable que la microflora nativa degrade la DMA16 evitando que se acumule hasta concentraciones inhibitorias. Futuros trabajos deben determinar una forma más apropiada para suministrar DMA16 (dosis, frecuencias y vehículos) de tal manera que produzca un efecto promotor del crecimiento en pinos.

Este trabajo mostró que la inoculación de la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 promovió el crecimiento de plántulas juveniles de *P. devoniana* cultivadas en invernáculo y sustrato no esterilizado. Los mecanismos por los cuales se ejerce esta promoción del crecimiento no están todavía establecidos. Sin embargo, el compuesto bacteriano DMA16 fue capaz de promover el incremento de la concentración de clorofila en pinos crecidos en sustrato no esterilizado, aunque su aplicación fue perjudicial en pinos crecidos en sustrato esterilizado. De esta forma, la inoculación de *P. devoniana* con *A. agilis* UMCV2 se presenta como una alternativa para acelerar el crecimiento de dicha especie de pino en condiciones de vivero.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) por el apoyo en este trabajo (proyecto "Segundo Período de la Convocatoria 2011 del Programa de Apoyos Complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación"). Gracias al Ing. Cuauhtémoc Ramírez Romero Dirección General de la COFOM y al Dr. Rafael Salgado Garciglia del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UMSNH.

REFERENCIAS

- Barriuso, J., M.T. Pereyra, J.A. Lucas-García, M. Megías, F.J. Gutiérrez-Mañero y B. Ramos (2005). Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microbial Ecology* 50: 82-89.
- Castellanos, J.Z., J.J. Peña-Cabrales y I. Rojas-Martínez (1995). Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas élite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Turrialba* 45: 89-99.
- Chanway, C.P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science* 43: 99-112.
- Chanway, C.P. y F.B. Holl (1994). Ecological growth response specificity of two Douglas-fir ecotypes inoculated with coexistent beneficial rhizosphere bacteria. *Canadian Journal of Botany* 72: 582-586.
- COFOM.michoacan.gob.mx/ Comisión Forestal del Estado de Michoacán, Calle Justo Mendoza #11, Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán de Ocampo, México.
- Domenech, J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J.A. Lucas-García, J.J. Colón y F.J. Gutiérrez-Mañero (2004). *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 194: 293-303.
- Eckert, A.J. y B.D. Hall (2006). Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for *Pinus* (Pinaceae): Phylogenetic tests of fossil-based hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 166-182.
- Farjon, A. y B.T. Styles (1997). *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropica. Monograph 75. New York Botanical Garden. New York. USA. 309 p.
- Flores-Velázquez, R., E. Serrano-Gálvez, V.H. Palacio-Muñoz y G. Chapela (2007). Análisis de la industria de la madera aserrada en México. *Madera y Bosques* 13: 47-59.
- Hassan, S.H.T. (2013). Effect of biofertilization by using three *Azotobacter* isolates and two levels of mineral nitrogen fertilizer on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) growth, yield and some chemical constituents. *Journal of American Science* 9: 437-446.
- Jousset, A., S. Scheu y M. Bonkowski (2008). Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria. *Functional Ecology* 22: 714-719.
- Liston, A., W.A. Robinson, D. Piñero y E.R. Alvarez-Buylla (1999). Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 95-109.
- Liu, M., L. Bjørnlund, R. Rønn, S. Christensen y F. Ekelund (2012). Disturbance promotes non-indigenous bacterial invasion in soil microcosms: analysis of the roles of resource availability and community structure. *PloS one* 7: e45306.
- Liu, W., W. Mu, B. Zhu y F. Liu (2008). Antifungal activity and components of VOC produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Research in Bacteriology* 1: 28-34.
- Lugtenberg, B. y F. Kamilova (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556.
- Orozco-Mosqueda, M.C., C. Velázquez-Becerra, L.I. Macías-Rodríguez, G. Santoyo, I. Flores-Cortez, R. Alfaro-Cuevas y E. Valencia-Cantero (2013a). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant and Soil* 362: 51-66.
- Orozco-Mosqueda, M.C., L.I. Macías-Rodríguez, G. Santoyo, I. Flores-Cortez, R. Fariás-Rodríguez y E. Valencia-Cantero (2013b). *Medicago truncatula* increases its iron uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiologica* 58: 579-585.
- Ortiz-Castro, R., E. Valencia-Cantero y J. López-Bucio (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior* 3: 263-265.
- Ortiz-Castro, R., E. Valencia-Cantero y J. López-Bucio (2013). The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. *Acta Horticulturae* 1009: 241-250.
- Perry, J.P. (1991). The pines of Mexico and Central America. Timber press. Portland, Oregon. USA. 231p.
- Probanza, A., J.A. Lucas-García, M. Ruiz-Palomino, B. Ramos y F.J. Gutiérrez-Mañero (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20: 75-84.
- Ramos, B., J. Barriuso-Maicas, J.A. Lucas-García, T. Pereyra de la Iglesia, A. Daza y F.J. Gutiérrez-Mañero (2007). Phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of *Pinus pinaster* and in the mycosphere of associated *Lactarius deliciosus*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Developments. *Plant and Soil Sciences* 102: 261-264.
- Steubing, L., Godoy R. y M. Alberdi (2002). Métodos de ecología vegetal. Primera Edición. Editorial Universitaria Universitaria S. A. Santiago de Chile. pp: 243-261
- Valencia-Cantero, E., E. Hernández-Calderón, C. Velázquez-Becerra, J. López-Meza, R. Alfaro-Cuevas y J. López-Bucio (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil* 291: 263-273.
- Velázquez-Becerra, C., L.I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, I. Flores-Cortez, G. Santoyo, C. Hernández-Soberano y E. Valencia-Cantero (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma* 250: 1251-1262.
- Velázquez-Becerra, C., L.I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, J. Altamirano-Hernández, I. Flores-Cortez y E. Valencia-Cantero (2011). A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro. *Plant and Soil* 339: 329-340.
- Zepeda, B.E.M. y M.M. Acosta (2000). Incremento y rendimiento maderable de *Pinus montezumae* L. amb. en San Juan Tetla Puebla. *Madera y Bosques* 6: 15-27.



INFORME BREVE

La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
Arthrobacter agilis UMCV2 coloniza endofíticamente a
Medicago truncatula



Maria Elizabeth Aviles-Garcia, Idolina Flores-Cortez, Christian Hernández-Soberano,
Gustavo Santoyo y Eduardo Valencia-Cantero*

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edificio B5, Ciudad
Universitaria, Morelia, Michoacán, México

Recibido el 5 de noviembre de 2015; aceptado el 7 de julio de 2016
Disponible en Internet el 2 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Arthrobacter agilis;
Leguminosas;
Bacterias endófitas

Resumen *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una bacteria rizosférica que promueve el crecimiento vegetal de plantas leguminosas proveyéndoles hierro soluble. Un segundo mecanismo de promoción se da a través de la producción de compuestos volátiles que estimulan los mecanismos de absorción de hierro. Adicionalmente, *A. agilis* UMCV2 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos. En el presente trabajo se emplea una combinación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa e hibridación *in situ* con fluorescencia para detectar y cuantificar la presencia de la bacteria en los tejidos internos de la planta leguminosa *Medicago truncatula*. Nuestros resultados demuestran que *A. agilis* UMCV2 se comporta como una bacteria endófitas de *M. truncatula* especialmente en medios donde el hierro está disponible.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Arthrobacter agilis;
Legumes;
Endophytic bacterium

The plant growth-promoting rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2
endophytically colonizes *Medicago truncatula*

Abstract *Arthrobacter agilis* UMCV2 is a rhizosphere bacterium that promotes legume growth by solubilization of iron, which is supplied to the plant. A second growth promotion mechanism produces volatile compounds that stimulate iron uptake activities. Additionally, *A. agilis* UMCV2 is capable of inhibiting the growth of phytopathogens. A combination of quantitative polymerase chain reaction and fluorescence *in situ* hybridization techniques were used here to detect

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vcantero@umich.mx (E. Valencia-Cantero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.004>

0325-7541/© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and quantify the presence of the bacterium in the internal tissues of the legume *Medicago truncatula*. Our results demonstrate that *A. agilis* UMCV2 behaves as an endophytic bacterium of *M. truncatula*, particularly in environments where iron is available.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La rizosfera es un ambiente único formado por la interfaz de las raíces de las plantas y el suelo circundante. Miríadas de microorganismos viven, compiten y prosperan en este ambiente. Dichos microorganismos pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, de manera perjudicial o benéfica. Un subconjunto de las bacterias rizosféricas son capaces de colonizar y prosperar en el interior de los tejidos vegetales (raíz y tejidos aéreos), a estas bacterias se les denomina endófitas, a condición de que no tengan un efecto negativo en el crecimiento de la planta, y se asume que su efecto en la planta es más bien de simbiosis o de proto-cooperación³.

Las poblaciones endofíticas, al igual que las poblaciones rizosféricas, están condicionadas por factores bióticos y abióticos, pero en todo caso el entorno endofítico es mejor controlado por las plantas que el entorno rizosférico, y de este modo las plantas ejercen una mayor selección sobre las poblaciones endofíticas que sobre las poblaciones rizosféricas⁶.

Las bacterias con efectos promotores del crecimiento vegetal han sido ampliamente empleadas como bioinoculantes, con diferentes resultados. Mientras que en algunas ocasiones los bioinoculantes han tenido un impacto significativo en el aumento de la producción vegetal, en otras ocasiones su impacto ha sido más bien discreto o nulo³. Una de las razones que explican estas variaciones en los resultados es la diferente habilidad de las bacterias inoculadas para competir y sobrevivir dentro de las comunidades bacterianas autóctonas de las rizosferas donde son introducidas³.

Las plantas leguminosas (orden Fabales) son el segundo grupo más importante de plantas cultivadas para la alimentación humana y de ganado, solamente superada por las gramíneas⁴, de allí la importancia de su estudio.

En un trabajo previo se aisló la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2 de la rizosfera de plantas de *Zea mays* (maíz)¹¹. *A. agilis* UMCV2 es una actinobacteria rizosférica capaz de promover el crecimiento vegetal por distintos mecanismos, que incluyen el suministro de hierro (Fe) soluble a las plantas¹¹ y la emisión de dimetilhexadecilamina, un compuesto orgánico volátil que estimula el crecimiento de la raíz y de los tejidos aéreos de *Medicago sativa*¹², además de estimular los mecanismos de absorción de Fe de la planta⁹. Este mismo compuesto tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los organismos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*¹³.

Las capacidades como promotores del crecimiento vegetal antes descritas hacen de *A. agilis* UMCV2 un agente microbiano con potencial para ser usado como bioinoculante. Una cuestión relevante para este propósito es determinar el nivel de asociación de *A. agilis* UMCV2 con la planta inoculada, como un modo de inferir sus

posibilidades de sobrevivencia dentro de la comunidad bacteriana asociada a la planta, independientemente del tipo de suelo y de sus condiciones nutricionales.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar los tejidos internos de la planta leguminosa modelo *Medicago truncatula*, cultivar Jemalong A17 en diferentes condiciones de disponibilidad de Fe, y empleamos para ello una combinación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa e hibridación *in situ* con fluorescencia.

A. agilis fue crecida en agar nutritivo a 25 °C durante 48 h antes de su utilización. Las semillas de *M. truncatula* fueron desinfectadas, germinadas e incubadas según se ha descrito previamente⁹. Plántulas de *M. truncatula*, a 3 d de su germinación, fueron colocadas en frascos de 170 ml de capacidad, con 30 ml de medio basal Hoagland solidificado con 6 g/l de agar de micropropagación y sin Fe, con 100 µM de Fe insoluble adicionado como ferrihidrita, o bien con 100 µM de FeSO₄. Algunas plantas se mantuvieron axénicas (controles axénicos), mientras que otras fueron inoculadas por goteo de 10 µl de una suspensión bacteriana de *A. agilis* UMCV2 con DO₅₉₀ de 0,1 (equivalente a 1,1 × 10⁶ UFC medidas por cuenta viable) sobre la raíz. Todos los tratamientos, incluidos los controles, tuvieron entre 3 y 8 réplicas independientes. Después de 3 semanas de incubación, se colectaron por separado la hoja cero (unifoliada), la hoja 1, la hoja 2, la raíz proximal (desde el hipocótilo hasta el punto de surgimiento de la primera raíz lateral, a aproximadamente 1,5 cm del hipocótilo) y la raíz distal (el resto de la raíz de aproximadamente 3,5 cm) (fig. 1A).

Tanto las hojas como las raíces de las plantas fueron desinfectadas superficialmente y la ausencia de bacterias viables fue corroborada como se ha descrito previamente⁸. Se extrajo el ADN de las muestras de tejido vegetal y de las bacterias empleando un método adecuado para estos 2 tipos de materiales biológicos⁷. La concentración de ADN fue determinada empleando un espectrómetro para micromuestras NanoDrop 2000c (Termo Scientific Nanodrop, Wilmington Delaware, EE. UU.).

Considerando la secuencia del segmento de ADN del espaciador intergénico existente entre los genes del ARNr del 16S y 23S de *A. agilis* UMCV2 (número de acceso GenBank EF101871.1), se diseñaron los oligonucleótidos 2CV2F (5'-GTCCTGGTGGCATTTC-3') y 2CV2R (5'-ACGCAGAACAGAGC-3') utilizando el programa Beacon Designer 4.02 (Primer Biosoft International, 3786 Corina Way, Palo Alto California, EE. UU.).

Para la detección de *A. agilis* UMCV2 y la cuantificación de su ADN dentro de los tejidos de *M. truncatula*, se realizaron pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando un termociclador StepOne (Applied Biosystems).

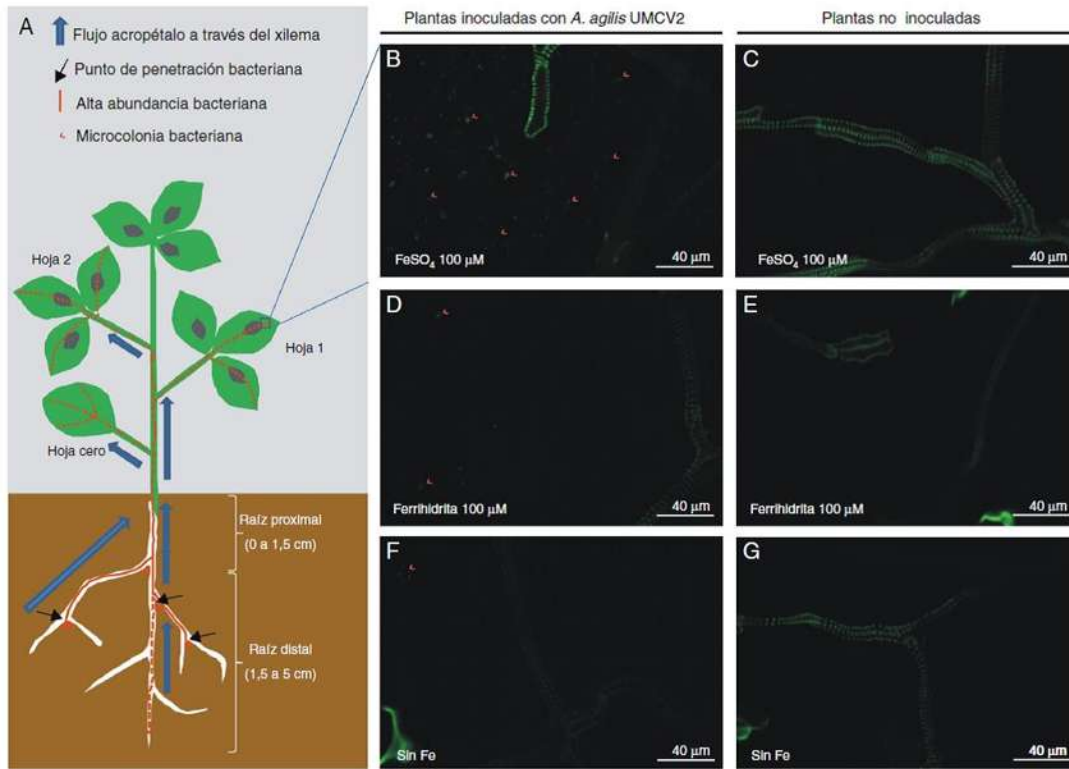


Figura 1 (A) Presencia y distribución de *A. agilis* UMCV2 en plantas de *M. truncatula*. El panel A muestra un esquema del sistema experimental, señalando las secciones de la planta analizadas y en las que se encontró *A. agilis* UMCV2 21 días después de la inoculación sobre la raíz. Los paneles B a G muestran fotografías representativas tomadas bajo un haz de luz de excitación de 488 nm y una ventana de emisión de 505 a 550 nm de longitud de onda, en un plano de 60 μm por debajo de la superficie de la hoja 1 de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y crecidas en medio adicionado con FeSO₄ (B), ferrihidrita (D) o sin Fe en el medio (F), o bien no inoculadas y crecidas en medio adicionado con FeSO₄ (C), ferrihidrita (E) o sin Fe en el medio (G). Las fotografías muestran la fluorescencia esperada de los elementos del xilema, pero solo las plantas inoculadas muestran microcolonias bacterianas señaladas con puntas de flecha.

Foster City, California, EE. UU.). Las curvas de calibración cubrieron un intervalo de 20 ng a 51,2 fg de ADN de *A. agilis* UMCV2 como templado, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0,997, y fueron seguidas de una curva de disociación con un solo máximo a los 83 °C, lo cual muestra un patrón de amplificación lineal con un solo amplicón. La cuantificación del ADN de *A. agilis* UMCV2 en tejidos de *M. truncatula* con base en las curvas de calibración se hizo de manera similar, utilizando como templado 20 ng de ADN proveniente de las muestras de tejidos vegetales.

De esta forma se detectó a *A. agilis* UMCV2 en cada una de las secciones de las plantas inoculadas en donde se buscó (tabla 1), si bien no siempre se detectó en todas las réplicas. En plantas que fueron crecidas en un medio suplementado con Fe disponible (FeSO₄) se encontraron las mayores cantidades de ADN bacteriano, en todos los órganos muestreados y en todas las réplicas, mientras que en las plantas crecidas en medio carente de Fe se registraron las menores cantidades de ADN bacteriano y no en todas las muestras (tabla 1). Un caso intermedio sucedió con las plantas crecidas en

medios con Fe adicionado en forma insoluble (100 μM de ferrihidrita), que tuvieron cantidades de ADN bacteriano numéricamente mayores aunque estadísticamente similares a las encontradas en plantas crecidas en medios sin Fe. En ninguna de las secciones de las plantas control, de ninguno de los tratamientos, se detectó ADN bacteriano (tabla 1).

Para corroborar que el ADN bacteriano detectado provenía de bacterias con crecimiento endofítico y no de restos de bacterias adheridas a las superficies de las diferentes secciones vegetales, se realizaron fotografías de las superficies y planos interiores de los tejidos clarificados utilizando un microscopio confocal (FV1200, Olympus Corporation, Tokio, Japón). Las bacterias inoculadas fueron localizadas utilizando hibridación *in situ* con fluorescencia, de acuerdo al protocolo descrito por Lo Piccolo et al. (2010)⁵ empleando la sonda fluorescente HGC dirigida específicamente contra el ARNr de 23S de actinobacterias¹⁰ y unida al fluoróforo verde de rodanina (Uniparts SA de C.V., Galileo 92, México D.F, México). De esta manera fue evidente la presencia de la bacteria dentro de los tejidos de las plantas inoculadas, pero

Tabla 1 Cantidad de ADN de *A. agilis* UMCV2 (pg) encontrada en 20ng de ADN extraídos de tejidos de *M. truncatula*^a

Origen de la muestra	Medios sin Fe		Medio con 100 μM de ferrihidrita		Medio con 100 μM de Fe(SO ₄)	
	Plantas inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 ^b					
Hoja 2	+ < 0,05	B (0,14)	0	B (0,00)	3,70	AB (1,00)
Hoja 1	+ < 0,05	B (0,29)	0,33	AB (0,25)	21,89	A (1,00)
Hoja cero	+ < 0,05	B (0,43)	0,05	AB (0,50)	2,13	AB (1,00)
Raíz proximal	0,17	B (0,71)	1,12	AB (0,88)	66,09	A (1,00)
Raíz distal	0,05	B (0,86)	0,05	AB (0,75)	17,74	A (1,00)
	Plantas no inoculadas					
Hoja 2	0	B (0,00)	0	B (0,00)	0	B (0,00)
Hoja 1	0	B (0,00)	0	B (0,00)	0	B (0,00)
Hoja cero	0	B (0,00)	0	B (0,00)	0	B (0,00)
Raíz proximal	0	B (0,00)	0	B (0,00)	0	B (0,00)
Raíz distal	0	B (0,00)	0	B (0,00)	0	B (0,00)

^a Se muestran valores promedio.

La notación + < 0,05 indica muestras positivas para la prueba de detección de ADN bacteriano pero en una cantidad inferior al límite de cuantificación (0,05 pg).

Los valores entre paréntesis expresan la proporción de muestras positivas. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) según un análisis de varianza en rangos de Kruskal-Wallis seguido de una comparación múltiple por método de Dunns.

en ningún caso pudieron detectarse bacterias ni en la superficie de los tejidos ni en los tejidos internos de las plantas control (fig. 1).

Por otro lado, la sección de la planta con mayor cantidad de ADN bacteriano en todos los tratamientos fue la raíz proximal, que fue la parte de la planta sobre la cual se goteó la suspensión bacteriana al momento de la inoculación y su probable punto de penetración, seguida de la raíz distal y la hoja 1, y al final estuvieron la hoja cero y la hoja 2.

El anterior patrón de distribución del ADN bacteriano es compatible con la hipótesis de que las bacterias pudieron haberse distribuido por los tejidos aéreos de *M. truncatula* pasivamente a través del tejido vascular, más probablemente por el xilema, con un movimiento acropétalo (a favor de la corriente de transpiración), según ha sido descrito para el caso de *Burkholderia phytofirmans* y partículas de látex en *Vitis vinicola*². Los vasos xilemáticos se comunican unos con otros en sus extremos a través de perforaciones con diámetros inferiores al diámetro bacteriano, lo que supone un obstáculo al paso de las bacterias de un vaso a otro^{2,14}. En un estudio realizado en *M. sativa*¹⁴, se mostró que la mayoría de los vasos xilemáticos terminan en los nodos del tallo y solo una proporción muy pequeña ramifica desde los elementos vasculares del tallo hasta los peciolas. De acuerdo a lo anterior, es explicable que las bacterias se encuentren impedidas de entrar pasivamente por el xilema hasta las hojas y que solo una pequeña fracción de la cantidad de ADN de *A. agilis* UMCV2 que encontramos en la raíz proximal fuera encontrada en la hoja 2, y solo en algunas réplicas.

Por otro lado, la presencia de ADN bacteriano en las raíces distales, teniendo en cuenta la escasa probabilidad de que las bacterias puedan penetrar pasivamente en el floema y ser llevadas por este en un flujo basipétalo (contra la corriente de transpiración), sugiere que la bacteria fue capaz de colonizar activamente los tejidos de la raíz y no que simplemente fue llevada por la corriente de transpiración, si bien en virtud de la cantidad de ADN hallada se concluye que la cantidad de bacterias que se movieron contra la corriente

de transpiración fue entre 3 y 20 veces menor que las que se encontraron en la raíz proximal (tabla 1).

Fue muy interesante observar que la mayor cantidad de bacterias fue encontrada en los tejidos de plantas que crecieron en medios con Fe disponible, seguida de la observada en plantas crecidas con Fe insoluble y finalmente en plantas crecidas en medios sin Fe.

Se conoce que *A. agilis* UMCV2 es capaz de reducir Fe en la rizosfera, haciéndolo más soluble y por tanto más accesible a las plantas¹¹, y que estimula los mecanismos de absorción y movilización de Fe en las plantas de *M. truncatula*⁹. Con base en estos antecedentes es posible hipotetizar que *A. agilis* UMCV2 y *M. truncatula* establecen una interacción positiva basada en la economía del Fe, donde la planta se vería beneficiada con la presencia de la bacteria en la rizosfera si el Fe estuviera en forma insoluble en el medio externo¹¹, y se beneficiaría con la colonización endofítica si el Fe estuviera disponible en el interior de la planta. Ya en el interior de las raíces, parte del Fe debe ser movilizado a los tejidos aéreos, donde se conoce que *A. agilis* UMCV2 puede coadyuvar a la homeostasis de dicho metal¹. En tales circunstancias es posible que las plantas favorezcan su colonización endofítica.

En conclusión, este trabajo muestra que *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar y prosperar como bacteria endófito en *M. truncatula*, y que esta capacidad es mayor cuando el Fe se encuentra más disponible para la planta.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al fondo SEP-Conacyt-231585 (México) por el financiamiento de este trabajo y al Dr. León Ruiz-Herrera por haber tomado las fotografías en el microscopio confocal.

Bibliografía

- Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez N, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *J Plant Growth Regul.* 2015;34:611–23.
- Chatelet D, Matthews M, Rost TL. Xylem structure and connectivity in grapevine (*Vitis vinifera*) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants. *Ann Bot.* 2006;98:483–94.
- Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am J Bot.* 2013;100:1738–50.
- Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131:872–7.
- Lo Piccolo S, Ferraro V, Alfonzo A, Settanni L, Ercolini D, Burruano S, Moschetti G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Ann Microbiol.* 2010;60:161–7.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature.* 2012;488:86–90.
- Mahuku SG. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol Biol Rep.* 2004;22:71–81.
- Marquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Sepulveda I, Santoyo G. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet Mol Res.* 2010;9:2372–80.
- Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil.* 2013;362:51–66.
- Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* 1994;140:2849–58.
- Valencia-Cantero E, Hernandez-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, Lopez-Bucio J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 2007;291:263–73.
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant Soil.* 2011;339:329–40.
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C, Valencia-Cantero E. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma.* 2013;250:1251–62.
- Wiebe HH, Greer RL, van Alfen NK. Frequency and grouping of vessel endings in alfalfa (*Medicago sativa*) shoots. *New Phytol.* 1984;97:583–90.

Nitrate influx in rose plants during day-night cycle

Raúl Cárdenas-Navarro^a, Vilma del Carmen Castellanos-Morales^a, Luis López-Pérez^a,
 Juan José Peña-Cabriales^b, Fidel Vargas-De La Cruz^a, and Idolina Flores-Cortez^c

^aInstituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Mexico; ^bCentro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Mexico; ^cInstituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

ABSTRACT

In herbaceous plants grown in controlled environmental conditions nitrate (NO_3^-) uptake increases during the day and decreases in the night. The aim of this work was to measure NO_3^- uptake rates along the day-night cycle, in rose (*Rosa hybrida* L.) plants grown under controlled environmental conditions. Two independent experiments were conducted inside a growth chamber at 20 °C and 25 °C, using rose mini-plants cv. Texas, grown in a hydroponic nutrient film technique (NFT) set-up with at 3.0 mol m⁻³ NO_3^- concentration. Dry matter and nitrogen (N) accumulation were registered during growth and NO_3^- uptake rates were measured during a day-night cycle, using ¹⁵N as ¹⁵ NO_3^- . In both experiments the hourly estimated N- NO_3^- accumulation rates are near to the measured uptake rates of ¹⁵ NO_3^- and nitrate uptake decrease during the day and increase in the night, in contrast with the herbaceous plants. Results are discussed on the basis of N plant demand and carbohydrates availability.

ARTICLE HISTORY

Received 4 September 2014
 Accepted 16 September 2015

KEYWORDS



Nitrate uptake; rose;
 day-night

Introduction

In well-aerated soils, plant roots absorb nitrogen (N) mainly as nitrate (Glass, 2009). Nitrate uptake rate depends on the plant species and its phenological phase, on the availability of this ion in nearby roots and on the environmental conditions, mainly light and temperature (Cárdenas-Navarro et al., 1999). In tomato plants, grown in completely controlled environmental conditions, at 3.0 mM of nitrate in the nutrient solution, a wide variation on nitrate uptake rates along the day-night cycle has been shown, increasing gradually during the day and decreasing in the night (Cárdenas-Navarro et al., 1998). A number of papers have been published concerning nitrate uptake in rose plants, measured under not fully controlled environmental conditions, in greenhouse (Cabrera et al., 1995, 1996; Brun and Chazelle, 1996; Siberbush and Lieth, 2004). As yet, there is not experimental information about the rates of nitrate uptake in rose plants during the day-night cycle, grown under controlled environmental conditions. The aim of this work was to determine the pattern of nitrate influx rate along diurnal cycle in order to better understand this physiological process in woody plants and to establish the basis to further eco-physiological predictive models.

Materials and methods

Two experiments were conducted on rose mini-plants cv. Texas. In both experiments, the plant material consisted of cuttings (0.01 m) with two leaves and two buds visibly healthy. In order to prevent

CONTACT Raúl Cárdenas-Navarro  rcardenasnavarro@gmail.com  Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 carretera Morelia-Zinápecuaro, Tarímbaro, Michoacán, C.P. 58880, Mexico.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/lpla.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

dehydration, to promote rooting and to avoid fungal diseases, the cutting top was covered with beeswax, the bottom was immersed in a solution of indol-3-butyric acid (500 mg L^{-1}) for one minute and the leaves were immersed in a fungicide solution (Benlate, 1000 mg L^{-1}), respectively. The cuttings were placed individually in plastic pots (0.0003 m^3) with vermiculite, inside a rooting chamber ($4.0 \text{ m} \times 3.0 \text{ m} \times 2.5 \text{ m}$) built with transparent plastic in a greenhouse. The relative humidity was maintained above 75% with a control system composed by a humidistat (Titan, EOS1; Sunlight Supply Inc., Vancouver, WA USA), two humidifiers (Herrmidifier, 707-U; Trion IAQ Inc., Sanford, NC, USA) and a demineralized water reservoir (0.03 m^3). The pots were watered daily with distilled water and 30 days after the establishment, the leaves and one bud of each cutting were removed. The cutting remained in these conditions until they had well differentiated roots and stems, approximately 60 and 45 days after the establishment, for the first and the second experiments, respectively.

The seedlings were transferred to a nutrient film technique (NFT) hydroponic system, inside a growth chamber (Lumistell, ICP; Biotécnica del Bajío SA de CV, Celaya, Gto. Mexico) with controlled climatic conditions. The hydroponic NFT system consisted of 14 PVC tubes (1.5 m long and 0.051 m diameter) fixed on a metallic stand. At the top of tubes a longitudinal slot (0.001 m width) was made to put the plants and the polyvinyl chloride (PVC) plates recovered were used to cover slots between plants. The tubes were connected to a feeding and recirculation system composed of a storage tank (1.0 m^3), with temperature control, a centrifugal pump (Little Giant, 3-MD; Franklin Electric Co. Inc., Oklahoma, OK, USA) and distribution and recovery network tubes. The whole set-up was black painted to prevent the passage of light and algal development.

Nine plantlets were placed equidistant in the slot of each tube secured with PVC plates. The growth chamber was programmed with a photoperiod of 12/12 h, $360 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ light intensity and 75% hygrometry. Air and nutrient solution temperatures were kept at 25°C and 20°C for the first and the second experiment, respectively. According to Cárdenas-Navarro et al. (1998), the nutrient solution was prepared with demineralized water and the following pure salts, in mol m^{-3} : monopotassium phosphate (KH_2PO_4), 1.0; potassium sulfate (K_2SO_4), 1.0; calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), 1.5; calcium sulfate (CaSO_4), 2.0; magnesium sulfate (MgSO_4), 1.5. The other nutrients in the solution were, in $\text{mol } 10^{-3} \text{ m}^{-3}$: boric acid (H_3BO_3), 20.0; copper (II) sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0.5; Fe-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid iron (III) sodium salt), 15.0; manganese (II) sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 12.0; ammonium molybdate hydrate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 0.05; zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 3.0. The nutrient solution was replaced weekly to maintain as close as possible 3.0 mol m^{-3} of nitrate (NO_3^-) pH of 5.5 and electroconductivity 1.2 mS cm^{-1} .

Once and twice a week, for the second and the first experiment, respectively, four plants were randomly sampled to determine fresh and dry biomass of each organ (root, old cutting, newly formed stem, petiole and leaflets). The dry weights of the samples were measured after 48 hours at 105°C . Dry biomass of organs was pulverized (Retch MM 200; Retch GmbH, Aaan, Germany) in order to determine N content by Dumas method (Flach EA 1112, Thermo; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

When various floral buds became visible, some plants were removed to keep only three homogeneous (without floral buds) plants per tube. At this phenological stage, at 51 and 66 days after the establishment in the growth chamber, for the first and second experiments, respectively, the diurnal $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate was measured. The measurements were made on three plants of each tube with a system that exclude the handling and the stress of plants. This system consisted of a micro magnetic pump (Ismatec 81511; IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Germany), two flexible tubes (2 m long and 0.004 m internal diameter) and two balloon flasks (0.003 m^3) containing a washing solution and a NO_3^- uptake measurement solution. Both solutions had the same pH and electrical conductivity that solution used during plant growth, but in the washing solution the NO_3^- was replaced by sulfate ($\text{SO}_4^{=}$) and in the NO_3^- uptake measurement solution NO_3^- was supplied as $^{15}\text{NO}_3^-$ using potassium nitrate (K^{15}NO_3) (Aldrich, abundance 99.99%). During the uptake measurement days, the balloon flasks containing the washing solution and the $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake measurement solution were kept inside the growth chamber at 25°C and 20°C , for the first and the second experiment, respectively. Every two hours, one culture tube was randomly chosen to measure $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate by plants; in

both experiments four measurements were made for the light period and five for the dark period. The plants of the two remaining growth tubes were maintained in the growth chamber ten more days under the same climatic conditions.

Measurements of $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake were carried out as follows: the tubing feeding with the growth nutrient solution was disconnected; the washing solution was connected for two minutes to remove NO_3^- traces inside the growth tube, allowing a short runoff waste; a volume 0.0005 m^3 of measurement solution was recycled for 5 minutes in to the growth tube. The roots were rinsed briefly (using washing solution), dissected and centrifuged at 2000 rpm for 2 min (Vanguard V6500; SmithKline Beecham, Meena Medical Inc., Bedford, TX, USA). The shoots and roots were oven-dried (48 h at 105°C), weighed, individually pulverized (Retch MM 200; Retch GmbH, Aaan, Germany) and then analyzed to determine total N content by the Kjeldahl method (Eastin, 1978) and $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ratio by emission spectrometry (Faust et al., 1987) using an optic emission spectrometer (NOI-6ePC; Fischer Analyser Instrument GmbH, Leipzig, Germany).

Data obtained from the plant growth survey in both experiments were submitted to a non-linear regression analysis to estimate the hourly N accumulation rates at the days of $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake measurements, with the SYSTAT software version 9.01 for Windows.

Results

Experiment 1

The dry matter (dm) of rose plants increased exponentially in the growth chamber (air temperature and solution 25°C) with a growth rate of 0.042 day^{-1} (Figure 1): $dm = 0.363 \times e^{0.042 \times \text{day}}$; $r^2 = 0.96$. According to this model, during the day of measurements the $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rates for plants (from day 51 to day 52, in the growth chamber), increased from 3.153 to $3.290 \text{ g plant}^{-1}$, an average weight of $3.222 \text{ g plant}^{-1}$. The average N content in plant dry matter was $1.848 \times 10^{-3} \text{ mol g}^{-1}$. Considering these data, the average of hourly NO_3^- uptake rate was estimated at $3.25 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

The measurements of $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rates showed a wide variation during the diurnal cycle. Two hours after the onset of the dark period was $2.401 \times 10^{-6} \text{ mol }^{15}\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and reached a maximum rate four hours later with $5.984 \times 10^{-6} \text{ mol }^{15}\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. When the light period was

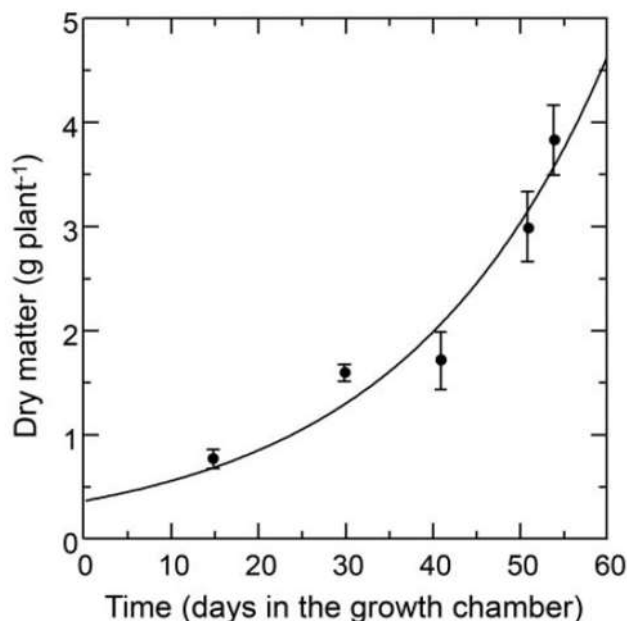


Figure 1. Dry matter accumulation of rose plants grown in NFT system at 25°C air and nutrient solution. Each point represents the average of four plants and bars express the standard deviation. The line shows the adjusted model: $dm = 0.363 \times e^{0.042 \times \text{day}}$ ($r^2 = 0.96$).

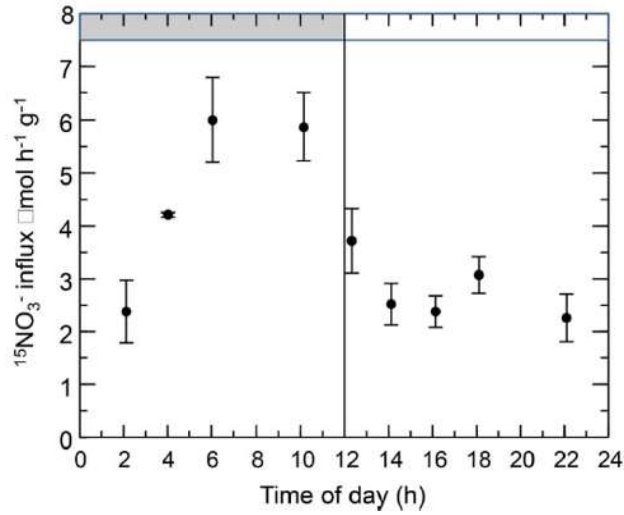


Figure 2. ¹⁵NO₃⁻ uptake rate along the day night cycle in rose plants grown in a NFT system at 25 °C air and nutrient solution. Each point represents the average of four plants and bars express the standard deviation. Shaded bar shows the extent of the night and vertical line indicates the end of this period.

established, the uptake rate of this ion dropped to $3.705 \times 10^{-6} \text{ mol } ^{15}\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and ten hours latter decreased to $2.245 \times 10^{-6} \text{ mol } ^{15}\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figure 2). The average rate of ¹⁵NO₃⁻ uptake during the night-day cycle was $3.577 \times 10^{-6} \text{ mol } ^{15}\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Experiment 2

The dry matter accumulation of rose plants in the growth chamber in this experiment (air temperature and solution 20 °C) also showed an exponential behavior. In this case, the growth rate was 0.025 day^{-1} (Figure 3): $dm = 0.649 \times e^{0.025 \times \text{day}}$, $r^2 = 0.94$. This model allowed us to estimate the increase of plant dry matter for day of ¹⁵NO₃⁻ uptake measurements (between days 66 and 67 in the growth chamber)

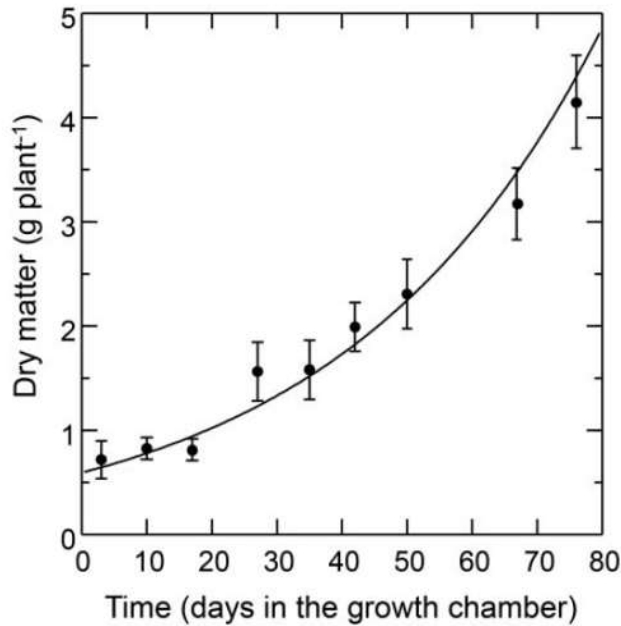


Figure 3. Dry matter accumulation of rose plants grown in NFT system at 20 °C air and nutrient solution. Each point represents the average of four plants and bars express the standard deviation. The line shows de adjusted model: $dm = 0.649 \times e^{0.025 \times \text{day}}$ ($r^2 = 0.94$).

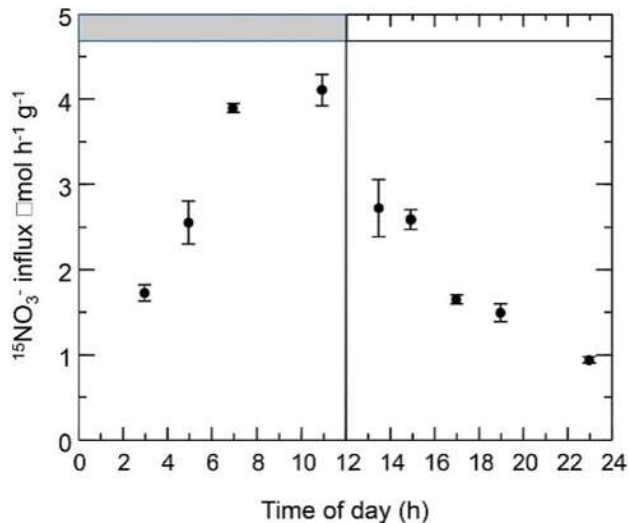


Figure 4. $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate along the day night cycle in rose plants grown in a NFT system at 20 °C air and nutrient solution. Each point represents the average of four plants and bars express the standard deviation. Shaded bar shows the extent of the night and vertical line indicates the end of this period.

from 3.449 to 3.537 g plant⁻¹, ie an average plant dry matter of 3.493 g plant⁻¹. The average N content in plant dry matter for this date was 1.920×10^{-3} mol g⁻¹. Using this information, the average of hourly NO_3^- uptake rates was estimated at 2.024×10^{-6} mol g⁻¹ h⁻¹.

The variation on $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate during the diurnal cycle showed a similar pattern that the earlier experiment, it increased gradually during the dark period from 1.719 to 4.129×10^{-6} mol $^{15}\text{NO}_3^-$ g⁻¹ h⁻¹ and decreased to 0.959×10^{-6} mol $^{15}\text{NO}_3^-$ g⁻¹ h⁻¹ during the light period (Figure 4).

Discussion

In both trials, the plant dry matter accumulation in the growing chamber fitted exponential models. When the plants grew at 25°C the relative growth rate was 60% higher than that of plants grown at 20°C. Comparing the hourly rates of N- NO_3^- accumulation in both trials, estimated with the dry matter accumulation models and the N content of plants at the day of $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake measurements, it could be observed that plants grown at 25°C showed an hourly accumulation rate 60% higher than those grown at 20°C. Furthermore, in both temperature conditions, the average of $^{15}\text{NO}_3^-$ influx rates, measured by the accumulation of ^{15}N , are very close to the hourly average of the N- NO_3^- accumulation estimated by the growth models and the plant N content. These values are similar to the uptake rates previously reported in literature for rose (Brun and Chezelle, 1996; Massa et al., 2009).

The influx rates of $^{15}\text{NO}_3^-$ showed a wide variation in the day-night cycle, increase progressively during the dark period and decrease during the light period. During the dark period the average uptake rate was 60% higher than that observed during the light period. The likelihood of these results is supported by: a) two independents experiments developed at two different temperatures showing similar day-night $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake patterns; b) the $^{15}\text{NO}_3^-$ absorption rate is very close to the hourly NO_3^- uptake rate estimated by the accumulation of N in plant tissues at the day of uptake measurements and c) the accuracy of the ^{15}N labeled technique used to measure $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rates (Glass, 2009). To our knowledge this is the first report on $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate variation during the day-night cycle, using a wood plant and controlled environmental conditions: light intensity, hygrometry, air temperature, concentration of NO_3^- , and temperature and chemical characteristics of the nutrient solution.

Reports about NO_3^- uptake rates in rose plants, measured by the depletion technique, under non-fully controlled environmental conditions, are contradictory. At short time steps during several days, Brun and Chazelle (1996), using an ion selective electrode, registered that the NO_3^- uptake rate is

higher in the light period and linked to water absorption. Cabrera et al. (1996), using a colorimetric method to determine NO_3^- in the nutrient solution, shows that in a 4-day period the pattern of NO_3^- uptake is irregular, dependent of internal N content and independent of transpiration. In these works, the patterns of NO_3^- uptake rate could be linked to light, humidity and temperature variations during the day-night cycle.

The nycthemeral pattern of NO_3^- uptake rate observed in this work was unlike the previously cited reports, it could be explained in terms of carbohydrates availability. Cabrera et al. (1995) and Silberbush and Lieth (2004) demonstrated that NO_3^- uptake rate in rose depends on plant development, decrease after shoot harvest and increase during flower development, with a maximum value at flower opening. These authors concluded that the NO_3^- uptake rate appears to be, at least in part, governed by photoassimilate availability to the roots. In this work, the NO_3^- uptake measurements were made at the end of the stem elongation period, when most of the photoassimilates are mainly driven toward new shoots and leaves, reducing their availability to supply energy-dependent root process as NO_3^- uptake (Cabrera et al., 1995). In such a carbohydrate limiting condition, sugars could be more available to the roots during the night period as predicated by Daudet et al. (2002), who modeled the nycthemeral pattern of root sucrose concentration during a period of ten day, using a model based on Munch theory. Furthermore, recently sucrose has been proposed as the specific signal for NO_3^- uptake (Li et al., 2013a, 2013b), however more research is needed to clarify this idea.

References

- Brun, R., and L. Chazelle. 1996. Water and nitrate absorption kinetics in the nycthemeral cycle of rose grown in the greenhouse using a recirculating solution. *Journal of Plant Nutrition* 19: 839–866.
- Cabrera, R. I., R. Y. Evans, and J. L. Paul. 1995. Cyclic nitrogen uptake by greenhouse roses. *Scientia Horticulturae* 63: 57–66.
- Cabrera, R. I., R. Y. Evans, and J. L. Paul. 1996. Enhancement of short-term nitrogen uptake by greenhouse roses under intermittent N-deprivation. *Plant and Soil* 179: 73–79.
- Cárdenas-Navarro, R., S. Adamowicz, A. Gojon, and P. Robin. 1999. Modelling nitrate influx in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 625–635.
- Cárdenas-Navarro, R., S. Adamowicz, and P. Robin. 1998. Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: Test of a feedback-based model. *Journal of Experimental Botany* 49: 721–730.
- Daudet, F. A., A. Lacoite, J. P. Gaudillere, and P. Cruziat. 2002. Generalized Münch coupling between sugar and water fluxes for modelling carbon allocation as affected by water status. *Journal of Theoretical Biology* 214: 481–498.
- Eastin, E. F. 1978. Total nitrogen determination for plant material. *Analytical Biochemistry* 85: 591–594.
- Faust, H., A. Sebastianelli, and H. Axmann. 1987. *Manual de Laboratorio, Métodos para el Análisis de ^{15}N* [Laboratory Manual: ^{15}N Methods of Analysis]. Vienna: FAO-IAEA.
- Glass, A. D. 2009. Nitrate uptake by plant roots. *Botany* 87: 659–667.
- Li, J. Z., G. Y. He, and W. J. Cram. 2013a. Identifying sucrose as a signal for nitrate uptake by wheat roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 60: 84–90.
- Li, J., J. Gao, and M. Jiang. 2013b. The effect of light on nitrate uptake by wheat roots. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82: 207–210.
- Massa, D., N. S. Mattson, and H. J. Lieth. 2009. Effects of saline root environment (NaCl) on nitrate and potassium uptake kinetics for rose plants: a Michaelis–Menten modelling approach. *Plant and Soil* 318: 101–115.
- Silberbush, M., and J. H. Lieth. 2004. Nitrate and potassium uptake by greenhouse roses (*Rosa hybrida*) along successive flower-cut cycles: a model and its calibration. *Scientia horticulturae* 101: 127–141.

ARTÍCULO

Comunicación bajo tierra

Idolina Flores Cortez



En la última década se ha incrementado el número de estudios centrados en las interacciones planta-suelo, los cuales han puesto de manifiesto que «*las comunidades de microorganismos del suelo son determinantes para la diversidad y composición de las comunidades vegetales*».

Las plantas en sus raíces tienen una gran riqueza biológica, que se sustenta en los nutrientes de los compuestos carbonados provenientes de la fotosíntesis que son exudados. Los exudados radiculares son secretados hacia la rizósfera, término dado por Hiltner en 1904 a la región del suelo que es influenciado bioquímica y biológicamente por el sistema radicular de las plantas, se asume que la rizósfera se extiende unos milímetros de la raíz.

Una zona de interacción única y dinámica

La rizósfera de las plantas está poblada con numerosos organismos incluidos nemátodos, hongos, bacterias y artrópodos, algunos de éstos son benéficos para la planta debido a que promueven el crecimiento y desarrollo de ésta, interacción en las que están involucrados diversos y complejos meca-

M.C. Idolina Flores Cortez es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental, realiza su tesis en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. idolina_fc@yahoo.com.mx

nismos: secretan fitohormonas, mejoran la disponibilidad de nutrientes, compiten con otros organismos que son patógenos para la planta por sitios de colonización y nutrientes, entre otros.

Es importante mencionar que en la rizósfera también podemos encontrar organismos que tienen efectos negativos sobre las plantas, como los hongos que causan enfermedades (patógenos) que afectan no solo las raíces sino también las partes aéreas de las plantas, como tallos, hojas o frutos.

Comunicación por parte de las plantas

Las interacciones entre los microorganismos y las plantas están mediadas por compuestos químicos. De hecho, las plantas liberan una gran matriz de compuestos de naturaleza muy diversa hacia la rizósfera, a los que se les conoce como exudados radiculares. En *Arabidopsis thaliana*, una planta pequeña que alcanza una altura de 30 cm, podemos encontrar más de 100 compuestos diferentes, entre ellos azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides, hormonas y vitaminas.

La exudación o también llamada rizodeposición, puede considerarse una gran pérdida de carbono por parte de la planta, ya que los compuestos que son exudados pueden llegar a constituir hasta un 30% del carbono fijado, sin embargo, desde un punto de vista ecológico, la rizodeposición es necesaria para establecer interacciones con otros organismos del entorno principalmente aquellos que viven bajo tierra «*funcionan como mensajes de comunicación bajo tierra*».

Es importante mencionar que la cantidad y el tipo de compuesto exudado varía dependiendo de la planta de la cual se trate, la edad de ésta y de los factores ambientales a los que esté expuesta. Los compuestos liberados por las raíces pueden ser usados como sustrato o alimento para el crecimiento de microorganismos –por esta razón, la rizósfera tiene una mayor densidad, se estima que existen de 10 a 200 veces más bacterias en la rizósfera de una planta que en el suelo adyacente-. De hecho, primero veremos cómo se lleva a cabo la interacción de plantas con algunos microorganismos del suelo mediante los exudados de raíz.

Bacterias en la rizósfera

La estructura de las comunidades microbianas del suelo varía grandemente en respuesta a la especie de planta, al tipo de suelo y a la historia de ese suelo en particular. Los exudados radiculares son un factor importante para el establecimiento de las comunidades bacterianas en la rizósfera; la zona de mayor exudación ha sido relacionada con la mayor acumulación de bacterias, la zona de elongación de las raíces es una zona de mayor atracción de microbios.

La habilidad de las bacterias rizosféricas para consumir exudados radiculares específicos, determina los patrones de colonización en las raíces. Por alteración en los patrones de exudación o la exudación de compuestos específicos, las plantas pueden cambiar la composición microbiana de la rizósfera.

Dentro de las sustancias presentes en los exudados radiculares podemos encontrar algunas que actúan como quimioatrayentes de bacterias rizosféricas, un ejemplo de quimioatracción es la excreción de los flavonoides naringenina, luteolina y daidzeína por parte de la planta, cuando ésta se encuentra en carencia de nitrógeno, y funcionan como atrayentes de bacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno y proveérselo. Esta interacción se lleva a cabo entre bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y plantas leguminosas como el frijol y la alfalfa.

Los azúcares y aminoácidos presentes en los exudados radiculares pueden funcionar como quimioatrayentes inespecíficos, es decir, pueden ser utilizados por bacterias que pueden ser benéficas para la planta, bacterias neutras e incluso por bacterias patógenas, ya que los usan como fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento.

Otros compuestos que las plantas exudan son los denominados fitoalexinas, que se producen en respuesta a la presencia de patógenos y que tienen actividad antibacteriana y antifúngica.

Hongos en la rizósfera

La rizósfera también alberga una gran diversidad de hongos, que pueden ser divididos en descomponedores, hongos patógenos y hongos micorrícicos. Estos últimos son benéficos para las plantas, forman estructuras simbióticas llamadas micorrizas, dichos hongos establecen una interacción con las raíces de las plantas, abasteciendo agua y nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno; en el intercambio, el hongo obtiene carbohidratos de la planta y se estima que el 90% de las plantas terrestres viven en asociación con este tipo de hongos.

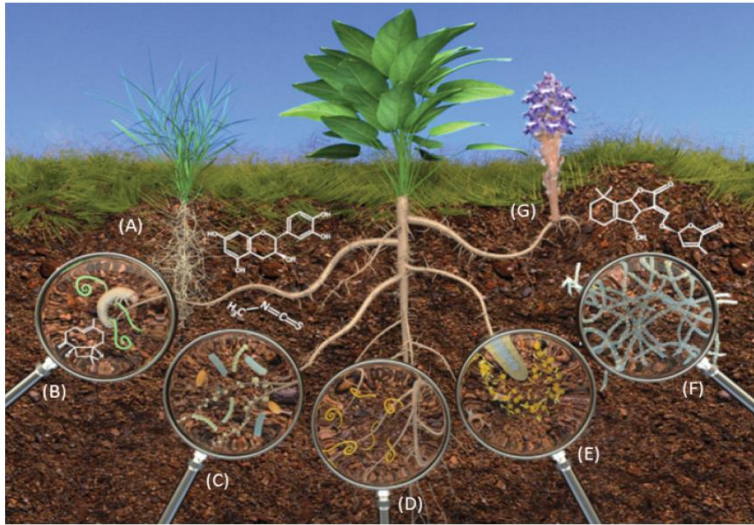
Entre los exudados radiculares, se ha observado que varios flavonoides pueden afectar el crecimiento de las hifas (el conjunto de hifas forma el cuerpo de los hongos), diferenciación y colonización de la raíz de forma específica, es decir, tienen un efecto solo en ciertos hongos antes de que se lleve a cabo la interacción con la planta. La estrigolactona 5-deoxistrigol fue identificada como una molécula señal en los exudados radiculares de *Lotus japonicus* y es un compuesto que induce la ramificación de las hifas, la germinación de las esporas y la alteración de la fisiología del hongo. Ahora se sabe, que las estrigolactonas son inestables y se degradan rápidamente, por lo que forman un gradiente distinto alrededor de la raíz de la planta indicando así al hongo la proximidad y dirección de la raíz. Otras estrigolactonas como el estrigol y la sorgolactona mimetizan la actividad de 5-deoxistrigol «*son mensajes identificados en este tipo de comunicación bajo tierra, entre las plantas y algunos hongos*».

Pero, las plantas en su entorno natural no se encuentran aisladas de otras plantas, ellas pueden interactuar entre sí y lo hacen a través de moléculas señal presentes en los exudados radiculares, es decir que también se comunican bajo tierra.

Interacción Planta-Planta

Una interacción es el parasitismo de una planta sobre otra. Algunas plantas como *Striga* y *Orobanchae* germinan únicamente en presencia de compuestos específicos como las estrigolactonas (estrigol, alectrol, 5-desoxiestrigol, entre otras) que son exudadas por otras plantas, este mecanismo aún está bajo estudios para comprenderlo. Es importante recordar que estos compuestos participan en el desarrollo de micorrizas, lo que sugiere que las plantas parásitas se pudieron haber co-adaptado al reconocimiento de señales presentes en los exudados que les ayudan a localizar a una potencial planta hospedera.

Una distinta forma de interacción planta-planta es la alelopatía (ver *Saber Más* 5(25):42-43), en la cual una planta específicamente interactúa con una vecina. Los compuestos involucrados en este tipo de interacción son de tipo fenólico, aunque algunos son de naturaleza química distinta. La producción de aleloquímicos puede ser constitutiva o inducida por factores bióticos o abióticos presentes en el ecosistema donde la planta crece. Un ejemplo, la sorgoleona es el principal componente de los exudados en sorgo (*Sorghum bicolor*) y es un aleloquímico bien estudiado, causa por lo que se conoce como "enfermedad del suelo" ya que inhibe el crecimiento de otros cultivos; este compuesto es liberado al suelo de manera continua brindando un efecto herbicida.



Comunicación química bajo tierra. (A) Las plantas exudan compuestos fenólicos que inhiben la germinación de otras plantas (alelopatía); (B) Las larvas de nemátodos cuando se alimentan de las raíces inducen la producción de compuestos por parte de las plantas para atraer a otros nemátodos que pueden alimentarse de las larvas; (C) Los exudados de las raíces de las plantas favorecen la colonización de la rizosfera por bacterias benéficas para la planta; (D) Los exudados radiculares inducen la eclosión de huevos de nemátodos y a la vez atraen a nemátodos juveniles hacia las raíces; (E) La punta de las raíces es el sitio de mayor exudación de compuestos en las plantas; (F) Las estrigolactonas presentes en los exudados de raíces inducen la ramificación de hongos micorrícicos favoreciendo con esto la colonización de la planta; y (G) La germinación de plantas parásitas de plantas también es inducida por estrigolactonas. Figura tomada de Van Dame y Bouwmeester (2016).