



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA**

“Efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por algunas rizobacterias en la expresión del gen FRO5 y marcadores de resistencia sistémica inducida y adquirida en *Medicago truncatula*”.

TESIS

Que presenta:

Roberto Méndez Ruiz

Para obtener el grado de:

Químico farmacobiólogo

Asesor: D.C. Eduardo Valencia Cantero.

Co. Asesor: D.C. Erasto Hernández Calderón.

Morelia, Michoacán marzo del 2018.



Contenido

1. Resumen	6
1.1 Abstract	7
2. Introducción.	8
2.1 <i>Medicago truncatula</i>	8
2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).	9
2.3 <i>Athrobacter agilis</i> UMCV2	10
2.4 <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021.	11
2.5 Bacterias fitopatógenas.	11
2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01.....	12
2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LasI (PA0- JP21)	13
2.8 Mecanismos de defensa de las plantas.	13
2.9 Resistencia sistémica adquirida.	15
2.10 Resistencia sistémica inducida.	16
2.11 Compuestos orgánicos volátiles.	16
3. Antecedentes.....	17
4. Justificación.	24
5. Hipótesis.....	24
6. Objetivos.....	25
6.1. Objetivo general.....	25
6.2. Objetivos específicos.	25
7. Materiales y Métodos.	26
7.1 Material vegetal.....	26
7.2 Esterilización de semillas.....	26
7.3 Bacterias rizosfericas.	26
7.4 Medios de cultivo.	27
7.4.1. Agar nutritivo (AN)	27
7.4.2. Medio Luria-Bertani (LB)	27

7.4.3. Medio de cultivo (PY)	27
7.4.4. Medio de Murashige-Skoog (MS).....	27
7.5. Vernalización de semillas.....	29
7.6. Experimentos de interacción planta-bacteria.....	29
7.7. Germinación de semillas.....	29
7.8. Inoculación de las bacterias.....	30
7.9. Análisis del crecimiento vegetal.....	30
7.10. Obtención de muestras para el análisis de la expresión de los genes <i>MtFRO5</i> , <i>MtPR1</i> y <i>MtPDF2.1</i>	31
7.10.1. Extracción de ARN	31
7.10.2. Cuantificación del ARN.....	32
7.10.3. Síntesis de ADN complementario (cDNA).....	32
7.10.4. Reacción de PCR en tiempo real.....	33
7.11. Análisis estadístico.....	34
8. Resultados	35
8.1 Efecto promotor del crecimiento por los VOCs de las bacterias.....	35
8.2 Expresión de genes <i>FRO5</i> , <i>PR1</i> y <i>PDF2.1</i>	42
9. Discusión	46
10. Conclusión	50
11. Literatura citada	51

Índice de figuras

Figura 1. Aspecto general de la planta modelo <i>Medicago truncatula</i>	8
Figura 2. Esquema de las señales de transducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR).....	15
Figura 3. Tubo ependorf con semillas estériles de <i>M. truncatula</i>	26
Figura 4. Caja Petri con semillas germinas de <i>M. truncatula</i>	29
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa.....	32
Figura 6. Sistema de compartimientos separados.....	35
Figura 7. Longitud de los brotes de plántulas de <i>M. truncatula</i>	37
Figura 8. Longitud de la raíz primaria de plántulas de <i>M. truncatula</i>	38
Figura 9. Peso fresco de los brotes de plántulas de <i>M. truncatula</i>	39
Figura 10. Peso fresco de las raíces de <i>M. truncatula</i>	40
Figura 11. Numero de raíces laterales de plántulas de <i>M. truncatula</i>	41
Figura 12. Expresión relativa del gen <i>MtFRO5</i>	43
Figura 13. Expresión relativa del gen <i>MtPDF2.1</i>	44
Figura 14. Expresión relativa del gen <i>MtPR1</i>	45

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de diferentes rizobacterias en plantas crecidas en diferentes medios....	21
Tabla 2. Descripción del contenido de las soluciones stock para preparar medio MS....	28
Tabla 3. Volúmenes necesarios de cada stock para preparar 1L de medio MS.....	28
Tabla 4. Análisis factorial del efecto de los VOCs y el hierro sobre el desarrollo de los brotes y la raíz de plántulas <i>M. truncatula</i>	36
Tabla 5. Análisis factorial del efecto de los VOCs y el hierro sobre la expresión de genes <i>MtFRO5</i> , <i>MtPDF2.1</i> y <i>MtPR1</i>	42

1. Resumen

En este trabajo se analizaron los efectos de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de las bacterias *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Y *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21), sobre la expresión de genes *MtFRO5* y los marcadores de resistencia sistémica inducida (*MtPDF2.1*) y adquirida (*MtPR1*) en brotes de *Medicago truncatula*, así como los efectos que tienen estos VOCs bacterianos sobre el crecimiento de las plántulas crecidas en medio con suficiencia y deficiencia de hierro. Se observó que tanto en deficiencia como en suficiencia de hierro, las plántulas que fueron expuestas a los VOCs bacterianos tuvieron un mayor crecimiento y desarrollo con respecto al control. Mediante un análisis ANOVA de dos vías, se determinó que las plantas crecidas en medio con hierro suficiente incrementaron sus parámetros de crecimiento. También, mediante un análisis factorial se encontró que la expresión de los genes *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1* fueron modulados tanto por la deficiencia de hierro como por los VOCs bacterianos. Los resultados indican que la planta *M. truncatula* responde diferencialmente a los VOCs de las cepas a través de modular el crecimiento y la expresión de genes *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1*, así como que el hierro y la interacción del hierro con los VOCs también ejercen un papel importante sobre el desarrollo de la planta.

Palabras claves: *Medicago truncatula*, VOCs, *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* LasI, genes *FRO5*, genes *PDF2.1*, genes *PR1*.

1.1 Abstract

In the present work we analyzed the effects of volatile organic compounds (VOCs) produced by the bacteria *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21), on the expression of gene *MtFRO5* and the marker genes of induced systemic resistance (*MtPDF2.1*) and systemic acquired resistance (*MtPR1*) in shoots of *Medicago truncatula*, as well as the effect of these bacteria VOCs on the growth of seedlings grown in medium with sufficiency and iron deficiency. It was observed that in both sufficiency and iron deficiency, the seedlings that were exposed to the bacterial volatiles showed higher growth and development than controls. A two-way ANOVA analysis showed that iron deficiency affected negatively plant growth, and that the expression of the *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1* genes was modulated by bacterial VOCs.

The results indicate that the *M. truncatula* plant responds differentially to the volatiles of the bacterial strains through modulating growth and gene expression of *MtFRO5*, *MtPDF2.1* and *MtPR1*, as well as iron and iron interaction with VOCs exert an important role on the development of the plant.

Key words: *Medicago truncatula*, VOCs, *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* LasI, genes *FRO5*, genes *PDF2.1*, genes *PR1*.

2. Introducción.

2.1 *Medicago truncatula*.

Medicago truncatula (Fig. 1) es una leguminosa que se ha utilizado como modelo para entender los mecanismos de interacción planta-bacteria así como también para estudiar la fijación de nitrógeno por la simbiosis que establece con bacterias del genero *Sinorhizobium* (Barker et al., 1990; Benedito et al., 2008). Las características favorables de *M. truncatula* como planta modelo son su pequeño genoma diploide, un tiempo de generación corto, es auto fertilizable, es prolífica en la producción de semillas y su genoma completo ya ha sido reportado así como un atlas de las expresión de sus genes (Cook, 1999; Benedito et al., 2008). *M. truncatula* también se ha utilizado como modelo para estudiar los mecanismos de absorción de hierro (estrategia I) y la actividad de las enzimas férrico quelato reductasa (FRO) (Andaluz et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2013a).



Figura 1. Aspecto general de las planta modelo *Medicago truncatula*.

2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).

La rizósfera es la zona de suelo que rodea y es influenciado por las raíces de la plantas (Bais et al., 2006). Algunas de las más complejas interacciones químicas, físicas y biológicas de las plantas ocurren entre las raíces y la rizósfera. Las interacciones que envuelven a las raíces de las plantas en la rizósfera son raíz-raíz, raíz-insecto y raíz-microorganismo. La diversidad microbiana está influenciada por las propiedades físicas y químicas de la rizósfera, muchas de las cuales están determinadas por la genética de la planta hospedera (Peiffer et al., 2013). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), son bacterias que viven en la rizosfera que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal y que proveen un beneficio para el desarrollo de la planta. El término PGPR fue introducido por Kloepper y Schroth en 1981. Las PGPR estimulan el crecimiento de la planta por medio de mecanismos directos y/o indirectos. Entre los mecanismos directos se encuentra la excreción de sustancias promotoras del crecimiento para la planta como auxinas, citoquininas, giberelinas y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) (Arkhipova et al. 2005; Persello-Cartieaux et al., 2001; Ryu et al. 2003) o por medio de la biofertilización, mecanismo que estimula la mineralización de nutrientes presentes en la atmósfera o el suelo. Entre los diversos mecanismos de biofertilización tenemos la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfato por medio de fosfatasas y la quelación de hierro por medio de sideróforos producidos por las rizobacterias (Ortiz-Castro *et al.*, 2013; Hassan, 2013). Entre los medios indirectos podemos mencionar la capacidad de las PGPR para proteger a la planta contra algunos patógenos y así ayudar al crecimiento de la misma (Santoyo *et al.*, 2012) y la producción de antibióticos y de cianuro de hidrogeno que inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para la planta (Bowen y Rovira, 1999).

De acuerdo con el grado de asociación con las células de la raíz de la planta, las PGPRs se pueden clasificar dentro de bacterias promotoras del crecimiento vegetal extracelulares (ePGPR) y bacterias promotoras de crecimiento vegetal intracelular (iPGPR) (Martínez-Viveros et al., 2010). Las ePGPRs pueden existir

en la rizósfera, en el plano rizosferico o en el espacio entre las células de la corteza de la raíz; por otra parte, iPGPRs se localizan generalmente dentro las estructuras nodulares especializadas de las células de la raíz (Bhattacharyya y Jha, 2012). Los géneros más comunes de bacterias que pertenecen al grupo ePGPR son: *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Gray y Smith 2005). Las iPGPR incluyen las especies endófitas y *Frankia* las cuales pueden fijar simbióticamente nitrógeno atmosférico con las plantas superiores (Verma et al., 2010). Las endófitas incluyen un amplio rango de géneros de bacterias tales como *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* de la familia *Rhizobiaceae* que generalmente invade los sistemas de la raíz en cultivos de plantas para formar nódulos (Wang et al., 2000) y estimular el crecimiento directa o indirectamente.

2.3 *Athrobacter agilis* UMCV2

A. agilis es una bacteria aerobia Gram positiva que originalmente estaba clasificada como *Micrococcus* y que fue reclasificada para integrarse al grupo 1 del género *Arthrobacter* (Koch et al., 1995). Es común encontrar el género *Arthrobacter* en suelos e incluso en ambientes extremos tales como el hielo ártico, sitios contaminados químicamente y entornos radioactivos (Mongodin et al., 2006). *A. agilis* UMCV2 fue aislada de la rizósfera de maíz y se ha demostrado que tiene la capacidad para reducir el Fe (III) a Fe (II) mejorando así la adquisición del hierro cuando es inoculada en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Valencia Cantero et al., 2007). Es capaz de estimular el crecimiento de plantas de *A. thaliana*, *Medicago sativa* y *M. truncatula* en condiciones *in vitro*. Sus efectos promotores del crecimiento vegetal se han atribuido a su capacidad para sintetizar dimetilhexadecilamina, un compuesto lípido-aminado volátil. Adicionalmente, este compuesto tiene actividad como agente antifúngico contra algunos hongos fitopatógenos (Velázquez-Becerra et al., 2011; Velázquez- Becerra 2013; Orozco-Mosqueda et al., 2013a).

2.4 *Sinorhizobium meliloti* 1021.

S. meliloti es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia Rhizobiaceae, esta familia de bacterias son capaces infectar las raíces de plantas leguminosas, produciendo estructuras a partir del cortex de la raíz denominadas nódulos. En su interior, las células vegetales de los nódulos, albergan (y también confinan) a las células de las bacterias Rhizobiaceae en estructuras intracelulares llamadas simbiosomas que están delimitadas por una membrana peribacteroidal. En el simbiosoma, las bacterias fijan nitrógeno atmosférico, mismo que es transferido a la planta (Jones et al., 2007; Ortiz-Castro et al., 2013). *Sinorhizobium meliloti* es la rhizobia más estudiada y mejor caracterizada, es el simbiote tanto de *Medicago sativa* (alfalfa) como de *M. truncatula* (Capela et al., 2001). En la rizósfera, las raíces de *M. truncatula* exudan componentes flavonoides que inducen la expresión de genes nod en la rizobacteria *S. meliloti* lo que conlleva a la síntesis de factores-nod. Los factores-nod (lipo-quitooligosacáridos) comunican la presencia del simbiote a la planta, causando la iniciación del proceso de nodulación (Gage 2004; Bensmihen et al. 2011).

2.5 Bacterias fitopatógenas.

Las plantas siempre están en contacto directo con microorganismo que pueden ser o no benéficos para la misma. Las bacterias que tienen la capacidad de generar una enfermedad en la planta se conocen bacterias fitopatógenas. Sin embargo, una bacteria no es universalmente patógena para todas las especies de plantas, los microorganismos se desarrollan de forma patogénica en un ámbito limitado de hospederos, frecuentemente a nivel género, especie y subespecie, esto quiere decir que una bacteria puede ser patógena para una planta pero para otra no (Madriz- Ordeñana, 2002). La patogenicidad de una bacteria con respecto a una planta la determina los genes tanto de la bacteria como de la planta. La bacteria puede sintetizar proteínas que pueden causar que se le reconozca como un patógeno si la planta sintetiza las proteínas que actúen de receptor de las mismas. Los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Thakur, 2007). Como parásitos, los fitopatógenos

están obligados a obtener nutrientes de fuentes existentes y para ello necesita invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados biótrofos. Estos patógenos necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean mecanismos de invasión sumamente sutiles. Otro tipo de patógenos, denominados necrotróficos, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto (Madriz, 2002). En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Estos muchas veces utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión (Collinge et al., 2001). Las bacterias patógenas, así como beneficiosas se reconocen inicialmente como invasores dañinos con el fin de limitar la propagación de bacterias. Este reconocimiento está asegurado por un sistema inmune eficiente de la planta, muy similar a la inmunidad innata de los animales (Pel y Pieterse, 2013). Podemos encontrar diversidad de especies bacterianas que pueden infectar a las plantas como lo son *Pseudomonas cichorii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium sp*, *Clavibacter sp*, *Xanthomonas sp*, *Streptomyces sp* y *Xylella sp*. (Trdá, 2015).

2.6 *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

P.aeruginosa PA01 es una bacteria gram-negativa que crece en el suelo, pantano, costas y también en tejidos de animales y plantas. *P.aeruginosa* la mayor patógena oportunista para humanos capaz de producir un biofilm confiriéndole resistencia natural ante antibióticos. Es una bacteria muy versátil capaz de adaptarse para sobrevivir en ambientes hostiles, tiene una amplia capacidad para transportar, metabolizar y vivir en sustancias orgánicas, numerosos sistemas de captación hierro-sideroforo y la capacidad mejorada de exportar componentes (por ejemplo, enzimas y antibióticos) mediante la secreción de numerosas proteínas y un sistema de eflujo RND (resistance-nodulation-cell-división) (Stover et al., 2000). Se ha demostrado que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de infectar las raíces de plantas como *Arabidopsis* (ecotipo Columbia) y albahaca (*Ocimum basilicu*)

provocándole necrosis y posteriormente la muerte (Walker et al., 2004). Sin embargo se reporta a PA01 como capaz de incrementar el peso fresco de los brotes, el peso fresco de la raíz y así como el número de raíces laterales por planta en *A. thaliana* colocadas en cajas Petri cuando la bacteria es inoculado a 5cm de distancia de la raíz primaria (Ortíz-Castro et al., 2011).

2.7 *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21)

P. aeruginosa secreta varios factores de virulencia de los cuales podemos mencionar la liberación de toxinas (exotoxina A y Exoenzima S), lipasas (Fosfolipasas) y proteasas (elastasas, proteasa LasA y proteasa alcalina). Estos factores de virulencia son controlados por dos sistemas de percepción de quórum (Las y rhl) en respuesta a la densidad de las células bacterianas. Los sistemas Las y rhl se caracterizan por generar un compuesto llamado autoinductor, una molécula señal que activa los factores de virulencia de la bacteria, estos compuestos son PAI-1 [*N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone] y PAI-2 (*N*-butyryl-L-homoserine lactone) respectivamente (Fuqua et al., 1994; Pescis et al., 1997; Ochsner et al., 1994; Pearson et al., 1995). *P. aeruginosa* LasI (PA0-JP21) es una mutante de PA01 Incapaz de generar el autoinductor (Pearson et al., 1997). Estudios con la mutante *P. aeruginosa* LasI demuestran cómo es capaz de incrementar el peso fresco de los brotes, el peso fresco de la raíz y así como el número de raíces laterales por planta en *A. thaliana* colocadas en cajas Petri cuando la bacteria es inoculado a 5 cm de distancia de la raíz primaria, también se demostró que inoculando LasI a una distancia muy corta (1cm) de la punta de la raíz, en la que incluso puede la bacteria tocar la raíz, esta tiene la capacidad de aumentar por 5 veces el peso fresco del aéreo y la raíz (Ortíz-Castro et al., 2011).

2.8 Mecanismos de defensa de las plantas.

Las plantas se encuentran en continuo contacto con microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. Cuando existe el ataque de un patógeno generalmente la planta

reconoce el microorganismo como un cuerpo extraño y activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas poseen mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia a patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se puede dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (Madriz- Ordeñana, 2002). Cuando un microorganismo infecta la planta se lleva a cabo de un proceso de reconocimiento específico de la planta y desencadena una respuesta de defensa. La respuesta de defensa se manifiesta en dos niveles. Ambos se inician directamente o indirectamente, con la percepción de proteínas producto de los genes de virulencia del patógeno (Avr) y su receptor, proteínas codificadas por los genes de resistencia (R) de la planta, dando lugar a una interacción gen-por-gen (Parker y Coleman, 1997; Vivanco, 2005). El primer nivel de respuesta es local e implica la síntesis de fitoalexinas y puede o no incorporar el elemento apoptótico de "respuesta hipersensible". Los efectos posteriores son sistémicos, se manifiestan a distancia y vienen instados por señalización secundaria producida por las células que han activado genes defensivos. Cuando las respuestas secundarias están dirigidas contra patógenos, ese tipo de respuestas constituye lo que se ha dado en llamar "resistencia sistémica adquirida" (RSA) o cuando son dirigidas a PGPRs "resistencia sistémica inducida" (RSI) (Vivanco, 2005) (Fig. 2).

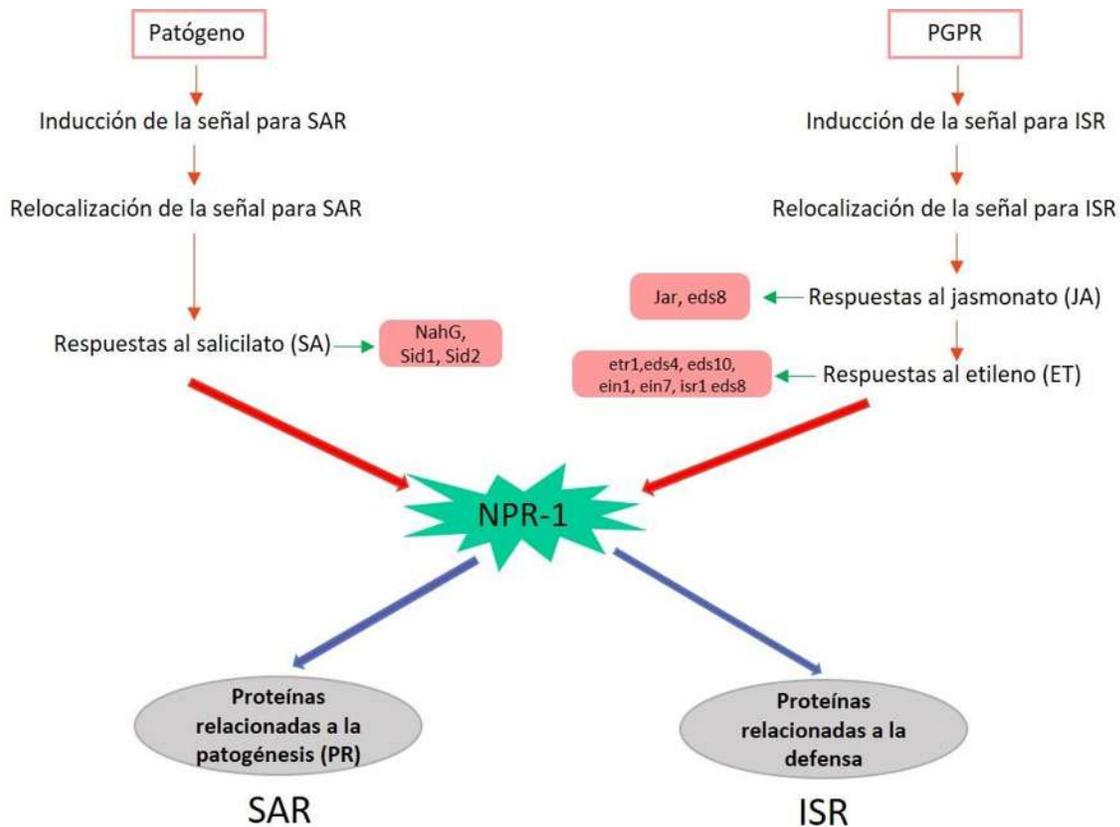


Figura 2. Esquema de las señales de transducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (modificado de Jain et al., 2014).

2.9 Resistencia sistémica adquirida.

Si sobreviven a un ataque inicial de patógenos ya sean virus, hongos o bacterias; las plantas pueden protegerse contra ataques posteriores de ellos. También se puede advertir la protección después de un ataque de artrópodos, herbívoros, un daño mecánico y después del contacto con algunos químicos (Pieterse et al., 2014). Se ha observado que el primer patógeno infectante, o algún daño, “inmuniza” a la planta contra infecciones posteriores (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaráz, 2007). Esta capacidad de las células para repeler los ataques subsiguientes, se dispersa a través de toda la planta. A esta respuesta se le llama resistencia sistémica adquirida (RSA) o SAR por sus siglas en inglés (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaráz, 2007). La resistencia sistémica adquirida se caracteriza por la acumulación de ácido salicílico (SA) y por la activación de genes

que se encargan de la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis denominadas (PRs) (Ryals Et al., 1996; Métraux et al., 1990; Ward et al., 1991). Estudios han demostrado que el estado SAR se puede desencadenar de manera exógena, esto mediante la aplicación de inductores químicos como ácido salicílico (SA) (Ward et al., 1991), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (Vernooij et al., 1995) o benzotiadiazol (Görlach et al., 1996).

2.10 Resistencia sistémica inducida.

La resistencia sistémica inducida o ISR por sus siglas en ingles puede ser provocada por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). A diferencia de SAR, ISR no involucra la acumulación de SA o la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (Pieterse et al., 1996), pero en su lugar, depende de las vías que son reguladas por el jasmonato (ácido jasmonico) y el etileno (Knoester et al., 1999; Pieterse et al., 1998; Yan et al., 2002). Sin embargo, se han encontrado ejemplos de ISR que están ligados a la producción de sideroforos y SA por algunas cepas que promueven el crecimiento vegetal demostrando así que ISR tiene características en común con SAR (De Meyer y Höfte, 1997; Leeman et al., 1996; Maurhofer et al., 1994).

2.11 Compuestos orgánicos volátiles.

Los VOCs, cumplen con diversas funciones en los sistemas naturales y artificiales, y son producidos por animales, humanos, hongos, plantas y bacterias. La capacidad de producir VOCs por parte de las bacterias ha sido reconocida por muchos años y los humanos han explotado los VOCs bacterianos como componentes aromáticos en la fabricación de quesos, vinos y productos fermentados (Schulz y Dickschat, 2007). Los VOCs son moléculas de bajo peso molecular usualmente inferior a 300 g/mol, son compuestos orgánicos que contienen carbono, poseen una alta presión de vapor (0.01 kPa o mayor a una temperatura de 293.15 °K) lo que favorece su evaporación e integración a la atmosfera en condiciones normales (Dudavera y Negre, 2005). Investigaciones recientes han demostrado que las bacterias emplean sus VOCs durante la

interacción con otros microorganismos para influir en las poblaciones y comunidades, sin embargo la función de muchos VOCs bacterianos no han sido entendidos a detalles. Se puede asumir que los VOCs bacterianos son similares a otros VOCs y probablemente pueden servir como: 1) infoquímicos para la comunicación inter e intra microorganismo, 2) señales en la comunicación célula a célula, 3) una posible válvula de liberación de carbono o 4) promotores del crecimiento o agentes inhibidores (Kai y Piechulla 2010).

3. Antecedentes.

El hierro es un micronutriente esencial para todas las plantas superiores (Römheld, 1987). Participa en reacciones de transferencia de electrones por medio de donación reversible y aceptación de electrones (Zhang et al, 2009). Es esencial para muchas funciones celulares de las plantas, incluyendo biosíntesis de clorofila, fotosíntesis y respiración (Ishimaru et al ,2006). Para obtener el hierro del suelo las plantas han desarrollado 2 diferentes estrategias: Estrategia I y Estrategia II (Marschner et al.,1986). La estrategia I consiste principalmente en la reducción de hierro mediante la actividad de una reductasa que se encuentra en la membrana plasmática de las células de las raíces (Bienfait et al., 1983; Tipton y Thowsen 1985; Marschner et al.,1986). Las enzimas férrico quelato reductasas (FRO) forman parte del sistema de adquisición de hierro en las plantas con estrategia I, aunque pueden estar presentes en plantas con estrategia II, su mecanismo consiste en reducir el hierro a una forma más soluble (Fe^{+3} a Fe^{+2}) y más accesible para la planta (Chaney et al., 1972). La escasez de hierro soluble induce la expresión de las enzimas férrico quelato reductasas (Robinson et al., 1999; Wu et al., 2005; Andaluz et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2013a). Los genes *FRO* son elementos clave para la reducción de hierro, el primer gen *FRO*, (nombrado *FRO2*) fue identificado y caracterizado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Robinson et al., 1999). Otros ocho genes *FRO* de *A. thaliana* (*AtFRO*) fueron identificados y caracterizados, estos genes se expresan en tejidos específicos de la planta (Wu et al., 2005). Otros genes *FRO* se han reportado en

plantas como *Pisum sativum* (guisante) (Waters et al., 2002), *Citrus junos* (yuzu) (Li et al., 2002) y *Solanum lycopersicum* (tomate) (Holden et al., 1991). Se han encontrado estos genes en gramíneas como *Oryza sativa* (arroz) (Ishumari et al., 2006) y en *Sorghum bicolor* (sorgo) (Mikami et al., 2011), demostrando así que los genes *FRO* no son exclusivos de las plantas con estrategia I. Se han reportado previamente 6 genes *FRO* en el genoma de la planta modelo *M. truncatula* (estratega I) (Andaluz et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2012). Dichos genes se expresan en los diferentes tejidos de la planta dependiendo de la suficiencia o insuficiencia del hierro que contenga el medio en el que se desarrolla. *MtFRO5* tiene un 71% de identidad con el gen de *Arabidopsis thaliana AtFRO6*, en condiciones de suficiencia de hierro se puede identificar en las hojas pero no en las raíces, en un estado que se puede considerar basal, mientras que en deficiencia de hierro tiene un aumento considerable en su expresión (Orozco-Mosqueda et al., 2012).

Como se mencionó, los mecanismos de defensa de las plantas se dividen principalmente en dos: mecanismos locales y sistémicos, donde dentro de los sistémicos encontramos a los mecanismos de SAR y los mecanismos de ISR. Para determinar si una planta activa un mecanismo de defensa sistémico se pueden analizar las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR1) consideradas como marcadoras de SAR y las defensinas de la plantas (PDF), conideradas como marcadores de ISR.

Las proteínas relacionadas con las patogénesis son proteínas que aparecen después de una infección por virus, hongo o bacterias a una planta o por exponer la planta a inductores químicos de SAR. Estas proteínas no son específicas a patógenos, son determinadas por el tipo de reacción de la planta huésped, indicando que son de tipo endógeno y son inducidas bajo ciertas condiciones patológicas (Van Loon., 1985). Las PRs se clasifican en 14 categorías (PR1-PR14) todas con un mecanismo de acción propio con la excepción de las PR1 que se mantiene desconocido. Los PR-1 son un grupo dominante de las PRs que se inducen por la presencia de patógenos o ácido SA, por lo cual son comúnmente utilizados como marcadores de SAR (Van Loon., 1999). Las primeras proteínas de

tipo 1 que se caracterizaron fueron las de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y las de *Nicotiana Xanthi*, plantas que responde hipersensiblemente al virus de mosaico del tabaco (Van Loon y Van Kammen, 1970). La secuencia de nucleótidos del ARN mensajero de la familia de genes *PR1* (*NPR1*) fueron definidos por primera vez en plantas de tabaco (Ward et al, 1991) y lo largo del tiempo se han identificado homólogos en diferentes plantas como *Arabidopsis* (Pieterse et al., 1998; Uknes et al., 1992), trigo (Görlach et al., 1996), tomate (Niderman et al., 1995) o Piña (Chinnasri et al., 2016). Estudios realizados buscando la relación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis en *M. truncatula* en simbiosis con *S. meliloti* demostraron la presencia de un homólogo con el 51% de identidad y 66% de similitud con el *PR1* de *A. thaliana* (Peleg-Grossman et al. 2012).

Por otra parte, las defensinas de las plantas son péptidos básicos y pequeños que tienen una característica de patrón plegable tridimensional que es estabilizado por ocho cisteínas unidas por disulfuro (Thomma et al., 2002). Se han definido como defensinas vegetales porque tiene una similitud estructural con las defensinas encontradas en otros organismos, incluidos los humanos. Estas defensinas de acuerdo a la alineación de sus aminoácidos y la similitud entre ellos se clasifican en dos grupos (Harrison et al., 1997). Las primeras defensinas fueron aisladas en 1990 a partir del trigo y la cebada (Colilla et al. 1990; Mendez et al. 1990). Las defensinas tienen una capacidad antifúngica y se han utilizado como un marcador de la resistencia sistémica inducida ya que los genes que codifican estos péptidos son inducidos por la acumulación de jasmonato y el etileno (Knoester et al., 1999; Pieterse et al., 1998; Yan et al., 2002). Estos genes se han encontrado en diferentes especies de plantas, los mejor caracterizados han sido en *A. thaliana* que tiene tres familias de genes: La familia *AtPDF-1* que contiene 7 genes que codifican defensinas (*AtPDF1.1* al *AtPDF1.5*), incluyendo las defensinas de plantas hasta ahora purificadas *AtPDF1.1*, *AtPDF1.2* y *AtPDF1.3* (Penninckx et al., 1996; Terras et al., 1993; Sels et al., 2007) con una alta similitud en su secuencia de aminoácidos. La secuencia putativa de la familia *AtPDF-2* (*AtPDF2.1* al *AtPDF2.6*) muestran una mayor variación relativa a nivel de aminoácido y la

Familia *AtPDF-3* constituye los dos genes *AtPDF3.1* y *AtPDF3.2* que codifican las proteínas con un carboxi (C)-terminal (Thomma et al., 2002; Sels et al., 2008). Los genes *PDF2.1* en *Arabidopsis* se expresan en las raíces y semillas de plantas sanas, sin embargo son altamente expresados en hojas infectadas (Thomma y Broekaert, 1998). En *M. truncatula* se han demostrado la presencia de los genes *PDF2.1* expresados solo en semillas, sin embargo también se demostró que se expresan en plántulas jóvenes cuando las semillas son expuestas al compuesto exógeno metil jasmonato (MeJA) (Hanks et al., 2005).

Estudios previos han demostrado que la resistencia sistémica inducida (ISR) se ve influida por la disponibilidad del hierro, así lo demuestra experimentos realizados en rábano donde la bacteria *P. fluorenses* cepa WCS374 obtuvo mejor control de la infección de *Fusarium oxysporum* cuando la disponibilidad del hierro en la solución de nutrientes del rábano era baja que cuando era alta (Leeman et al., 1996). Posteriormente estudios realizados con semillas de pepino que fueron tratadas con la cepa inductora de ISR *Serratia marcescens* cepa 90-166 para suprimir la antracnosis causada por *Colletotrichum orbiculare*, también demostró que la ISR es influenciada por la disponibilidad del hierro, donde la supresión de la antracnosis fue significativamente disminuida cuando la concentración del hierro de una mezcla de siembra se redujo al adicionar un quelante de hierro. (Press et al., 2001).

Los VOCs bacterianos son capaces de influir en el desarrollo de las plantas (Tabla 1) cuando estas son expuestas a ellos, muchos estudios demuestran que los VOCs bacterianos promueven un mejor desarrollo y un incremento en la biomasa de plantas, así como también un incremento en la expresión de algunos genes.

Tabla 1. Efecto de los VOCs de diferentes rizobacterias en plantas crecidas en diferentes medios (modificado de Bailly y Weisskopf , 2012).

Bacteria	Cepas	Medio	Planta objetivo	Efectos observados	Referencias
<i>Arthrobacter agilis</i>	UMCV2	NA	<i>M. sativa</i>	Promoción del crecimiento	Velázquez-Becerra et al., 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	IN937a	MS	<i>A. thaliana</i>	Promoción del crecimiento e inducción de ISR	Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004
<i>Bacillus megaterium</i>	XTBG34	MS	<i>A. thaliana</i>	Promoción del crecimiento	Zou et al., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	GB03	MS	<i>A. thaliana</i>	Promoción del crecimiento e inducción de ISR	Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CV0	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al 2011a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1, PAO14	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al., 2011a; Rudrappa et al 2008
	TB, TBC10839, PUPa3	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al., 2011a
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	O6	MS	<i>N. tabacum</i>	Promoción del crecimiento e inducción de ISR	Han et al., 2006
			<i>A. thaliana</i>	Protección contra estrés por sequia	Cho et al., 208
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A112	NB	<i>T. aestivum</i>	Reducción de la longitud de los brotes, longitud de la raíz y el número de raíces.	Åström et al., 1989
	CHAO	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al 2011a, Rudrappa et al., 2008
	L13-6-12	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
<i>Pseudomonas trivialis</i>	3Re2-7	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
<i>Serratia marcescens</i>	MG-1	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al., 2011a
<i>Serratia odorifera</i>	4Rx13	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
		NA	<i>P. patens</i>	Promoción o inhibición del crecimiento dependiendo de la configuración del sistema.	Kai y Piechulla, 2010
<i>Serratia plymuthica</i>	3Re4-18	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
	HCRO-C48	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
	IC14	LB	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Blom et al., 2011a
<i>Stenotrophosmonas rhizophila</i>	P69	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R3089	NA	<i>A. thaliana</i>	Inhibición del crecimiento	Vespermann et al., 2007
42 cepas rizosfericas pertenecientes principalmente a <i>Burkholderia</i> genus		LB, MR-VP, MS y Angle	<i>A. thaliana</i>	Promoción o inhibición del crecimiento dependiendo de la cepa y el medio.	Blom et al., 2011b

El primer reporte de los efectos de los VOCs bacterianos en plantas fue descrito en *A. thaliana* expuesta a siete cepas bacterianas (*P.s fluorescens* 89B- 61, *B. pumilus* T4, *B. pasteurii* C-9, *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937a, *S. marcescens* 90–166 y *Enterobacter cloacae* JM22.), teniendo como resultado que las cepas *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a produjeron una promoción del crecimiento vegetal significativo con respecto al control (Ryu et al., 2003), dando lugar a una nueva línea de investigación donde los VOCs de las bacterias juegan una función importante como nuevo modo interacción planta-microorganismo.

Los VOCs que son capaces de promover el crecimiento vegetal emitidos por rizobacterias están estrechamente relacionados con el medio donde se crece la bacteria, así lo demuestra un estudio realizado con *A. thaliana* y diferentes cepas bacterianas crecidas en 4 medios diferentes [medio Luria-Bertani (LB), agar rojo de metilo Vogues Proskauer (MR-VP), medio Murishige and Skoog (MS) y medio Angle], dando como resultado crecimiento de la planta con todas las cepas crecidas en medio MR-VP, pero con mayores efectos de algunas cepas crecidas con medio LB (Bloom et al., 2011a). Estudios realizados con los VOCs de *A. agilis* UMCV2 demuestran tener la capacidad de promover el crecimiento en plantas como *Sorghum bicolor*, *M. sativa* y *M. truncatula*. Además de estimular el crecimiento, también se ha demostrado que sus VOCs modulan los mecanismos de reducción del hierro de la plata de *S. bicolor* (estimulando con ello la expresión del gen *SbFRO1*) y de *M. truncatula* (Velázquez-Becerra et al., 2010; Castulo-Rubio et al., 2015; Orozco-Mosqueda et al., 2013b).

En el caso de los VOCs producidos por *S.meliloti* se ha demostrado que inducen el crecimiento en *M. truncatula* y *S. bicolor*. En el caso de plantas de *M. truncatula*, se ha demostrado que los VOCs de *S. meliloti* inducen las respuestas asociadas a la escasez de hierro en plantas que fueron crecidas en deficiencia de hierro, pero también en plantas crecidas en suficiencia de hierro. Tales respuestas incluyen la acidificación de la rizosfera y la actividad férrico-quelato reductasa en la raíz. (Orozco-Mozqueda et al., 2013; Aviles-Garcia, 2015).

Estudios con los VOCs de *P. aeruginosa* demostraron ser capaces de promover el crecimiento vegetal en plantas de sorgo en comparación con plantas control teniendo un aumento en la longitud aérea, longitud de la raíz, peso fresco de la raíz y del aéreo, y en el número de raíces laterales (Aviles-Garcia, 2015).

Estudios con VOCs bacterianos en diferentes plantas demostraron que los VOCs son capaces de desencadenar una respuesta defensiva por parte de la planta. El primer reporte se dio con plántulas de *A. thaliana* expuestas a los VOCs de *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a que posteriormente se inocularon con la bacteria patógena *E. carotovora* demostrando que *E. carotovora* disminuyó considerablemente en comparación con plántulas que no fueron expuestas a los VOCs (Ryu et al., 2004). La cepa *B. subtilis* GB03 por medio de sus VOCs también ha demostrado tener la capacidad de mejorar la adquisición de hierro en plantas de *Arabidopsis* (Zhang et al., 2009). Los VOCs de la bacteria *P. simiae* WCS417 (*P. fluorescens*) han demostrado tener la capacidad de desencadenar resistencia sistémica inducida además de inducir la expresión de genes *FRO2* e *IRT1* relacionados con la adquisición de hierro, así como también inducir el factor de transcripción relacionado con la adquisición del hierro *MYB72* en *A. thaliana* independientemente de la disponibilidad del hierro en la rizosfera (Zamioudis et al., 2015).

4. Justificación.

La interacción de la plantas con bacterias rizosfericas mediante la emisión de VOCs se ha convertido en una nueva línea de investigación para comprender como las plantas responden a la presencia de los microorganismos y de que manera la planta diferencia entre un agente potencialmente nocivo o benefico para su desarrollo.

No obstante ya se ha trabajado con VOCs de bacterias promotoras de crecimiento vegetal que han demostrado ser capaces de promover el desarrollo de las plantas, incrementar los sistemas de captación de hierro y de inducir un estado de defensa, existen muy pocos estudios referentes como las plantas responden a los VOCs de rizobacterias benéficas y patógenas, cuando se desarrollan en condiciones de escasez o de suficiencia de hierro.

Además, pocos estudios analizan el impacto que tiene el hierro sobre la expresión de los genes marcadores para los mecanismos de defensa sistémicos (PR1 y PDF) y el efecto que tienen los VOCs de rizobacterias benéficas y patógenas en genes relacionados con la economía del hierro en plantas.

Por tanto es importante contribuir a conocer cómo se interrelacionan las respuestas de defensa y a escasez de hierro en una planta modelo como *M. truncatula*.

5. Hipótesis.

Los compuesto orgánicos volátiles emitidos por las rizobacterias *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01 modulan diferencialmente la expresión de los genes *FRO5*, *PR1* y *PDF2.1* en la planta modelo *Medicago truncatula*.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles producidos por algunas rizobacterias patógenas y promotoras del crecimiento vegetal en la expresión del gen *FRO5* y marcadores de resistencia sistémica inducida y adquirida en plántulas de *Medicago truncatula* crecidas en condiciones de deficiencia y de suficiencia de hierro.

6.2. Objetivos específicos.

1.- Determinar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Y *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21) en la expresión de los genes *FRO5*, *PR1* y *PDF2.1* en la planta modelo *Medicago truncatula*, crecida en medio con suficiencia y deficiencia de hierro.

2.- Determinar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias *Athrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Y *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21) en el crecimiento vegetal de la planta modelo *Medicago truncatula*, crecida en medio con suficiencia y deficiencia de hierro.

3.- Evidenciar la función del hierro en la inducción de los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias rizosféricas.

7. Materiales y Métodos.

7.1 Material vegetal.

Se utilizaron semillas de la planta *Medicago truncatula* jemalong A17 (Orozco-Mosqueda et al., 2012).

7.2 Esterilización de semillas.

Semillas de *M. truncatula* jemalong A17 fueron sometidas a un proceso de escarificación bajo el siguiente protocolo: se colocaron las semillas en un vial de 1.5 mL (Fig. 3) y se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado por un tiempo de 8-12 minutos agitando vigorosamente hasta la aparición de pequeñas manchas cafés en las semillas. Posteriormente se retiró el excedente de ácido y se enjuago con 1 mL de agua desionizada estéril de 3-5 veces hasta la eliminación completa del ácido. Posteriormente se desinfectaron con 1 mL de una solución de cloro comercial al 15% agitando vigorosamente por 5 minutos para después retirar el excedente de cloro y enjuagar con agua desionizada estéril de 3-5 veces hasta la eliminación completa del cloro.



Figura 3. Se muestra tubo ependorf con semillas de *M. truncatula* desinfectadas.

7.3 Bacterias rizosfericas.

Se utilizaron las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero et al., 2007) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Orozco-Mosqueda et al., 2013a). La bacteria fitopatógena *Pseudomonas aeruginosa* PA01

(Ortíz-Castro *et al.*, 2011) y la mutante de PA01 *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PA0- JP21) (Pearson *et al.*, 1997).

7.4 Medios de cultivo.

7.4.1. Agar nutritivo (AN)

El agar nutritivo de la marca BIOXON es un medio sólido enriquecido que se preparó disolviendo 23 gr/L en agua purificada, se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión. Este medio fue utilizado para el crecimiento de la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 a 25°C.

7.4.2. Medio Luria-Bertani (LB)

El medio de cultivo Luria-Bertani (LB) es un medio sólido enriquecido que fue preparado de la siguiente forma: 10 gr/L de NaCl, 10 gr/L de peptona de caseína, 5 gr/L de extracto de levadura, 18 gr/L de agar bacteriológico en agua desionizada y se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión. Este medio fue utilizado para el crecimiento de la bacteria *P. aeruginosa* PA01 y *P. aeruginosa* LasI PA0-JP21 a 30°C.

7.4.3. Medio de cultivo (PY)

Es un medio selectivo sólido que se preparó con 3 gr/L de extracto de levadura, peptona de caseína 5 gr/L, 15 gr/L de agar bacteriológico y CaCl₂ 1M (7mL/L) en agua desionizada y se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión. Este medio fue utilizado para crecer a la bacteria *Sinorhizobium meliloti* 1021 a 30°C.

7.4.4. Medio de Murashige-Skoog (MS).

El medio MS es un medio para crecimiento vegetal *in vitro*. Se preparó a partir de las soluciones Stock mostradas en la tabla 2, a una concentración de 0.2 X y se solidificó con 6 gr/L de fita-agar para micropropagación y se aforó con agua desionizada. Se ajustó el pH a 6.5 con una solución NaOH 2M. Una vez preparado el medio se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión.

Tabla 2. Descripción del contenido de las soluciones stock que se utilizan para la preparación del medio de MS.

Stock 1	Stock 2	Stock 3	Stock 4	Stock 5	Stock 6
50mL	250mL	100mL	100mL	250mL	250mL
CaCl ₂	MgSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	Glicina	NH ₄ NO ₂
(25 gr)	(9.25 gr)	(0.5 gr)	(1.69 gr)	(0.5 gr)	(41.25 gr)
	KH ₂ PO ₄	NaEDTA	ZnSO ₄	Piridoxina	KNO ₂
	(4.25 gr)	(0.7 gr)	(1.05 gr)	(0.0125 gr)	(47.5gr)
			H ₃ BO ₃	Ac.Nicotínico	
			(0.62 gr)	(25 gr)	
			KI	Tiamina HCl	
			(0.83 gr)	(0.0025 gr)	
			Na ₂ MoO ₄	Myo-Inositol	
			(0.025 gr)	(2.5 gr)	
			CuSO ₄		
			(0.0025 gr)		
			CaCl ₂		
			(0.0025 gr)		

La tabla 3 muestra los volúmenes necesarios de cada Stock para preparar 1 litro de medio que se utilizado como medio de cultivo para germinación y crecimiento de la planta *M. truncatula*. Para preparar medio suficiente de hierro (100 µM) se empleó el volumen indicado del stock 3 y para preparar medio deficiente de hierro (1 µM) se agregó 55 µl/L del Stok 3.

Tabla 3. Volúmenes de las soluciones stock empleadas para la preparación de 1 litro de medio MS

Stock 1	1mL
Stock 2	10mL
Stock 3	5mL
Stock 4	1mL
Stock 5	10mL
Stock 6	10mL

7.5. Vernalización de semillas.

Una vez desinfectadas las semillas, se colocaron en cajas Petri con medio MS y se protegieron de la luz con papel aluminio y se vernalizaron por 6 días en un refrigerador a una temperatura de 4°C.

7.6. Experimentos de interacción planta-bacteria.

Para evaluar el efecto de los VOCs bacterianos sobre el crecimiento y expresión de genes de defensa por la planta *M. truncatula* se utilizó un modelo experimental de compartimientos separados previamente descrito por Orozco-Mosqueda et al., 2013b. En frascos de vidrio (4 frascos por tratamiento) se agregaron 40 mL de medio MS con suficiencia de hierro (100 μM) o deficiencia de hierro (1 μM) y antes de solidificar se introdujeron viales con medio de cultivo para las diferentes bacterias que se utilizaron en el experimento y se sellaron con una película plástica para evitar contaminaciones.

7.7. Germinación de semillas.

Finalizados los 6 días se incubaron las cajas Petri por un tiempo de 4 días a una cámara de crecimiento PERCIVAL® modelo AR66LC8 con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 22°C y una intensidad de luz de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 4). Pasados los 4 días de germinación en las cajas las plántulas de *M. truncatula* se pasaron a los frascos de vidrio (3 plántulas por frasco) y se dejaron crecer por otros 5 días más.



Figura 4. Se muestra el acomodo de las semillas y las plántulas después del tiempo de germinación en la cámara de crecimiento.

7.8. Inoculación de las bacterias.

Las bacterias previamente se crecieron en sus respectivos medios con a las temperaturas adecuadas (*A. agilis* UMCV2 en medio agar nutritivo por 2 días a 25°C, *S. meliloti* 1021 en medio PY por 1 día a 30°C, PA01 y LASI en medio LB por 1 día a 30°C). Una vez crecidas se preparó un stock tomando una muestra de cada bacteria con un asa bacteriológica y suspendiéndola en 1 mL de agua desionizada estéril en un vial, se realizó un dilución 1:10 de cada suspensión bacteriana para leer su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro JENWAY modelo 7305 utilizando agua desionizada estéril como blanco, la absorbancia obtenida se utilizó para estandarizar la densidad del inoculo con la siguiente formula:

$$\text{Volumen a inocular} = (0.05) (0.1 \text{ mL}) / \text{Absorbancia observada}$$

Lo anterior corresponde aproximadamente a 1×10^6 UFC.

El resultado obtenido se multiplico por 1000 para obtener la cantidad a inocular en μL , la cantidad obtenida se aforo a 30 μL con agua desionizada estéril. Se agregaron los 30 μL de la bacteria a cada uno de los viales en sus respectivos medios de crecimiento.

Una vez inoculadas las bacterias en los viales los frascos se sellaron y se mantuvieron en la cámara de crecimiento durante 5 días.

7.9. Análisis del crecimiento vegetal.

El crecimiento vegetal fue evaluado al finalizar la interacción planta-bacteria midiendo diversos parámetros: la longitud de los brotes y la longitud de la raíz primaria se midió con un vernier digital marca Mitutoyo. Se contaron el número de raíces laterales. El peso fresco de los brotes y del sistema radicular se obtuvo con el uso de una balanza analítica de la marca "Sartorius®". Para la determinación del contenido de clorofila se utilizó un medidor de clorofila de la marca "OPTI-SCIENCES CCM-200®" y resultado se expresó en unidades arbitrarias.

7.10. Obtención de muestras para el análisis de la expresión de los genes

***MtFRO5*, *MtPR1* y *MtPDF2.1*.**

Para analizar los efectos de los VOCs en la expresión de los genes *FRO5*, *PR1* y *PDF2.1* de hoja, un experimento de interacción planta-bacteria mediada por VOCs fue realizado. Las plantas fueron crecidas durante 5 días más dos días de interacción con los VOCs de las rizobacterias. El experimento de interacción fue parado después de 2 días de incubación con las rizobacterias congelando las plantas en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizó la extracción de ARN y se cuantifico la expresión de genes mediante RT-PCR en tiempo real.

7.10.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se tomaron 3 muestras por tratamiento de la parte aérea de la planta, se congelaron con nitrógeno líquido para triturarlas con ayuda de un mortero y se colocó el triturado en viales estériles marcados, se agregaron 500 μ L de TRI (Sigma-Aldrich) para posteriormente homogenizar las muestras con la ayuda de un vortex, seguida la homogenización las muestras se centrifugaron a 12,000 gravedades por 10 minutos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, se les agrego 100 μ L de cloroformo y se agito vigorosamente por 15 segundos. Se dejaron incubar a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos, seguida la centrifugación se procedió a separar la fase acuosa (que contiene el ARN) y colocarla en tubos diferentes. Se procedió a agregar 250 μ L de isopropanol a cada tubo con a la fase acuosa, se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y pasado el tiempo se centrifugaron a 12,000 x g por 10 minutos (terminado los 10 minutos se forma una pastilla en el fondo del tubo). Posteriormente para enjuagar el ARN se removió el sobrenadante dejando solo las pastillas, se enjuagaron las pastillas con 500 μ L de etanol al 75%, se pusieron al vortex brevemente y se centrifugaron los tubos a 7500 x g por 5 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se pusieron a secar las pastillas al aire por 5-10 minutos, las pastillas se resuspendieron en 50 μ L de agua libre de RNasa, se les agrego 0.5 μ L de DNasa y se les llevó a incubar por 10 minutos a

60 °C. Por último se confirmó la integridad del ARN mediante una electroforesis en agarosa al 1.5% (Fig. 5).

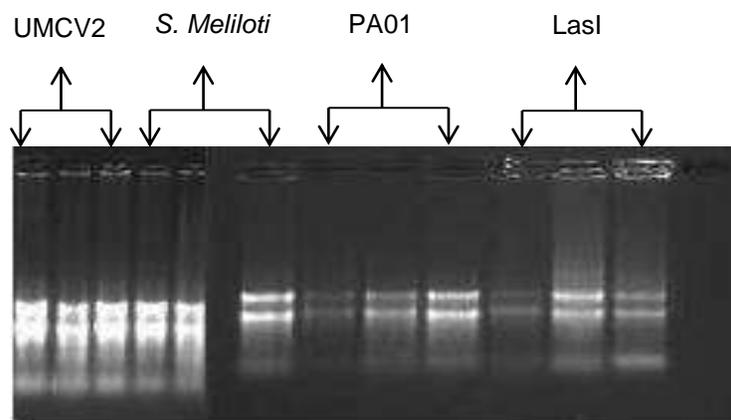


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % que confirma la integridad del ARN de las plántulas sometidas a los VOCs de las diferentes rizobacterias utilizadas.

7.10.2. Cuantificación del ARN.

Se cuantifico el ARN en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific Rockfords, IL) 2000c utilizando 1.5 µL de muestra para la lectura y 1.5 µL de agua desionizada estéril para enjuagar el lector entre cada lectura. Se evaluó la integridad del ARN mediante la relación 260/280 nm y por visualización en gel de agarosa al 1.2 teñido con GelRed (Biotium USA).

7.10.3. Síntesis de ADN complementario (cDNA).

Se sintetizo cADN a partir de 500 ng de ARN total mediante el kit Super Script First-Strand (Life Technologies/Gibco-BRL CA U.S.A). En breve, la relación se llevó a cabo en un tubos eppendorf de 1.5 mL estériles se hizo una mezcla de oligonucleótido/ARN de acuerdo con las especificaciones del fabricante: volumen de muestra equivalente a 500 ng de ARN, 1 µL de la mezcla dNTP 10 mM, 1 µL de oligo dT (0.5 µg/ µL) y agua tratada con DEPC suficiente para para aforar a 10 µL. Seguido a la preparación de los tubos se les llevó a incubar a una temperatura de 65°C por 5 minutos. En un tubo de 0.2 mL separado se prepararon las reacciones suficientes de la mezcla de reacción (2X) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para una reacción: 2 µL de 10x RT buffer, 4 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de RNaseOUT™ (40 U/ µL).

Posteriormente se agregó 9 μL de la mezcla de reacción 2X a cada uno de los tubos con la mezcla de oligonucleótido/ARN, se agito suavemente y se colecto por una breve centrifugación. Se incubaron los tubos a 42°C por 2 minutos, se les agregó 1 μL de Superscript™ II RT y se incubaron a 42°C por 50 minutos. Se terminaron las reacciones a una temperatura de 70°C por 15 minutos y se colocaron en hielo. Finalmente se colectaron las reacciones por una breve centrifugación y se les agregó 1 μL de RNasa H a cada tubo, para posteriormente llevarlos a incubar por 20 minutos a 37°C.

7.10.4. Reacción de PCR en tiempo real.

Para realizar las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se prepararon las muestras diluyendo 500 ng de ADN complementario sintetizado en el paso anterior hasta una concentración de 4 ng. Posteriormente Las reacciones de qPCR se prepararon en la placa del termociclador de la marca Applied Biosystems StepOne por triplicado para cada tratamiento con el kit de SYBR-Green (Applied Biosystems) usando el siguiente protocolo para una reacción: 10 μl de SYBR-Green, 1 μl de los oligos Foward y Reverse de cada gen utilizado, 5 μl de cDNA a 4 ng/ μl y 3 μl de agua. Para estas reacciones de qPCR se utilizaron los oligonucleótidos MtPR1F 5' ACT TTA ATA CAC ACA CCC ATT TGC 3' y MtPR1R. 5' TCA GTT AAG ATC TAG AGT CCC ACA 3' (Peleg-Grossman et al. 2012); MtDEF2.1F 5' ACT TTA ATA CAC ACA CCC ATT TGC 3' y MtDEF2.1R 5' TCA GTT AAG ATC TAG AGT CCC ACA 3' (Montejano Ramírez, 2016) y MtFRO5F 5' TTA TAT TAG TGG CAG GTG GTA TTG G 3' y MtFRO5R 5' ACG GTT GAA AGA AGT GGA AGC 3' (Orozco-Mosqueda et al., 2012). Una vez preparada la placa se cubrió con una película óptica adhesiva MicroAmp™ (Applied Biosystems), se colectaron las reacciones por una breve centrifugación de la placa y se llevó al termociclador. Las muestras se corrieron de acuerdo al protocolo del proveedor: 95°C por 5 min, seguido de 95 °C por 3 seg y 60 °C por 30 seg por 40 ciclos. Para elaborar la curva de melting, las muestras se corrieron a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y posteriormente la temperatura fue elevada a 95°C a una proporción de 0.3°C/s. La expresión relativa de los genes *MtFRO5*, *PDF2.1* y *PR1* se evaluaron utilizando el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak et al., 2001)

7.11. Análisis estadístico.

Los datos de expresión de genes y de crecimiento fueron evaluados mediante el programa STATISTICA 7, en el cual los resultados fueron sometidos a una prueba de ANOVA de dos vías para determinar el efecto de los VOCs, del hierro y de la interacción de ambos factores y se utilizó una prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$) para determinar diferencias estadísticamente significativas debidas a los efectos de los VOCs de cada rizobacteria.

8. Resultados

8.1 Efecto promotor del crecimiento por los VOCs de las bacterias

Para determinar el efecto por los VOCs de las diferentes rizobacterias en la promoción del crecimiento de *M. truncatula*, se utilizó un sistema de compartimientos separados el cual permite que la interacción planta-bacteria sea mediada por VOCs de origen bacteriano. Se colocaron plántulas de *M. truncatula* en frascos de vidrio con 40 mL de medio MS que dentro contenían un vial con los diferentes medios (AN, LB y PY) para permitir el crecimiento de las diferentes cepas utilizadas (UMCV2, *S. meliloti*, PA01 y LasI) (Fig. 6). Las plántulas se dejaron crecer en los frascos por 5 días y al cabo de los 5 días se inocularon las cepas en los viales, se dejaron por 5 días más para posteriormente analizar diferentes indicadores de crecimiento. Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA de dos vías.



Figura 6. Sistema de compartimientos separados para la interacción planta-bacteria vía VOCs. Se muestra el frasco de vidrio con medio MS en soluciones con plántulas de *M. truncatula* que al lado tiene un vial de vidrio que contiene los diferentes medios para las cepas bacterianas usadas en los experimentos. Para el caso particular de la imagen la bacteria crecida en el vial es *P. aeruginosa* LasI en medio LB.

Al realizar un ANOVA de dos factores, se determinó el efecto tanto del nivel de hierro en el medio y los VOCs emitidos por las bacterias así como la interacción de ambos factores sobre el crecimiento de plántulas de *M. truncatula*. Encontramos que el factor VOCs y el factor del hierro en el medio influyen en el crecimiento de la longitud de los brotes, la longitud de la raíz, el peso fresco de los brotes y de la raíz y el número de raíces laterales, sin embargo la interacción VOCs x hierro solo tuvo influencia en el peso fresco de la raíz (tabla 4).

Tabla 4. Análisis factorial del efecto de los VOCS y el hierro sobre el desarrollo de los brotes y la raíz en plántulas de *M. truncatula*.

Factor	Significancia estadística (<i>p</i>)
<u>Longitud de los brotes</u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	0.083
<u>Longitud de la raíz</u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	0.063
<u>Peso fresco de los brotes</u>	
VOCs	0.0015
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	0.163
<u>Peso fresco de la raíz</u>	
VOCs	0.0004
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	0.015
<u>Numero de raíces laterales</u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	0.104

Para separar el efecto de los VOCs bacterianos y eliminar el efecto del hierro como factor sobre el crecimiento de *M. truncatula* se realizó un análisis de ANOVA de vía y una prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Encontramos que en

plantas que se desarrollaron en medio con hierro suficiente los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* LasI, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2 lograron estimular la longitud de los brotes ($p < 0.001$) (Fig. 7A), mientras que plantas que se desarrollaron en medio con hierro deficiente solo los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* PA01 y LasI estimularon la longitud de los brotes ($P < 0.001$) (Fig. 7B).

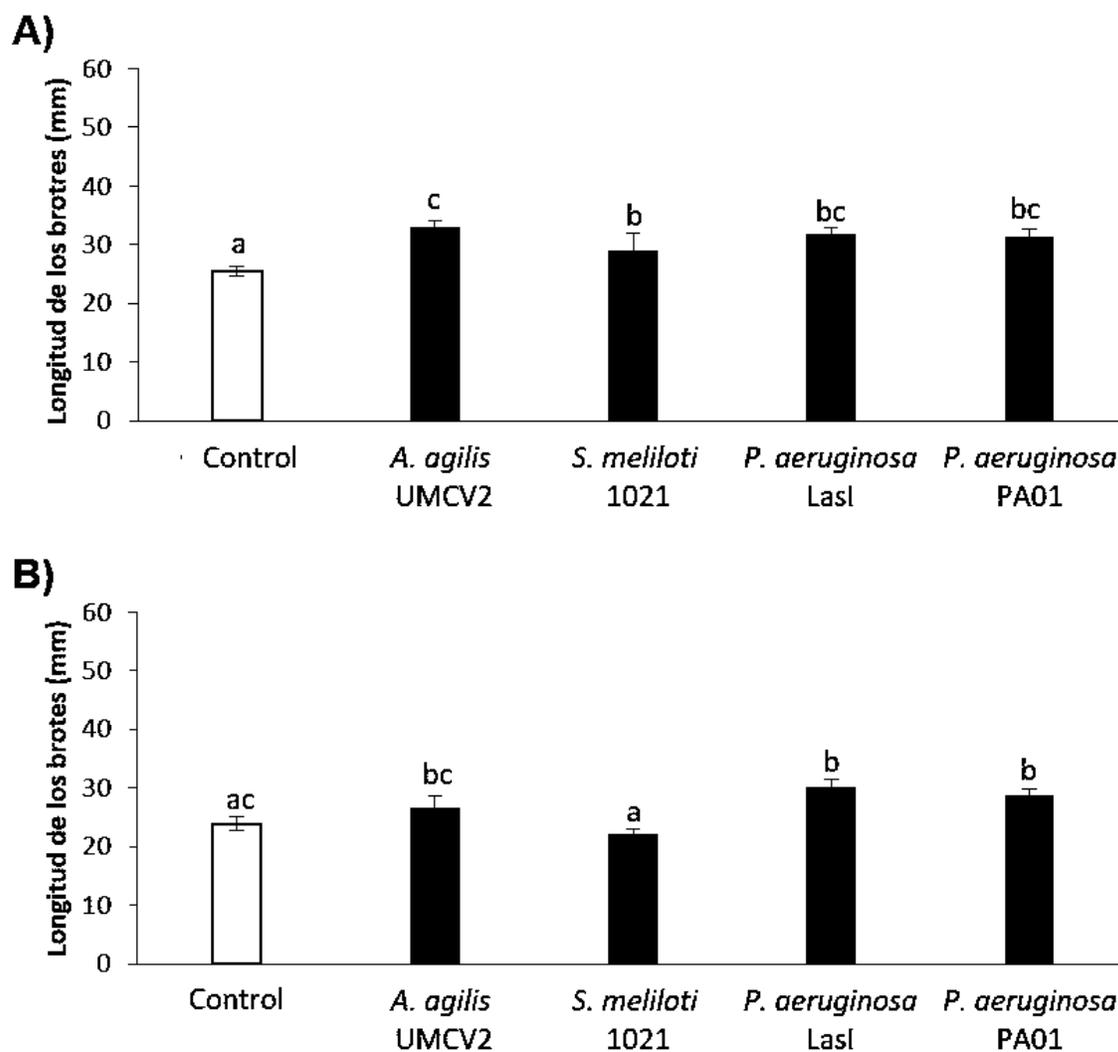


Figura 7. Efecto de los VOCs de las diferentes cepas *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* LasI y *P. aeruginosa* PA01 sobre la longitud de los brotes de plántulas de *M. truncatula* en tratamientos con hierro suficiente 100 μM (A) y hierro deficiente 1 μM (B). Las barras representan el promedio \pm error estándar ($n=12$) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de una sola vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Para la longitud de la raíz encontramos que en plantas que se desarrollaron en medio con hierro suficiente los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* LasI, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2 lograron estimular la longitud de la raíz ($p < 0.001$) (Fig. 8A), mientras que las plántulas que se desarrollaron en medio con hierro deficiente no tuvieron efecto significativo sobre la longitud de la raíz (Fig. 8B).

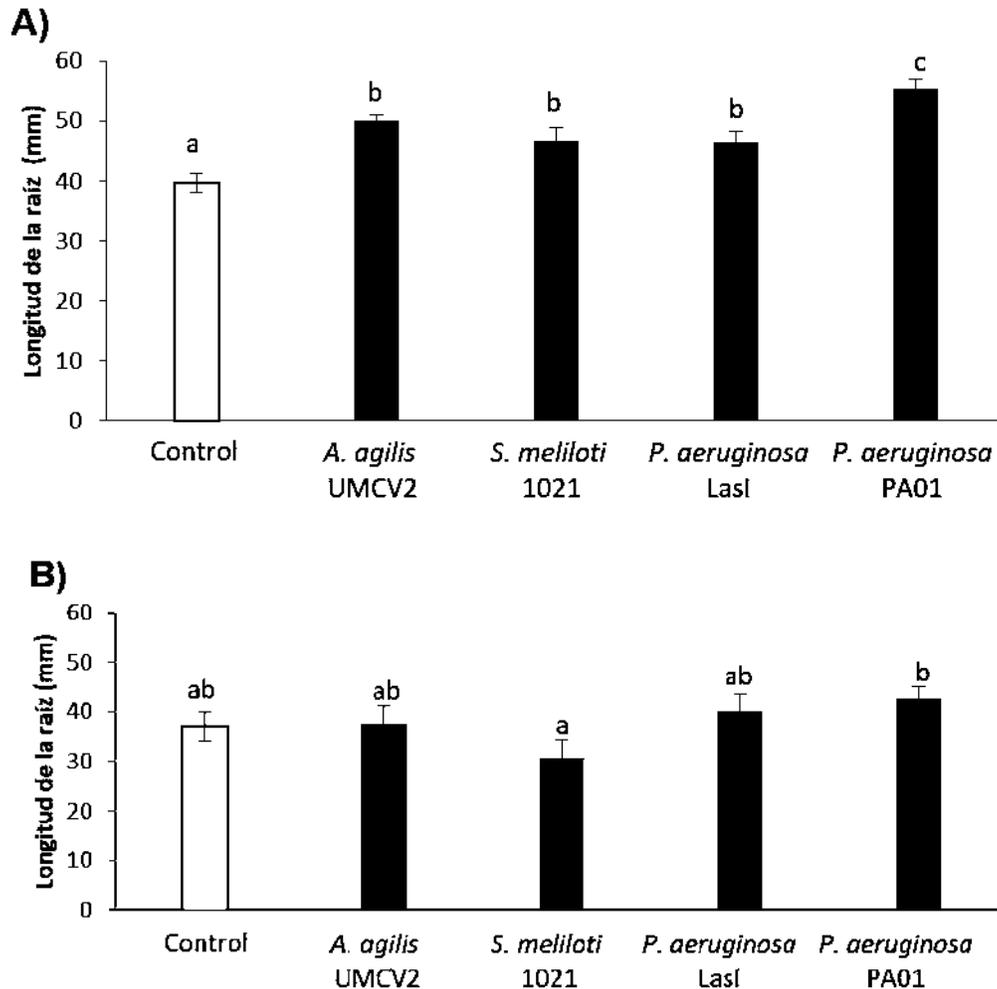


Figura 8. Efecto de los VOCs de las diferentes cepas *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* LasI y *P. aeruginosa* PA01 sobre la longitud de la raíz de plántulas de *M. truncatula* en tratamientos con hierro suficiente 100 μM (A) y hierro deficiente 1 μM (B). Las barras representan el promedio ± error estándar (n=12) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de una sola vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

En el peso fresco de los brotes no se encontró diferencias significativas en plántulas que crecieron en medio con hierro suficiente (Fig. 9A), mientras en medio con hierro deficiente (Fig.9B) los VOCs de la cepa *P. aeruginosa* LasI lograron estimular el peso fresco de los brotes con una diferencia estadísticamente significativa de $p = 0.0017$.

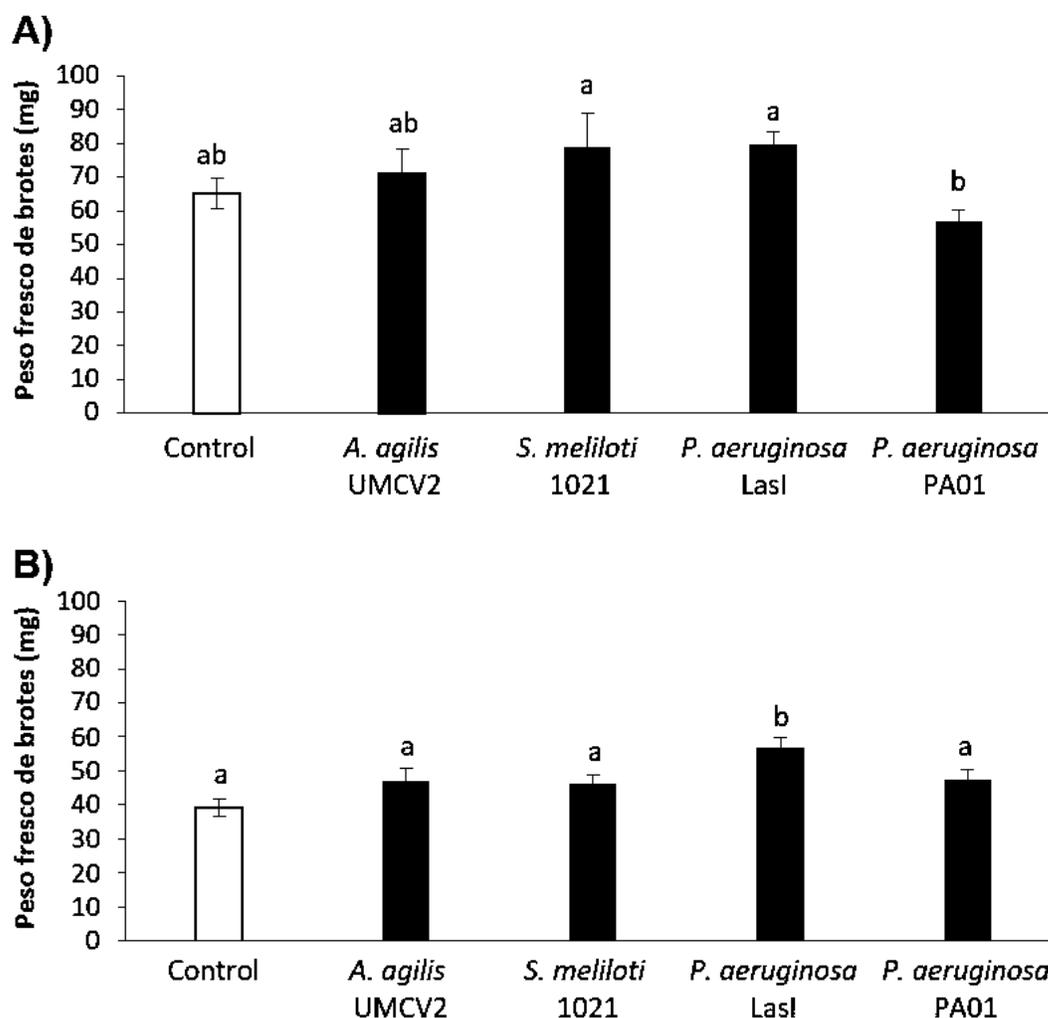


Figura 9. Efecto de los VOCs de las diferentes cepas *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* LasI y *P. aeruginosa* PA01 sobre el peso fresco de los brotes de plántulas de *M. truncatula* en tratamientos con hierro suficiente 100 μ M (A) y hierro deficiente 1 μ M (B). Las barras representan el promedio \pm error estándar (n=12) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de una sola vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Para el peso fresco de la raíz se encontró que los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* Lasl y *S. meliloti* 1021 lograron estimular el peso fresco de la raíz en plántulas que crecieron en medio con hierro suficiente ($p= 0.0045$) (Fig. 10A), mientras que en plántulas que crecieron en medio con hierro deficiente, los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* PA01 y Lasl lograron estimular el peso fresco de la raíz ($p < 0.001$) (Fig. 10B).

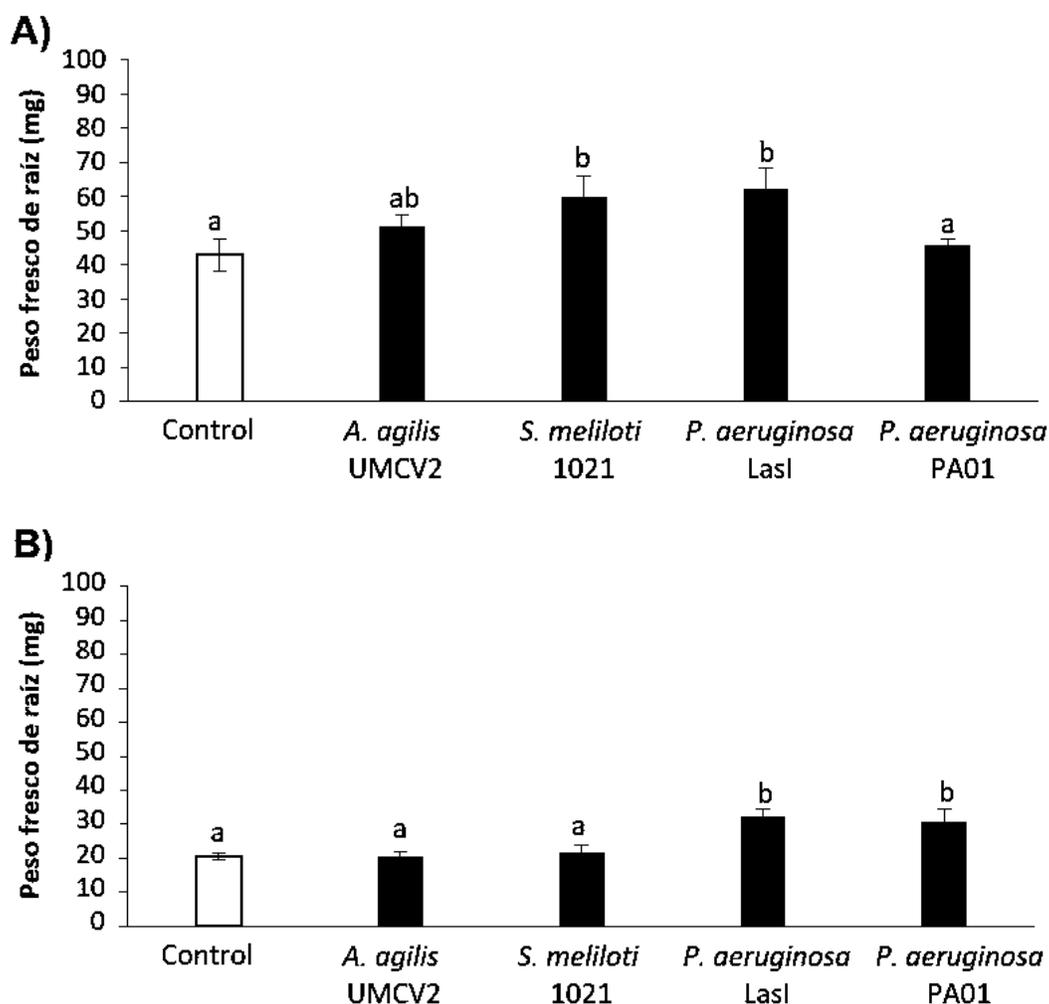


Figura 10. Efecto de los VOCs de las diferentes cepas *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* Lasl y *P. aeruginosa* PA01 sobre el peso fresco de la raíz de plántulas de *M. truncatula* en tratamientos con hierro suficiente 100 µM (A) y hierro deficiente 1 µM (B). Las barras representan el promedio \pm error estándar (n=12) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de una sola vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Finalmente, como último indicador de crecimiento, se evaluó el número de raíces laterales donde los VOCs de las cepas *P. aeruginosa* LasI y *P. aeruginosa* PA01 estimularon el desarrollo de raíces laterales ($p < 0.001$) en plántulas que crecieron en medio con hierro suficiente (Fig. 11A), mientras que en plántulas que crecieron en medio con hierro deficiente los VOCs de todas las cepas lograron estimular el desarrollo de raíces laterales ($P = 0.0013$) (Fig. 11B).

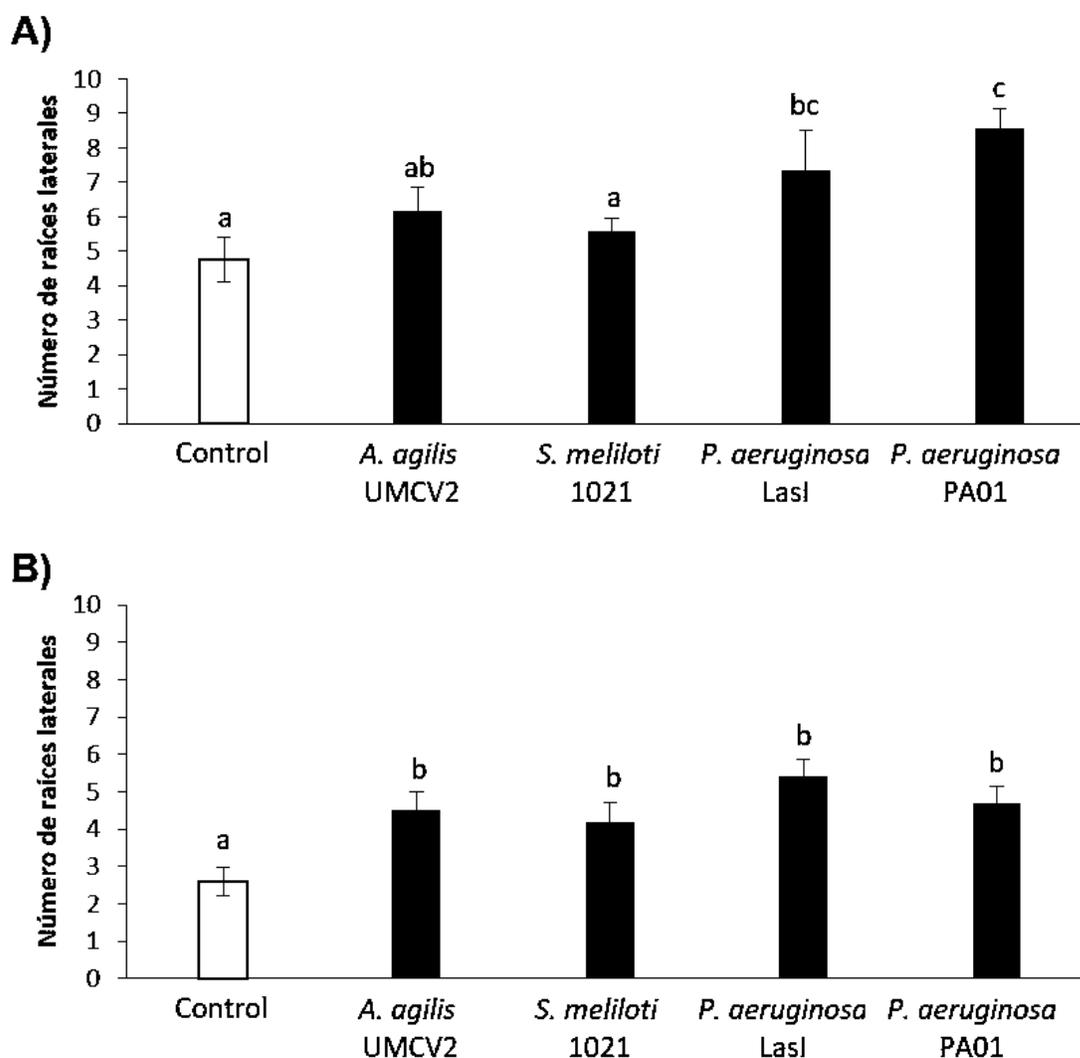


Figura 11. Efecto de los VOCs de las diferentes cepas *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* LasI y *P. aeruginosa* PA01 sobre el número de raíces laterales de plántulas de *M. truncatula* en tratamientos con hierro suficiente 100 μM (A) y hierro deficiente 1 μM (B). Las barras representan el promedio ± error estándar (n=12) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de una sola vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

8.2 Expresión de genes *FRO5*, *PR1* y *PDF2.1*

Para evaluar el efecto de los VOCs de las diferentes cepas de rizobacterias utilizadas sobre la expresión de los genes *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1* se utilizó del método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los resultados de la expresión relativa se analizaron efectuando un ANOVA de dos vías considerando un diseño dos factores y dos niveles (medio suficiente y deficiente de hierro y presencia y ausencia de VOCs). Encontramos que la expresión relativa de los genes *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1* se encuentra influenciada tanto por los VOCs y el hierro, así como por la interacción de ambos factores (tabla 5).

Tabla 5. Análisis factorial del efecto de los VOCS y el hierro sobre la expresión de genes *MtFRO5*, *MtPDF2.1* y *MtPR1* en plántulas de *M. truncatula*.

Factor	Significancia estadística (<i>p</i>)
<u>Expresión relativa de <i>MtFRO5</i></u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	< 0.001
<u>Expresión relativa de <i>MtPDF2.1</i></u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	< 0.001
<u>Expresión relativa de <i>MtPR1</i></u>	
VOCs	< 0.001
Fe	< 0.001
Fe x VOCs	< 0.001

Se evaluó la expresión relativa del gen *MtFRO5* de los brotes y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en plántulas que se desarrollaron en medio con bajo nivel de hierro y bajo los efectos de los VOCs producidos por las

bacterias *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2, con un aumento de 11, 4 y 10 veces mayor respectivamente con relación al control (Fig. 12).

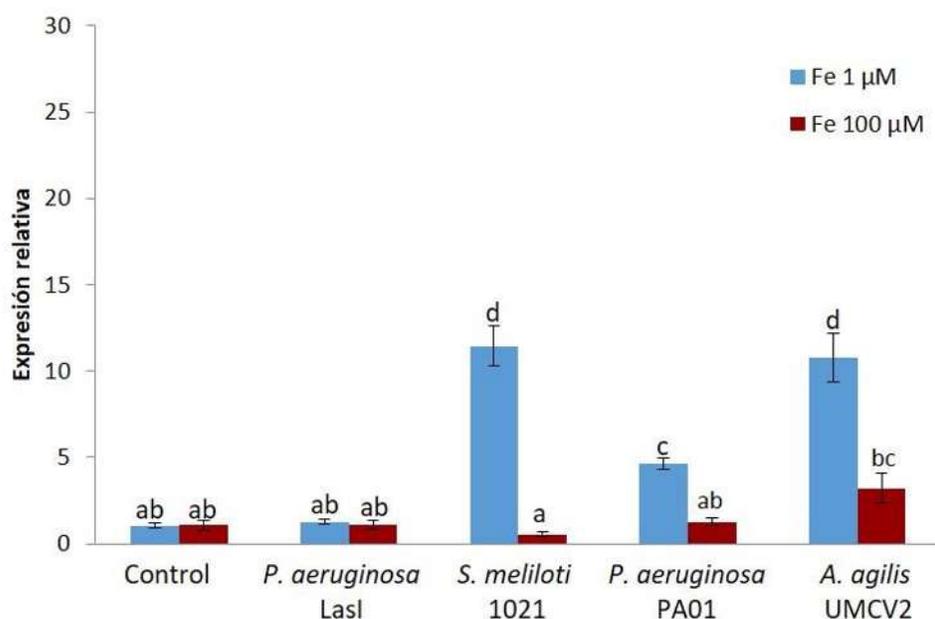


Figura 12. Expresión relativa del gen *MtFRO5* en plántulas de *M. truncatula* crecidas en medio deficiente de hierro (1μM) y suficiente (100 μM), expuestas a los VOCs de las bacterias *P. aeruginosa* LasI, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2. Las barras representan el promedio ± error estándar (n=3) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p<0.05$).

En la expresión relativa del gen *MtPDF2.1*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en plántulas crecidas en medio deficiente de hierro bajo el efecto de los VOCs de las bacterias *P. aeruginosa* PA01 con un aumento 9 veces mayor con respecto al control y la bacteria *A. agilis* UMCV2 en plántulas crecidas tanto en medio deficiente como en medio suficiente de hierro con un aumento de 15 veces y 3 veces mayor respectivamente con relación al control (Fig. 13).

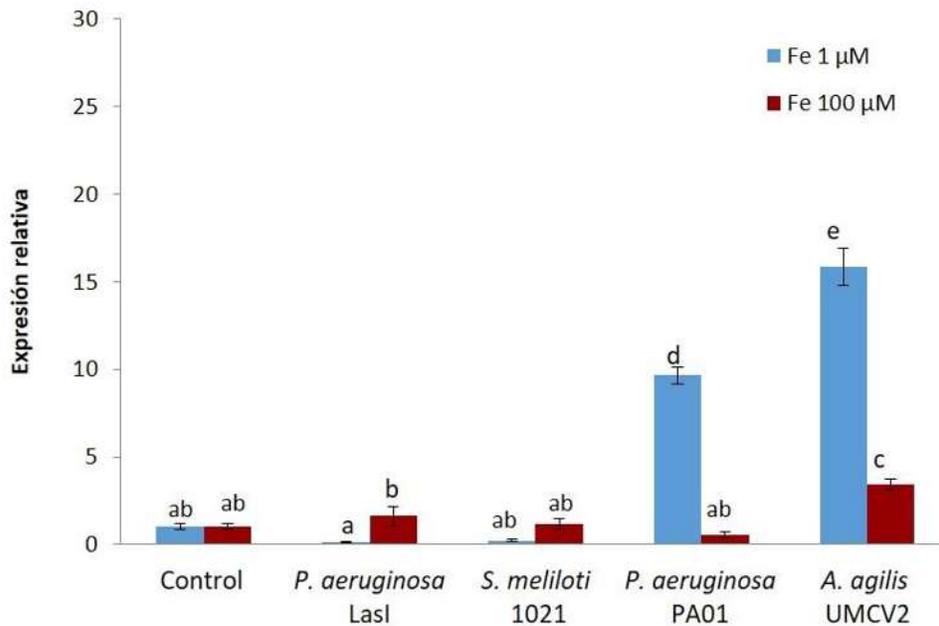


Figura 13. Expresión relativa del gen *MtPDF2.1* en plántulas de *M. truncatula* crecidas en medio deficiente de hierro (1 μ M) y suficiente (100 μ M), expuestas a los VOCs de las bacterias *P. aeruginosa* Lasl, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2. Las barras representan el promedio \pm error estándar (n=3) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Cuando se evaluó la expresión relativa del gen relacionado con la patogénesis (*MtPR1*) en plántulas crecidas en medio con hierro suficiente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas debidas al efecto de los VOCs de las bacterias *P. aeruginosa* Lasl, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2 con un aumento 4, 6 y 25 veces mayor respectivamente con relación al control (Fig. 14).

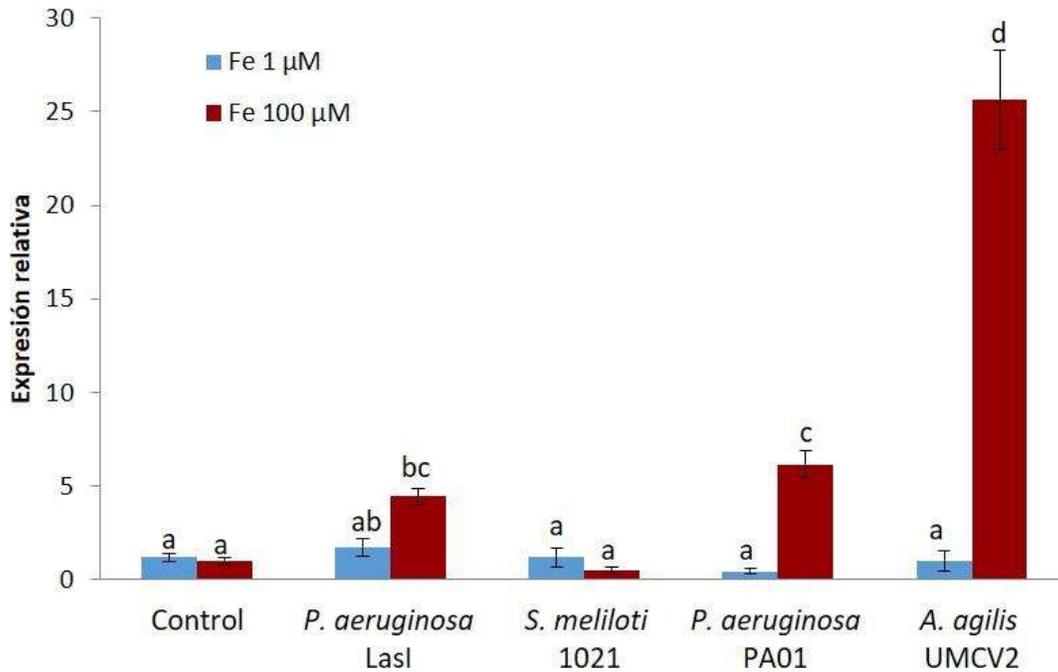


Figura 14. Expresión relativa del gen *MtPR1* en plántulas de *M. truncatula* crecidas en medio deficiente de hierro (1 μ M) y suficiente (100 μ M), expuestas a los VOCs de las bacterias *P. aeruginosa* LasI, *S. meliloti* 1021, *P. aeruginosa* PA01 y *A. agilis* UMCV2. Las barras representan el promedio \pm error estándar (n=3) y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas con la prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

9. Discusión

Se encuentra demostrado que los VOCs de bacterias rizosféricas son eficaces para promover el desarrollo de *A. thaliana* (Ryu et al., 2003). Un número creciente de publicaciones también han demostrado el efecto de los VOCs en diferentes especies de plantas como los resultados obtenidos en Orozco-Mosqueda et al., 2013 a y b donde se demuestra el efecto de los VOCs de las cepas *A. agilis* UMCV2 y *S. meliloti* 1021 sobre el crecimiento de *M. truncatula*. El efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre *M. sativa* y *Sorghum bicolor* también han sido demostrados previamente (Velazquez-Becerra et al., 2012; Castulo-Rubio et al., 2015). En nuestro estudio utilizamos el efecto demostrado de los VOCs de *A. agilis* y *S. meliloti* sobre el crecimiento vegetal de *M. truncatula* como un control positivo para comparar sus efectos con los producidos por la bacteria patógena *P. aeruginosa* PA01 y su mutante LasI. Los experimentos realizados sobre el efecto de los VOCs de *A. agilis* y *S. meliloti* son congruentes con los previamente reportados, demostrando su capacidad de promoción del crecimiento vegetal. Resultados también esperados son los relacionados al mayor crecimiento de *M. truncatula* en medio con suficiencia de hierro como ampliamente se ha reportado (Valencia Cantero et al., 2007; Andaluz et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2013b). Aunque *P. aeruginosa* PA01 es considerada una bacteria patógena en *Arabidopsis* (Walker et al., 2004), estudios *in vitro* han demostrado que sus efectos perjudiciales dependen de la distancia entre el sitio de inoculación y la raíz (Ortíz – Castro et al., 2011). Un estudio más recientemente se demostró que los VOCs de PA01 tienen la capacidad de promover el crecimiento de sorgo (Aviles-Garcia., 2015), con esto se demostró que PA01 es capaz de promover el desarrollo vegetal siempre y cuando no entre en contacto directo con la planta. En los experimentos realizados, la interacción de los VOCs de PA01 con plántulas de *M. truncatula* ocasiono resultados similares que los obtenidos en plantas de sorgo, teniendo una promoción del crecimiento de las plántulas y en general un mejor desarrollo en plantas que crecieron en medios con hierro suficiente. Estudios en *Arabidopsis* con una cepa mutante simple en LasI (cepa PA0214) de PA01 han demostrado tener los mismos síntomas de infección que PA01 sucumbiendo la planta a los 7

días de inoculación (Walker et al., 2004). Otro estudio con *Arabidopsis* y cepas patógenas, donde sugieren que unos de los VOCs que tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas es el cianuro de hidrogeno, demuestran que una cepa mutante en *LasI* (cepa MH694) de la cepa PA01 produce menos cantidad de este compuesto haciéndola menos toxica (Blom et al., 2011a). En los resultados obtenidos *P. aeruginosa* *LasI* (cepa PA0-JP21) demuestra tener ampliamente un efecto positivo sobre el desarrollo de la planta generándole un aumento general de la biomasa con un comportamiento bastante similar a la cepa PA01. Los VOCs de las rizobacterias utilizadas no solo estimulan el crecimiento de las plántulas, sino que algunas también tienen efecto en diferentes mecanismos, como en mecanismo de reducción del hierro. Este mecanismo se debe al incremento en la expresión de genes *FRO*. En nuestro sistema experimental analizamos la expresión relativa de genes *MtFRO5*, genes que están demostrados que se expresan en las hojas de plántulas de *M. truncatula* en un en un estado basal cuando las plantas se encuentran en hierro suficiente y teniendo un incremento con deficiencia de hierro (Orozco-Mosqueda et al., 2012). Los VOCs de las bacterias *A. agilis* UMCV2, *S. meliloti* 1021 y *P. aeruginosa* PA01, demostraron incrementar la expresión de genes *FRO5* en plantas que crecieron en medio deficiente de hierro. Esto concuerda con reportes previos en Castulo-Rubio et al., 2015; Orozco-Mosqueda et al., 2013b y Aviles-Garcia., 2015. Los genes *FRO* son mayormente estimulados en medios con carencia de hierro debido a que cuando la planta se encuentra en medio deficiente de hierro necesita una mayor actividad del enzima férrico quelato reductasa para satisfacer las demandas de hierro soluble (Robinson et al., 1999; Wu et al., 2005; Andaluz et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2013a).

Por otro lado los VOCs de las bacterias estimulan los sistemas de defensa de las plantas. Los primeros estudios donde se demuestra la respuesta defensiva de las plantas se mostraron en el trabajo de Ryu et al., 2004. Donde plántulas *A. thaliana* fueron expuestas a los VOCs de *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a, y posteriormente se inocularon con la bacteria patógena *E. carotovora* demostrando que *E. carotovora* disminuyó considerablemente en comparación con plántulas

que no fueron expuestas a los VOCs. Para demostrar que las plantas son capaces de reconocer una bacteria patógena de una benéfica por medio de sus VOCs y el papel que juega el hierro en los mecanismos de defensa de las plantas se analizó la expresión relativa del gene *PR1*

El análisis de la expresión relativa del gen *MtPR1* (marcador de la respuesta sistémica adquirida que es inducida por patógenos y la vía del ácido salicílico) mostró que dicho gen fue inducido por los VOCs de *P. aeruginosa* PA01 y LasI en plantas que crecieron en medio con hierro suficiente, resultados esperados considerando que estas bacterias se consideran patógenas. El resultado inesperado fue por parte de la bacteria *A. agilis* UMCV2 que es considerada una PGPR y que está demostrado que estas inducen un estado de resistencia sistémica inducida, indujo la expresión de genes *MtPR1* en plantas que estaban crecidas en medio con hierro suficiente.

En cuanto al gen *MtPDF2.1*, se conoce que es un marcador de resistencia sistémica inducida que principalmente se desencadena por bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) que no causan un daño visible en la planta (Van Loon et al., 1998) y depende de las vías que son reguladas por el jasmonatos y el etileno (Knoester et al., 1999; Pieterse et al., 1998; Yan et al., 2002). Los *MtPDF2.1* son principalmente expresados en las semillas de las plantas de *M. truncatula*, sin embargo se ha demostrado que se expresan en las hojas de las plántulas cuando estas son expuestas al compuesto exógeno metil jasmonato (MeJA) (Hanks et al., 2005). Resultados obtenidos en estudios realizados en pepino y rábano demuestran que la ISR es mediada por la cantidad de hierro disponible en las plantas con una disminución significativa de los niveles de ISR con un incremento en el hierro disponible (Leeman et al., 1996; Press et al., 2001). Esto concuerda con nuestros resultados demostraron que los VOCs de la cepa *A. agilis* UMCV2 induce la expresión de genes *MtPDF2.1* en hojas de plántulas crecidas en medio con hierro suficiente, y en menor cantidad en plántulas que crecieron en medio con hierro deficiente. El resultado inesperado fue que los VOCs de la cepa *P. aeruginosa* PA01 indujera genes *MtPDF2.1* en plantas que crecieron en medio deficiente de hierro, cuando se considera un bacteria

fitopatógica. Recientemente se ha demostrado una estrecha relación entre los mecanismos de captación de hierro y las respuestas de defensa de las plantas, cuando existe un ataque por patógenos, el hierro se deposita en las paredes celulares y se acumula como un intermediario de la explosión oxidativa (Liu et al. 2007). También se ha demostrado que la deficiencia de hierro está relacionada con disminuida capacidad de respuesta ante patógenos (Kieu et al. 2012). Esto nos lleva a plantearnos la hipótesis de que las plantas identifican, mediante los VOCs, a una bacteria como patógena o no, dependiendo de su nutrición, y por ende, de acuerdo a los nutrientes que se tienen en el medio que el que se desarrolla. Una planta mejor nutrida se defiende mejor, por lo tanto, cuando interacciona con una los VOCs de una bacteria que en principio se considera patógena, la planta no la considerara como tal.

10. Conclusión

En conclusión, los resultados reafirman la importancia de la concentración del hierro en el medio para el crecimiento vegetal que junto con el papel que los VOCs bacterianos tienen un efecto aditivo sobre la promoción del crecimiento vegetal y en los mecanismo de defensa de las plantas los cuales son diferenciales dependiendo del tipo de medio en el que crezcan. Como se hipotetizó al inicio, la expresión del gen *FRO* se encuentra directamente relacionada al nivel de hierro en el medio pero se incrementa bajo un estímulo de los VOCs producidos por *A. agilis*, *S. meliloti* y PA01, con un aumento de 10, 11 y 4 veces mayor respectivamente con respecto al control. El hierro juega un papel principal en los mecanismos de defensa de *M. truncatula*, bajo deficiencia de este elemento las plantas inducen una mayor expresión del marcador de resistencia sistémica inducida cuando son expuestas a los VOCs de *A. agilis* y *P. aeruginosa* PA01, con un aumento de 15 y 9 veces mayor respectivamente con respecto al control. Caso contrario, cuando las plantas crecen en medio con hierro, tanto *A. agilis* como PA01 y LasI son detectadas como bacterias patógenas ya que sus VOCs inducen fuertemente la expresión del marcador de resistencia sistémica adquirida, con un aumento en la expresión de 25, 6 y 4 veces mayor respectivamente con respecto al control. En conjunto los resultados demuestran el papel promotor del crecimiento vegetal de *A. agilis* y PA01 en *M. truncatula* y que la inducción de los mecanismos de respuesta mediada por VOCs depende del hierro en el medio de crecimiento de la planta. Lo anterior puede ser utilizado como una estrategia biotecnológica para incrementar el nivel basal de respuesta a patógenos vía su acondicionamiento.

11. Literatura citada

Andaluz S, Rodríguez-Celma J, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF (2009) Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1082-1088.

Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272: 201-209.

Åström B, Gerhardson B (1989) Wheat cultivar reactions to deleterious rhizosphere bacteria under gnotobiotic conditions. *Plant and Soil* 117: 157-165.

Aviles-Garcia ME (2015) Determinación de los efectos diferenciales de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diversas rizobacterias en plantas de *Sorghum bicolor*. Tesis de Maestría. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH*. 67 pp.

Bailly A, Weiskopf L (2012) The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior* 7: 79-85.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.

Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J Huguet T (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 40-49.

Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K., Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G,

He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 55: 504-513.

Bensmihen S, de Billy F, Gough C (2011) Contribution of NFP LysM domains to the recognition of Nod factors during the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *PLoS One* 6: e26114.

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.

Bienfait HF, Bino RJ, Bliet AVD, Duivenvoorden JF, Fontaine JM (1983) Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 59: 196-202.

Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klauser DR., Boller T, Eberl L, Weiskopf L (2011a). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology* 13: 3047-3058.

Blom D, Fabbri C, Eberl L, Weiskopf L (2011b) Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1000-1008.

Bowen G.D, Rovira AD (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1-102.

Camarena-Gutiérrez, De la Torre-Almaráz R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13: 157-162.

Capela D, Barloy-Hubler F, Gouz J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P... Galibert F (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 9877-9882.

Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez NA, del Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2015) Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 34: 611-623.

Chaney RL, Brown JC, Tiffin LO (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology* 50: 208-213.

Chinnasri B, Borsics T, Christopher DA, Sipes BS (2016) Induction of pathogenesis-related gene 1 (PR-1) by acibenzolar-s-methyl application in pineapple and its effect on reniform nematodes (*Rotylenchulus reniformis*). *Agriculture and Natural Resources* 50: 368-373.

Cho SM, Kang BR, Han SH, Anderson AJ, Park JY, Lee YH, Cho BH, Yang KY, Ryu CM, Kim YC (2008) 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1067-1075.

Colilla FJ, Rocher A, Mendez E (1990) γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters* 270: 191-194.

Collinge DB; Borch J; Madriz-Ordeña K; Newman MA (2001) The responses of plants to pathogens. En: Hawkesford MJ; Buchner, P (ed) Molecular analysis of plant adaptation to the environment. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers. pp 131-158.

Cook DR (1999) *Medicago truncatula* a model in the making!: Commentary. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304.

De Meyer G, Höfte M (1997) Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the *LuxR-LuxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176: 269.

Gage DJ (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300.

Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8: 629-643.

Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.

Han SH, Lee SJ, Moon JH, Park KH, Yang KY, Cho BH, Kim KY, Kim YW, Lee MC, Anderson AJ, Kim YC (2006) GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 924-930.

Hanks JN, Snyder AK, Graham MA, Shah RK, Blaylock LA, Harrison MJ, Shah DM (2005) Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant Molecular Biology* 58: 385-399.

Harrison SJ, Marcus JP, Goulter KC, Green JL, Maclean DJ, Manners JM (1997). An antimicrobial peptide from the Australian native *Hardenbergia violacea* provides the first functionally characterised member of a subfamily of plant defensins. *Functional Plant Biology* 24: 571-578.

Hassan SHT (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.

Holden MJ, Luster DG, Chaney RL, Buckhout TJ, Robinson C (1991) Fe³⁺-Chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiology* 97: 537-544.

Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2006) Rice plants take up Fe as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *The Plant Journal* 45: 335-346.

Jain S, Vaishnav A, Kasotia A, Kumari S, Choudhary DK (2014) Plant growth-promoting bacteria elicited induced systemic resistance and tolerance in plants. En: Ahmad P, Rasool S (ed) Emergin technologies and management of crop stress tolerance. Voll II A sustainable approach. Academic Press. Oxford Gran Bretaña. pp 109-132.

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology* 5: 619–633.

Kai M, Piechulla B. (2010) Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior* 5(4), 444-446.

Kieu NP, Aznar A, Segond D, Rigault M., Simond-Côte E, Kunz C, Soulie MC, Expert D, Dellagi A (2012) Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 13: 816-827.

Kloepper JW, Schroth MN. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*,71: 1020-1024.

Knoester M, Pieterse CM, Bol JF, Van Loon LC (1999) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 720-727.

Koch C, Schumann P, Stackebrandt E (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45: 837-839.

Leeman M, Den Ouden FM, Van Pelt JA, Dirkx FPM, Steijl H, Bakker PAHM, Schipper, B (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86: 149-155.

Liu G, Greenshields DL, Sammynaiken R, Hirji RN, Selvaraj G, Wei Y (2007) Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science* 120: 596-605

Madriz-Ordeñana K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 22-32.

Marschner H, Römheld V, Kissel M (1986). Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* 9: 695-713.

Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 293-319.

Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Métraux JP, Defago G (1994) Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84: 139-146.

Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, Haro C (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in

eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry* 194: 533-539.

Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250 1004-1006.

Mikami Y, Saito A, Miwa E, Higuchi K. (2011). Allocation of Fe and ferric reductase activities in mesophyll cells of barley and *Sorghum* under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 513-519.

Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SC, DeBoy RT, Emerson JB, Shvartzbeyn A, Radune D, Vamathevan J, Riggs F, Grinberg V, Khouri H, Wackett LP, Nelson KE, Sadowsky MJ (2006) Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet*, 2: e214.

Montejano Ramírez V (2016) Efecto de la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 en la expresión órgano específica de los genes *FRO* y de genes marcadores de las vías de resistencia sistémica en *Medicago truncatula*. Tesis de Maestría Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH. 97pp.

Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Friting B, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiology* 108: 17-27.

Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 176: 2044-2054.

Orozco-Mosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Farías-Rodríguez R, Valencia-Cantero E (2013a) *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiologica* 58: 579-585.

Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E (2013b) *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 MC, Santoyo G, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez L, Valencia-Cantero E (2012) Identification and expression analysis of multiple FRO gene copies in *Medicago truncatula*. *Genetics and Molecular Research* 11: 4402-4410.

Ortíz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río-Torres REN, Campos-García J, López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 7253-7258.

Ortiz-Castro R, Valencia-Cantero E, López-Bucio J (2013) The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. *Acta Horticulturae* 1009: 241-250.

Parker JE, Coleman MJ (1997). Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 291-296.

Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 1490-1494.

Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology* 179: 5756-5767.

Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6548-6553.

Pel MJ, Pieterse CM (2013) Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of Experimental Botany* 64: 1237-1248.

Peleg-Grossman S, Melamed-Book N, Levine A (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signaling & Behavior* 7: 409-415.

Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Métreaux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* 8: 2309-2323.

Persello-Cartieaux F, David P, Sarrobert C, Thibaud MC, Achouak W, Robaglia C, Nussaume L (2001) Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* 212: 190-198.

Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179: 3127-3132.

Pieterse CM, Van Wees SC, Hoffland E, Van Pelt JA, Van Loon LC (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8: 1225-1237.

Pieterse CM, Van Wees SC, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek LC, Van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1571-1580.

Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52:347-375.

Press CM, Loper JE, Kloepper JW (2001) Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* 91: 593-598.

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinor ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694–697.

Römheld V (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70: 231–234

Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP (2008) Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS One* 3: e2073.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1017-1026.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei H X, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4927-4932.

Santoyo G, Orozco-Mosqueda MC, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* 22: 855-872.

Schulz S, Dickschat JS (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports* 24: 814-842.

Sels J, Delauré SL, Aerts AM, Proost P, Cammue BP, De Bolle MF (2007) Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Research* 16: 531-538.

Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941-950.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, ... Garber RL (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Thakur RP (2007) Host plant resistance to diseases: Potential and limitations. *Indian Journal of Plant Protection* 35: 37-21.

Terras FR, Torrekens S, Van Leuven F, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters* 316: 233-240.

Thomma BP, Broekaert WF (1998). Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 533-537.

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.

Tipton CL, Thowsen J (1985) FeIII reduction in cell walls of soybean roots. *Plant Physiology* 79: 432-435.

Trdá L, Boutrot F, Claverie J, Brulé D, Dorey S, & Poinssot B (2015) Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Frontiers in Plant Science* 6: 219.

Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 4: 645-656.

Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J (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.

Van Loon LC (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4: 111-116.

Van Loon LC, Van Kammen A (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.

Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.

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

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

Verma JP, Yadav J, Tiwar, KN, Lavakush SV (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research* 5: 954-983.

Vernooij B, Friedrich L, Goy PA, Staub T, Kessmann H, Ryals J (1995) 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 228-234.

Vespermann A, Kai M, Piechulla B (2007) Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5639-5641.

Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM, Flores HE (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia* 341: 68-75.

Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* 134: 320-331.

Wang ET, Martínez-Romer, E (2000) *Sesbania herbacea*–*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating *Rhizobia* in different environments. *Microbial Ecology* 40: 25-32.

Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JA, Ryals JA (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3: 1085-1094.

Waters BM, Blevins DG, Eide DJ (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology* 129: 85-94.

Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ (2005). Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 46: 1505-1514.

Yan Z, Reddy MS, Ryu CM, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92: 1329-1333.

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

Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim M. S, Dowd SE, Paré PW (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal* 58: 568-577.

Zou C, Li Z, Yu D (2010) *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology* 48: 460-466.