



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE *Arthrobacter
agilis* UMCV2 Y DE LA DIMETILHEXADECILAMINA EN
EL PROCESO DE NODULACIÓN DE
*Medicago truncatula***

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

QFB. MARTHA ALICIA MÉNDEZ CAMARILLO

Asesor:

DR. EDUARDO VALENCIA CANTERO

Morelia Mich., Agosto 2018



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. Eduardo Valencia Cantero. Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIA

A mis papás

Sin ustedes no hubiera logrado nada. Gracias por seguir conmigo en una meta más en mi carrera y en mi vida; por el apoyo incondicional que siempre siento en los dos. Por los momentos de estrés, donde nunca me faltó el cariño y los consejos de ambos, GRACIAS por siempre. Los amo.

A mi hermana

Gracias Verito, por hacerme la vida más fácil, con positivismo y alegría, gracias por tus consejos ilimitados y apoyo moral en cada momento, por las risas de diario. Me hiciste ver todo en otra perspectiva, nunca dude en pedir tu consejo porque siempre estuviste ahí. Te admiro, te amo. Por siempre juntas.

A mi hermano y su familia

Por el apoyo durante este proyecto, tus enseñanzas, por ayudarme cuando lo necesité. Gracias Leonard. A Valeria y Gaby por el apoyo que también me dieron, verlas siempre me ponía feliz a pesar del estrés, muchas gracias por los consejos. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor

Por la confianza y haberme dado la oportunidad de formar parte del laboratorio. El apoyo y la paciencia que recibí en todo momento durante este proyecto, el tiempo, las enseñanzas y consejos brindados. Gracias por todo.

A mis sinodales

Por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y guiarme durante el transcurso del mismo. Gracias por los consejos brindados y el apoyo en todo momento.

A mi novio

Gracias por todo tu apoyo durante este proyecto a pesar de la distancia, por los ánimos que nunca faltaron y por ayudarme cuando lo necesitaba; por aconsejarme y hacerme sonreír siempre. Te amo.

A mis compañeros de trabajo

Muchas gracias por esos momentos que hacen el día de trabajo en el laboratorio ameno y divertido. Por todos los consejos, la gran ayuda que me dieron cuando más lo necesitaba y no veía la luz, tanto en lo personal como referente al trabajo de laboratorio. Agradezco infinitamente y espero seguir en contacto con ustedes

por siempre. Ya los considero mis amigos: Kass, Idolina, Vicente, Christian, Ramiro, Ernesto (lado de la luz); Dani, Crhistina, Miguel, Luz, Adrián, Aura, (lado oscuro).

A mis amigos

A todos mis amigos, sin ellos no sé qué hubiera hecho. El apoyo que ustedes me han dado, el cariño, todos los momentos de risas y anécdotas, que hicieron que mis días fueran menos estresantes. Las porras y confianza que me dan cuando he sentido que ya no puedo más y me hicieron olvidarme de todo lo malo, muchas gracias a todos: Lalo, Edna, Ever, Hans, Érika, Mechita, Chepe, Iván, Miriam. Cada uno sabe lo importantes que son para mí, los quiero mucho.

Mis compañeros de maestría: Xóchitl, Nalle, Dani, Jona, Iñaqui, Rosy, Mariana, Ismael.

INDICE GENERAL:

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Características de la rizósfera.....	5
1.2. Las bacterias endófitas	7
1.2.1. Mecanismos de ingreso de las bacterias a los tejidos vegetales.....	7
1.3. La nodulación en el sistema Fabace-Leguminosales.....	9
1.3.1. Posición taxonómica de la familia Fabaceae.....	9
1.3.2. Orden Rhizobiales (bacterias noduladoras).....	10
1.3.3. Comunicación planta microorganismo para el establecimiento de la nodulación	10
1.3.4. Percepción de las rhizobias por la planta.....	12
1.3.5. Colonización del córtex por las rhizobias y organogénesis del nódulo	18
1.3.6. Factores que regulan la nodulación.....	19
1.3.7. Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN).....	22
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1. <i>Arthrobacter</i> y sus propiedades de fitoestimulación	25
2.2. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	26
2.3. La dimetilhexadecilamina (DMHDA) como molécula señal en plantas	28
2.4. Efecto de la inoculación de <i>A. agilis</i> UMCV2 en la nodulación de <i>Medicago sativa</i> por <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	32
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos específicos.....	35

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
6.2 Medios de cultivo	37
6.3 Material biológico	37
6.4 Desinfección de nódulos y aislamiento de cepas silvestres	38
6.5 Caracterización molecular de los aislados bacterianos	38
6.6 Desinfección de semillas de <i>M. truncatula</i>	40
6.7 Esterilización de sustrato Pro-Mix.....	40
6.8 Ensayos de inoculación y co-inoculación de <i>M. truncatula</i> con <i>Sinorhizobium</i> spp y <i>A. agilis</i> UMCV2	40
6.9 Efecto de la DMHDA en la nodulación de <i>M. truncatula</i>	42
6.10 Ensayo de inducción de plántulas con DMHDA aplicado como compuesto volátil 42	
6.11 Extracción de RNA de la planta.....	43
6.12 Síntesis de cDNA.....	44
6.13 Cuantificación relativa de genes por tiempo real	45
6.14 Ensayo de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) para observar la distribución de <i>A. agilis</i> UMCV2 en nódulos de <i>M. truncatula</i>	47
6.15 Observación en microscopio confocal.....	48
6.16 Análisis estadístico	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Aislamiento bacteriano de nódulos de <i>Medicago</i> sp y análisis filogenético de las cepas silvestres UMAC1, 2, 3 y 4	49
7.2. Nodulación de <i>M. truncatula</i> por cepas de <i>S. meliloti</i> de colección y <i>S. medicae</i> silvestres	51
7.3. Cinética de nodulación de plantas de <i>M. truncatula</i> durante los primeros 40 días de crecimiento.....	53
7.4. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 en el establecimiento de la nodulación de <i>Medicago truncatula</i>	55
7.5. Efecto de la DMHDA en la nodulación de <i>M. truncatula</i> inoculada con la cepa <i>S.</i> <i>medicae</i> UMAC4.....	58

7.6. Efecto de <i>A. agilis</i> UMCV2 en la nodulación de <i>S. medicae</i> UMAC4 en suficiencia y deficiencia de hierro.....	61
7.7. Efecto de la exposición de <i>M. truncatula</i> al VOC DMHDA en la expresión de los genes de nodulación	64
7.8 Detección de <i>A. agilis</i> UMCV2 en nódulos de <i>M. truncatula</i>	70
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIÓN	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88

RESUMEN

Las leguminosas son de gran importancia para la agricultura, debido a su empleo en la alimentación humana y del ganado, además de ser utilizadas como materia prima en la industria. Una de las características más relevantes de las leguminosas es su capacidad de formar órganos especializados llamados nódulos en una asociación simbiótica con bacterias denominadas rizobias. En nódulos, las rizobias pueden fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio, el cual es utilizado por la planta para su desarrollo. Se han caracterizado diversos genes que controlan el proceso de nodulación actuando en distintas etapas durante la formación del nódulo. Por ejemplo, los genes *NFP*, *DMI1* y *DMI2* están involucrados en el reconocimiento de la rizobia y la leguminosa hospedera; mientras que el gen *SUNN* es el control de la organogénesis y el gen *NAD1* en el mantenimiento del nódulo. Por otra parte, se conoce que en el proceso de fijación de nitrógeno hay una alta demanda de hierro, para la formación de las enzimas involucradas en la fijación de nitrógeno.

Algunas rizobacterias tienen la capacidad de favorecer el proceso de nodulación cuando se co-inoculan con rizobias, tal es el caso de *Arthrobacter agilis* UMCV2. Se ha documentado que esta rizobacteria promueve el crecimiento y la absorción de hierro en plantas a través de la emisión del compuesto volátil dimetilhexadecilamina (DMHDA). En el presente trabajo se realizaron ensayos de nodulación entre la leguminosa modelo *Medicago truncatula* y las cepas de colección de *Sinorhizobium meliloti* 1021, 2011 y GR4 y las cepas silvestres de

Sinorhizobium medicae UMAC1, UMAC2, UMAC3 y UMAC4 co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2. Cuando las plantas interactúan con *S. medicae* UMAC4 y *A. agilis* UMCV2 se aumenta el número de nódulos funcionales respecto a los ensayos donde solo se inoculó *S. medicae* UMAC4. La co-inoculación de *S. medicae* UMAC4 y *A. agilis* UMCV2 también condujo a un aumento en el número de nódulos funcionales cuando las plantas de *M. truncatula* se cultivaron en condiciones de deficiencia de hierro. Adicionalmente, el compuesto bacteriano DMHDA, incrementa el número y peso de los nódulos funcionales formados por *S. medicae* UMAC4. El compuesto también aumentó la expresión de los genes *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* y *NAD1*, aún más que en las plantas inoculadas con *S. medicae* UMAC4. Con base en los resultados se concluye que *A. agilis* UMCV2 y su compuesto DMHDA promueven la formación de nódulos funcionales en plantas de *M. truncatula*.

Palabras clave: *Medicago truncatula*, *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium*, nodulación

ABSTRACT

Leguminosae represents the second-most important plant family in agriculture given their extensive uses, including as a food source for human and cattle, and as a raw material for the industry. One of the most important characteristics of the legume family is its ability to form specialized organs called nodules in a symbiotic association with bacteria called rhizobia. Within the nodules, rhizobia can fix atmospheric nitrogen and convert it to ammonium; which is used by the plant for its development. Diverse genes that control nodulation in distinct phases have been characterized. For example, the genes *NFP*, *DMI1* and *DMI2* are involved in the early signaling pathway during the legume-rhizobia recognition. The *SUNN* gene is involved in controlling nodule organogenesis, while the *NAD1* gene participates in nodule maintenance. The nitrogen fixation process consumes high amounts of plant iron content and involves several enzymes.

Some rhizobacteria are capable of promoting nodulation when co-inoculated with rhizobia, as in the case of *Arthrobacter agilis* UMCV2. This rhizobacteria promotes plant growth and plant iron uptake by emitting the compound dimethylhexadecylamine (DMHDA). In this study, diverse assays for nodulation were performed by employing the model legume *Medicago truncatula*, laboratory strains of *Sinorhizobium meliloti* 1021, 2011 and GR4, and the wildtype strains *S. medicae* UMAC1, UMAC2, UMAC3 and UMAC4, by co-inoculating with *A. agilis* UMCV2. Plants co-inoculated with *S. medicae* UMAC4 and *A. agilis* UMCV2 produced a large number of functional nodules than those produced by plants inoculated only with *S. medicae* UMAC4. Co-inoculations with *S. medicae* UMAC4 and *A. agilis* UMCV2 also increased the number of functional nodules when *M.*

truncatula plants were grown in iron-deprived conditions. Interestingly, addition of 1 μ molal of the DMHDA increased the weight and the number of functional nodules produced by *S. medicae* UMAC4 in the plants. Addition of the compound also increased the expression of *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* and *NAD1* genes at higher levels than in the plants inoculated with *S. medicae* UMAC4 only. These results conclusively show that *A. agilis* UMCV2 and the DMHDA promote nodulation in *M. truncatula* plants.

Keywords: *Medicago truncatula*, *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Sinorhizobium*, nodulation

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de la rizósfera

Las plantas y los animales se relacionan con diversos microorganismos (Rosenblueth y col. 2006). La interacción entre plantas y bacterias ha sido profusamente estudiada; Hiltner (1904) observó que los microorganismos son más abundantes en el suelo que está en torno a las raíces, acuñando el término “rizósfera” para la región influenciada por la raíz (Gaiero y col. 2013). Actualmente se considera que dicha región está conformada por la endorizósfera, el rizoplano y la ectorizósfera; la primera incluye la raíz cortical y el tejido endodérmico, mientras que el rizoplano engloba la epidermis de la raíz y el mucílago, finalmente la ectorizósfera incluye el suelo cercano a la raíz (De La Peña y Loyola-Vargas, 2014). Así pues, las plantas pueden ser colonizadas por hongos endofíticos y micorrizas (Bamisile y col. 2018), por bacterias que proliferan en la superficie y aquellas que viven dentro de sus tejidos, como las formadoras de nódulos (Goh y col. 2013) que, en conjunto constituyen el microbioma de la planta (Goh y col. 2013, Bandyopadhyay y col. 2016).

Las plantas producen diversos compuestos químicos y moléculas de señalización con funciones en la defensa contra patógenos o para atraer a otros que pueden tener una función benéfica. Entre los compuestos producidos se incluyen exudados de la raíz, como aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides, glucosinolatos, ácidos grasos y polisacáridos (DeAngelis y col. 2008; De La Peña y Loyola-Vargas, 2014) que son utilizados por las bacterias como fuente de

carbono y que representan entre el 11 y el 20% de los fotosintatos (Haichar y col. 2008; Tkacz y col. 2015).

En la rizósfera se encuentran hasta 10^{11} de bacterias por gramo de raíz y se cree que más de 30,000 especies procariotas que pueden influenciar la productividad vegetal (De La Peña y Loyola-Vargas, 2014). El microbioma es esencial para la salud y el crecimiento de la planta, ya que contribuye con la adquisición de nutrientes, tolerancia al estrés y fortalecimiento de la inmunidad (Pérez-Jaramillo y col. 2016).

Algunas de las interacciones mejor conocidas se establecen con las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR's), llamadas así porque promueven el crecimiento de forma directa o indirecta (Glick, 2012 y Requena y col. 1996). La estimulación directa ocurre cuando una bacteria facilita la adquisición de nutrientes esenciales como el fósforo, el nitrógeno y el hierro (Figueiredo y col. 2008; Raya-González y col. 2016) o mediante la modificación de la homeostasis hormonal a través de la síntesis de auxinas, citocininas y giberelinas (Santoyo y col. 2016).

Algunas bacterias disminuyen los niveles de etileno sintetizando la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que escinde el compuesto ACC, precursor inmediato de etileno (Santoyo y col. 2016). Lo anterior implica dos ventajas: 1) disminuyen las concentraciones endógenas de etileno y 2) se incrementa la disponibilidad de amonio en la rizósfera (Esquivel-Cote y col. 2013).

La estimulación indirecta incluye la disminución del daño causado por microorganismos fitopatógenos, a través de la producción de sustancias

antimicrobianas, de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de estas, por competencia de nutrientes o de espacio, así como de la inducción de las respuestas de defensa vegetal (Esquivel-Cote y col. 2013).

1.2. Las bacterias endófitas

Existe otro nicho donde se llevan a cabo interacciones planta-bacteria, además de la rizósfera, el nicho endofítico. Los microorganismos endófitos son aquellas bacterias y hongos que viven en el interior de las células o tejidos sin causarles daño, de lo contrario se les considera fitopatógenos (Gaiero y col. 2013). Las bacterias endófitas interactúan con el hospedero de forma más eficiente que las bacterias que se unen exclusivamente a la raíz (Ali y col. 2014), promueven el crecimiento vegetal, brindan protección contra patógenos, contribuyen en la asimilación de fosfato y la fijación biológica de nitrógeno, además, son importantes para la biorremediación del suelo. (Rosenblueth y col. 2006).

1.2.1. Mecanismos de ingreso de las bacterias a los tejidos vegetales

Las bacterias endófitas se pueden encontrar en raíces, tallos, hojas, frutas, semillas y en los nódulos de leguminosas (Marquez-Santacruz y col. 2010); pueden penetrar por medio de heridas, estomas, lenticelas, grietas en la raíz y a través de los pelos radiculares (Ali y col. 2014; Santoyo y col. 2016), (**Figura 1**) mediante la producción de enzimas como la celulasa y la pectinasa, que ayudan en el proceso de infección (Hallman y col. 1997).

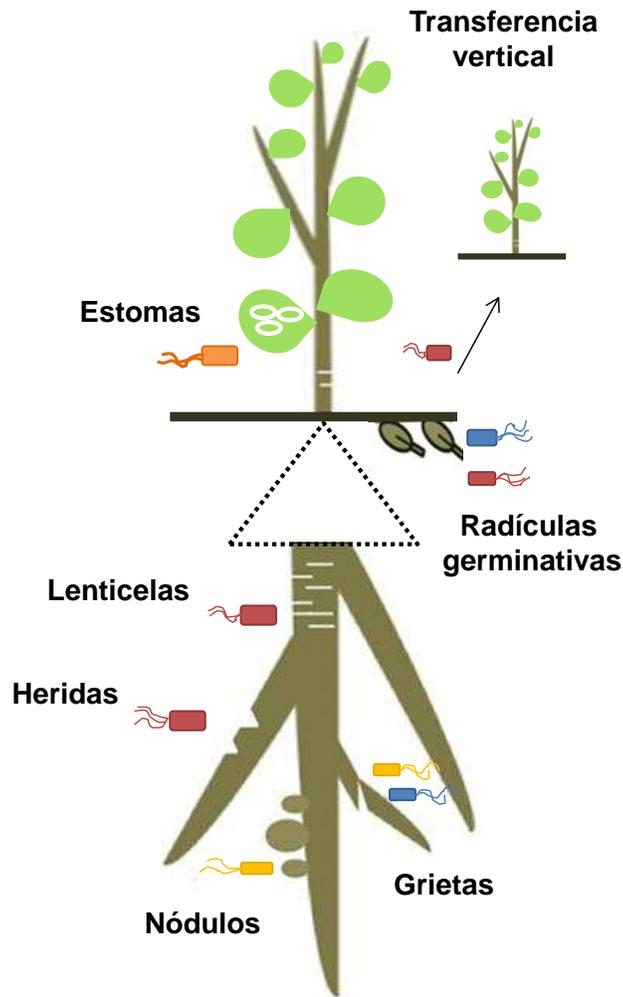


Figura 1. Forma de entrada de bacterias endofíticas en diferentes tejidos vegetales. La vía más común de entrada es a través de la raíz, a través de las células de los pelos radiculares primarios y laterales, por grietas y heridas. Algunos otros sitios como los estomas, particularmente en las hojas y en tallos jóvenes, lenticelas y radículas germinativas. Las rhizobia son capaces de colonizar los tejidos internos y formar nódulos radiculares. La transmisión vertical es otra manera de heredar endófitos a través de generaciones de plantas hospederas. (Santoyo y col. 2016)

Por ejemplo, enzimas que degradan la pared celular, como la endoglucanasa y la poligalacturonasa, mostraron ser necesarias para la infección de *Vitis vinifera* por *Burkholderia* sp. PsJN (Rosenbluet y col. 2006).

1.3. La nodulación en el sistema Fabace-Leguminosales

1.3.1. Posición taxonómica de la familia Fabaceae

Las plantas leguminosas son de gran importancia para el consumo humano (Benedito y col. 2008), representan el tercer mayor grupo de angiospermas y son el segundo grupo en relevancia desde el punto vista agrícola con base en la extensión de sus cultivos y su producción a nivel global (Ferguson y col. 2010), encontrando especies como la soya, el guisante, el trébol, el garbanzo, la alfalfa y el frijol.

Las leguminosas incluyen más de 18,000 especies que establecen relaciones simbióticas con las α y β proteobacterias (Masson-Boivin y col. 2009). Son claves en la agricultura debido a que pueden asimilar el amonio derivado de la fijación de nitrógeno, con la ayuda de rizobias por el proceso denominado “fijación simbiótica de nitrógeno” (Larrainzar y col. 2015), permitiendo incrementar la producción de los cultivos con una fuente libre y renovable de nitrógeno (Benedito y col. 2008).

Medicago truncatula es una leguminosa que posee un genoma relativamente pequeño, diploide y un ciclo de vida corto (Shao y col. 2016); es utilizada como modelo de estudio de las interacciones planta-microorganismo en leguminosas, en la fijación simbiótica de nitrógeno y en interacciones con micorrizas (Krishnakumar y col. 2014).

1.3.2. Orden Rhizobiales (bacterias noduladoras)

Las bacterias Gram-negativas de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, colectivamente referidas como rizobias, pertenecen todas al Orden Rhizobiales y son capaces de generar en su hospedero específico la formación de órganos especializados llamados nódulos (Catoira y col. 2000). Una vez que la simbiosis se ha establecido, la rizobia fija nitrógeno atmosférico, proporcionando del 40 al 50% del nitrógeno que requieren las plantas para su crecimiento y desarrollo, lo que les atribuye de una ventaja sobre las demás especies vegetales (Ferguson y col. 2010, Larrainzar y col. 2015).

1.3.3. Comunicación planta microorganismo para el establecimiento de la nodulación

Las plantas reconocen a los organismos potencialmente dañinos de aquellos que les son benéficos; una de las preguntas más relevantes en términos de interacciones ecológicas es, ¿cómo realizan esta función? (Dalla Via y col. 2015). Se sabe que las plantas utilizan receptores en la superficie de las células para percibir el ambiente externo inmediato; receptores tipo cinasas (RLKs) están involucrados en las respuestas de desarrollo, así como en estrés biótico y abiótico. La percepción de moléculas microbianas que contienen N-acetilglucosaminas (GlcNAc) por parte de las plantas, involucran receptores cinasas con dominios LysM, los cuales están involucrados en las interacciones simbióticas y patógenas (Bensmihen y col. 2011). El reconocimiento de patógenos está dominado por los

componentes principales de la pared celular de microorganismos, por ejemplo en el reconocimiento de la quitina en los hongos. Los oligosacáridos de quitina, polímeros de GlcNAc unidos por enlaces β -1,4 son fuertes inductores de la respuesta inmune en plantas. Los peptidoglicanos, constituyentes de la pared celular de las bacterias, estructuralmente similares a la quitina, son oligosacáridos con enlaces β -1,4 de GlcNAc y N-acetilmurámico (Zipfel y Oldroyd, 2017). La detección de estas moléculas en la superficie de la pared celular de microorganismos, tienen una función activa durante la infección y en la supresión o inducción de las respuestas de defensa vegetal (Dalla Via y col. 2016).

Para el establecimiento de la fijación simbiótica de nitrógeno se requiere de múltiples pasos de reconocimiento con el intercambio de moléculas señal y complejos programas de desarrollo. Los nódulos, se forman en las raíces de las leguminosas en respuesta a la invasión de las rhizobias, las cuales proliferan dentro de las células vegetales; finalmente las rhizobias se alargan y se diferencian en bacteroides (Larrainzar y col. 2015; Wittenberg, 1974).

Percepción de las plantas por las rhizobias

Las rhizobias pueden existir de forma saprófita en el suelo y pueden percibir moléculas que son exudadas a la rizósfera por las raíces de las leguminosas hospederas (Saeki y col. 2011). En bajas concentraciones de nitrógeno, la planta secreta flavonoides específicos, que son metabolitos secundarios de bajo peso molecular y constan de una cadena de 15 carbonos con dos anillos benceno,

biosintetizados por la vía de fenilpropanoides (Liu y Murray, 2016). Éstos exudados determinan la especificidad de la relación simbiótica. Cada especie de rizobia responde a flavonoides específicos (Ferguson y col. 2010).

Cuando las bacterias perciben los flavonoides, son atraídas hacia la raíz y además inducen la expresión del regulador transcripcional NodD, activando la transcripción de genes *nod*, que participan en la síntesis de los factores Nod (NFs) (Ferguson y col. 2010; Saeki y col. 2011). Los NFs, por su parte, activan diversos procesos de desarrollo en la planta, de forma similar a las hormonas vegetales (**Figura 2**) (Oldroyd y col. 2008).

1.3.4. Percepción de las rizobias por la planta

Los NFs son lipoquitos oligosacáridos que constan de una cadena principal de quitina con un ácido graso unido al grupo N y un enlace al azúcar terminal no reductor. Diversas modificaciones pueden ocurrir en las cuales la longitud y el grado de saturación del grupo de ácidos grasos difiere entre las especies de rizobia (Oldroyd y col. 2008) (**Figura 2**).

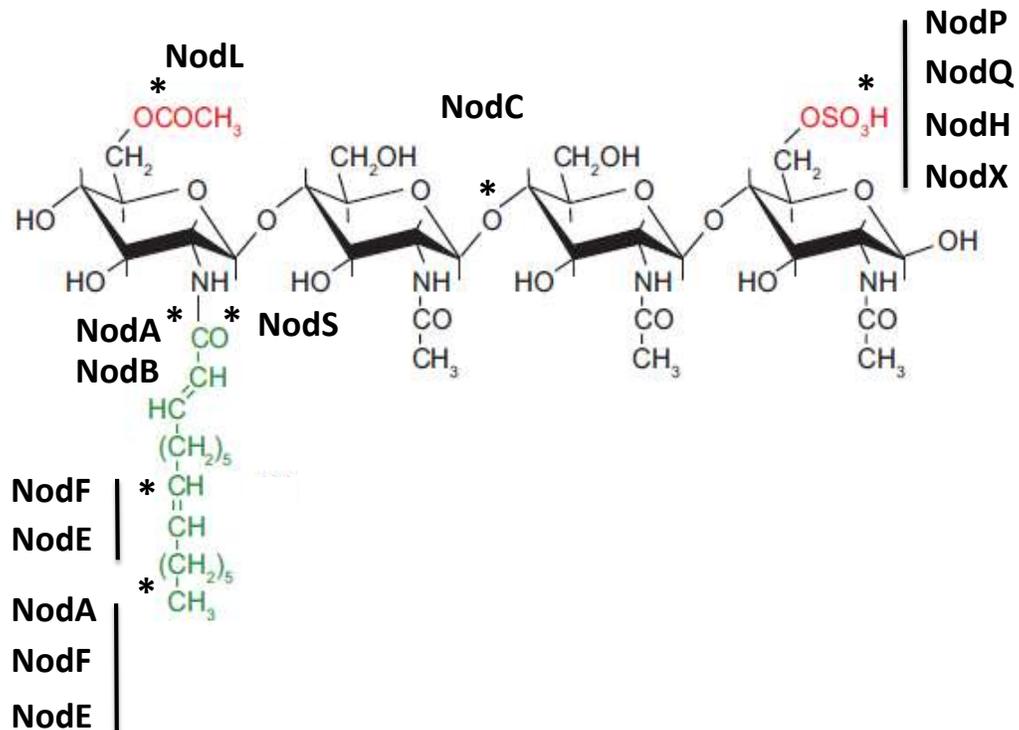


Figura 2. Factor Nod representativo de *Sinorhizobium meliloti*. Se muestra la cadena de residuos de N-acetilglucosamina (negro) con enlaces β 1-4 con grupos acil (verde) y otros grupos funcionales hospedero-específicas (rojo). El producto de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* participan en la síntesis del esqueleto del NF (Modificado de Dalla Via y col. 2015; y de Oldroyd y col. 2008).

Tras la percepción de los NFs ocurren diferentes cambios en la planta hospedera. En segundos, se generan fluctuaciones de los iones Ca^{2+} , H^+ , Cl^- y K^+ lo que conlleva a una despolarización de la membrana y en minutos, las oscilaciones de Ca^{2+} en el citoplasma inducen modificaciones en el citoesqueleto de actina de los pelos radiculares, lo que produce el “encorvamiento” de los mismos e inicia la formación del nódulo (Catoira y col. 2000) **(Figura 3)**.

En *M. truncatula*, los defectos en la percepción de los factores Nod (*NFP*), alteran su interacción con *S. meliloti*, siendo incapaces de producir nódulos (Ben Amor y col. 2003). *NFP* codifica un receptor cinasa con tres dominios extracelulares del motivo lisina (LysM). Se ha revelado que los motivos LysM se unen a las N-acetilglucosamina, los quitosacáridos y al peptidoglicano, por lo que se reconoció a *NFP* como un receptor de NFs (Rival y col. 2012) **(Figura 4)**.

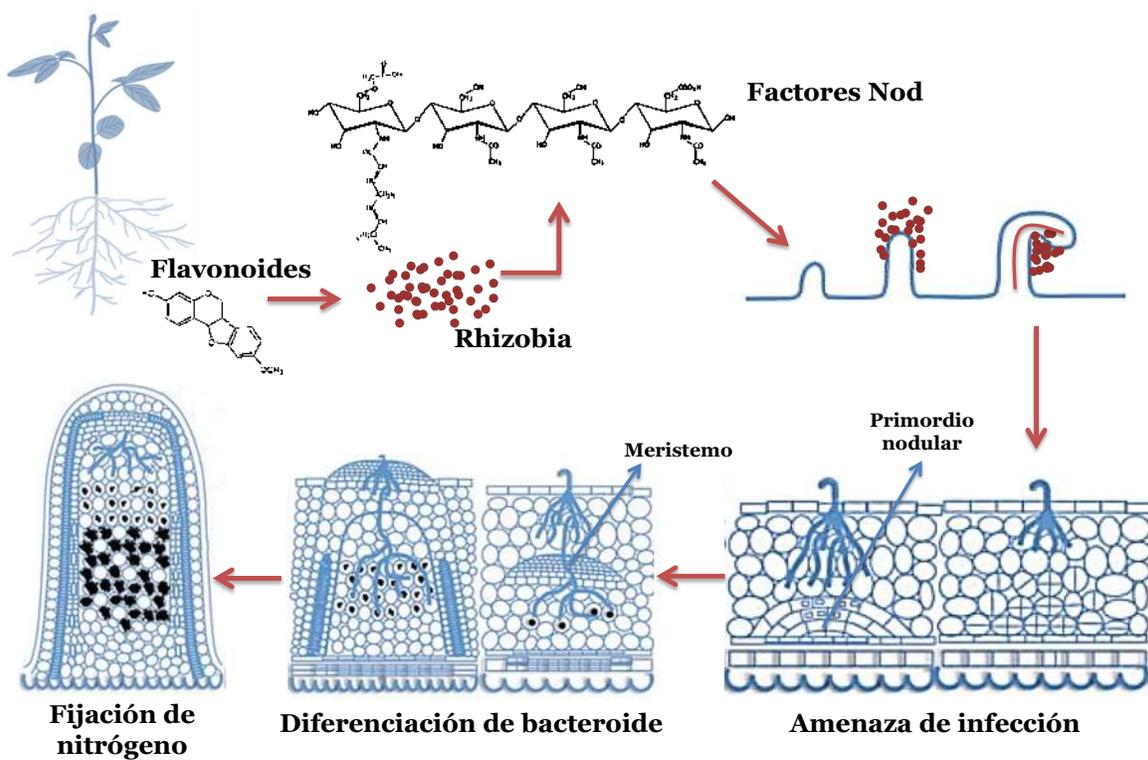


Figura 3. Estadios de desarrollo nodular en leguminosas. Los pelos radiculares emergentes exudan compuestos flavonoides, los cuales atraen a las rhizobias compatibles y estimulan en ellas la producci3n de factores nod (NF). El pelo radicular se deforma y forma una curvatura en la que las rhizobias quedan atrapadas. Los hilos de infecci3n le permiten a la bacteria entrar a los tejidos internos de la planta, comienzan las divisiones celulares en el c3rtex, form3ndose as3 el primordio nodular. Los hilos de infecci3n progresan hacia el primordio y liberan a la rhizobia en gotas de infecci3n, dentro de los cuales se diferencian en bacteroides fijadores de nitr3geno. (Modificado de Ferguson y col. 2010).

En *M. truncatula*, *NFP* controla la vía de señalización de los NFs. Los genes *DMI1*, *DMI2*, *DMI3* (*does not make infection*), *NSP1* y *NSP2* (*nodulation signalling pathway*) actúan río abajo de *NFP* (Arrighi y col. 2006) y son requeridos para la activación de la vía de transducción de señales que desencadena respuestas como la deformación de los pelos radiculares, la expresión de los genes nodulina y las divisiones de las células corticales. Mutaciones en estos genes afectan todas las respuestas a los NFs (Catoira y col. 2000).

DMI1 (canal catiónico putativo) y *DMI2* (receptor cinasa con regiones ricas en leucina repetidas) activan a *DMI3*, que codifica una proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK), requerida para las oscilaciones de Ca^{2+} (Rival y col. 2012).

Las primeras respuestas en las leguminosas frente a las rhizobias ocurren en la epidermis, con la inducción de los genes de nodulación (*ENODs*) (Oldroyd y col. 2008). Por ejemplo, los genes nodulina tempranos *ENOD11*, *ENOD12* y *rip1* se inducen en la epidermis a las dos horas tras la adición de los NFs, mientras que los genes *ENOD20* y *ENOD40* posteriormente en el córtex (Catoira y col. 2000).

La epidermis de la raíz representa la primera barrera a vencer de la rhizobia. Así, la infección y el desarrollo del nódulo están altamente acoplados y son iniciados en las diferentes capas de células de la raíz (Oldroyd y col. 2008) (**Figura 4**).

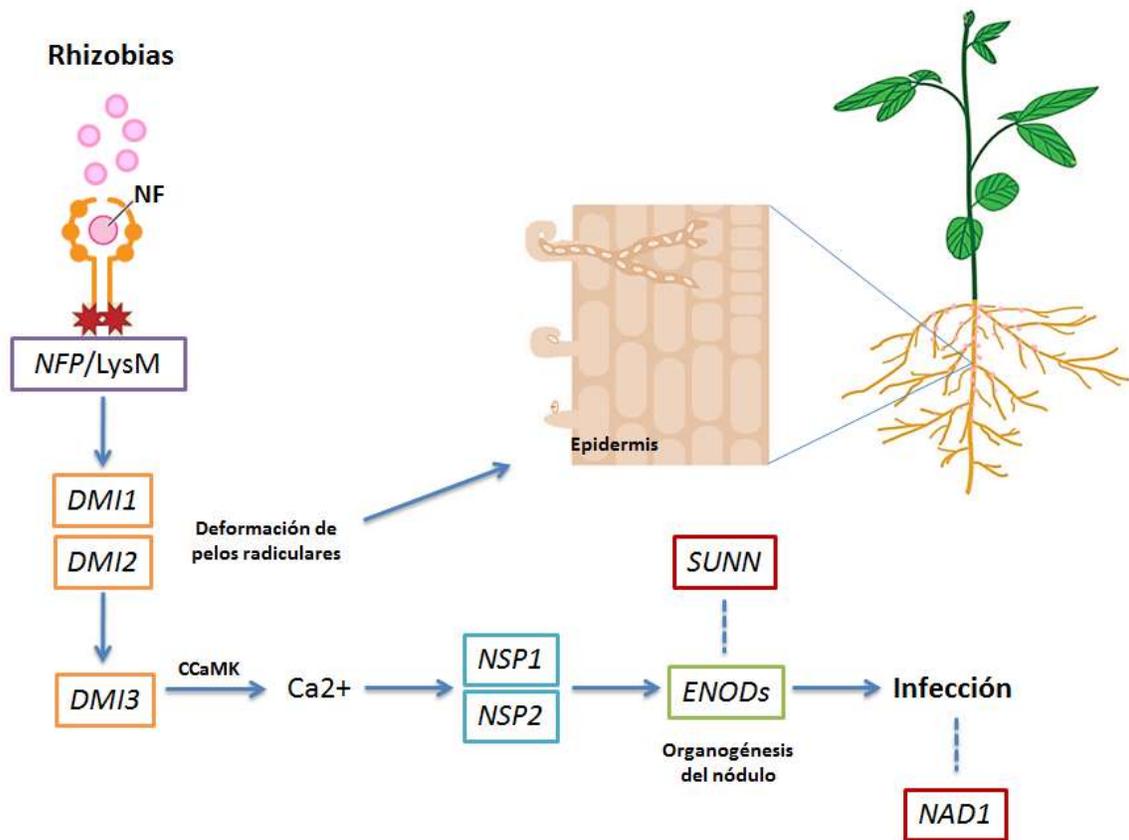


Figura 4. Vía de señalización para la nodulación en *M. truncatula*. Los NFs excretados por las rhizobias son detectados por las células epidérmicas de la raíz que activan el receptor NFP tipo cinasa con motivos LysM. La activación del receptor induce fluctuaciones de Ca²⁺ en las puntas de los pelos radiculares de la raíz, lo que eventualmente resulta en el encorvamiento del mismo y la infección de la rhizobia. También el receptor tipo cinasa DMI2 y el canal nuclear de potasio DMI1 son activos en etapas iniciales en la vía epidérmica y liberan Ca²⁺. Decodificando esta señal, la proteína de unión a calmodulina Ca²⁺ DMI3 activa los factores de transcripción *NSP1* y *NSP2*. Juntos, estos factores de transcripción están involucrados en la activación de genes *ENOD* para iniciar el proceso de infección (Modificado de Mortier y col. 2012; Oldroyd y col. 2008).

1.3.5. Colonización del córtex por las rhizobias y organogénesis del nódulo

Los pelos radiculares tienen un papel importante facilitando la infección bacteriana (Oldroyd y col. 2008) debido a la delgada y menos reticulada pared celular que poseen, permitiendo una mejor penetración de la bacteria (Ferguson y col. 2010).

Las rhizobias unidas a la punta de los pelos radiculares estimulan el desarrollo del nódulo, incluyendo la deformación del pelo radicular en 6 a 8 horas tras el contacto (Ferguson y col. 2010); las bacterias son capturadas en un encorvamiento de los pelos radiculares, formándose unas estructuras tubulares denominadas “hilos de infección” (Saeki y col. 2011). Las células bacterianas proliferan direccionalmente hacia el frente del hilo de infección en crecimiento, por lo que funciona como un puente para las bacterias, el cual va dirigido hacia los tejidos internos de la planta (Ferguson y col. 2010) (**Figura 3**). Así, mientras el hilo de infección crece, las células en el córtex comienzan a dividirse y forman el primordio nodular (Verma y Hong, 1996); cuando los hilos de infección se elongan y atraviesan las múltiples células adyacentes, éstos se ramifican y finalmente llegan al primordio del nódulo (Saeki y col. 2011), donde la síntesis de la pared de este puente se detiene y únicamente permanece la membrana plasmática que lo rodea (Verma y Hong, 1996).

Una vez que el hilo de infección cesa de crecer, las bacterias son liberadas como una gota infectiva en el citoplasma de la célula hospedera mediante un proceso similar a la endocitosis; las rhizobias son rodeadas por una membrana de origen

vegetal denominada membrana peribacteroidal, en conjunto esta estructura tipo organelo se conoce como simbiosoma (Ferguson y col. 2010). Las células bacterianas se alargan, se diferencian en bacteroides e inician el proceso de fijación de nitrógeno en los simbiosomas.

Conforme las endobacterias se diferencian, el DNA del hospedero se replica en las células invadidas sin realizar mitosis, por ello se vuelven células largas y poliploides que guardan cientos de simbiosomas. Los nódulos maduros activamente fijan nitrógeno dependiente de las condiciones ambientales y de desarrollo de la planta y posteriormente entran en senescencia y mueren (Saeki y col. 2011) (**Figura 3**).

1.3.6. Factores que regulan la nodulación

La nodulación es un proceso estrictamente controlado y regulado, debido a que no solo consume energía, sino que también requiere de un control de las bacterias invasoras. Cuando las condiciones ambientales son favorables, las raíces que son susceptibles a la nodulación permitirán a los hilos de infección bacteriana proceder, mientras que en otros será arrestado en el córtex de la epidermis. Además, después de que el primer primordio se forma, el inicio de otros nuevos se inhibirá, restringiendo el número de nódulos (Mortier y col. 2011).

Existen factores externos e internos adicionales que actúan como reguladores negativos en la nodulación; plantas mutantes incapaces de sintetizar o percibir estos factores exhiben un incremento en el número de nódulos. Muchos de estos factores participan en la vía de autorregulación de la nodulación (AON) que

involucra una señalización a larga distancia entre el tallo y la raíz (Ferguson y col. 2010). La activación de AON es iniciada en la raíz durante el desarrollo del nódulo por la síntesis de una molécula señal denominada “Q”. Estudios recientes indican que Q está relacionada a los péptidos CLE; después de la inoculación de la raíz con las rhizobias, esta señal viaja al tallo donde es percibida por el receptor AON LRR RLK el cual posee un dominio cinasa serina/treonina (Ferguson y col. 2010).

Las hormonas vegetales como el ácido abscísico (ABA), el ácido jasmónico (JA), el etileno y el ácido salicílico actúan como reguladores negativos que reprimen la nodulación. La hormona más estudiada al respecto es el etileno, que afecta la percepción de la planta a los NFs (Oldroyd y col. 2008). En *M. truncatula*, la insensibilidad a etileno correlaciona con el incremento en el número de nódulos (Penmetsa y col. 2003). Mutantes hipernoduladoras de *M. truncatula* han permitido la identificación de ortólogos de LRR-RLKs que actúan en AON, como lo es el gen *SUNN* (super numeric nodules) (Mortier y col. 2011). Las mutantes muestran una excesiva infección bacteriana y organogénesis de nódulos, indicando que la autorregulación puede influenciar ambas respuestas, epidérmicas y corticales (Oldroyd y col. 2008).

Los mecanismos moleculares de los eventos simbióticos primarios se conocen bien en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sin embargo, poco se sabe acerca de los genes que funcionan en las etapas tardías de la simbiosis después de que la rhizobia es internalizada en las células del nódulo, desarrollándose en simbiosomas fijadores de nitrógeno (Wang y col. 2016). Al entrar en contacto las rhizobias y la raíz de la planta hospedera, se activa la inmunidad innata similar a

aquella que ocurre en infecciones por patógenos; sin embargo, a diferencia de ella la respuesta es transitoria y regulada durante la infección con rhizobias compatibles. Estas respuestas transitorias incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, de óxido nítrico y la expresión de productos génicos similares a las proteínas asociadas a patógenos (RP) (Saeki y col. 2011).

La supresión de la inmunidad innata del hospedero se requiere para el establecimiento de la simbiosis. Para prevenir la invasión de microorganismos hostiles, las plantas tienen al menos dos barreras de señalización de inmunidad innata: inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PTI) y efectores desencadenantes de inmunidad (ETI) (Chen y col. 2017). Algo asombroso durante la nodulación es que la planta hospedera puede suprimir los mecanismos de defensa para mantener una interacción simbiótica exitosa. Análisis transcriptómicos han revelado que muchos genes relacionados a la defensa y al estrés son regulados a la alza en la leguminosa durante las etapas iniciales de la interacción, pero la mayoría son suprimidos conforme el proceso de simbiosis procede (Saeki y col. 2011).

Se han reportado una serie de plantas mutantes y genes involucrados en las etapas tardías del desarrollo del nódulo y/o el desarrollo y diferenciación del bacteroide en *M. truncatula*. Los nódulos formados en estas mutantes generan una respuesta de defensa tipo defensina, llevando a la muerte celular que es distinguida por la senescencia de los nódulos. El gen *NAD1* (*Nodules with Activated Defense 1*), que codifica un péptido con dos dominios transmembranales, desencadena respuestas tipo defensina, por lo que su función

es importante en el mantenimiento a largo plazo de la endosimbiosis de las rizobias dentro de los nódulos (Wang y col. 2016).

1.3.7. Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)

En el nódulo, el bacteroide cataliza la reducción de N_2 a amonio (NH_4) utilizando el complejo de enzima nitrogenasa, proceso denominado fijación simbiótica de nitrógeno (Ferguson y col. 2010). Todas las rizobias poseen la forma más común de nitrogenasa, molibdeno-nitrogenasa, la cual tiene un alto requerimiento energético con un gasto de 16 moles de ATP por cada N_2 reducido.

La nitrogenasa presenta una extrema sensibilidad y se inactiva en presencia del oxígeno. Para contrarrestar estas limitaciones, las leguminosas proveen a la bacteria endosimbiótica con derivados fotosintéticos y generan dentro de las células del nódulo un ambiente microaeróbico requerido para la fijación de N_2 (Masson-Boivin y col. 2009). Para esto, las plantas poseen hemoglobinas simbióticas y no simbióticas. La inducción de genes vegetales específicos de nódulos, incluyen aquellos que codifican leghemoglobinas simbióticas (Lb) a la par del desarrollo del nódulo (Ott y col. 2005).

Las Lb son proteínas que tienen un núcleo de Fe que regula la tensión de oxígeno en el nódulo (Orozco-Mosqueda y col. 2013a). Éstas se acumulan en concentraciones milimolares en el citoplasma de las células vegetales infectadas durante la fijación de nitrógeno y funciona como amortiguador que abate al oxígeno, evitando la inactivación de la nitrogenasa (lábil al oxígeno), mientras que mantiene un flujo alto del mismo para el proceso de respiración celular (Ott y col.

2005). La presencia de Lb en los nódulos les confiere una coloración rosada-rojiza en ausencia de Lb los nódulos son blancos e incapaces de fijar nitrógeno (**Figura 5 A y B**).

También se ha documentado que diversas alteraciones en la capacidad de fijar nitrógeno en los nódulos también conducen a una coloración blanquecina en estos órganos (Veerappan y col. 2016; Wang y col 2016) (**Figura 5 C y D**). Como se mencionó, el proceso de nodulación es demandante para la planta, tanto en la formación del nódulo, como en la energía y el carbono requerido para la reducción del N₂. Las plantas controlan esto utilizando cualquier fuente de nitrógeno preferentemente, y después cuando no hay más disponible, restringe la actividad del nódulo al mínimo necesario para su crecimiento (Liese y col. 2017). Sin embargo, diferentes factores ambientales influyen en la infección bacteriana y el desarrollo del nódulo, incluyendo el tipo de suelo donde las plantas crecen, altos niveles de pH, y bajas concentraciones de hierro (Fe). La disponibilidad de hierro en el suelo determina la capacidad de los simbioses para formar nódulos funcionales, debido a las enzimas bacterianas responsables de la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN), la nitrogenasa y la Lb, que contiene altas concentraciones de hierro (Orozco-Mosqueda y col. 2013a; Valencia-Cantero y col, 2006).

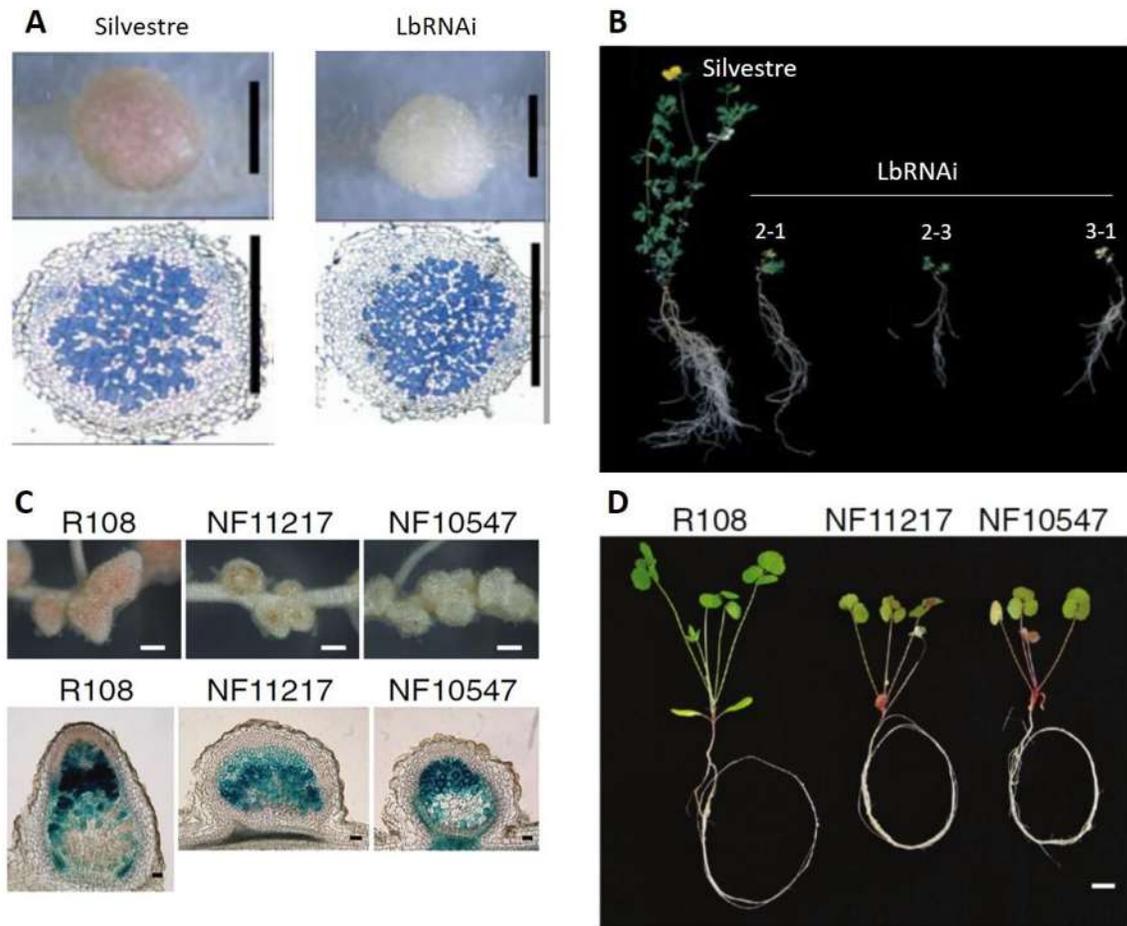


Figura 5. Coloración de nódulos funcionales y no funcionales de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*. **A** Nódulos de plantas de líneas silvestres de *L. japonicus* e incapaces de producir Lb (LbRNAi), **B** plantas de *L. japonicus* silvestres e incapaces de producir Lb crecidas durante 10 semanas en sustrato carente de nitrógeno, **C** nódulos de plantas de *M. truncatula* silvestre (R108) y de líneas mutantes incapaces de fijar nitrógeno (NF11217 y NF10547), **D** plantas de *M. truncatula* crecidas por 10 d sin nitrógeno. Los nódulos funcionales capaces de derivar nitrógeno a las plantas tienen una coloración rojiza, mientras que los nódulos no funcionales tienen una coloración blanca. Tomado de Ott y col. 2008 y Veerappan y col. 2016.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arthrobacter* y sus propiedades de fitoestimulación

Los miembros del género *Arthrobacter* son bacterias Gram positivas, con forma de bastón en su fase exponencial de crecimiento y forma de coco en su fase estacionaria; son capaces de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias y pertenecen al Phylum *Actinobacteria*. Diferentes especies de *Arthrobacter* producen de enzimas importantes para la industria y para la estimulación del crecimiento vegetal, denotando su importancia para la agricultura y la biotecnología (Singh y col. 2016).

En plantas que crecen en suelos salinos, en sequía, contaminados y con bajo contenido de nutrientes, especies de *Arthrobacter* ejercen efectos benéficos al proteger del estrés abiótico y mejorar la nutrición, la salud y el rendimiento de las mismas (Krishnan y col. 2016). Por ejemplo, se ha evaluado la tolerancia a la salinidad en plantas de guisantes mediante la reducción de los niveles de etileno a través de la inoculación de cepas de *A. protophormiae*; estas bacterias también promueven el crecimiento de las plantas mejorando su colonización por otras bacterias benéficas como *Rhizobium leguminosarum*, la colonización tripartita actúa sinérgicamente para inducir un mecanismo contra el estrés salino (Barnawal y col. 2014).

2.2. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por *Arthrobacter agilis* UMCV2

Arthrobacter agilis UMCV2 es una PGPRs aislada de la rizósfera de plantas de maíz (Valencia Cantero y col. 2007), que promueve el crecimiento de plantas de *M. sativa*, *M. truncatula*, *Shorgum bicolor* y *Pinus devoniana* (Castulo-Rubio y col. 2015; Montejo-Mayo y col 2016; Orozco-Mosqueda y col 2013; Velázquez–Becerra y col 2011), mediante i) la reducción del Fe (III) a Fe (II) en la superficie de la raíz, lo que se traduce en aumento de disponibilidad del metal y un incremento en el contenido de hierro y clorofila (Valencia-Cantero y col. 2007) (**Figura 6**); ii) la adquisición y homeostasis de hierro; iii) modulación de la morfogénesis que conduce a un aumento en el número de raíces laterales y desarrollo acelerado de brotes y iv) un aumento en la tasa de germinación (Montejo-Mayo y col 2016). Adicionalmente se conoce que *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar de manera endofítica a *M. truncatula* (Aviles-Garcia y col. 2016) al tiempo que enciende las vías de resistencia sistémica inducida (ISR) y adquirida (SAR) de esta leguminosa (Mentejano-Ramirez y col. 2018), por lo que se infiere, *A. agilis* UMCV2 también podría promover el crecimiento vegetal de manera indirecta al reducir el daño de las plantas por patógenos

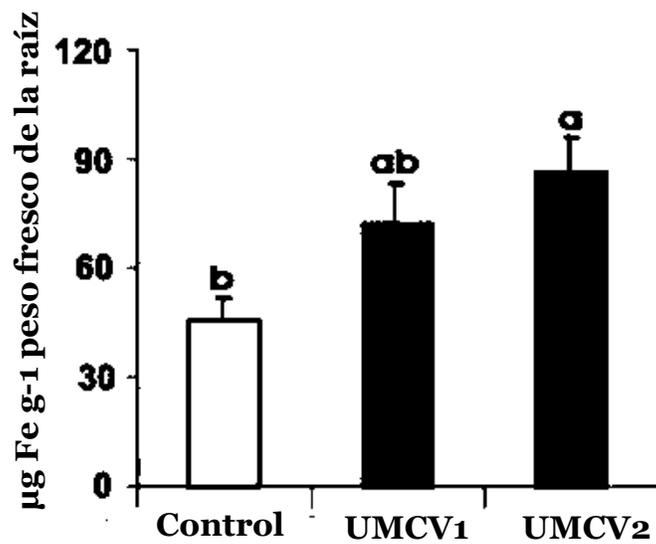


Figura 6. Efecto de la inoculación bacteriana en el crecimiento y el contenido de hierro en plantas de frijol en suelo alcalino. Las plantas de frijol fueron inoculadas y crecidas por 12 d en suelo alcalino estéril con *Bacillus megaterium* UMCV1 y *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero y col. 2007).

La adquisición de hierro, la modulación de la morfogénesis y el aumento en la tasa de germinación están mediados por la emisión del compuesto orgánico volátil (VOC, por sus siglas en inglés) dimetilhexadecilamina (Castulo-Rubio y col. 2015; Montejo-Mayo y col 2016; Orozco-Mosqueda y col 2013; Velázquez –Becerra y col 2011).

2.3. La dimetilhexadecilamina (DMHDA) como molécula señal en plantas

En estudios anteriores del grupo de trabajo, se identificó la molécula dimetilhexadecilamina (DMHDA), un VOC estructuralmente relacionado a las *N*-acil-*L*-homoserina lactonas (AHLs) bacterianas (**Tabla 1**).

La DMHDA modula el crecimiento bacteriano y vegetal, indicando que este componente pudiera tener una función en procesos celulares de ambos organismos (Velázquez-Becerra y col. 2011).

Tabla 1. VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2.

Compuestos	Cantidad de compuestos volátiles normalizado (%)^a	
	A. agilis NA	A. agilis LB
Etanol	0	1.7
3-Metil 1-butanol	0	2.3
2,5-Dimetil pirazina	23.57	0
4-Etil 1,2,4-triazol	0	8.7
Ácido acético	13.48	0.6
1-Octanol	0	0.3
Hexadecano	0	1.1
Hexilisobutanoato	0	6.2
1-(2-Hidroxi-1-metiletil)-2,2-dimetilpropil 2-metilpropanoato	0	4.5
Hidroxitolueno butilado	0	43.6
Dimetilhexadecilamina	2.14	0.8
2,4,6-Cicloheptatrien-1-ona	0	1.6
3-Metil quinolina	10.6	0.8
2,4-Di-tertbutinil-fenol	50.2	0

Tomado de Velázquez-Becerra y col. (2011)

La adición del DMHDA al medio de cultivo de *M. sativa* y *M. truncatula*, crecidas *in vitro* tiene un efecto que varía con la concentración, a 8 μM del compuesto se estimula el crecimiento de la parte aérea, mientras que concentraciones superiores a 16 μM inhibe el crecimiento de los brotes e incrementan la densidad de raíces laterales (Velázquez-Becerra y col 2011) (**Figura 7**). Las plantas expuestas a DMHDA también incrementan la actividad de la enzima férrico-quelato reductasa radicular y la acidificación rizosférica y muestran una mejoría en su estado nutricional por hierro (Orozco-Mosqueda y col. 2013b).

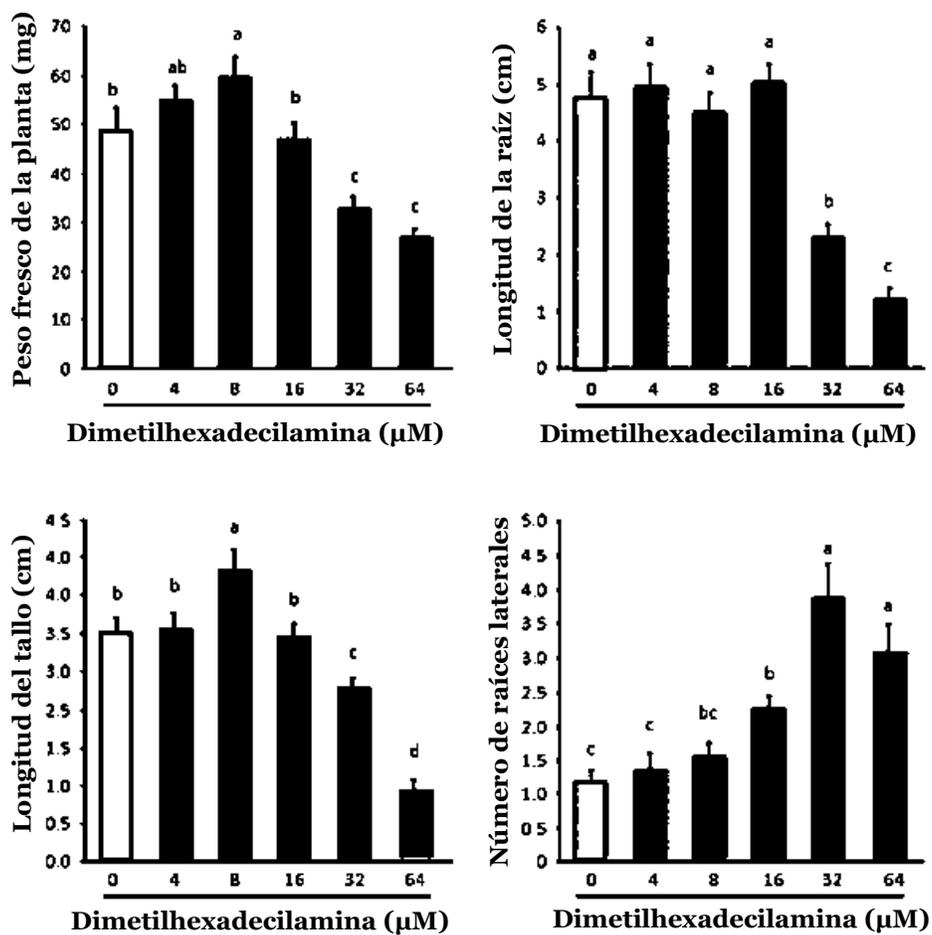


Figura 7. Efecto de la DMHDA en el crecimiento de *M. sativa*. Semillas de *M. sativa* fueron germinadas y crecidas en la superficie de cajas de agar suplementadas con medio Hoagland adicionándose concentraciones crecientes de DMHDA. Las plantas fueron cosechadas a los 6 días de crecimiento. Tomado de Velazquez-Becerra y col. 2011.

2.4. Efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de *Medicago sativa* por *Sinorhizobium meliloti* 1021

Anteriormente se ha estudiado el efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de leguminosas. Plantas de *Medicago sativa* han sido inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *A. agilis* UMCV2 para formar una interacción tripartita *in vitro*, encontrándose que la inoculación de *A. agilis* UMCV2 produjo un incremento en el número y peso de los nódulos formados en las plantas cuando éstas fueron crecidas en medios con hierro insoluble (**Figura 8**). La presencia de *A. agilis* UMCV2 fue detectada en los nódulos por qPCR (Onofre-Ortega 2013). Lo anterior plantea la posibilidad de que *A. agilis* UMCV2 haya estimulado la nodulación al promover la absorción de hierro en las plantas, sin embargo, otras posibilidades son que *A. agilis* UMCV2 tenga efecto sobre las vías de señalización que dan inicio a la nodulación, incida sobre la organogénesis del nódulo o bien regule la senescencia de los nódulos.

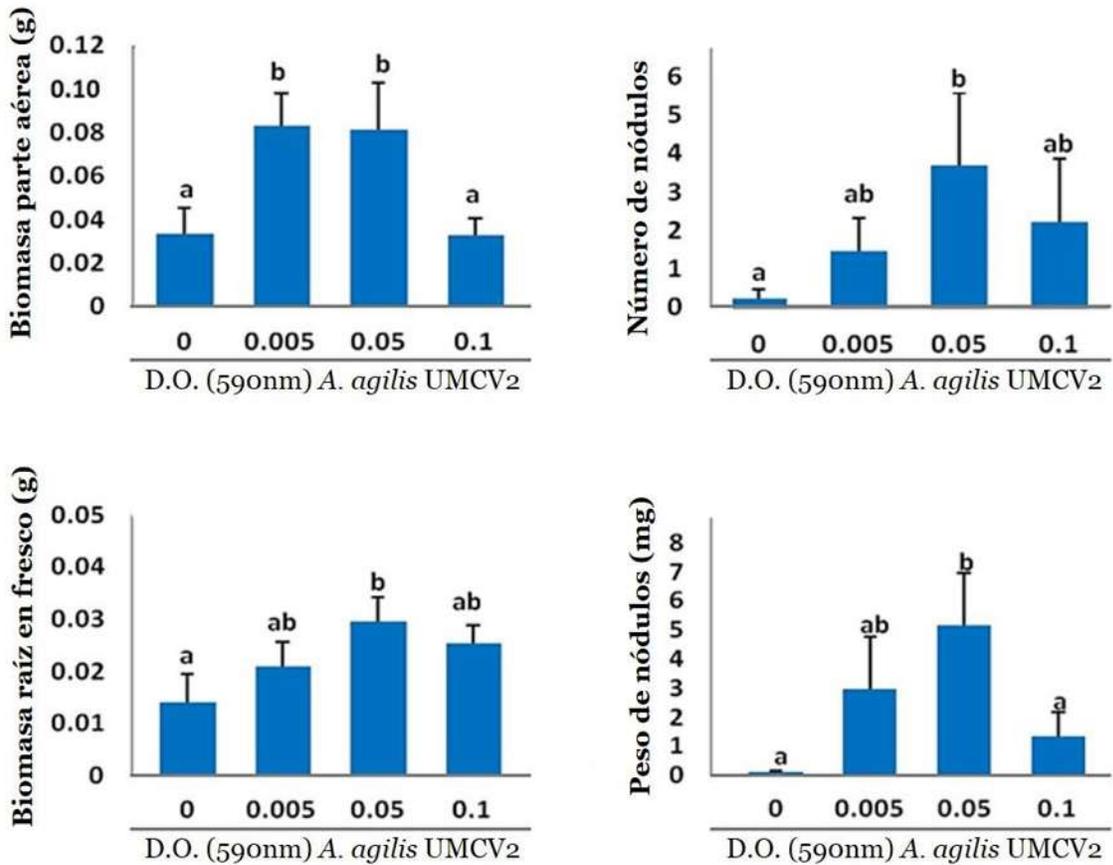


Figura 8. Efecto de la inoculación de *A. agilis* UMCV2 en el crecimiento y la nodulación de *M. sativa*. Plantas de *M. sativa* fueron crecidas en medio de nodulación Fåhræus y utilizando ferrihidrita [Fe(OH)₃] 50 µM, como fuente de hierro. Plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* 1021 fueron inoculadas con 30 µL de suspensiones de *A. agilis* UMCV2 con diferentes densidades ópticas (590 nm). Las plantas fueron cultivadas *in vitro* por 25 d antes de medirse los parámetros que se grafican. Tomado de Onofre-Ortega, 2011.

3. JUSTIFICACIÓN

Arthrobacter agilis UMCV2 es una bacteria endófitas que induce el crecimiento de las plantas, a través de la emisión del compuesto orgánico volátil DMHDA y mejora el crecimiento y la formación de nódulos en plantas de *M. sativa*. Sin embargo, se desconoce si la nodulación de *M. truncatula* y la funcionalidad de sus nódulos son favorecidos por *A. agilis* UMCV2 o su compuesto dimetilhexadecilamina; si el efecto es dependiente exclusivamente de la disponibilidad de hierro para la planta y si el efecto de *A. agilis* UMCV2 impacta de manera general en el proceso de nodulación o de forma particular en el reconocimiento rhizobia-leguminosa; en la organogénesis del nódulo o en el mantenimiento del nódulo.

4. HIPÓTESIS

Arthrobacter agilis UMCV2 estimula la nodulación en *Medicago truncatula*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

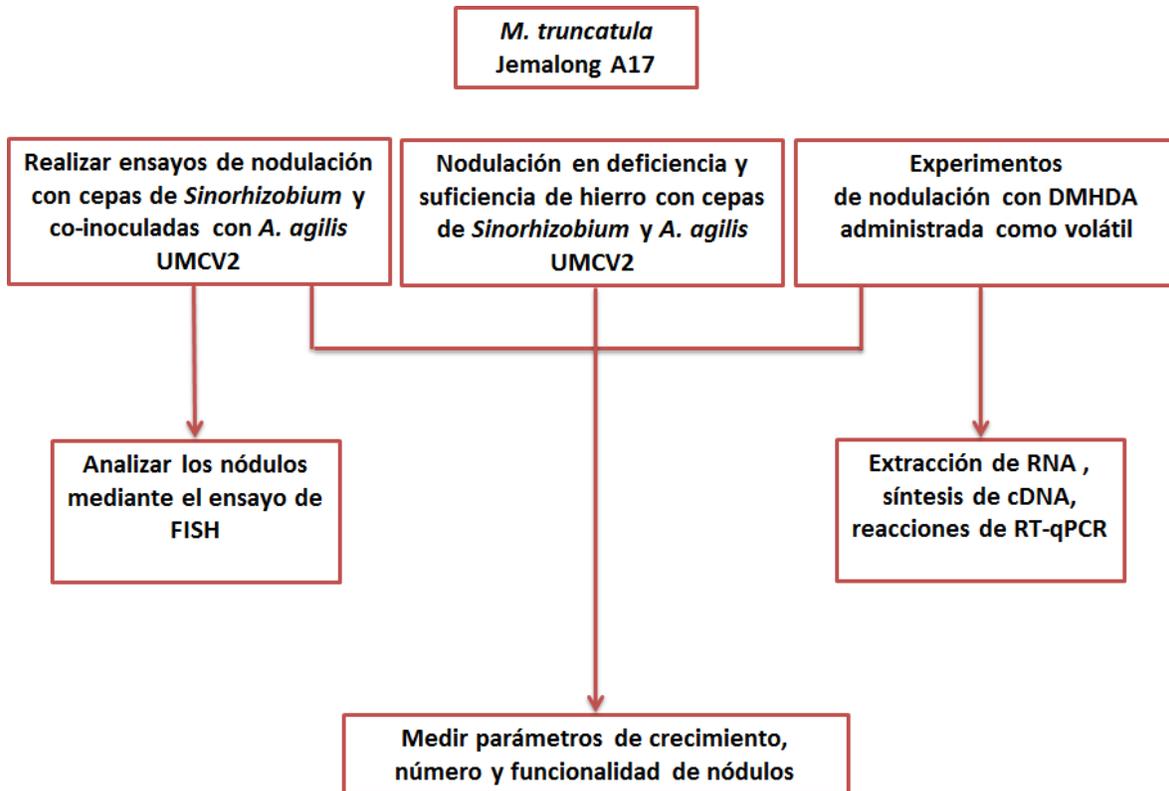
Caracterizar el efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 y de la dimetilhexadecilamina en el proceso de nodulación de *Medicago truncatula*.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de *A. agilis* UMCV2 en el establecimiento de la nodulación *M. truncatula*-*Sinorhizobium* spp.
2. Determinar el efecto de *A. agilis* UMCV2 en la formación de nódulos de *M. truncatula* en condiciones de limitación de hierro.
3. Analizar el efecto de la dimetilhexadecilamina en las distintas etapas de la nodulación de *M. truncatula* por *Sinorhizobium* spp.
4. Caracterizar la capacidad de *A. agilis* UMCV2 para colonizar tejidos de *M. truncatula* nodulada por cepas de *Sinorhizobium*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.2 Medios de cultivo

Se emplearon los siguientes medios de cultivo: Medio Fåhraeus modificado por Vincent (1970) con la composición: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM, KH_2PO_4 0.7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mM. Micronutrientes 0.1 $\mu\text{g/L}$ MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , Na_2MoO_4 ; medio MS (Sigma-Aldrich catálogo: M5519-50L) adicionado con sacarosa 6 g/L; Agar PY: peptona de caseína 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, CaCl_2 1.11 g/L, agar bacteriológico 15 g/L (Noel y col 1984); y agar nutritivo: peptona de caseína 5 g/L, extracto de carne 3 g/L, agar bacteriológico 15 g/L (Gordon y col. 1954). En el caso de los medios Fåhraeus y MS se agregaron 6 g/L de agar para plantas (Phytotechnology Laboratories Cat A111) para obtener medios sólidos cuando fue necesario

6.3 Material biológico

En el presente trabajo se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *A. agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero y col. 2007), *S. meliloti* cepas 1021, 2011 (Krol y Becker 2004) y GR4 (Casadesús y Olivares 1974;) *S. medicae* cepas UMAC1, UMAC2, UMAC3 y UMAC4 (presente trabajo).

También se emplearon plantas y semillas de *M. truncatula* Jemalong A17 de la colección del laboratorio de Ecología Microbiana IIQB-UMSNH (Orozco Mosqueda y col. 2013).

6.4 Desinfección de nódulos y aislamiento de cepas silvestres

Las plantas de *Medicago* sp fueron colectadas de los jardines del Campus central de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Morelia Michoacán México (19°41'14.05" N, 101°12'15.78" O). Se inspeccionaron las raíces en busca de nódulos, mismos que se extrajeron. Se colocaron 5 nódulos en un vial de 1.8 mL. Se adicionó etanol al 70% durante 5 min, pasado este tiempo se enjuagaron los nódulos con agua estéril para después agregar blanqueador (hipoclorito de sodio) al 20% por 8 min; posteriormente se enjuagaron los nódulos cinco veces con agua destilada estéril con agitación vigorosa en un vórtex en cada lavado. Se trituraron los nódulos, en un mortero y se agregaron 500 µL de agua estéril. Se tomaron 100 µL del triturado y se sembraron en cajas Petri con medio PY. Las cajas se incubaron a 30°C durante 3 d y finalmente se seleccionaron cuatro colonias que mostraron una morfología colonial diferente, se sembraron las colonias por separado, a las mismas condiciones, y se les denominaron UMAC1, UMAC2, UMAC3 y UMAC4.

6.5 Caracterización molecular de los aislados bacterianos

Se extrajo el ADN genómico bacteriano empleando el método de Mahuku (2004). Se tomó una asada del cultivo bacteriano, se colocó en un vial con 300 µL de amortiguador TES (0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5 M NaCl y 1% SDS) y se lisaron las células dando 15 min en vórtex. Posteriormente se adicionaron 200 µL de TES conteniendo Proteinasa K (concentración final de 50 µg/mL) se dio un pulso de vórtex y se incubó en un bloque térmico ThermoMixer

f1.5 (Eppendorf) a 65°C por 30 min. Transcurrido el tiempo se adicionó 0.5 mL de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló y se mantuvieron las muestras en hielo durante 10 min posteriormente se centrifugó a 20800 g/15 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo al que se adicionó 1 mL de Isopropanol frío, dejando reposar a -20°C por 2 h para después centrifugar a 20800 g/10 min. Se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 800 µL de etanol frío al 70% agitando en un vórtex por 15 s. Se centrifugó nuevamente a 20800 g/3min y se decantó el sobrenadante. Finalmente se secó la pastilla a 37°C, se resuspendió con 50 µL de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

El ADN obtenido se empleó para amplificar por PCR el gen ribosomal de 16S empleando los oligonucleótidos FD1 y RD1 como se ha descrito previamente (Valencia-Cantero y col. 2007). Los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % para ser visualizados y revisados. Los amplicones obtenidos se secuenciaron comercialmente por la empresa Macrogen (Seúl Corea del Sur).

Con la secuencia obtenida de la secuenciación y distintas secuencias obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) de genes ribosomales de 16S de bacterias del orden Rhizobiales, se construyó un árbol filogenético empleando el programa Mega 6.0 (Tamura y col. 2013) con el algoritmo de máxima parsimonia y un soporte de nodos por el método de “bootstraps” calculados con base en 1000 pseudorepeticiones.

6.6 Desinfección de semillas de *M. truncatula*

La desinfección de semillas se realizó de acuerdo al método descrito por Orozco-Mosqueda y col. (2013). Se colocaron semillas en viales de 1.8 mL y se adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado, se agitó durante 8 min; posteriormente las semillas se enjuagaron tres veces con 1 mL agua desionizada, descartando el sobrenadante en cada lavado. Se agregó 1 mL de blanqueador (hipoclorito de sodio) al 12% y se agitó durante 2 min en vórtex, finalmente se realizaron cinco lavados con 1 mL de agua desionizada.

6.7 Esterilización de sustrato Pro-Mix

Se empaquetaron aproximadamente 2 kg de sustrato peat moss marca Pro-Mix (Premier Horticulture LTD, Av. Premier Rivière-du-Loup, Quebec, Canadá, G5R 6C1) en bolsas de polipapel, agregando 50 mL de agua antes de sellar la bolsa. Las bolsas se sometieron a 120 °C y 15 psi durante 1 hora una vez al día por tres días consecutivos.

6.8 Ensayos de inoculación y co-inoculación de *M. truncatula* con *Sinorhizobium* spp y *A. agilis* UMCV2

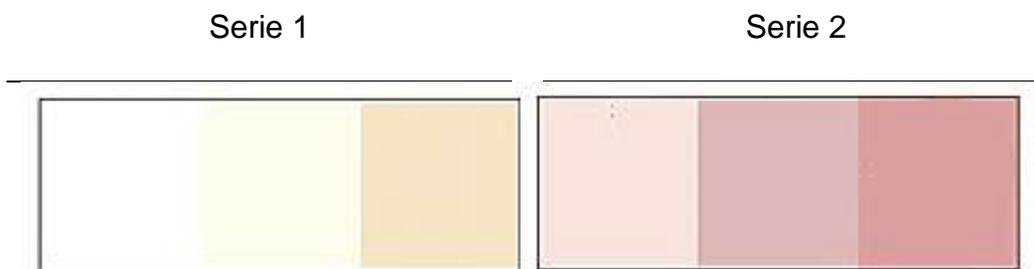
Se sembraron las diferentes cepas de *Sinorhizobium* previamente mencionadas, en medio PY a 30°C y *A. agilis* UMCV2 en agar nutritivo durante dos d. Las semillas de *M. truncatula*, previamente desinfectadas, se dejaron vernalizar por tres d a 4°C en cajas Petri con agar Fåhraeus en oscuridad. Posteriormente se colocaron a una cámara de crecimiento a 22°C, con un fotoperiodo de 16/8 h

luz/obscuridad para su germinación durante tres d. Se llenaron macetas con 170 g (ensayo en invernadero) o bien 100 g (ensayos en cámaras de crecimiento) de sustrato esterilizado y se trasplantaron tres plántulas recién germinadas por maceta.

Para generar indisponibilidad de hierro para las plantas, se adicionó CaO según la metodología descrita por Kim y col. (2006) con ligeras modificaciones; se mezclaron 2.213 g CaO/Kg de sustrato húmedo, posteriormente se esterilizó el sustrato y se determinó el pH con un potenciómetro, obteniéndose un pH de 7.5. El pH del sustrato sin tratar con CaO también se midió, encontrándose un pH de 5.0.

Para preparar los inóculos bacterianos, se tomó una asada de las cepas bacterianas y se resuspendieron en 4 mL de agua desionizada estéril, se realizaron diluciones para obtener una densidad óptica (D.O.) medida a 595 nm de 0.05. Finalmente se inocularon las plántulas con 100 μ L sobre el inicio de la raíz, con las bacterias de interés.

Las plantas se cultivaron durante dos meses en condiciones de invernadero en riego constante con medio Fåhræus o bien se cultivaron en cámaras de crecimiento por distintos tiempos en función del experimento. Después del periodo de cultivo, se midieron los parámetros de crecimiento de las plantas: peso fresco de los brotes, de la raíz y de los nódulos en una balanza analítica y se contaron los nódulos en las raíces. Los nódulos se clasificaron como nódulos rosas o nódulos blancos de acuerdo con la siguiente escala de color.



Los nódulos comparados con los colores de la serie 1 fueron considerados blancos, mientras que los nódulos comparados con los colores de la serie 2 fueron considerados rosas.

6.9 Efecto de la DMHDA en la nodulación de *M. truncatula*

Se llenaron macetas con 170 g de sustrato esterilizado y humedecido a capacidad de campo, al cual se adicionó DMHDA a la concentración final de 0 (control) 1, 2, 4, 8, y 16 molal de sustrato húmedo. El sustrato húmedo adicionado con DMHDA fue vigorosamente homogenizado en cada maceta antes de ser utilizado para transferir tres plántulas de *M. truncatula* inoculadas con cepas de *Sinorhizobium* spp como se describió en la sección anterior. Las plántulas se cultivaron en cámara de crecimiento durante 21 d más, antes de ser cosechadas y registrados los parámetros de crecimiento y nodulación.

6.10 Ensayo de inducción de plántulas con DMHDA aplicado como compuesto volátil

Plántulas de *M. truncatula* de 4 d de germinadas fueron trasferidas a macetas (tres plántulas por maceta) con sustrato esterilizado y cultivadas por 7 d en cámara de

crecimiento. Al término de este tiempo, dentro de las macetas se incluyó un vial abierto con 100 μ L de DMHDA 10 μ M usando etanol como solvente de manera que la DMHDA solo pudiera entrar en contacto con la planta al volatilizarse; las macetas fueron cubiertas con un vaso plástico transparente invertido de 200 mL para construir un sistema cerrado de compartimentos separados. También se incluyó un tratamiento con plantas que al momento de transferirse a las macetas se inocularon con *S. medicae* UMAC4 pero que fueron expuestas solamente al solvente y plantas no inoculadas expuestas solamente al solvente (Control).

Después de 48 h de cultivo en cámara de crecimiento, las plantas se cosecharon y las raíces de las plántulas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización para extracción de RNA.

6.11 Extracción de RNA de la planta

En un mortero se maceró el tejido congelado con nitrógeno líquido para después colocarlo en viales de 1.8 mL; se agregó 1 mL de trizol (Sigma-Aldrich) por cada 50-100 mg de tejido. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de trizol. Se cerraron los viales de forma segura, se agitaron manualmente por 15 s y se incubaron 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12, 000 x g durante 15 min a 4°C. Se colectó la fase acuosa por pipeteo y se colocó en un vial nuevo. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de isopropanol al 100% a la fase acuosa y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12, 000 xg por 10 min a 4°C hasta la formación de una pastilla en el fondo del tubo. Tras desechar el sobrenadante, la pastilla de RNA fue lavada dos

veces con 1 mL de etanol al 75%, centrifugando a 7500 xg por 5 min a 4°C en cada lavado. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 10 min antes de resuspenderla en 50 µL de agua libre de RNAsa pipeteando varias veces. Finalmente se aplicó el siguiente tratamiento de DNAsa para cada muestra: se les agregaron 5 µL del buffer de reacción 10X DNAsa I, 4.5 µl de agua dietil pirocarbonato (DEPC) y 0.5 µL de la enzima DNAsa I. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente y finalmente se inactivó la DNAsa adicionando 1 µL de 25 mM EDTA a la mezcla, misma que se incubó 10 min a 65°C. Las muestras se guardaron a -70 °C hasta la síntesis de cDNA.

6.12 Síntesis de cDNA

Una vez extraído y purificado el RNA, se emplearon 250 ng de la muestra para sintetizar cDNA empleando el kit comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Se mezcló la muestra delicadamente y luego se centrifugó antes de utilizarla. En un vial se adicionó a la muestra de RNA 10 mM dNTP Mix, Oligo(dT) Primer 2 mM, agua DEPC. La mezcla (RNA/oligo) se incubó a 65°C por 5 min, y posteriormente se colocó en hielo por al menos 1 min. En un tubo por separado, se agregaron los siguientes compuestos en el orden indicado: 10x buffer RT, 25 mM MgCl₂, 0.1 MDTT, RNAsa “out” (40 U/µl). Se agregaron 8.5 µl del mix a cada mezcla RNA/Oligo, mezclando gentilmente y posteriormente se colectó por centrifugación breve. Se incubaron las muestras a 42°C durante 2 min, después se agregaron 0.5 µL de enzima SuperScript II RT a cada tubo y se dejó incubar a 42°C por 50 min. La reacción se terminó incubando a 20°C por 15 min y

se dejó enfriar en hielo. Finalmente, la reacción se colectó por centrifugación breve y se agregaron 0.5 μ L de RNAsa H a cada tubo incubando por 20 min a 37°C.

6.13 Cuantificación relativa de genes por tiempo real

La expresión relativa de los genes *DMI1*, *SUNN*, *NAD1* y *NFP* se realizó por RT-qPCR de la siguiente manera: Se realizaron diluciones 1:5 del cDNA, las cuantificaciones de la concentración del templado inicial se realizó por el método $\Delta\Delta$ CT (Puckette y col. 2008) utilizando la actina como gen endógeno control. El qPCR se realizó utilizando el kit iQ SYBR-Green (Applied Biosystems) como se indica a continuación: para una reacción de 20 μ l, se agregaron 10 μ l de Master mix, 0.5 μ l de 10 μ M de los oligos directo y reverso, 5 μ l del cDNA templado (20 ng/ μ l en la primera dilución) y 4 μ l de agua. Las muestras se corrieron y analizaron usando el equipo Applied Biosystems Real-Time PCR con el protocolo de ciclamiento de 95°C por 10 min, seguido de 95°C por 15 s, después 61.0°C durante 30 s, por 40 ciclos; para la curva de disociación las condiciones fueron 95°C por 15 s, 61.0°C por 1 min, y luego se aumentó la temperatura a 95°C durante 15 s. El ciclo umbral (Ct) los valores de actina se restaron de los valores de Ct de las muestras de control (Δ Ct), y los valores medios de Ct de las diferentes muestras de tratamiento se restaron del valor medio de Δ Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (Livak y Schmittgen 2001).

Los oligonucleótidos utilizados en el tiempo real fueron diseñados en el programa computacional <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> con base en la secuencia reportada de cada gen (**Tabla 2**) generándose diferentes oligonucleótidos posibles; y la página http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html que muestra de forma *in silico* el producto de PCR predicho

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Gen	Oligos	Secuencias (5'-3')	Longitud de amplicón	Referencia
<i>DMI1</i>	FMtDMI1-qF	CTCAAGGTATTACTGATTGCACCC	142 pb	Este trabajo
	RMtDMI1-qR	CCGTTACGGGAACAAAAATCA		
<i>DMI2</i>	FMtDMI2-qF	TGGACCCCTTTTGAATGCCTATG	148 pb	Este trabajo
	RMtDMI2-qR	TCCAATCCAATCTCCAATGCTTC		
<i>SUNN</i>	FMtSUNN-qF	GGGTTTTGAGTAGTACTGCTATTG	142 pb	Este trabajo
	RMtSUNN-qR	AGCACCATCCTCTCTCGTAT		
<i>NAD1</i>	MtNAD1-qF	TCAAGAAGTGTGTGGGCAG	126pb	Wang y col. 2016
	MtNAD1-qR	GCAATCTTGGTGCTACTTTGG		
<i>NFP</i>	FMtNFP-qF	TGCTTACATCTTTATGTGTGGAGT	124 pb	Este trabajo
	RMtNFP-qR	GCAGCTTACAATCACTTTACCGA		

6.14 Ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para observar la distribución de *A. agilis* UMCV2 en nódulos de *M. truncatula*

Se empleó el protocolo de hibridación descrito por Roller y col 1994, con modificaciones mínimas. Se recolectaron 5 nódulos y se colocaron en un vial de 1.5 mL. Para minimizar la autofluorescencia de las muestras, se transfirieron a un vial con 500 μ L de H₂O₂ al 30% a temperatura ambiente hasta su completa clarificación por 30 min. Se acidificaron las muestras en una inmersión rápida en HCl 10% y se realizaron 3 enjuagues con agua desionizada.

Posteriormente se realizan los cortes delgados de aproximadamente 0.5 a 1 mm de los nódulos. Los discos clarificados se colocaron en portaobjetos cubiertos en poli-L-lisina y se fijaron con gliceraldehído al 4% por 150 min. Los discos fijados se secaron en PBS (solución de buffer de fosfatos) en un horno a 46°C por 10 min y se deshidrataron sucesivamente en etanol al 50, 80 y 100% por 3 min en cada solución. Después de la evaporación del etanol, los especímenes se sometieron a una hidratación. Se colocaron 30 μ L de buffer de hibridación en los especímenes secados, conteniendo 10 ng de las sondas: Actinobacterias 5' Verde de rodaminaTM-X (NHS Ester) TAT AGT TAC CAC CGC CGT (Roller et al., 1994), dirigida específicamente contra el ARN ribosomal 23S de actinobacterias y cuya fluorescencia es verde (longitud de onda de excitación y emisión: 502 y 527 nm, respectivamente); α -proteobacterias 5' rojo de rodaminaTM-X (NHS Ester) GGT AAG GTT CTG CGC GTT 3' dirigido contra el 16S de α -proteobacterias (longitud

de onda de excitación y emisión: 570 y 590 nm respectivamente) y se incubaron en la oscuridad en cámara húmeda toda la noche a 48°C. Después de la hibridación, se lavaron con buffer de lavado (NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9, EDTA 5 mM y SDS 0.01%), precalentado (48°C), durante 30 min a 48°C. Los portaobjetos se enjuagaron con agua destilada y se almacenaron en la oscuridad.

6.15 Observación en microscopio confocal

Los cortes delgados de nódulos fueron examinados en microscopio confocal (FV1200, Olympus Corporation, Tokio, Japón) en busca de α -proteobacterias y actinobacterias utilizando hibridación in situ con fluorescencia (FISH) como se describe anteriormente (Aviles-Garcia y col. 2016).

6.16 Análisis estadístico

Los experimentos de nodulación fueron realizados con una $n = 12$ plantas y analizados por el método de ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías con un diseño factorial, seguida de una prueba de separación de medias de rango múltiple de Duncan empleando el programa Statistica 7.0 (Statsoft Inc.) considerando una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento bacteriano de nódulos de *Medicago sp* y análisis filogenético de las cepas silvestres UMAC1, 2, 3 y 4

No obstante se conoce que *S. meliloti* es capaz de nodular a *M. truncatula*, se han reportado que esta capacidad es limitada en el sistema simbiótico *S. meliloti* 1021-*M. truncatula* A17 (Terpolilli y col. 2008). Con esto en mente, en el presente trabajo se realizaron ensayos con diversas cepas de *Sinorhizobium*, incluyendo *S. meliloti* y *S. medicae* proveniente de plantas de *M. truncatula* silvestres (Rome y col. 1996; Terpolli y col 2008). Para tal efecto, se aislaron rhizobias de nódulos de plantas de *Medicago sp.* que crecen de manera silvestre en el los jardines del campus central (Ciudad Universitaria) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se aislaron las cepas UMAC1, UMAC2, UMAC3, y UMAC4 y se obtuvieron productos de PCR de los respectivos genes ribosomales de 16S de estos aislados (**Figura 9A**), mismos que fueron secuenciados comercialmente, obteniéndose secuencias de las cepas UMAC1, UMAC3 y UMAC4 con una longitud de 1392, 1461 y 1323 nucleótidos respectivamente. Estas secuencias se utilizaron para realizar un árbol filogenético, comparándolas con las secuencias de diferentes géneros y especies de rhizobias que tienen capacidad de formar nódulos con otras especies leguminosas. El árbol filogenético muestra que las secuencias de los aislados UMAC1, UMAC3 y UMAC4 se agrupan de manera bien soportada por los “bootstraps” con las secuencias de bacterias de la especie *S. medicae*. y que están claramente separados de las secuencias obtenidas de la

especie *S. meliloti* (**Figura 9B**). En el análisis filogenético también se encontraron *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti*, *Azorhizobium caulinodans* y *Bradyrhizobium japonicum*.

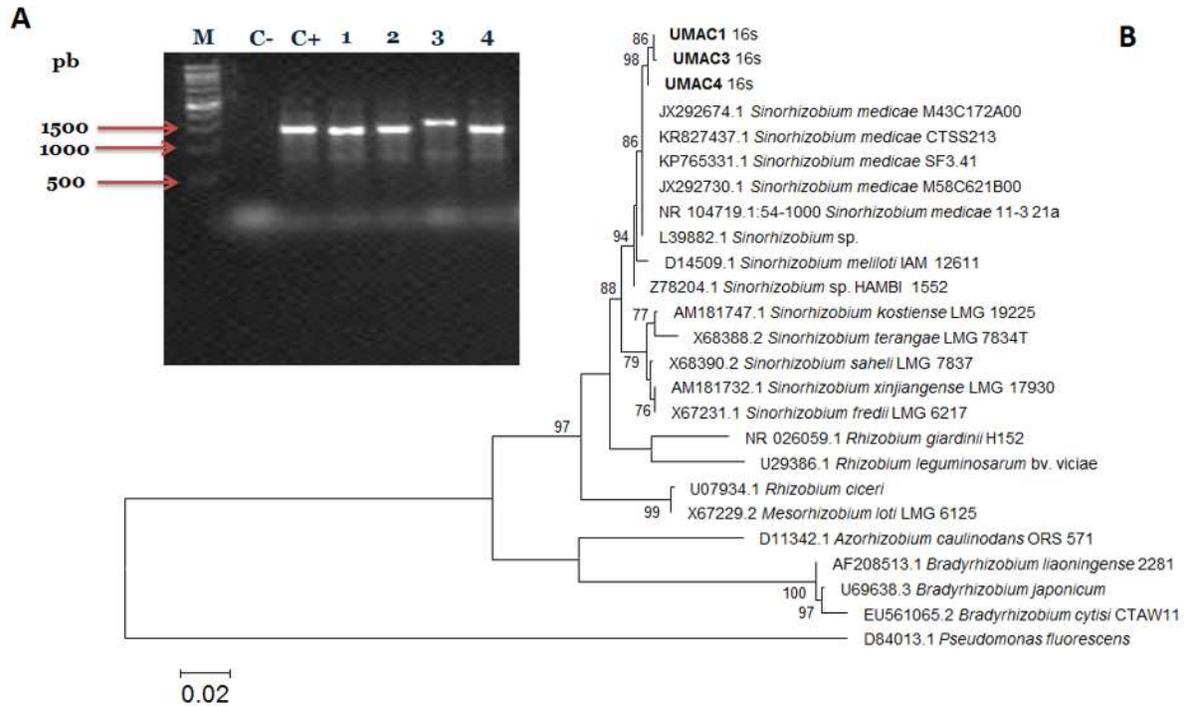


Figura 9. Análisis filogenético del gen 16S rRNA de las cepas UMAC1, UMAC3, y UMAC4. A) Gel de electroforesis de la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S, M, es el marcador 1 kb plus; se muestra el producto de PCR de las diferentes cepas aisladas UMAC1, 2, 3 y 4 respectivamente. B) Árbol filogenético de los aislados UMAC1, 3 y 4, basado en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de diferentes especies de rizobias. En código alfanumérico mostrado antes del nombre de la cepa indica el número de acceso de la secuencia respectiva en el GenBank el soporte de los nodos se indica arriba de las ramas y está representado por valores arriba del 70%.

7.2. Nodulación de *M. truncatula* por cepas de *S. meliloti* de colección y *S. medicae* silvestres

Con la intención de comparar la capacidad de distintas cepas de colección de *S. meliloti* y los aislados obtenidos de *S. medicae* para nodular *M. truncatula* se realizó un experimento de nodulación en condiciones de invernadero.

Los resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el peso de los nódulos de ninguno de los tratamientos (**Figura 10B**). Sin embargo, el promedio de nódulos rosas (R) considerados como nódulos funcionales fijadores de nitrógeno, y los nódulos blancos (B) considerados como no funcionales (Ott 2005), si fue diferente entre tratamientos. Las plantas inoculadas con el aislado UMAC2 y *S. medicae*, UMAC3 y *S. medicae* UMAC4 fueron las que mayor número de nódulos funcionales produjeron (**Figura 10A**). Las cepas de laboratorio *S. meliloti* GR4 y *S. meliloti* 2011 fueron la que más nódulos blancos generaron (**Figura 10A**). El caso de la cepa de laboratorio 1021 fue interesante en tanto que produjo tanto nódulos blancos como nódulos rosas, si bien en menor cantidad que las cepas de *S. medicae* UMAC1, UMAC3 y UMAC4. Con los resultados obtenidos se decidió seleccionar para los posteriores experimentos al aislado UMAC2 y las cepas *S. medicae* UMAC1, UMAC3 y UMAC4, debido a que produjeron una mayor cantidad de nódulos y la cepa estándar de laboratorio *S. meliloti* 1021 con fines de comparación.

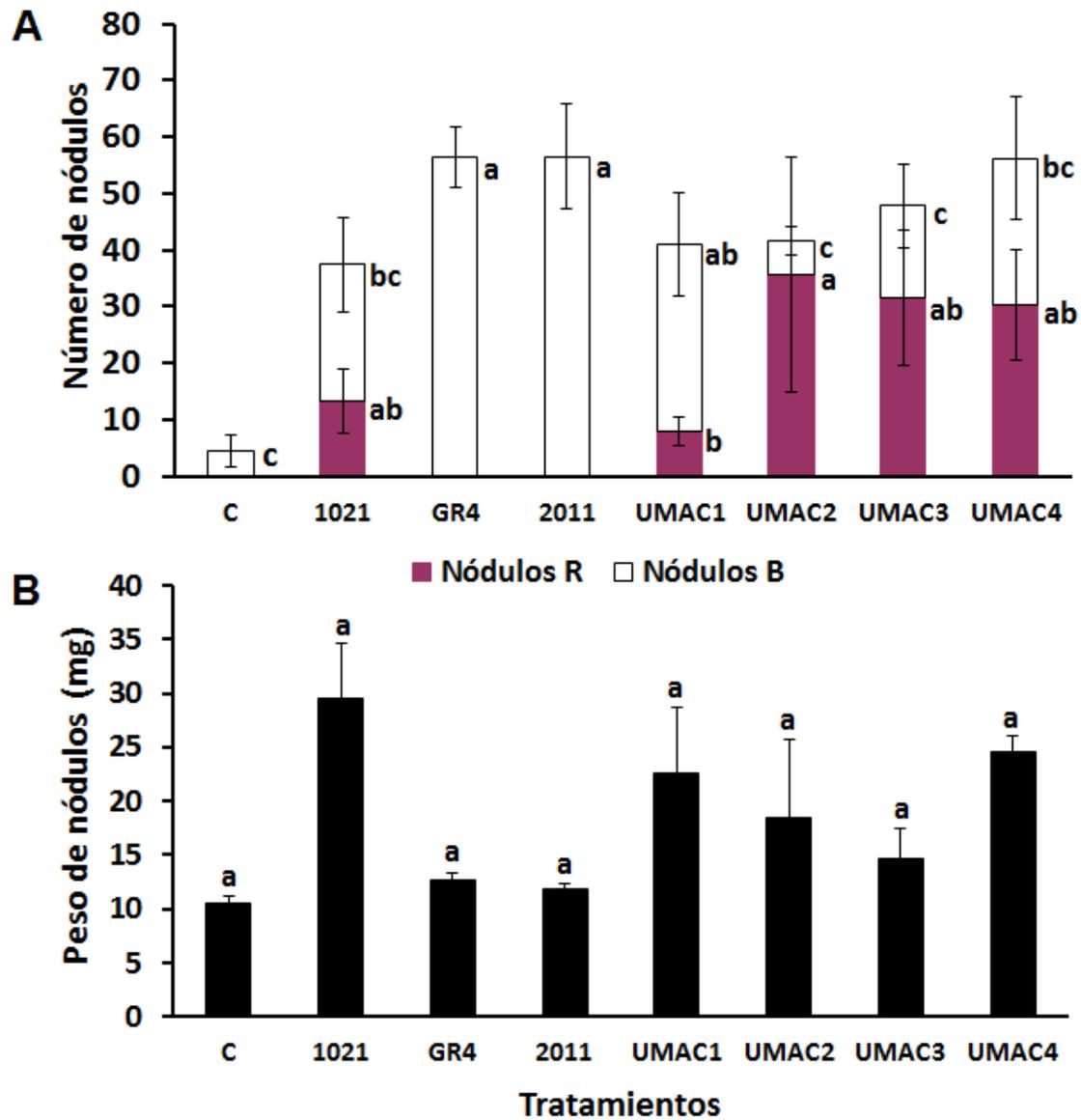


Figura 10. Producción de nódulos en plantas de *M. truncatula* inoculadas con distintas cepas. Plantas de *M. truncatula* se inocularon con las cepas de *S. meliloti* 1021, GR4 y 2011, *S. medicae* UMAC1, 3 y 4 y el aislado UMAC2 y crecidas en invernadero por 2 meses. Al término de este tiempo se cosecharon las plantas y se cuantificaron los nódulos. **A)** Número de nódulos funcionales por planta, rosas (R) y blancos (B) formados con las diferentes cepas (el análisis estadístico compara número de nódulos rosas entre sí y número de nódulos blancos entre sí). **B)** peso de los nódulos totales por planta formados en cada tratamiento. Las barras de error indican \pm error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa (prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n=9$).

7.3. Cinética de nodulación de plantas de *M. truncatula* durante los primeros 40 días de crecimiento

Con el propósito de determinar la variación del número de nódulos y el crecimiento en plántulas de *M. truncatula* a lo largo del tiempo, se inocularon plántulas de *M. truncatula* con la cepa de *S. medicae* UMAC2. Una vez que las plántulas se inocularon, se cultivaron en cámara de crecimiento. Cada 10 d se cosechó plántulas hasta cumplir 40 d. Se incluyeron plántulas sin inocular como controles.

Se determinaron los parámetros de crecimiento, encontrándose que el peso de los brotes fue significativamente diferente entre plántulas inoculadas y no inoculadas a partir del día 30. Las plantas inoculadas incrementaron poco más de dos veces su peso mientras que las plantas control registraron incluso una disminución en el peso de su parte aérea (**Figura 11A**). El peso de la raíz aumentó de manera constante con el transcurso de los días en ambos tratamientos, sin embargo, nuevamente el peso de la raíz de las plantas inoculadas fue mayor que el de las plantas sin inocular (**Figura 11B**). Este mismo aumento constante se observó en el número de raíces laterales, donde también fue mayor en las plantas inoculadas que en las plantas control, aumento que se mantuvo hasta los 40 d (**Figura 11C**). Respecto a los nódulos, como se esperaba, sólo se encontraron nódulos en las plantas inoculadas. El peso de los nódulos mostró un incremento constante hasta el día 40 (**Figura 11D**). Sin embargo, el número de nódulos no tuvo una variación significativa desde el día 20 hasta el día 40 (**Figura 10E**). Lo anterior mostró que el aporte de la nodulación al crecimiento de las plantas en ausencia de nitrógeno (las plantas fueron crecidas en sustrato y regadas con medio carente de nitrógeno)

y que si bien el peso de los nódulos aumentó progresivamente, el número de nódulos no lo hizo significativamente después del día 20 en condiciones de cámara de crecimiento.

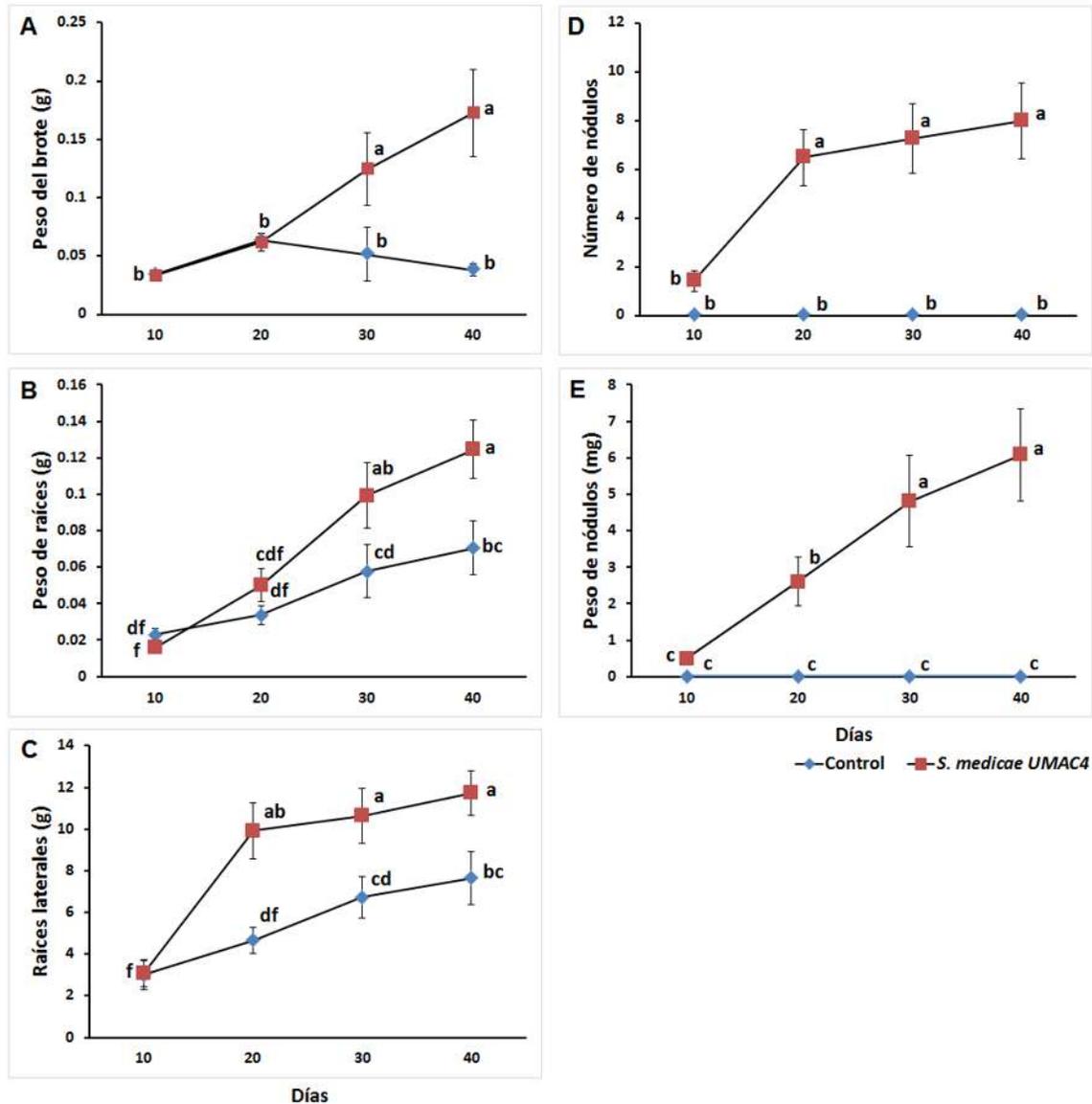


Figura 11. Cinética de crecimiento de *M. truncatula* inoculada con *S. medicae* UMAC4 y cultivada por 40 d. A) Peso fresco de los brotes; B) peso fresco de la raíz sin nódulos; C) número de raíces laterales por planta; D) peso de los nódulos totales por planta; E) número de nódulos totales por planta. Las barras de error indican \pm error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa (prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$, $n = 12$).

7.4. Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 en el establecimiento de la nodulación de *Medicago truncatula*

Después de seleccionar las cepas a utilizar y de seleccionar el tiempo de cultivo de las plantas, se procedió a determinar el efecto de la cepa de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación. Para este efecto, se inocularon plántulas con *S. meliloti* 1021, y *S. medicae* UMAC1, UMAC3 y UMAC4, y el aislado UMAC2. Algunas plantas además fueron coinoculadas con *A. agilis* UMCV2. Los resultados mostraron que sólo las plantas inoculadas con cepas de *Sinorhizobium* estaban noduladas, los controles sin bacterias y el control con *A. agilis* UMCV2 no presentaron nódulos **(Figura 11A y B)**.

En cuanto al número de nódulos rosas, se observa que la inoculación con las cepas de *S. medicae* produjo más nódulos rosas que la inoculación con la cepa de laboratorio *S. meliloti* 1021; a su vez, las plantas que fueron inoculadas con *S. medicae* UMAC4 y co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 produjeron una cantidad de nódulos rosas significativamente mayor que las plantas inoculadas con los demás tratamientos **(Figura 12A)**. Por su parte, en el número de nódulos blancos, las plantas inoculadas con la cepa 1021 fueron las que formaron más nódulos no funcionales de entre todos los tratamientos **(Figura 12A)**.

Finalmente, en cuanto al peso de los nódulos totales, las plantas inoculadas con el aislado UMAC2, *S. medicae* UMAC1 co-inoculada con *A. agilis* UMCV2 y *S. medicae* UMAC4 co-inoculada con *A. agilis* UMCV2 tuvieron los nódulos con mayor peso **(Figura 12A)**.

El fenotipo de las plantas control y las plantas inoculadas con la cepa UMAC4 y co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 mostró fuertes diferencias (**Figura 12C**). Fue interesante observar que todas las plantas que fueron co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 tuvieron un número de nódulos mayor que el tratamiento de las plantas inoculadas sólo con la cepa de *Sinorhizobium* respectiva. No obstante que esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa entre las plantas co-inoculadas con *S. medicae* UMAC4 y *A. agilis* UMCV2 con las plantas inoculadas sólo con *S. medicae* UMAC4, el análisis factorial realizado muestra que el factor “co-inoculación con *A. agilis*” fue muy altamente significativo ($p < 0.001$) (**Tabla suplementaria 1**).

Estos resultados muestran que la co-inoculación con *A. agilis* UMCV2 incrementa la nodulación y que el mejor sistema para observarlo es el de *M. truncatula*-*S. medicae* UMAC4-*A. agilis* UMCV2.

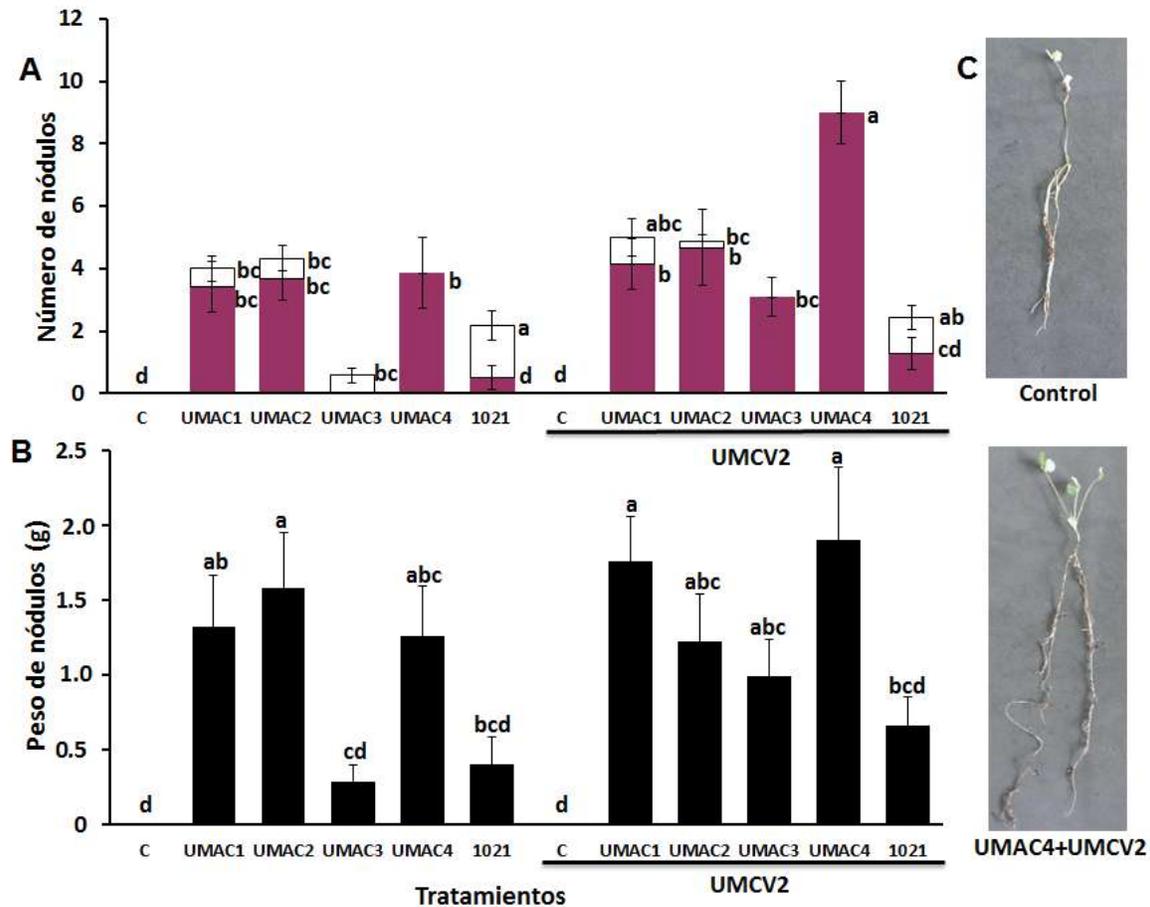


Figura 12. Efecto de la co-inoculación de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de plantas de *M. truncatula* inoculadas con distintas cepas de *Sinorhizobium*. Plantas de *M. truncatula* fueron inoculadas con las cepas de *S. meliloti* 1021, GR4 y 2011, *S. medicae* UMAC1, 3 y 4 y el aislado 2A y co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y cultivadas en cámara de crecimiento por 21 d. Al término de este tiempo se cosecharon las plantas y se cuantificaron los nódulos. **A)** Número de nódulos rosas (R) y blancos (B) producidos por planta en los diferentes tratamientos. **B)** peso de los nódulos totales por planta producidos en cada uno de los tratamientos. **C)** Fotografías representativas de las plantas control sin nodulación y plantas inoculadas y co-inoculadas con las cepas *S. medicae* UMAC4 y *A. agilis* UMCV2 respectivamente. Las barras de error indican \pm error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa determinada por un análisis factorial de dos factores (“cepa de rhizobia” y “co-inoculación con *A. agilis*”) seguida de una prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n = 12$).

7.5. Efecto de la DMHDA en la nodulación de *M. truncatula* inoculada con la cepa *S. medicae* UMAC4.

Una vez que se demostró que *A. agilis* UMCV2 tiene un efecto positivo en la nodulación, se realizó un ensayo para determinar si la DMHDA, que es una molécula producida por *A. agilis* UMCV2, también afecta la nodulación. Para esto se inocularon a las plantas con *S. medicae* UMAC4 y el compuesto DMHDA fue incorporado de manera directa en el sustrato en concentraciones de 1, 2, 4, 8, y 16 μmolal (con base en la masa del sustrato húmedo), teniendo como controles plantas no inoculadas y sin el compuesto DMHDA, plantas inoculadas sólo con la cepa de *A. agilis* UMCV2 sin el compuesto y plantas inoculadas únicamente con *S. medicae* UMAC4 sin el compuesto. Se puede observar, con base en los resultados, que no existe diferencia significativa en el peso de la parte aérea en ninguno de los tratamientos (**Figura 13A**); sin embargo, el tratamiento de plantas inoculadas con *S. medicae* UMAC4 sin DMHDA produjo un mayor peso de raíces con respecto a los tratamientos con una concentración de DMHDA de 2 μmolal o mayor (**Figura 13B**).

El número de nódulos rosas aumentó de forma significativa en los tratamientos con 1 y 2 μmolal del compuesto comparado con el resto de los tratamientos (**Figura 13C**). Para el número de nódulos blancos, las diferencias fueron muy discretas debido al escaso número de nódulos blancos formados, sin embargo, los tratamientos con DMHDA 1 y 4 μmolal presentaron la mayor cantidad de nódulos blancos formados (**Figura 13C**).

Con respecto al peso de los nódulos totales formados en cada tratamiento, éste fue mayor en el tratamiento con 1 μ molal de DMHD, sin embargo, esta diferencia sólo fue significativa respecto de los tratamientos con 4, 8 y 16 μ molal de DMHDA (las mayores concentraciones probadas) pero no respecto del control sin DMHDA. Los controles sin *S. medicae* UMAC4, como se esperaba, no produjeron nódulos (**Figura 13D**). Se encontró que las plantas tratadas con DMHDA tuvieron un aumento en el crecimiento principalmente a la concentración de 1 μ molal, lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en los parámetros de crecimiento y la nodulación, efecto que se observa hasta la concentración de 4 μ M con respecto al control (**Figura 13E**).

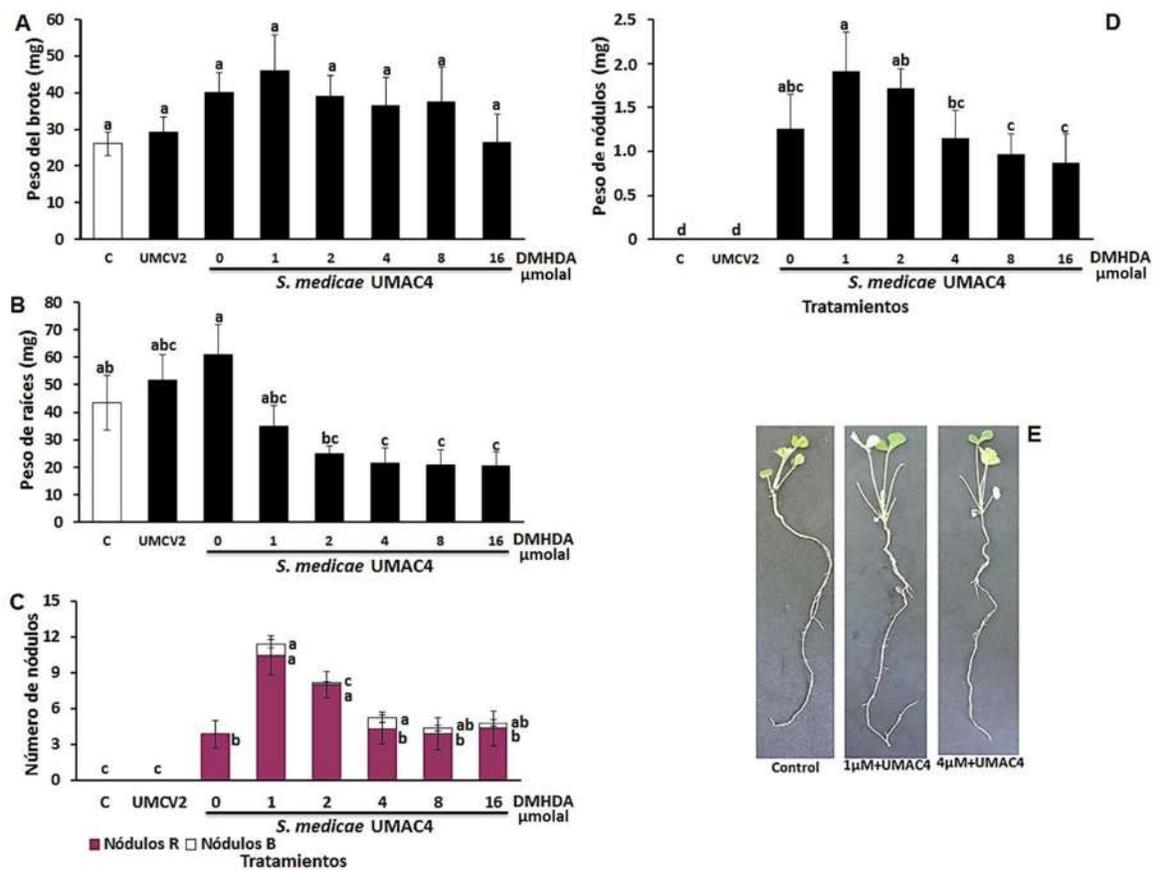


Figura 13. Efecto de la DMHDA en la nodulación de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. medicae* UMAC4. Plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. medicae* UMAC4 y se cultivaron en cámara de crecimiento con DMHDA por 21 d. Plantas no inoculadas o inoculadas con *A. agilis* UMCV2 se agregaron como controles negativos. A) peso del brote de las plantas tratadas con las respectivas concentraciones de DMHDA. B) peso de las raíces sin nódulos de cada uno de los tratamientos. C) número de nódulos rosas (R) y blancos (B) formados por planta. D) peso de los nódulos totales en cada tratamiento por planta. E) Imágenes representativas de los tratamientos control y plantas tratadas con 1 y 4 μM de DMHDA. Las barras de error indican ± error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa (prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n=9$).

7.6. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de *S. medicae* UMAC4 en suficiencia y deficiencia de hierro

Debido a que el hierro es un micronutriente requerido en altas cantidades durante la fijación simbiótica de nitrógeno y a que se ha establecido que *A. agilis* UMCV2 incrementa la adquisición de hierro en plantas leguminosas (Orozco-Mosqueda y col. 2013b), se probó el efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de *M. truncatula* en condiciones limitantes de hierro. Para este efecto, el sustrato fue alcalinizado hasta un pH de 7.5, induciendo con esto la oxidación y precipitación del hierro presente y, posteriormente, plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. medicae* UMAC4 y co-inoculadas con *A. agilis* UMCV2 se transfirieron al sustrato y se crecieron en estas condiciones durante 40 d en cámara de crecimiento.

Al medir el peso fresco de los brotes, se observó que tanto en condiciones control (suficiencia de hierro) como en deficiencia de hierro, el peso de las plantas inoculadas con *S. medicae* UMAC4 fue entre tres y cuatro veces mayor que el de las plantas no inoculadas lo que muestra un claro efecto en el crecimiento atribuible a la fijación simbiótica de nitrógeno (**Figura 14A**). En esta variable, la co-inoculación con *A. agilis* UMCV2 produjo un efecto discreto que sin embargo no fue significativo.

Las plantas crecidas en condiciones de suficiencia de hierro no registraron diferencias en el peso fresco de raíz entre tratamientos inoculados y no inoculados. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro las plantas no inoculadas produjeron mayor peso de raíz (**Figura 14B**).

En suficiencia de hierro prácticamente todos los nódulos registrados fueron rosas y que la inoculación con *A. agilis* UMCV2 condujo a un incremento de nodulación que no fue significativo; sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro el número de nódulos blancos se incrementó notablemente. La co-inoculación con *A. agilis* UMCV2 en condiciones de deficiencia de hierro condujo a la formación de un número de nódulos rosas significativamente mayor que la registrada en plantas no co-inoculadas y también condujo a una disminución en el número de nódulos blancos (**Figura 14C**). El peso de los nódulos de las plantas inoculadas sólo con *S. medicae* UMAC4 y crecidas en deficiencia de hierro fue inferior a su contraparte crecida en condiciones de suficiencia de hierro, siendo que la co-inoculación con *A. agilis* UMCV2 en condiciones de deficiencia de hierro condujo a un incremento en el peso de nódulos suficiente para igualar el peso con los nódulos de plantas crecidas en suficiencia de hierro (**Figura 14D**). Lo anterior corrobora que en un cultivo prolongado (40 d) la fijación de nitrógeno en nódulos es necesaria para el crecimiento de plantas en un sustrato carente de este elemento (**Figura 14E y F**), y muestra que al incrementarse el pH para generar indisponibilidad de hierro la co-inoculación con *A. agilis* UMCV2 preserva el número de nódulos funcionales en las plantas.

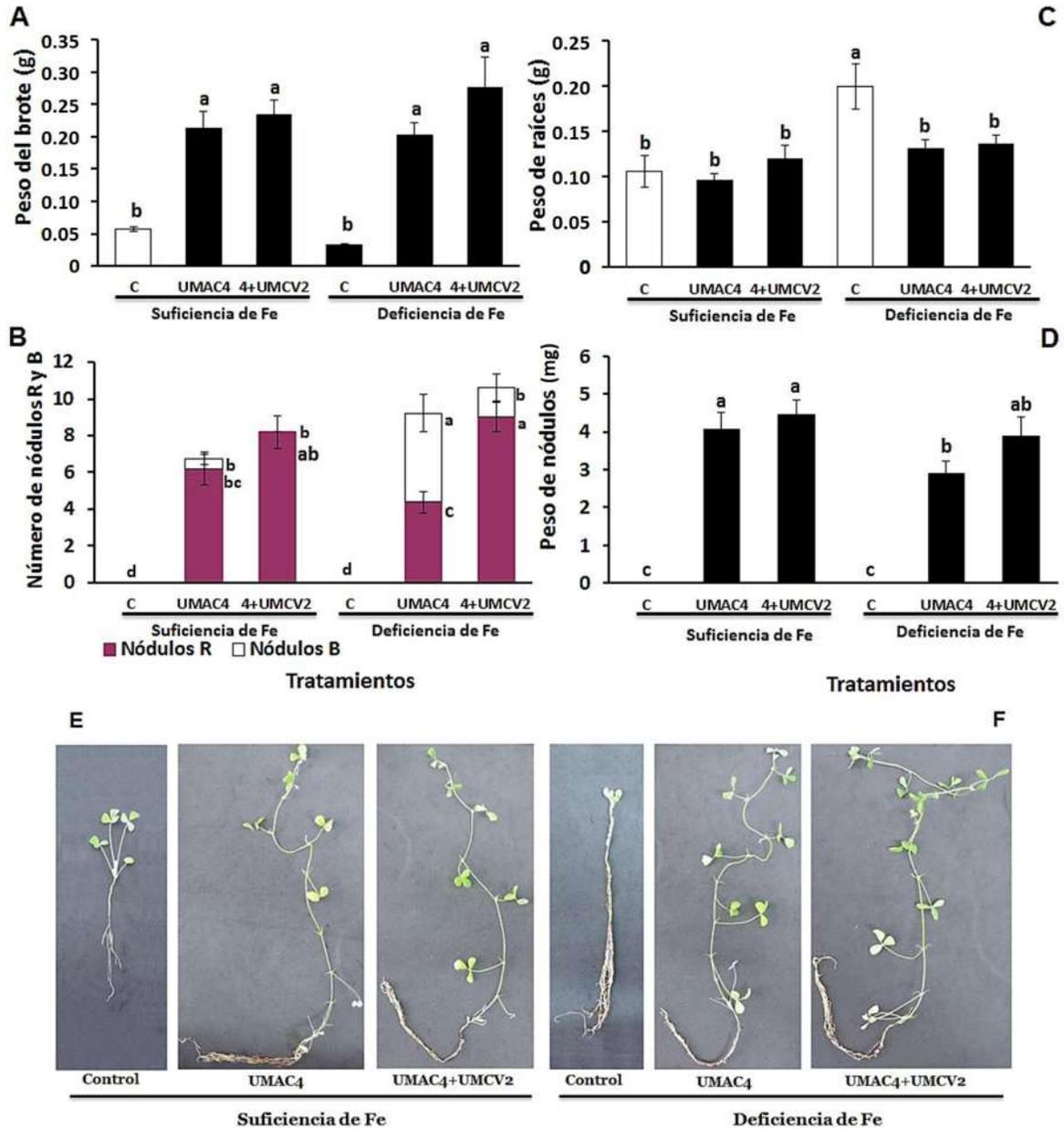


Figura 14. Efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. medicae* UMAC4 en suficiencia y deficiencia de hierro. Plantas de *M. truncatula* se inocularon con *S. medicae* UMAC4 y co-inoculadas (o no) con *A. agilis* UMCV2 y cultivadas en sustrato alcalinizado para generar indisponibilidad de hierro o cultivadas en sustrato en condiciones estándar por 40 d. Plantas sin inocular se inocularon como controles negativos. A) Peso del brote de las plantas con los diferentes tratamientos en suficiencia y deficiencia de hierro. B) Peso de las raíces en cada uno de los tratamientos. C) Número de nódulos rosas (R) y blancos (B) por planta formados en suficiencia y deficiencia de hierro. D) Peso de los nódulos totales en

cada tratamiento. E) Imágenes representativas de los tratamientos en suficiencia y deficiencia de hierro. Las barras de error indican \pm error estándar y las letras al lado de las barras muestran diferencia significativa determinada por un análisis factorial de dos factores (disponibilidad de hierro y forma de inoculación) seguida de una prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n=12$).

7.7. Efecto de la exposición de *M. truncatula* al VOC DMHDA en la expresión de los genes de nodulación

Una vez que se determinó que tanto *A. agilis* UMCV2 como su compuesto volátil, la DMHDA, tuvieron un efecto en la nodulación, se procedió a determinar si este compuesto afecta la expresión de un conjunto de genes involucrados en la nodulación. Para esto, primeramente, plántulas de *M. truncatula* de 4 d de germinación se transfirieron a macetas con sustrato, después de siete d un vial con DMHDA se incluyó en cada maceta y las macetas se cerraron con una cubierta transparente para construir un sistema de compartimentos separados donde las plantas se mantuvieron por 48 h. Con fines de comparación, se incluyó un tratamiento con plantas que se inocularon con *S. medicae* UMAC4 al momento de ser transferidas a las macetas y un tratamiento control sin inoculación ni exposición al compuesto.

Las plantas inoculadas con *S. medicae* mostraron un mayor crecimiento que las no inoculadas y como se esperaba, sólo las plantas inoculadas produjeron nódulos **(Figura 15)**.

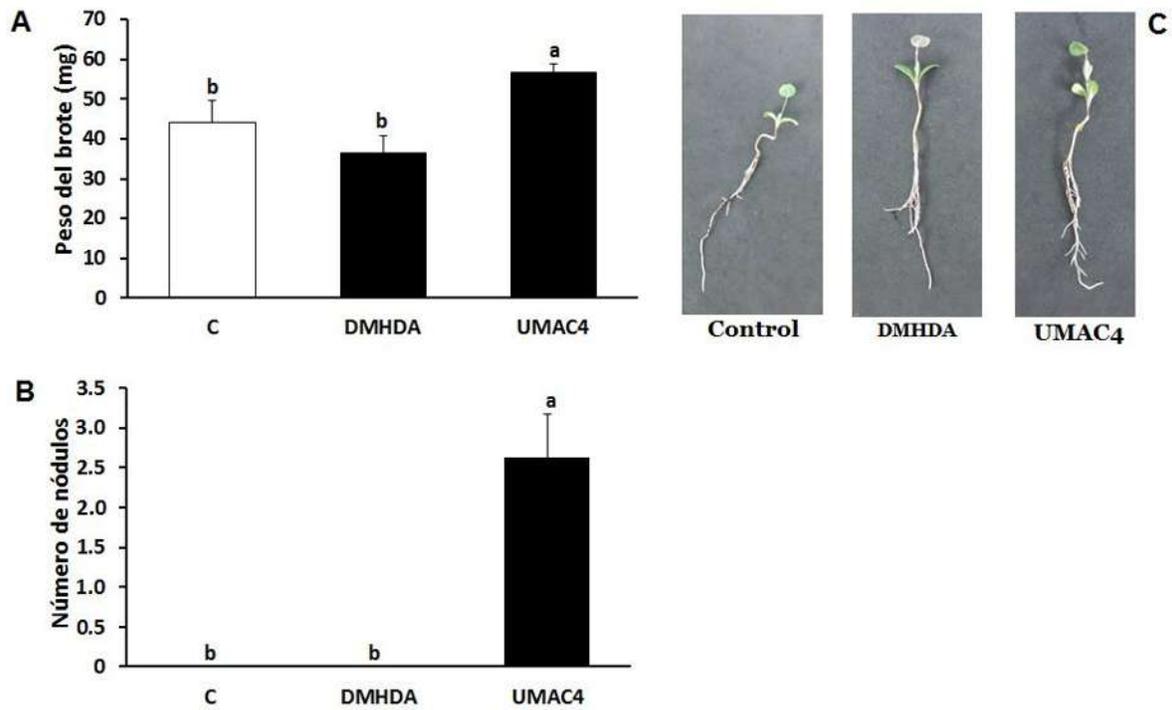


Figura 15. Crecimiento y nodulación de plantas de *M. truncatula* expuestas al VOC DMHDA o inoculadas con *S. medicae* UMAC4 en un sistema de compartimentos separados. Plantas de *M. truncatula* se inocularon con *S. medicae* UMAC4 o bien expuestas a DMHDA en forma de volátil. A) peso del brote de las plantas. B) número de nódulos totales por planta. C) Imágenes representativas de plantas control y plantas inoculados o expuestas a la DMHDA. D) Las barras de error indican \pm error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa (prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n=12$).

Se extrajo el RNA total de las raíces de las plantas y se sintetizó cDNA para hacer una cuantificación de los genes *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* y *NAD1* por qRT-PCR.

Para tal efecto, los oligonucleótidos empleados que se listan en la Tabla 2 se validaron, comprobándose su especificidad al generar un solo amplicón con el DNA de *M. truncatula* como muestra la presencia de un solo máximo en la curva de disociación del producto de qPCR (**Figura 16**).

Al realizar el análisis de la expresión relativa de genes que están involucrados en la vía de señalización inicial de la nodulación, se observó que en plantas expuestas a la DMHDA se induce la expresión del gen *NFP* (que codifica el receptor cinasa de los factores NOD) casi 40 veces respecto al control; se observa también que, en comparación con las plántulas que fueron inoculadas, hay una expresión mayor en las plantas expuestas al compuesto que en las plantas inoculadas con *S. medicae* UMAC4 (**Figura 17A**).

En la expresión de los genes *DMI1* y *DMI2* (ubicados río abajo en la ruta de señalización activada por factores NOD) se tiene un nivel de expresión menor que en *NFP*, sin embargo, aumentó 3 veces la expresión relativa de *DMI1* en el tratamiento con DMHDA respecto al control, siendo que en el tratamiento con *S. medicae* UMAC4 no hubo diferencia significativa. La expresión de *DMI2* aumentó hasta 10 veces en el tratamiento con el compuesto volátil, mientras que en los tratamientos de inoculación con la bacteria la inducción fue de 5 veces siempre respecto al control (**Figura 17 B y C**).

Por otro lado, el análisis en la expresión relativa del gen modulador de la organogénesis *SUNN* mostró que plantas expuestas a la DMHDA tuvieron una expresión relativa de 2.5 veces superior a la expresión encontrada en plantas

control; por el contrario, en los tratamientos con la inoculación de la cepa de *S. medicae* UMAC4, nuevamente no se encontró un cambio significativo, e incluso la expresión pareció disminuir en presencia de la bacteria (**Figura 17D**). Por último, en el análisis del gen *NAD1* (involucrado en mantenimiento del nódulo), se observó que plantas expuestas a la DMHDA tuvieron un aumento en la expresión de más de 80 veces respecto del control; este aumento es menor en el tratamiento con la cepa *S. medicae* UMAC4 que, sin embargo, donde aumenta 20 veces en comparación con el control (**Figura 17E**). Se puede observar que los 5 genes analizados tuvieron un aumento en su expresión en plantas expuestas al compuesto volátil DMHDA, incluso mayor al que se observa cuando está la cepa noduladora *S. medicae* UMAC4 (**Figura 17**).

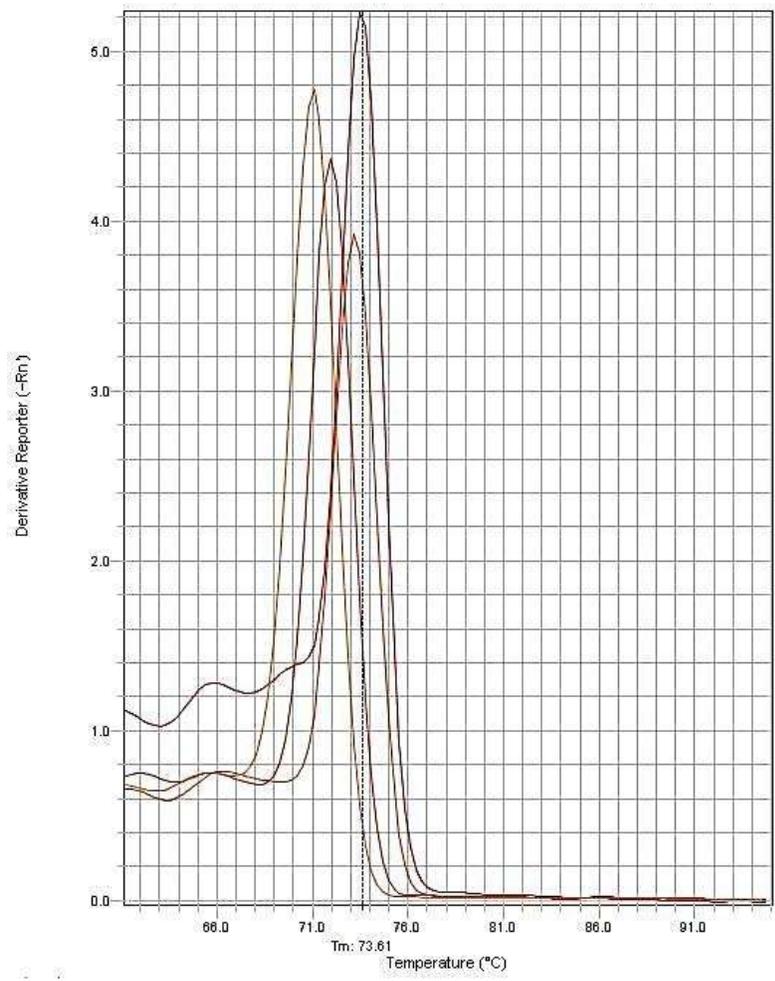


Figura 16. Curvas de disociación de los amplicones generados por qPCR. Curvas de disociación de la amplificación de los genes de nodulación, *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* y *NAD1*.

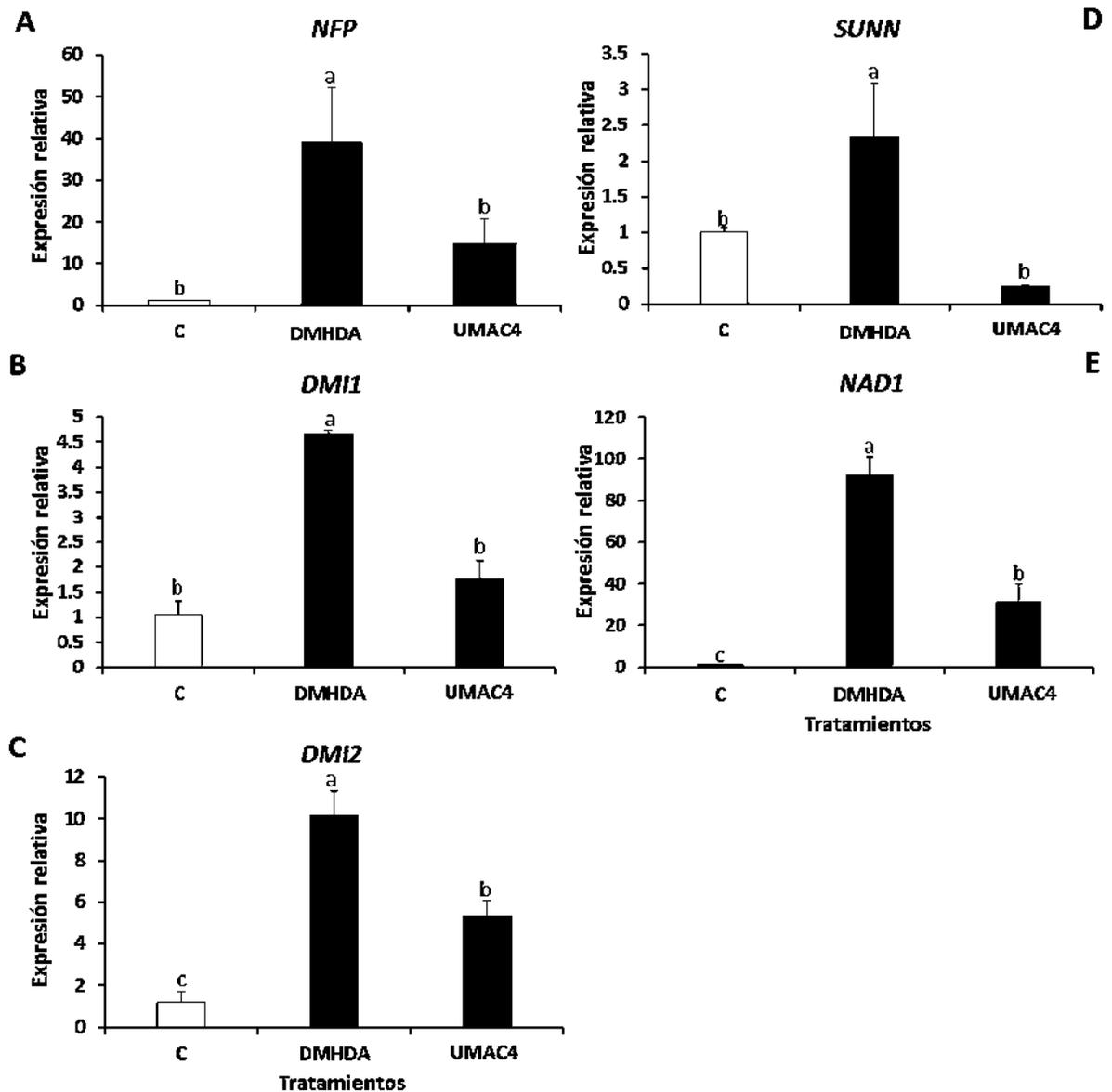


Figura 17. Efecto de la DMHDA en la expresión relativa de los genes *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* y *NAD1* involucrados en la nodulación. Los niveles de expresión se identificaron mediante qRT-PCR 9 d después de la inoculación con *S. medicae* UMAC4 o después de 48 h de exposición a la DMHDA. Los niveles de transcrito se identificaron utilizando tres réplicas biológicas y se calcularon en relación con la expresión detectada en plantas control, mediante el análisis $\Delta\Delta CT$. Las barras de error indican \pm error estándar y las letras sobre las barras de error muestran diferencia significativa (Prueba de rango múltiple de Duncan; $p < 0.05$ $n=3$).

7.8 Detección de *A. agilis* UMCV2 en nódulos de *M. truncatula*.

Para el análisis de la colonización de *A. agilis* UMCV2 en nódulos de *M. truncatula* formados por la asociación simbiótica con *S. medicae* UMAC4 se empleó la técnica de FISH. Para asegurar la especificidad de las sondas utilizadas se hicieron hibridaciones cruzadas, donde se busca hibridar la sonda que tiene como blanco a la cepa UMCV2 con la cepa UMAC4 y viceversa (**Figura 18 A-E**). Se confirmó de esta manera que efectivamente las sondas usadas son específicas para cada división/subdivisión bacteriana (firmicutes y α -proteobacteria) ya que cada sonda hibridó con su bacteria blanco (**Figura 18 A y B**), sin mostrar hibridación cruzada (**Figura 18 C y D**), pero sí hibridación simultánea cuando ambas bacterias y ambas sondas estuvieron presentes (**Figura 18E**).

Posteriormente, se procedió a analizar los nódulos de las plantas empleando microscopía confocal. Se realizaron los cortes de aproximadamente 0.5 a 1 mm de grosor del nódulo. Las fotografías obtenidas con el microscopio confocal muestran que, *A. agilis* UMCV2 es capaz de internalizarse en los nódulos formados por *S. medicae* UMAC4 en *M. truncatula*; esto se aprecia tanto en luz visible como en luz fluorescente y en combinación de ambas (**Figura 19 A-C**). Los nódulos muestran las señales fluorescentes características para cada cepa hibridada con su respectiva sonda (**Figura 19C**). Se puede observar que, con respecto a su ubicación, las bacterias se encuentran en los espacios intercelulares principalmente y que tanto la cepa de UMCV2 como la UMAC4 se encuentran en un aglomerado de bacterias, detalles que se aprecian de mejor manera en los acercamientos en las imágenes (**Figura 19 A y B**).

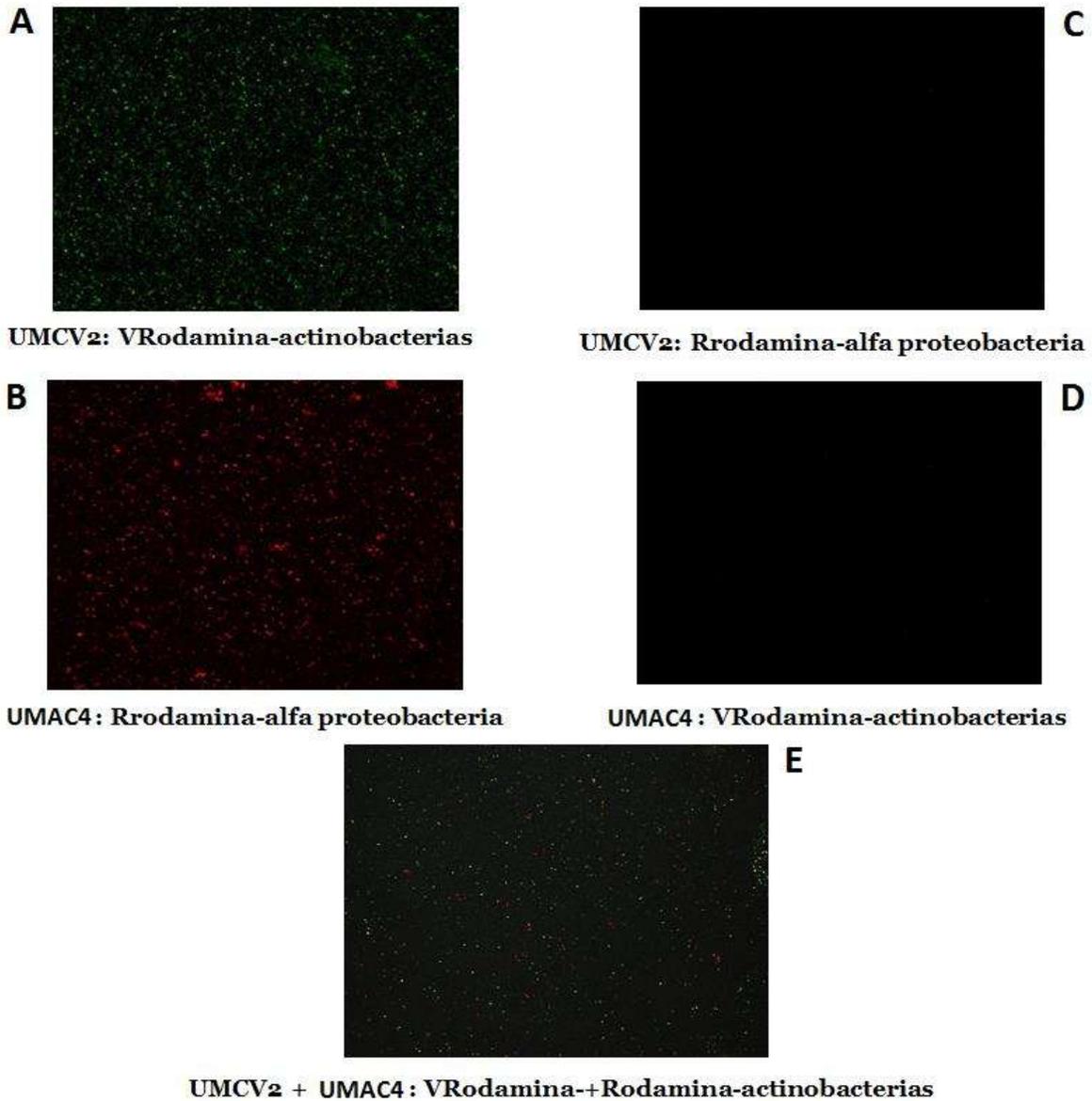


Figura 18. Validación de la técnica de FISH para las cepas bacterianas *A. agilis* UMCV2 (actinobacteria) y *S. medicae* UMAC4 (α -proeobacteria). Cultivos puros de *A. agilis* UMCV2 y *S. medicae* UMAC4 se utilizaron como blanco de las sondas Vrodamina-actinobacteria (verde) y Rrodamina- α -proeobacteria (roja). Imágenes representativas de A) *A. agilis* UMCV2 con Vrodamina-actinobacteria, B) *S. medicae* UMAC4 con Rrodamina- α -proeobacteria, C) *A. agilis* UMCV2 con Rrodamina- α -proeobacteria, D) *S. medicae* UMAC4 con Vrodamina-actinobacteria E) mezcla de *A. agilis* UMCV2 y *S. medicae* con Vrodamina-actinobacteria y Rrodamina- α -proeobacteria. Fotografías obtenidas por microscopía confocal.

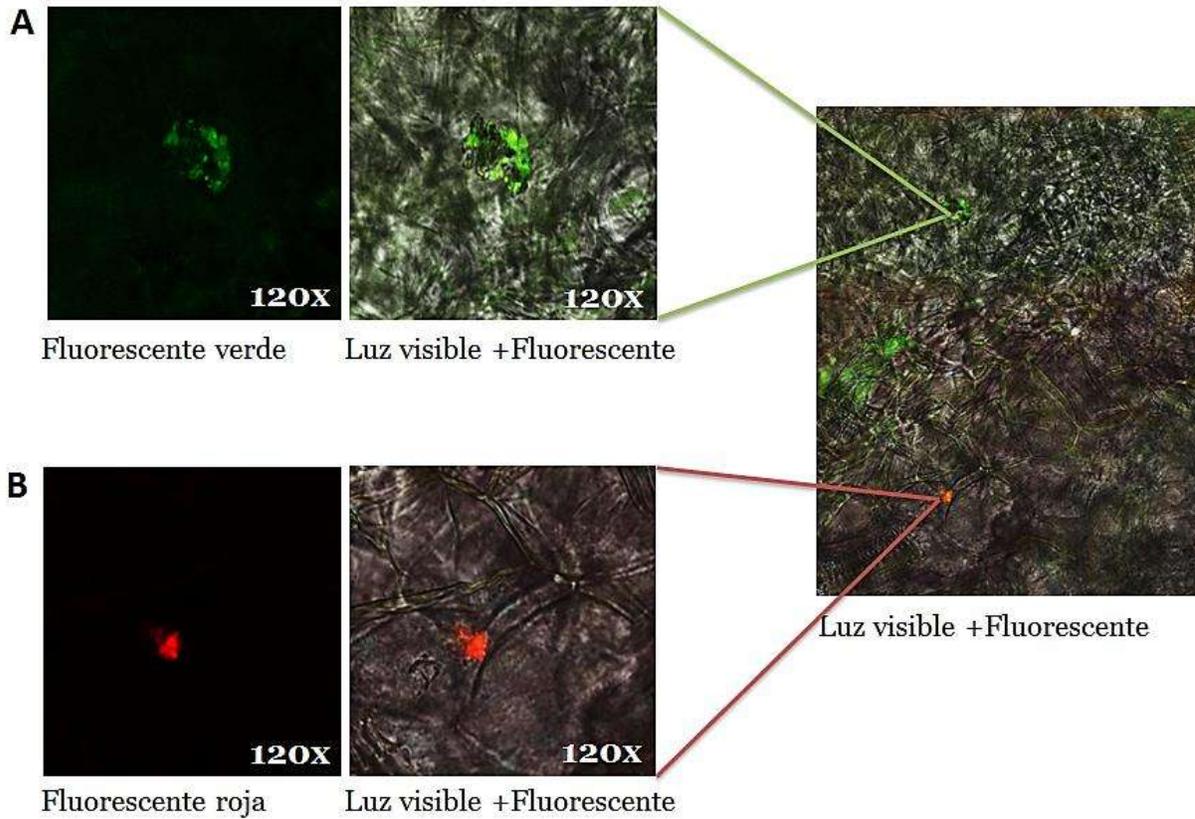


Figura 19. Colonización de *A. agilis* UMCV2 a los nódulos formados por la simbiosis de *M. truncatula* y *S. medicae* UMAC4. Cortes de nódulos de plantas que se analizaron después de 40 d de crecimiento. A) y B) Son acercamientos en 120X, en luz fluorescente y luz visible con luz fluorescente, del panel C). C) Presencia de *A. agilis* UMCV2 y *S. medicae* UMAC4 dentro del nódulo.

DISCUSIÓN

Las plantas leguminosas proveen múltiples servicios ecológicos a los sistemas agrícolas. El principal beneficio de su inclusión en los sistemas de cultivo, es su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico (Sisic y col. 2017) en una asociación simbiótica con bacterias denominadas rhizobia, proporcionando cultivos con una fuente de nitrógeno libre y renovable (Benedito y col. 2008). Ciertos factores ambientales tienen influencia en la infección bacteriana y la formación de los nódulos, como la disponibilidad de hierro (Orozco-Mosqueda y col. 2013).

En nuestro grupo de trabajo, estudiamos la cepa de *A. agilis* UMCV2, actinobacteria aislada de la rizósfera de maíz, de la cual ya se ha reportado que aumenta la adquisición de hierro en la leguminosa de frijol, cuando se inocula en plantas crecidas en deficiencia del nutriente (**Figura 6**). Por esta razón, en el presente trabajo se decidió estudiar dicha bacteria en el proceso de nodulación.

De forma inicial, se realizaron ensayos de nodulación en invernadero, utilizando cepas capaces de generar simbiosis con plantas leguminosas como *M. truncatula*, la cual es ampliamente utilizada como modelo de estudio de la fijación simbiótica de nitrógeno y en la genética de leguminosas (Krishnakumar y col. 2014). No obstante que *M. truncatula* puede ser nodulada por la especie *S. meliloti*, algunos reportes indican que la eficiencia del sistema de nodulación *M. truncatula*-*S. meliloti* es baja (Niehaus y col. 1998; Terpolilli y col. 2008). Como parte de este estudio se compara la nodulación de *M. truncatula* con cepas de colección de *S. meliloti* y con cepas de rhizobia aisladas de plantas de *Medicago* silvestres

cercanamente emparentadas con *M. truncatula*, considerando que las asociaciones plantas-rhizobias son específicas y que una bacteria determinada sólo puede nodular con un número definido de plantas (Dénarié y Debellé, 1996). A las bacterias aisladas en el presente trabajo (UMAC1, UMAC 2, UMAC 3, y UMAC4) se les amplificó el gen ribosomal 16S y se mandó secuenciar. Al realizarse un análisis filogenético, comparándose con secuencias del 16s rRNA de diferentes géneros y especies de rhizobias, se encontró que tres de estas pertenecen al grupo de *S. medicae* (**Figura 10**).

Para proceder con los experimentos de nodulación, se realizó primero un ensayo en invernadero para estudiar el fenotipo de nodulación de las diferentes especies de *Sinorhizobium*. Se inocularon las plántulas de *M. truncatula*, sembradas en macetas con sustrato, con las cepas aisladas anteriormente de *S. medicae* y con diferentes cepas del laboratorio de *S. meliloti* 1021, GR4, 2011 y se crecieron en invernadero durante dos meses. Se pudo observar que el fenotipo de nodulación varía de una cepa a otra. Las cepas de *S. meliloti* 1021, GR4 y 2011 formaron un mayor número de nódulos blancos, contrario a las cepas anteriormente aisladas, donde la mayoría presentó un mayor número de nódulos rosas, como lo fueron las cepas de *S. medicae* UMAC3 y 4 y el aislado UMAC2. A este respecto, la coloración de los nódulos, rosas (nódulos funcionales) y blancos (no funcionales), es un fenotipo importante en la nodulación. Wang y col (2016) observaron que los nódulos de plantas de *M. truncatula* se vuelven ligeramente rosados a los 7 d después de la inoculación con *S. meliloti* 2011 y se vuelven completamente rosados en etapas tardías (21 d después de la inoculación), lo cual es un indicador

de una alta expresión de leghemoglobina, proteína que está presente durante la fijación de nitrógeno. En cuanto al peso de los nódulos, no se encontraron diferencias significativas (**Figura 10**). Con este ensayo en invernadero, se seleccionaron las cepas de *S. medicae* UMAC1, 3 y 4, el aislado UMAC2 y la cepa de *S. meliloti* 1021 para analizar el efecto de la actinobacteria *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de *M. truncatula* en asociación con cepas del género *Sinorhizobium*.

Si bien, el ensayo en invernadero se dejó durante dos meses, se redujo el tiempo para los experimentos, sin que esto influyera en el análisis experimental y a su vez llevando las plantas a cámaras de crecimiento, en condiciones más controladas. Para ello, se estudió el crecimiento y la nodulación de *M. truncatula* a 40 d. Al ser la cepa de *S. medicae* UMAC4 una de las bacterias que mayor número de nódulos totales formó, se inoculó con dicha bacteria; además, las plantas estuvieron en constante riego con medio Fåhraeus, que no contiene nitrógeno; esto para favorecer la nodulación, debido a que en bajas concentraciones de nitrógeno se comienzan a secretar flavonoides en la raíz de la planta hospedera dando inicio al proceso de nodulación (Liu y Murray, 2016). Se observó que hubo un aumento del peso del brote y de las raíces, así como un aumento en el número de las raíces laterales en las plantas que fueron inoculadas con la cepa *S. medicae* UMAC4, principalmente a partir de los 20 d después de la inoculación con la rhizobia. Esto en comparación con las plantas control, en las cuales se tuvo una disminución en el crecimiento del brote conforme transcurrieron los días (**Figura 11**).

Se ha reportado que el metabolismo del N está fuertemente interrelacionado con el del carbono; numerosos estudios han demostrado que los metabolitos de C y N

son monitoreados por la célula y actúan en conjunto para controlar la expresión génica y así determinar perfiles de transcripción que son apropiados para el estado nutricional y metabólico en plantas (Borlotti y col 2012). Por lo que se puede esperar que las plantas control, que no fueron inoculadas con la rhizobia y no formaron nódulos fijadores de nitrógeno, presenten una deficiencia en su crecimiento, contrario a aquellas que tenían una fuente de nitrógeno gracias a la presencia de la rhizobia. Por otro lado, en nuestro sistema experimental, el número de nódulos totales no aumentó de forma significativa entre los 20 y 40 d y no obstante el peso de los mismos sí lo hizo, presentando nodulación únicamente las plantas que fueron inoculadas con la rhizobia (**Figura 11**).

En trabajos previos, se ha visto que la formación de los nódulos en plantas de *M. sativa* noduladas por diferentes cepas de *S. meliloti*, como la 1021, comienza aproximadamente a los 15 d y el número de nódulos por planta aumenta de forma notable a partir de los 21 d hasta los 40 d, donde el número se mantiene durante las siguientes mediciones (Vences-Guzmán y col. 2008); estos resultados se asemejan a lo obtenido en la curva de crecimiento realizada. Con esto, se decidió reducir los siguientes experimentos de nodulación a una ventana de tiempo entre 20 y 40 d.

Una vez que se evaluó el fenotipo de nodulación de las cepas de *Sinorhizobium* y el crecimiento y nodulación de *M. truncatula*, se realizaron ensayos donde se estudió el efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación. Onofre-Ortega (2011) reportó el efecto de *A. agilis* UMCV2 a una D.O. de 0.05, donde observó un efecto discreto en la nodulación de plantas de *M. sativa* (Figura 7), por lo que se decidió

co-inocular a la misma densidad óptica. Se utilizaron las cepas seleccionadas anteriormente, *S. meliloti* 1021 y las cepas aisladas de *S. medicae* UMAC1, 3 y 4 y el aislado UMAC2, las cuales se inocularon en plántulas de *M. truncatula* y posteriormente se co-inoculó con la cepa de UMCV2, observando que la bacteria *S. meliloti* 1021 fue la que mayor número de nódulos blancos generó, esto cuando es inoculada de forma individual. En los tratamientos donde se inoculó con esta cepa y se co-inoculó con *A. agilis* UMCV2, existe un ligero aumento en la formación de nódulos rosas (**Figura 12**). Sin embargo, de los tratamientos estudiados, la inoculación con la cepa de *S. medicae* UMAC4 y la co-inoculación con la cepa de *A. agilis* UMCV2 fue el tratamiento que mayor número de nódulos rosas formó, en comparación con los demás tratamientos, inclusive cuando esta cepa fue inoculada de forma individual sin la co-inoculación de *A. agilis*, no se obtuvo el mismo resultado. En cuanto al peso de nódulos, no hubo grandes diferencias significativas, sin embargo, cuando se co-inoculó con la UMCV2 se tuvieron mayores pesos de nódulos. También se observó que el crecimiento de las plantas cuando son inoculadas con las rizobias y co-inoculadas con *A. agilis* es mayor, en comparación con el control donde se observó un crecimiento menor (**Figura 12**). Concluyendo que *A. agilis* UMCV2 tiene un efecto promotor no sólo en la nodulación en sí, sino también en la formación de nódulos rosas, siendo esto más claro cuando se co-inocula con la cepa *S. medicae* UMAC4; a su vez, se estableció la cepa UMAC4 para el estudio de nodulación en los siguientes ensayos.

Los cambios en el fenotipo de nodulación se han relacionado con la especificidad de las rizobias; ya que se ha reportado que la especie de *S. meliloti* no es óptima para la fijación de nitrógeno con plantas de *M. truncatula* A17, a su vez, cepas de *S. medicae* mostraron ser mejores microsimbiontes para dicha leguminosa (Terpolilli y col. 2008). Por lo que el efecto en el mejoramiento de la nodulación de la cepa *A. agilis* UMCV2 puede no ser tan grande como con cepas que son mejores noduladoras. Ya se ha establecido a la cepa *A. agilis* UMCV2 como una PGPR, que promueve el crecimiento en plantas de *M. sativa* (Velázquez-Becerra y col. 2011). Se han estudiado a otras PGPR's también respecto a la nodulación, como el estudio de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común) y la nodulación con la bacteria *Rhizobium tropici*, donde se inocula de forma individual a la rizobia y en combinación con las PGPR's *Bacillus endophyticus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Paenibacillus lautus*, *P. macerans*, *P. polymyxa* o *Bacillus* sp.; de las diferentes combinaciones de cepas, la inoculación de *R. tropici* y la co-inoculación de *P. polymyxa* en la leguminosa de frijol, tuvieron un aumento en las concentraciones de leghemoglobina, en la actividad de la nitrogenasa y en la fijación de nitrógeno, formando así asociaciones simbióticas de mayor eficiencia (Figuereido y col. 2007).

Como ya se ha mencionado en Antecedentes, se sabe que existen diversos mecanismos de las PGPR's para la promoción del crecimiento en plantas, como lo es mediante la producción de VOC's. *A. agilis* UMCV2 produce el compuesto DMHDA (**Tabla 1**), el cual tiene actividad promotora del crecimiento vegetal de manera dosis dependiente y se ha estudiado de forma directa y de forma volátil,

en plantas como *M. sativa* (**Figura 7**) y *Sorghum bicolor* (Velázquez-Becerra y col. 2011; Castulo-Rubio y col. 2015).

La DMHDA es un compuesto volátil de naturaleza amino lipídica relacionado estructuralmente a compuestos bioactivos en plantas como las acil homoserina lactonas (AHLs) (Velázquez-Becerra y col. 2011). Las AHLs representan un sistema de comunicación que es utilizado por bacterias para regular la densidad poblacional (Parsek y col 2000); ya se ha estudiado el efecto de estos compuestos en la nodulación de plantas de *M. truncatula*. Veliz-Vallejos y col. (2014) probaron AHLs producidas por diferentes bacterias, encontrando que en tratamientos con la homoserina lactona-3-oxo-C14, sintetizada por *S. meliloti*, a una concentración de 1 μM se incrementa el número de nódulos formados, pero no el número de raíces laterales ni la longitud de la raíz de *M. truncatula*. Debido a los anteriores reportes, se decidió estudiar si la DMHDA, además de promover el crecimiento vegetal y al tener una similitud estructural con AHLs, tenía un efecto en la nodulación cuando el compuesto se agrega de forma directa al sustrato donde se crecen las plántulas de *M. truncatula*. Encontrando que hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso de las raíces y en el número y peso de los nódulos, efecto que varía según la concentración del compuesto, donde a la concentración de 1 μM de DMHDA se observó un aumento de forma significativa en el número de nódulos rosas, así como un aumento en el peso de los mismos (**Figura 13**). Con estos resultados obtenidos podemos concluir que la DMHDA tiene un efecto promotor en la nodulación de *M. truncatula* y la cepa *S. medicae* UMAC4 cuando se adiciona de forma directa, además que el efecto es dosis dependiente.

Como se ha mencionado anteriormente, la fijación simbiótica de nitrógeno en *M. truncatula* es regulada por el estado nutricional de nitrógeno de la misma, es decir, si hay una falta del nutriente se activa la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, mientras que los nódulos pierden su actividad (en horas o días) cuando se vuelve disponible una fuente alternativa de nitrógeno (Liese y col. 2017). Otro de los requerimientos, para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno, es el estado nutricional del hierro (Sankari y O'Brian, 2016). La deficiencia de hierro es un problema importante en la producción de cultivos a nivel mundial, debido a la baja solubilidad del Fe (III), la principal forma en como se encuentra en el suelo (Valencia-Cantero y col. 2007). Los microorganismos son compañeros cruciales para las plantas para asimilar el hierro que se encuentra en la rizósfera, éstos pueden mejorar el crecimiento vegetal a través de un suministro continuo de hierro (Valencia-Cantero y col. 2007). Se ha mencionado en antecedentes que *A. agilis* UMCV2 y la DMHDA inducen la expresión de los elementos de adquisición de hierro, como son los genes que codifican las enzimas férrico quelato-reductasa (FRO) (Montejano-Ramírez y col. 2018; Orozco-Mosqueda y col 2013b), las cuales reducen Fe (III) a su forma soluble Fe (II).

En este punto se consideró que el efecto tanto de *A. agilis* UMCV2 como de la DMHDA en la nodulación puede deberse a dos mecanismos distintos que no necesariamente son excluyentes: que la DMHDA incida sobre el sistema de regulación de la nodulación y/o que incremente el suministro de hierro a la planta mejorando indirectamente la nodulación.

En este trabajo se estudió además el efecto de *A. agilis* UMCV2 en la nodulación de *M. truncatula* con la cepa *S. medicae* UMAC4 en suficiencia (pH ácido) y deficiencia (pH alcalino) de hierro. Observando que hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso del brote de las plantas inoculadas con *S. medicae* UMAC4 y cuando además se co-inoculan con la UMCV2, aumentando de manera significativa respecto a las plantas control, donde se tiene un crecimiento menor; por otro lado, el peso de las raíces es mayor en las plantas control en deficiencia de Fe, en comparación de las plantas inoculadas con las bacterias (**Figura 14**).

Se ha reportado que hay variaciones en el crecimiento de plantas leguminosas como el *Lupinus albus* L. en suelo alcalino, que puede ser debido a la sensibilidad de un pH alto y a los bicarbonatos, así como a la deficiencia de hierro y la deficiencia de nitrógeno debido a una pobre nodulación (Tang y col. 2006). Respecto al efecto en la nodulación, en condiciones de deficiencia de hierro cuando las plantas se inocularon con *A. agilis* UMCV2 hay un aumento significativo en la formación de nódulos rosas y el peso de los nódulos fue mayor respecto a los tratamientos donde únicamente se inoculó con *S. medicae* UMAC4. Anteriormente, no se había observado que la cepa de *S. medicae* UMAC4 formara gran cantidad de nódulos blancos. Se puede observar que en suficiencia de hierro se forman más número de nódulos rosas, sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro por el contrario se obtuvo un aumento en la formación de nódulos blancos que fue revertida casi totalmente por la co-inoculación con *A. agilis* UMCV2. Si bien, al ser las plantas crecidas en suelo, donde se tiene una

mezcla de nutrientes indeterminada y puede haber concentraciones importantes de Fe, se ha reportado que en suelos alcalinos, las plantas no enfrentan el problema de una baja cantidad total de hierro en el suelo, sino de una baja solubilidad del hierro en el mismo (Eroglu y col. 2016). El pH disminuye tanto la disponibilidad como la toma de hierro por las plantas, y su requerimiento para la formación del nódulo es mayor que para el crecimiento de la planta hospedera (Tang y col. 2016). Por lo que se concluye que la cepa de *A. agilis* UMCV2 promueve la formación de nódulos rosas de *M. truncatula* en un medio en deficiencia de hierro probablemente promoviendo la absorción de hierro en las plantas.

Como ya se había descrito, una vía de señalización de interacción entre rhizobias y leguminosas es esencial para la formación de la simbiosis (Gorton y col. 2012). Así, los ensayos anteriormente descritos también ponen de manifiesto la incertidumbre de si *A. agilis* UMCV2, a través de su molécula DMHDA, tiene algún efecto en la expresión de los genes involucrados en la nodulación. Por lo que se realizó un ensayo donde se inoculó a las plántulas de *M. truncatula* con la cepa *S. medicae* UMAC4 y en otro tratamiento se expuso a las plántulas a la DMHDA de forma volátil durante 48 h. Si bien el peso del brote de las plantas inoculadas con la rhizobia fue mayor que en lo demás tratamientos y el número de nódulos totales (R y B) formados es poco, no se aprecia un efecto claro, lo que puede deberse a que el tiempo de exposición (48 h) fue insuficiente para permitir el desarrollo de nódulos observables (**Figura 15**). Pero al medir la expresión de los genes de nodulación, se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se han

identificado diversos genes de la vía de señalización inicial en *M. truncatula*: *DMI1*, *DMI2*, *DMI3*, *NFP*, *NSP1* y *NSP2* por lo que se decidió medir la expresión de algunos de ellos. A su vez, existen otros genes relacionados con el desarrollo de la simbiosis y la organogénesis del nódulo, como el gen *SUNN*, y en el mantenimiento de la infección a largo plazo, como el gen *NAD1* (Penmetsa y col. 2003; Wang y col. 2016). En este trabajo se midió la expresión de los genes *DMI1*, *DMI2* y *NFP* de la vía de señalización inicial y *SUNN* y *NAD1* de la organogénesis y mantenimiento del nódulo, respectivamente.

El tratamiento con la DMHDA aumento la expresión de los genes de nodulación respecto al control, incluso fue mayor la expresión en presencia del compuesto que en presencia de la bacteria *S. medicae* UMAC4 (**Figura 17**).

Se ha descrito en el trabajo que *NFP* codifica un receptor LysM-RLKs; los genes *DMI1* y *DMI2* están involucrados en la vía de señalización de calcio, el cual es un segundo mensajero en plantas y diversos estímulos del exterior provocan un aumento transitorio del mismo (Whalley y Knight 2013). El gen *SUNN* codifica un receptor tipo LRR-RLKs que se ha reportado tiene homología con *CLAVATA1*, una proteína que controla el meristemo apical del tallo (Stacey y col. 2006). *NAD1* codifica una proteína cuya función específica se desconoce, sin embargo, se sabe que participa en la represión de las respuestas inmunes en los nódulos (Domonkos y col. 2017). Con estos reportes, se llega a una probable conclusión del porqué se activa la expresión de los genes de nodulación, por la presencia de la DMHDA incluso mayor que con la rhizobia. Se ha reportado, que la DMHDA induce la vía de señalización del ácido jasmónico, relacionado en respuestas de

defensa en plantas (Raya-González y col. 2016). Las plantas de *M. truncatula* pudieran reconocer el compuesto DMHDA, como reconocen las plantas a otros compuestos bacterianos, el cual activa vías comunes de defensa y de nodulación, lo que a su vez induce la expresión de los genes río abajo de la nodulación sin necesidad del estímulo de los factores nod sintetizados por la rhizobia, pero sin la formación de nódulos. Sin embargo, se desconoce la forma específica en que actúa la molécula durante el proceso.

Se ha reportado, que algunos oligómeros de quitina con residuos de GlcNAc inducen las oscilaciones de calcio, aunque la respuesta difiere de aquella inducida por los factores nod (Walker y col. 2000). También, en otros trabajos han demostrado que al remover un dominio auto-inhibitorio que regula negativamente la actividad cinasa en la nodulación, activa la vía de señalización de nodulación en la planta, la inducción de nódulos y la expresión de genes de nodulación en ausencia de la rhizobia (Gleason y col. 2006). Aunque el reconocimiento de moléculas microbianas en todo el reino vegetal se conserva parcialmente, parte de esto es el resultado de la evolución convergente para identificar proteínas bacterianas ampliamente conservadas a través de la detección de epítopes por distintos receptores (Zipfel y Oldroyd, 2017). La interacción específica entre las moléculas bacterianas y los RLKs presentes en la epidermis de las raíces, es el punto central de control para que la planta active una respuesta de defensa y evitar la entrada de patógenos o, como alternativa, suprima la respuesta de defensa permitiendo la infección por bacterias simbióticas (Via y col. 2016). Con lo anteriormente discutido, se concluye que la DMHDA induce la expresión de los

genes de la vía inicial de la nodulación lo que a su vez activa genes en etapas tardías de nodulación, a través de una probable activación de respuestas de defensa en la planta de *M. truncatula*.

Las plantas leguminosas tienen una capacidad intrínseca de alojar tanto bacterias simbióticas como endófitas en los nódulos de la raíz (Zgadzañ y col. 2015). En estudios recientes, se ha determinado que *A. agilis* UMCV2 se comporta como una bacteria endófitas de *M. truncatula* (Aviles-García y col. 2016), por lo que se decidió estudiar si además puede internalizarse en los nódulos formados por *S. medicae* UMAC4 en *M. truncatula*. Por lo cual se analizaron muestras de nódulos de *M. truncatula* inoculada por la cepa UMAC4 y co-inoculada con la UMCV2, empleando la técnica de FISH, usando las sondas fluorescentes indicadas en la metodología. Observando que efectivamente las bacterias de *A. agilis* UMCV2 fueron capaces de establecerse dentro de los tejidos de los nódulos (**Figura 19**). Diversos estudios han mostrado que la infección simultánea de rizobias y bacterias rizosféricas puede incrementar la nodulación en gran variedad de leguminosas (Sturtz y col. 1996). Zgadzañ y col (2015) estudiaron la colonización de bacterias noduladoras y bacterias endófitas en plantas de *Lotus japonicus*. Inocularon las plantas con *Mesorhizobium loti*, que es el simbiote natural de *L. japonicus* y las bacterias endófitas *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum* sp., *Rhizobium giardinii* sp., *R. mesosinicum* y *Burkholderia* sp. Observando que a excepción de *H. frisingense*, todas las cepas fueron capaces de internalizarse a los nódulos o incluso a los hilos de infección formados por *M. loti*. Otros estudios con PGPR's y rizobias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* sp. muestran que

la co-inoculación puede incrementar la actividad de la nitrogenasa, la fijación de nitrógeno y el rendimiento de garbanzo y diversas leguminosas (Zhao y col. 2010).

Los resultados hasta ahora mostraron que en diferentes condiciones *A. agilis* UMCV2 y el compuesto volátil DMHDA sintetizado por la misma, tienen un efecto promotor en la nodulación de *M. truncatula* y *S. medicae* UMAC4 mediante un mecanismo no caracterizado hasta el momento pero que involucra un mejor suministro de hierro a la planta al menos en condiciones de deficiencia de hierro y una inducción de los elementos de la vía de señalización de la nodulación, organogénesis del nódulo y su mantenimiento.

CONCLUSIÓN

A. agilis UMCV2 y su compuesto dimetilhexadecilamina promueven la formación de nódulos funcionales en plantas de *M. truncatula* inoculadas con la cepa silvestre *S. medicae* UMAC4 en condiciones de suficiencia o deficiencia de hierro, mientras que el compuesto dimetilhexadecilamina aumenta la expresión de los genes *NFP*, *DMI1*, *DMI2*, *SUNN* y *NAD1* que están involucrados en la regulación de la nodulación.

BIBLIOGRAFÍA

Ali S, Duan J, Charles TC, Glick BR (2014) A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. Journal of Theoretical Biology 343:193–198.

<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.10.007>

Ané J, Kiss G, Riely B, Penmetsa R, Oldroyd G, Ayax C, Lévy J, Debelle F, Baek J, Kalo P, Rosenberg C, Roe B, Long S, Dénarié J, Cook D (2004) *Medicago truncatula* *DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. Science 303:1364-1367. <https://doi.org/10.1126/science.1092986>

Arrighi JF, Barre A, Amor BB, Bersoult A, Campos L, Mirabella R, Carvalho-Niebel F, Journet ET, Ghérardi M, Huguet T, Geurts R, Dénarié J, Rougé P, Gough C (2006) The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *nfp* and new nodule-expressed genes. Plant Physiology 142: 265–279.

<https://doi.org/10.1104/pp.106.084657>

Aviles-García M, Flores-Cortes I, Hernández-Soberano C, Santoyo G, Valencia-Cantero E (2016) La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. Revista Argentina de Microbiología 48:342-346 <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.004>

Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya C, Kalra A (2014) ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved

nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. Journal of Plant Physiology 171:884-894 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jplph.2014.03.007>

Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J (2017) Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. Microbiome 5:2-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0241-2>

Ben Amor B, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Dénarié J, Gough C (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. The Plant Journal 34:495–506. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01743.x>

Benedito V, Torres-Jerez I, Murray J, 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 P, Tang Y, Udvardi M (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. The Plant Journal 55: 504-513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x>

Benhizia Y, Benhizia H, Benguedovar A, Muresu R, Giacomini M, Squartini A (2004) Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology 27:462-468. <https://doi.org/10.1078/0723202041438527>

Bensmihen S, 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 6:1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026114>

Borlotti A, Vigani G, Zocchi G (2012) Iron deficiency affects nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Plant Biology* 12:189.

<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-189>

Casadesús J, Olivares J (1979) Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Molecular and General Genetics* 174:203–209

<https://doi.org/10.1007/BF00268356>

Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez NA, Orozco-Mosqueda MA, 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 <http://DOI:10.1007/s00344-015-9495-8>

Catoria R, Galera C, Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarié J (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *The Plant Cell* 12:1647–1665.

<https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1647>

Chen T, Duan L, Zhou B, Yu H, Zhu H, Cao Y, Zhang Z (2017) Interplay of pathogen-induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology* 8:1-13.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00973>

De La Peña C, Loyola-Vargas VM (2014) Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant Physiology* 166:701–719. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241810>

Denarié J, Debelle F (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual*

<http://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>

Domonkos A, Kovács S, Gombár A, Kiss E, Horváth B, Kovács GZ, Farkas A, Tóth MT, Ayaydin F, Bóka K, Fodor L, Ratet P, Kereszt A, Endre G, Kaló P (2017) NAD1 Controls defense-Like responses in *Medicago truncatula* symbiotic nitrogen fixing nodules following rhizobial colonization in a BacA-independent manner. *Genes* 387:2-21. <http://doi.org/10.3390/genes8120387>

Eroglu S, Meier B, von Wirén N, Peiter E (2016) The vacuolar manganese transporter mtp8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 170:1030-1045. <http://doi.org/10.1104/pp.15.01194>

Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R, Huante P (2013) Agrobiotechnological importance of the acc deaminase in rhizobacteria, a review. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 251-258. <http://www.readylc.org/articulo.oa?id=61028975010>

Ferguson J, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M, Lin Y, Reid D, Gresshoff P (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 61-76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

Figueredo M, Martinez C, Burity H, Chanway C (2007) Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology Biotechnology* 24:1187–1193. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9591-4>

Gage D (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>

Gaiero JR, McAll CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion . *American Journal of Botany* 100: 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>

Geurts R, Fedorova E, Bisseling T (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* 8:346–352. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.013>

Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441:1149-1152. <http://doi.org/10.1038/nature04812>

Glick B (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica Article ID 963401:15*. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>

Goh CH, Veliz-Vallejos DF, Nicotra AB, Mathesius U (2013) The impact of beneficial plant associated microbes on plant phenotypic plasticity. *Journal of Chemical Ecology* 39:826–839. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0326-8>

Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang HN (1974) *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 54-63. <https://doi.org/10.1099/00207713-24-1-54>

Gorton AJ, Heath KD, Pilet-Nayel ML, Baranger A (2012) Mapping the genetic basis of symbiotic variation in legume-rhizobium interactions in *Medicago*

truncatula. G3: Genes|Genomes|Genetics 2:1291-1303.

<http://doi.org/10.1534/g3.112.003269>

Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Biologists* 131:872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, Kloepper J W (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43:895-914

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43:895-914.

<https://doi.org/10.1139/m97-131>

Hardoim PR, Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsche A (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:293-320. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>

Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, Li L, Alonso JM, Ecker JR, Kaplan J, Gueriot ML. (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science* 314:295–1298.

<https://doi.org/10.1126/science.1132563>

Krishnakumar V, Kim M, Rosen BD, Karamycheva S, Bidwell SL, Tang H, Town CD (2014) MTGD: The *Medicago truncatula* genome database. *Plant Cell Physiology* 56:1-9. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu179>

Krishnan R, Menon R, Tanaka N, Busse H-J, Krishnamurthi S, Rameshkumar N (2016) *Arthrobacter pokkali* sp nov, a novel plant associated actinobacterium with

plant beneficial properties, isolated from saline tolerant pokkali rice, Kerala, India.

PLoS ONE 11(3):e0150322 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0150322>

Krol E, Becker A (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1030-8>

Larrainzar E, Riely BK, Kim SC, Carrasquilla-García N, Yu HJ, Hwang HJ, Oh M, Kim GB, Surrendrarao AK, Chasman D, Siahpirani AF, Penmetsa RV, Lee GS, Kim N, Roy S, Mun JH, Cook DR (2015) Deep Sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. *Plant Physiology* 169:233–265 <https://doi.org/10.1104/pp.15.00350>

Liese R, Schulze J, Cabeza RA (2017) Nitrate application or P deficiency induce a decline in *Medicago truncatula* N₂-fixation by similar changes in the nodule transcriptoma. *Scientific Reports* 7:2-10 <http://doi.org/10.1038/srep46264>

Liu CW, Murray JD (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants* 5:1-13. <https://doi.org/10.3390/plants5030033>

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Long SR (1996) Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell* 8:1885-1898. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1885>

Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagés V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez E, Driguez H, Bécard G, Dénarié J

(2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature 469: 58-64. <https://doi.org/10.1038/nature09622>

Marquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I, Santoyo G (2010) Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. Genetics and Molecular Research 9: 2372-2380. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr921>

Martínez-Rodríguez L, López-Contreras JA, Jiménez-Zurdo JI, Toro N (2013) Complete genome sequence of the alfalfa symbiont *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* strain GR4. Genome Announcements. 1:e00174-12. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00174-12>

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in Microbiology 17:458-466 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>

Montejo-Mayo W, Valencia-Cantero E, López-Albarrán P, Velázquez-Becerra C (2016) Efecto de *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre la germinación y crecimiento de *Pinus devoniana* Lindley. Polibotánica 41: 79-90. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.41.5>

Mortier V, Holsters M, Goormachtig S (2012) Never too many? How legumes control nodule numbers. Plant, Cell and Environment 35:245–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02406.x>

Niehaus K, Lagares A, Pühler A (1998) A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but

fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 906-914. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.906>

Noel KD, Sanchez A, Fernández L, Leemans J, Cevallos MA (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. Journal of Bacteriology 158: 148-155.

Noorden G, Verbeek R, Dinh Q, Jin J, Green A, Liang J, Mathesius U (2016) Molecular signals controlling the Inhibition of nodulation by nitrate in *Medicago truncatula*. International Journal of Molecular Sciences 17:2-18. <https://doi.org/10.3390/ijms17071060>

Oldroyd G, Downie J (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. Molecular Cell Biology 5:566-576. <https://doi.org/10.1038/nrm1424>

Oldroyd G, Downie J (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Plant Biology 59:519-546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>

Onofre Ortega P (2013) Efecto de la co-inoculación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 con *Arthrobacter agilis* UMCV2 en *Medicago sativa*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo UMSNH. 84 pp.

Orozco-Mosqueda C, Macías-Rodríguez L, 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. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0243-9>

Orozco-Mosqueda C, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez L, 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1263-y>

Ott T, Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi M (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for Nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 15:531–535 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>

Parsek MR, Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS* 97:8789-8793 <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8789>

Partida-Martínez LP, Heil M (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* 2:1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>

Penmetsa R, Frugoli J, Smith L, Long S, Cook D (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 998-1008. <https://doi.org/10.1104/pp.015677>

Puckette MC, Tang Y, Mahalingam R (2008) Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions. *BMC Plant Biology* 8(1):46. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-46>

Raya-González J, Hernández-Abreu E, Valencia-Cantero E, López-Bucio J (2016) microbial resources for improved crop productivity. En: Gupta VK, Sharma GD,

Tuohy MG, Gaur R (eds) The handbook of microbial Bioresources CAB International. Boston MA, USA. pp 1-13.

Raya-González J, Hernández-Abreu E, Valencia-Cantero E, López-Bucio J (2016) Microbial Resources for Improved Crop Productivity. En: Gupta VK, Sharma GD, Tuohy MG, Gaur R (eds) The handbook of microbial Bioresources. CAB International. Boston MA, USA. pp 1-13.

Remigi P, Zhu J, Young P, Masson-Boivin C (2016) Symbiosis within Symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. Trends in Microbiology 24: 63:75
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>

Rival P, Billy F, Bono JJ, Gough C, Rosenberg C, Bensmihen S (2012) Epidermal and cortical roles of *NFP* and *DMI3* in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. Development 139:3383-3391.
<https://doi.org/10.1242/dev.081620>

Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel JC (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from annual *Medicago* spp. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 972-980. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-972>

Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions 19:827–837.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>

Saeki K (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-*rhizobium* model systems. Cellular and Molecular Life Sciences 68:1327–1339. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0650-5>

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MC, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183:92-99.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

Schnabel E, Journet E, Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J (2005) The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology* 58:809-822.

<https://doi.org/10.1007/s11103-005-8102-y>

Shao L, Zheng X, Yi D, Li C (2015) Comparative sequence and expression analysis of tapetum specific male sterility related genes in *Medicago truncatula*.

Genetics and Molecular Research 15:2-13. <https://doi.org/10.4238/gmr.15028323>

Singh RM, Gaba S, Yadav AN, Gaur P, Gulati S, Kaushik R, Saxena AK (2016) First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77 11:1-9.

<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0176-4>

Sisic A, Bacanovic-Sisic J, Karlovsky P, Wittwer R, Walder F, Campiglia E, Radicetti E, Friberg H, Baresel JP, Finckh MR (2017) Roots of symptom-free leguminous cover crop and living mulch species harbor diverse *Fusarium* communities that show highly variable aggressiveness on pea (*Pisum sativum*).

Plos One 13(2): e0191969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191969>

Stacey G, Libault M, Brechenmache L, Wan J, May GD (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9:110–

121. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.005>

Sturtz AV, Chistine BR, Matheson BG, Novak J (1997) Biodiversity of endophytic bacterial which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence of host growth. *Biology and Fertility of Soils* 25:13-19.

Sturz A, Christie B, Matheson B, Nowak J (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils* 25: 13-19.
<https://doi.org/10.1007/s003740050273>

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Tang C, Zheng SJ, Qiao YF, Wang GH, Han XZ (2006) Interactions between high pH and iron supply on nodulation and iron nutrition of *Lupinus albus* L. genotypes differing in sensitivity to iron deficiency. *Plant and Soil* 279:153–162.
<http://doi.org/10.1007/s11104-005-0616-1>

Terpolilli JJ, O'hara GW, Tiwari RP, Dilworth MJ, Howieson JG (2008) The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Snorhizobium meliloti* 1021. *The New Phytologist* 179:62-66. <http://doi.org.10.1111/j.1469-8137.2008.02464.x>

Tkacz A, Cheema J, Chandra G, Grant A, Poole PS (2015) Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME Journal* 9:2349-2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>

Valencia-Cantero E (2006) Contribución de la reducción bacteriana de Fe a la nutrición vegetal, perspectivas biotecnológicas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48:127-128.

Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza J, 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 <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9191-y>

Veerappan V, Jani M, Kadel K, Troiani T, Gale R, Mayes T, Shulaev E, Wen J, Mysore KS, Azad RK, Dickstein R (2016) Rapid identification of causative insertions underlying *Medicago truncatula* Tnt1 mutants defective in symbiotic nitrogen fixation from a forward genetic screen by whole genome sequencing. *BMC Genomics* 17:141. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2452-5>

Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez L, 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0583-z>

Veliz-Vallejos D, Van Noorden G, Yuan M, Mathesius U (2014) A *Sinorhizobium meliloti*-specific N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal increases nodule numbers in *Medicago truncatula* independent of autoregulation. *Frontiers in Plant Science* 5: 551 <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00551>

Vences-Guzmán MA, Geiger O, Sohlenkamp C (2008) *Sinorhizobium meliloti* mutants deficient in phosphatidylserine decarboxylase accumulate

phosphatidylserine and are strongly affected during symbiosis with alfalfa. *Journal of Bacteriology* 190: 6846–6856. <https://doi.org/10.1128/JB.00610-08>

Verma DP, Hong Z (1996) Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends in microbiology* 4:364-368. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10053-6](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10053-6)

Via VD, Zanetti ME, Blanco F (2016) How legumes recognize rhizobia. *Plant Signaling and Behavior* 11:1-6. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1120396>

Vincent JM (1970) Appendix III. The modified Fåhraeus slide technique. En: A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria, pp. 144- 145. Ed. Vincent JM Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.

Walker SA, Viprey V, Downie JA (2000) Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *PNAS* 97:13413–13418. <https://doi.org/10.1073/pnas.230440097>

Wang C, Yu H, Luo L, Duan L, Cai L, He X, We J, Mysore K, Li G, Xiao A, Duanmu D, Cao Y, Hong Z, Zhang Z (2016) *NODULES WITH ACTIVATED DEFENSE 1* is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 212:176–191. <https://doi.org/10.1111/nph.14017>

Whalley HJ, Knight MR (2013) Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses. *New Phytologist* 197:690-693. <http://doi.org/10.1111/nph.12087>. Epub 2012 Nov 28

Wittenberg JB (1974) Facilitated Oxygen Diffusion. *The Journal of Biological Chemistry* 249:4057-4066.

Zgadzaj R, James EK, Kelly S, Kawaharada Y, Jonge N, Jensen DB, Madsen LH, Radutoiu S (2015) A legume genetic framework controls infection of nodules by

symbiotic and endophytic bacteria. Plos One 11:1-21.

<http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005280>

Zhang HY, Yu Q, Lü XT, Trumbore SE, Yang JJ, Han XG (2016) Impacts of leguminous shrub encroachment on neighboring grasses include transfer of fixed nitrogen. *Oecologia* 180:1213–1222. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3538-5>

Zipfel C, Oldroyd GE (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543:328-336. <http://doi.org/10.1038/nature22009>

Tabla S1. Análisis de varianza factorial correspondiente al experimento reportado en la figura 12A.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Co-inoculación	37.1871	1	37.1871	15.2608	0.000132
Cepa	240.5286	11	21.8662	8.9734	0.000000
(Co-inoculación)(Cepa)	566.6670	11	51.5152	21.1408	0.000000
Error	438.6186	180	2.4368		