



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Maestría en Biología Experimental

“Efecto del compuesto bacteriano dimetilhexadecilamina en la microbiota endofítica de la leguminosa modelo *Medicago truncatula*”

TESIS

QUE PRESENTA:

Q.F.B. Kassandra Michelle Real Sosa

Como requisito para obtener el Título Profesional de
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Director de Tesis:

D.C. Eduardo Valencia Cantero

Morelia, Michoacán. Agosto 2018



RESUMEN

El suelo es un ambiente habitado por diversos microorganismos, incluyendo bacterias. En el suelo también crecen las raíces de las plantas que interactúan con los microorganismos presentes formando un microecosistema denominado rizosfera. Las plantas y las rizobacterias han coevolucionado intercambiando señales bioquímicas, donde algunas son capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas sin causarles daños conformando lo que se ha denominado la microbiota endofítica.

En el presente trabajo se puso a prueba la hipótesis de que el compuesto orgánico volátil dimetilhexadecilamina (DMHDA) producido por la actinobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 actúa como una molécula mediadora para la colonización endofítica de la planta modelo *Medicago truncatula* por bacterias provenientes de suelos con características diferentes. Principalmente, se caracterizó a las comunidades bacterianas de suelo y rizósfera, así como a las comunidades bacterianas endófitas de *M. truncatula*. Plantas de *M. truncatula* fueron crecidas *in vitro* en presencia de extractos de microbiota del suelo y de diferentes concentraciones de DMHDA en el intervalo de 1 a 16 μ M, y se realizaron perfiles de la estructura de la microbiota endofítica de las plantas cuantificando el ADN de las divisiones actinobacteria y firmicutes y las clases α -proteobacteria, β -proteobacteria y γ -proteobacterias, así como de la actinobacteria *A. agilis* UMCV2 mediante PCR cuantitativo.

Se encontró una elevada concentración de ADN bacteriano en los compartimientos vegetales de raíz y brotes. En particular, se encontró que el crecimiento de las plantas en

medio de cultivo en un intervalo de concentraciones de 1 a 4 μM produjo un enriquecimiento en la abundancia relativa de las divisiones firmicutes y actinobacterias y un empobrecimiento de las clases α -proteobacteria y β -proteobacteria. La adición del compuesto DMHDA condujo a un enriquecimiento apenas perceptible de *A. agilis* UMCV2, mostrando que el efecto de la DMHDA en la colonización endofítica no es específico para esta especie.

Los resultados del trabajo permiten concluir que la DMHDA actúa como una molécula moduladora en la colonización endofítica de *M. truncatula* por bacterias extraídas del suelo.

Palabras clave: Dimetilhexadecilamina, *Medicago truncatula*, qPCR, colonización endofítica, microbiota.

ABSTRACT

Soil is an environment inhabited by diverse microorganisms, including bacteria. In the soil also grow the plant roots that interact with the microorganisms, shaping a microecosystem named rhizosphere. Plants and rizobacteria have co-evolved interchanging biochemical signals, where some are able to colonize the internal tissues of the plants without causing any damage, forming what has been called endophytic microbiota.

In the present work was tested the hypothesis that the volatile organic compound dimethylhexadecylamine (DMHDA), produced by the actinobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, acts as a signal molecule that modulate the endophytic colonization of the model plant *Medicago truncatula* by rhizobacteria, coming from soils with different traits. The bacterial communities from bulk soil and rhizosphere, as well as the endophytic communities from *M. truncatula* plants were characterized. *M. truncatula* plants were grown *in vitro* in presence of soil microbiota and concentrations of DMHDA in the range of 1 to 16 μM , and profiles of the endophytic plant microbiota structure were performed quantifying the DNA from actinobacteria, firmicutes, α -, β - and γ -proteobacteria classes, as well as the strain UMCV2 by quantitative PCR.

A high concentration of bacterial DNA was found in the plant compartments of root and shoots. In particular, it was found that the plant growth in culture medium in a concentration range from 1 to 4 μM of DMHDA produced an enrichment in the relative abundance of the firmicutes and actinobacteria divisions, and a decrease of α - and β -

proteobacteria. The addition of DMHDA compound lead to a bearly enrichment of *A. agilis* UMCV2, showing that the role of DMHDA during endophytic colonization is not specific to *A. agilis* UMCV2.

The results allow concluding that DMHDA acts as a modulating molecule on endophytic colonization of *M. truncatula* by soil bacteria.

Keywords: Dimethylhexadecylamine, *Medicago truncatula*, quantitative PCR, endophytic colonization, microbiota.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	10
II.	ANTECEDENTES.....	13
II.1.	Microbiota vegetal	13
II.2.	Rizósfera.....	14
II.2.1.	Interacciones planta-rizobacteria benéfica, perjudicial y neutra	14
II.2.2.	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	16
II.2.3.	Diversidad bacteriana rizosférica.....	17
II.2.4.	Competencia entre bacterias rizosféricas.....	19
II.2.5.	Reclutamiento de bacterias rizosféricas por las plantas.....	20
II.3.	Bacterias endófitas	25
II.3.1.	Diversidad de bacterias endófitas.....	25
II.3.2.	Factores que afectan la composición del microbioma endofítico	26
II.3.3.	Efecto de la motilidad bacteriana en la colonización endofítica	29
II.3.4.	Control de la planta sobre el microbioma endofítico	30
II.3.5.	La bacteria endofítica <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	31
II.4.	Dimetilhexadecilamina.....	33
II.4.1.	Dimetilhexadecilamina y resistencia sistémica	34
III.	JUSTIFICACIÓN	36
IV.	HIPÓTESIS.....	37
IV.1.	Objetivo General.....	38
IV.2.	Objetivos específicos	38
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
V.1.	Suelo modelo	39
V.2.	Condiciones de crecimiento de plantas de <i>Medicago truncatula</i>	39
V.3.	Preparación de la microbiota de suelo modelo natural y la microbiota modificada de suelo modelo desecado.....	41
V.4.	Extracción de ADN metagenómico de suelo modelo	41
V.5.	Obtención de ADN rizosférico.....	42
V.6.	Extracción de ADN total de plantas de <i>Medicago truncatula</i>	43
V.7.	Cuantificación de las comunidades bacterianas por PCR en tiempo real (qPCR)	44
V.8.	Análisis Estadístico	46
VI.	RESULTADOS.....	47

VII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	74
VIII.	LITERATURA CITADA.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones en la rizósfera	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Conductores de la estructura de la comunidad microbiana dentro de la raíz ¡Error! Marcador no definido.9	
Figura 3. Modelo de enriquecimiento de tres pasos para microorganismos colonizando diferentes microambientes	28
Figura 4. Curvas de calibración o curvas estándar realizadas con los cebadores específicos a nivel de división, clase y en específico para <i>A. agilis</i> UMCV2	49
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% 90 Volts durante 45 min, mostrando el amplificado del gen 16S del tamaño esperado	50
Figura 6. Crecimiento de <i>M. truncatula</i> en suelo modelo o no desecado bajo condiciones <i>in vitro</i>	52
Figura 7. Porcentaje de abundancia relativa de diferentes clases, divisiones y de <i>A. agilis</i> UMCV2 presentes en las comunidades microbianas de suelo, rizósfera y en el interior de los tejidos de raíz y brote de <i>M. truncatula</i> (Microbiota endofítica ME).....	54
Figura 8. Efecto de la DMHDA en el crecimiento de la leguminosa <i>M. truncatula</i> suplementada con microbiota extraída de suelo natural	58
Figura 9. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de las raíces de <i>M. truncatula</i> basado en la cuantificación mediante qPCR	61
Figura 10. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de los brotes de <i>M. truncatula</i> basado en la cuantificación mediante qPCR.	62
Figura 11. Efecto de la dimetilhexadecilamina en el crecimiento de la leguminosa <i>M. truncatula</i> suplementada con microbiota extraída de suelo desecado	66
Figura 12. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de las raíces de <i>M. truncatula</i> crecidas en medio suplementado con microbiota extraída de suelo desecado basado en la cuantificación mediante qPCR.	69
Figura 13. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de los brotes de <i>M. truncatula</i> crecidas en medio suplementado con microbiota extraída suelo desecado basado en la cuantificación mediante qPCR.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Combinaciones de cebadores y condiciones de la PCR utilizadas para cuantificar mediante qPCR el número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales y grupo taxonómicos específicos.....	45
Tabla 2. Cantidad de ADN de las clases, divisiones y de <i>A. agilis</i> UMCV2 presentes en el ADN extraído de suelo, rizosfera y de los tejidos internos de <i>M. truncatula</i> basada en la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR [†]	56
Tabla 3. Cantidad de ADN de las divisiones, clases y de <i>A. agilis</i> UMCV2 en las comunidades microbianas presentes en el ADN extraído de los tejidos internos de <i>M. truncatula</i> obtenida de la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR [†]	64
Tabla 4. Cantidad de ADN de las clases y divisiones en las comunidades bacterianas presentes en el ADN de los tejidos internos de <i>M. truncatula</i> basada en la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR [†]	73

I. INTRODUCCIÓN

El suelo proporciona un conjunto de microorganismos, cuya diversidad es afectada por factores edáficos y ambientales, y probablemente por la historia de la vegetación del lugar (Reinhold-Hurek et al. 2015). Se conoce que los microorganismos colonizadores de raíz se reclutan desde este reservorio a la rizósfera (Wargner et al. 2016), la cual es la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas a través de la rizodeposición de exudados, mucilago y células desprendidas. Los exudados de raíz contienen una variedad de componentes predominantemente ácidos orgánicos y azúcares, así como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas, compuestos antimicrobianos y compuestos orgánicos volátiles o VOCs (alcoholes, aldehídos, cetonas y CO₂, entre otros) (Turner et al. 2013).

Los VOCs son definidos como todos aquellos compuestos que presentan una presión de vapor de 0.01k Pa o más a 293.15 °K (20 °C) (Insam y Seewald et al. 2010), por lo que son volátiles a temperatura ambiente. Los VOCs pueden ser liberados de manera constitutiva o bajo condiciones de estrés biótico o abiótico y ser usados por las plantas como mediadores de una comunicación entre organismos del mismo o de diferente reino (Velázquez-Becerra, 2011). Por otra parte, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) también participan en el bienestar de las plantas mediante la emisión de VOCs (Sharifi y Ryu 2018).

La dimetilhexadecilamina (DMHDA) es un compuesto orgánico volátil producido por distintas PGPRs (Velázquez-Becerra et al. 2011; Orozco-Mosqueda et al. 2013; Hernández-

León et al. 2015) que modula (estimula y reprime según la concentración) el crecimiento bacteriano e inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos (Velázquez Becerra et al. 2011 y 2013) además, se conoce que este compuesto actúa como una molécula señal en la comunicación planta-microorganismo (Velázquez-Becerra et al. 2011; Orozco-Mosqueda et al. 2013).

En plantas, la DMHDA tiene diversos efectos, modula la morfogénesis y la organogénesis y estimula los mecanismos vegetales de absorción de hierro, aun cuando las plantas no sufran deficiencias de este nutrimento (Orozco-Mosqueda et al. 2013; Castulo-Rubio et al. 2015). Resultados recientes, muestran que la DMHDA también enciende mecanismos de señalización relacionados con las rutas de defensa en plantas mediadas por el ácido jasmónico (Resistencia Sistémica Inducida ó ISR) y el ácido salicílico (Resistencia Sistémica Adquirida o SAR) (Raya-González et al. 2017).

Por otra parte, se ha determinado que las rizobacterias productoras de DMHDA *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Sinorizobium meliloti* tienen capacidades de colonizar endofíticamente a la leguminosa modelo *Medicago truncatula* (Orozco-Mosqueda et al. 2013; Aviles-Garcia et al. 2016).

Medicago truncatula es una especie de planta del Orden Fabales que se utiliza para el estudio de las interacciones planta-microorganismo (Benedito et al. 2008) debido a que tiene un genoma diploide pequeño, un tiempo de generación corto, es altamente transformable y su genoma completo fue recientemente reportado (Cook et al. 1999; Trieu et al. 2000; Young et al. 2011). Además, se conoce que las plantas leguminosas

(Orden Fabales) son el segundo grupo más importante de plantas cultivadas para la alimentación humana y de ganado, solamente por detrás de las gramíneas (Graham PH, 2003), de allí la importancia de su estudio.

En el presente trabajo se explora la hipótesis de que la DMHDA actúa como una molécula mediadora para la colonización endofítica de *Medicago truncatula* por bacterias del suelo.

II. ANTECEDENTES

II.1. Microbiota vegetal

La microbiota vegetal se define como todos los microorganismos asociados a las plantas incluyendo comensales, simbioses y patógenos oportunistas que habitan la planta huésped (Müller et al. 2016). Dicha microbiota pueden ayudar a las mismas a suprimir enfermedades, a estimular el crecimiento, a promover la resistencia al estrés e influenciar el rendimiento y la calidad del cultivo mediante la movilización y transporte de nutrientes (Lugtenberg and Kamilova, 2009).

Por lo tanto, la microbiota es uno de los determinantes clave para la salud y productividad de la planta, esta consiste de microorganismos presentes en la rizósfera, filósfera y endósfera. La rizósfera puede contener hasta 10^7 - 10^9 unidades formadoras de colonia (UFC) de bacterias cultivables por gramo de suelo (Compant et al. 2010). La filósfera, o la superficie aérea de una planta, es considerada relativamente pobre de nutrientes comparada con la rizósfera. Se conoce que la colonización microbiana de hojas no es homogénea debido a que es afectada por estructuras de hojas como venas, pelos y estomas (Turner et al. 2013). Las superficies de las hojas son colonizadas por hasta 10^7 UFC por cm^2 (Lindow SE et al. 2003). Por otra parte, la endosfera está formada por bacterias que se residen por lo menos una parte de su vida en el interior de los tejidos vegetales (Goel et al. 2017).

A continuación se desarrollan algunos aspectos relevantes de la rizósfera y la endósfera.

II.2. Rizósfera

La rizósfera es un ambiente único formado por la interface de las raíces de las plantas y el suelo circundante (Berendsen et al. 2012). En esta región particular, el sistema de raíz y bacterias asociadas proliferan, interactúan y responden a cambios en condiciones ambientales (Campbell et al. 1990), dicha interacción es influenciada a través de la liberación de exudados radicales, de mucilago y por las células desprendidas por la raíz. Los exudados de raíz contienen una variedad de componentes, predominantemente ácidos orgánicos y azúcares, pero también aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y componentes antimicrobianos (Turner et al. 2013). Por lo tanto, los exudados de raíz son determinantes clave de la estructura del microbioma rizósferico (Turner et al. 2013), que se refiere a la totalidad de genomas microbianos e información genética presente en la planta habitada (Müller et al. 2016). Debido al aporte de los fotosintatos de las plantas a la rizósfera, las densidades de poblaciones microbianas son entre 3 y 10 veces más altas en la rizósfera que en el suelo circundante. Este fenómeno es conocido como “efecto rizósfera” (Lynch et al. 1990).

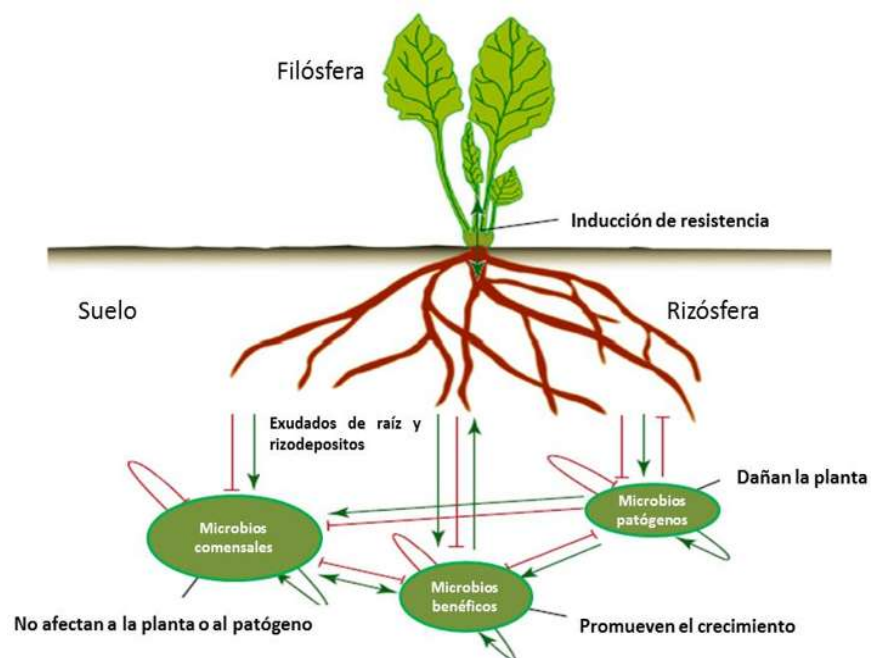
II.2.1. Interacciones Planta-rizobacteria benéfica, perjudicial y neutra

Los microorganismos rizosféricos incluyen a hongos, bacterias, protozoa y algas, de entre los cuales las bacterias constituyen aproximadamente el 95%. Tanto el número como los tipos de bacterias que son encontradas en diferentes suelos, son influenciados por las condiciones del mismo, tales incluyen temperatura, textura y la presencia de sal y otros

químicos así como el número y tipo de plantas encontradas en esos suelos (Glick et al. 1999). Las bacterias respecto a las plantas pueden tener tres efectos: benéfico, perjudicial o neutro (Glick et al. 2012).

Las bacterias benéficas a menudo se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB). Las bacterias que interactúan con las plantas, pero que no tienen ningún efecto discernible en la planta (aunque a menudo es un beneficio para las bacterias) se denominan bacterias comensales y por último, las bacterias que son dañinas para las plantas generalmente se consideran patógenos de las plantas (fitopatógenos) (Berendsen et al. 2012; Glick et al. 2015).

Figura 1. Interacciones en la rizósfera. Las interacciones planta-rizobacteria pueden ser benéficas, perjudiciales o neutras. Modificado de Berendsen et al. 2012.



Se conoce, que las plantas son capaces de influenciar no sólo el número sino también la composición y activación de su microbioma rizosférico a través de sus exudados.

Viceversa, un amplio rango de patógenos transportados por el suelo son capaces de afectar la salud de la planta, sin embargo, antes de la infección estos microbios están en competencia con muchos otros microorganismos en la rizósfera por nutrientes y espacio. En esta batalla por recursos, microbios benéficos pueden limitar el éxito del patógeno a través de la producción de compuestos biostáticos, el consumo de (micro) nutrientes o estimulando el sistema inmune de la planta. La mayoría de los microbios podrían no afectar la planta o el patógeno directamente debido a que ocupan diferentes nichos ecológicos (microbios comensales) pero es probable que afecten a cualquier otro organismo hasta cierto punto a través de una compleja red de interacciones (**Figura 1**) (Berendsen et al. 2012).

II.2.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las PGPRs contribuyen al crecimiento de planta a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen a aquellos por los cuales la bacteria influencia el crecimiento de la planta por la secreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como son auxinas, citocininas, giberelinas y VOCs (Arkhipova et al. 2005; Ryu et al. 2003) o por el mejoramiento en la absorción de nutrientes tales como, hierro, fosfato y nitrógeno (Raya-González et al. 2016).

En tanto que, los mecanismos indirectos incluyen la producción de antibióticos y de enzimas degradadoras de la pared celular, la disminución de los niveles de etileno en la planta, induciendo la resistencia sistémica, disminuyendo la cantidad de hierro disponible

para patógenos y la síntesis de compuestos volátiles los cuales incrementan la aptitud de la planta por la inhibición del crecimiento de microorganismos perjudiciales (Glick, 2015; Santoyo et al. 2012).

Se ha demostrado que tanto las bacterias rizosféricas, como las bacterias que habitan la endosfera (endofíticas) son capaces de comportarse como PGPRs (Lacava y Azevedo, 2013).

II.2.3. Diversidad bacteriana rizosférica

Desde hace tiempo se conoce que el suelo aloja un gran número de bacterias (alrededor de 10^8 a 10^9 células por gramo de suelo) y que el número de células bacterianas cultivables en el suelo, es generalmente alrededor del 1% del número total de células presentes (Schoenborn et al. 2004). Diversos factores bióticos y abióticos influyen la diversidad estructural y funcional de las comunidades bacterianas, por ejemplo, el clima y la estación del año, los animales, el tipo de suelo, la salud de la planta y el estado de desarrollo (Fig.2). Los efectos sobre la población del suelo varían con la especie o la variedad del vegetal (Frioni, 1999). La edad de la planta, su estado sanitario y vigor, el tipo y posición de la raíz, así como el tipo de suelo y el ambiente determinan el efecto rizosférico. Asimismo, el grado de lignificación del aparato radical, el cual está asociado a la edad del cultivo, afecta decisivamente la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Lynch, 1990; González-Manero et al. 1995) y por lo tanto, es un factor que influye en el funcionamiento de la rizósfera.

Estudios de microbiomas rizósfericos de distintas plantas han revelado que la distribución a nivel taxonómico de phyla microbianos son similares. Proteobacteria usualmente domina las muestras, particularmente aquellas de la clase α y β . Otros grupos principales incluyen a Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Acidobacteria. (Turner et al. 2013). Dentro de las PGPRs se incluyen varios géneros bacterianos, entre los que destacan *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Serratia* (Klopper et al., 1989), *Azospirillum* (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994), *Pseudomonas* (Cook & Baker, 1983), *Azotobacter* (Khalid & Ashad., 2004), *Frankia*, *Thiobacillus* (Baker et al., 2007). *Burkholderia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Hafnia*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*.

En un estudio realizado por Ofek et al. (2014), se compararon la diversidad y actividad de las comunidades bacterianas en el rizoplano y en el suelo situado más allá de la rizósfera de plantas de pepino, jitomate, trigo y maíz, mediante un análisis metagenómico y se observó que las comunidades de raíz y suelo difirieron significativamente. Las raíces fueron dominadas significativamente por Proteobacteria (80%) mientras que en el suelo las Actinobacterias fueron las más abundantes (40%). Además se reflejó un cambio poblacional importante en la abundancia de bacterias γ -proteobacteria (desde 5.1% en suelo a 25.2% en asociación con raíces) y también de α -proteobacteria, la clase dominante de bacterias de la raíz, que aumentaron 1.5 veces respecto a las poblaciones del suelo (38.1% de las lecturas bacterianas totales). También pudo observarse que en el rizoplano de las plantas se produjo una composición en la comunidad microbiana que fue distintiva de cada especie vegetal.

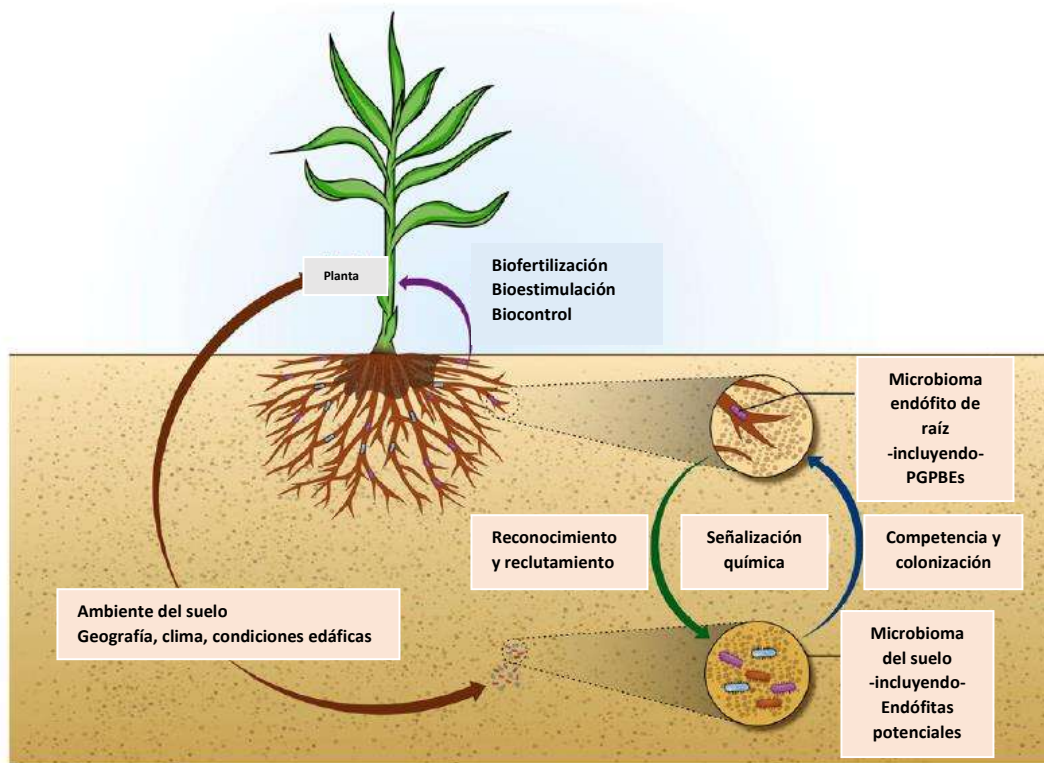


Figura 2. Conductores de la estructura de la comunidad microbiana dentro de la raíz. El suelo es capaz de influenciar la composición del microbioma del mismo a través de factores locales y de gran escala (flecha café). Similarmente, el ambiente del suelo también influencia la fisiología de la planta (flecha café), afectando así a las interacciones bioquímicas entre las raíces de las plantas y el microbioma del suelo. Las plantas seleccionan y reclutan a endófitas potenciales (flecha verde) a través de las diferencias en la arquitectura de la raíz y la señalización química en los exudados de raíz. Las endófitas potenciales cooperan y compiten por sitios de invasión en la raíz (flecha azul). Una vez establecidas dentro de la raíz de la planta pueden influenciar el crecimiento (flecha morada) a través de la liberación de fitohormonas (fitoestimulación), incrementando el suministro de nutrientes (biofertilización) y proporcionando protección contra fitopatógenos (biocontrol). Este subconjunto de población endófitas es llamado bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (PGPBEs) (Gaeiro et al. 2013. American Journal of Botany 100: 1738–1750).

II.2.4. Competencia entre bacterias rizosféricas

La rizósfera es un ambiente altamente competitivo por microorganismos para ocupar espacios y obtener nutrimentos (Raaijmakers et al. 2002). Los microorganismos, ya sean

potencialmente benéficos o patogénicos compiten por colonizar los tejidos de las plantas y en obtener nutrientes, logrando proliferar en este microambiente, posiblemente afectando el crecimiento y desarrollo de la planta (Haas and Keel, 2003). Dada la abundancia relativa de sustratos en la rizósfera, la eficiencia en la absorción de nutrientes y catabolismo de las bacterias es un factor clave para la competitividad (Chin-A-Woeng et al., 2003). La implementación de estrategias metabólicas, como por ejemplo, la capacidad de conversión extracelular de la glucosa a ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico permite a algunas bacterias, incluyendo varias especies de *Pseudomonas*, secuestrar eficientemente glucosa y darle una ventaja sobre los microorganismos que carecen de la capacidad de utilizar estos compuestos (Gottschalk, 1986). Otro ejemplo es la producción de sideróforos específicos por algunas bacterias especialmente del género *Pseudomonas*, no solo como parte de un sistema de captación de hierro de alta afinidad, sino también para secuestrar el hierro y dejarlo indisponible para otras bacterias (Sexton et al. 2017).

II.2.5. Reclutamiento de bacterias rizósfericas por las plantas

Las plantas pueden influenciar la composición del microbioma de la raíz por la secreción activa de compuestos que específicamente estimulan o inhiben a miembros de la comunidad microbiana debido a esto, en la rizósfera existe una selección de microorganismos que son capaces de prosperar con base a los exudados de raíz y competir con otros. Por lo tanto, la colonización endofítica de las plantas por bacterias es un proceso complejo que requiere de la capacidad de la bacteria para competir en el suelo

rizósferico y encontrar un lugar para comunicarse e interactuar con las raíces de las plantas (Bais HP et al. 2006).

Las raíces de las plantas secretan grandes cantidades que van del 10% hasta el 44% de su carbono fijado fotosintéticamente como exudados los cuales contienen un amplio rango de moléculas como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, polisacáridos y mucilago; también descaman células del borde de la capa de raíz, (Bais HP et al. 2006; Bertin C et al. 2003). De entre los fotosintatos exudados por la raíz, destacan los ácidos orgánicos, que han recibido atención considerable por su función en la producción de sustratos para el metabolismo microbiano y por su función como intermediarios para reacciones biogeoquímicas en el suelo.

Especialmente, las plantas que crecen en ambientes de bajo contenido de nutrientes emplean exudados de raíz de distintas formas. Un ejemplo es: como señales simbióticas a los microorganismos del suelo involucrados en la adquisición de nutrimentos (Berg y Smalla, 2009). De esta forma, las raíces proporcionan un nicho atractivo y rico en nutrimentos para microorganismos, donde las interacciones de ambas partes también son fomentadas por la necesidad de un transporte intenso de agua y moléculas solubles por las raíces. (Dakora & Phillips, 2002).

Debido a que los exudados de raíz son químicamente diversos, incluyen a aquellas moléculas involucradas en atraer microorganismos a la raíz o en el caso de endófitos, microorganismos que sean capaces de colonizar tejidos internos de las plantas (Santoyo et al. 2016). Sin embargo, las diferencias en los patrones de exudados de la raíz de la planta,

pueden tener efectos negativos o positivos sobre microorganismos (Bais et al. 2006) los cuales, probablemente juegan un papel importante en el desarrollo del tipo de planta.

La función de las moléculas derivadas de raíces ha sido demostrada en un enfoque reduccionista. Shidore et al. 2012 demostraron que los exudados de raíz colectados bajo condiciones estériles inducen una respuesta transcriptómica global en la bacteria endófito *Azoarcus sp.* strain BH72 elevando la expresión de genes requeridos para la colonización endofítica, sugiriendo que la bacteria fue preparada para el estilo de vida endofítico por exudados producidos por la planta.

En un estudio realizado por Dayakar et al. 2013 se analizó el efecto de diferentes grupos de compuestos naturales derivados de los exudados de raíz de *Arabidopsis thaliana* en la composición microbiana del suelo. En el estudio se demostró que fenoles están correlacionados significativamente con 31 OTUs (correspondientes a las especies de *Rhizobium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, etc.) seguido de aminoácidos con 9 OTUs y alcoholes dulces con uno. Sugiriendo con estos datos que los azúcares, aminoácidos y alcoholes dulces actúan como atrayentes generales para un amplio rango de microbios, sin embargo los compuestos fenólicos actúan como sustratos específicos o moléculas de señalización para microbios específicos. Dos azúcares (glucosa o fructosa) están positivamente correlacionados con 28 OTUs, reforzando lo establecido que azúcares actúan como quimio-atrayentes generales.

Exudados rizosféricos atractivos y antibacterianos

El "efecto rizosfera", descrito por primera vez por Hiltner en 1904 (Hiltner et al. 1904), asume que muchos microorganismos son atraídos por nutrientes exudados por las raíces de las plantas. Hiltner observó que el número y la actividad de los microorganismos incrementaban en las proximidades de las raíces de las plantas (Bais et al. 2006).

Por el hecho de que exudados de raíz son altamente específicos de especies vegetales, el uso de compuestos específicos pueden explicar la especificidad de las comunidades microbianas por la planta. Curiosamente, los flavonoides, una clase diversa de compuestos polifenólicos secretados por las plantas, a menudo sirven en interacciones entre plantas y microorganismos (Shaw et al. 2006). Por ejemplo, la secreción de isoflavonas en las raíces de soja atrae a la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* así como al patógeno *Phytophthora sojae* (Morris et al. 1998).

Se conoce que, las raíces de las plantas incrementan substancialmente la actividad microbiana en la rizósfera (Oger et al. 2004). Tal como las interacciones simbióticas microbio-raíz dependen de metabolitos secundarios en exudados de raíz para la iniciación y desarrollo de asociaciones benéficas, la supervivencia de células de raíz físicamente vulnerables ante el continuo ataque de microorganismos patógenos depende de "productos químicos subterráneos" mediados por la secreción vegetal de fitoalexinas, proteínas de defensa y otros químicos aun no conocidos (Bais HP et al. 2006).

Por ejemplo, se ha reportado la evidencia de la participación de oxalato en el reclutamiento de la cepa bacteriana benéfica *Burkholderia phytofirmans* PsJN por plantas huéspedes (Kost et al. 2014). En el estudio, una cepa mutante en la utilización de oxalato de *Burkholderia phytofirmans* fue usada para inocular plantas de lupino y maíz que secretan niveles bajos y moderados de oxalato respectivamente. La mutante fue observada en números significativamente menores comparados con los de la cepa silvestre tanto en maíz como en lupino tres días después de la inoculación. El oxalato también ha sido observado en los exudados de raíz de *Brachypodium*, observándose altos números de Proteobacterias en la rizósfera de esta planta (Kawasaki et al. 2016).

Además en un estudio realizado por Yuan et al. 2015 se determinó la respuesta quimotáctica y la formación de biofilm de *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 en respuesta a los ácidos orgánicos encontrados en los exudados de raíz en banana, sugiriendo con los resultados que los exudados de raíz que contienen los ácidos orgánicos inducen la quimiotaxis y la formación de biofilm en NJN-6. De hecho, la fuerte respuesta quimiotáctica y de biofilm se encontró cuando se aplicaron 50 μ M de ácidos orgánicos. Mostrando con los resultados que los exudados de raíz en banana, en particular ácidos orgánicos tienen un efecto crucial en la atracción y la inicialización de la colonización de PGPR en raíces del huésped.

II.3. Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas pueden ser definidas como todas aquellas bacterias que pueden colonizar el tejido interno de las plantas sin mostrar efectos negativos en su huésped (Marquez-Santacruz et al. 2010). Sin embargo las comunidades endófitas pueden incluir hongos y se asume que contribuyen al crecimiento, desarrollo, aptitud y adaptación de la planta huésped (Rodríguez et al. 2008; Hardoim et al. 2015; Kandel et al. 2017). Por ejemplo las bacterias endófitas diazotróficas (fijadoras de nitrógeno) pueden convertir gas dinitrógeno en compuestos de nitrógeno tales como amonio y nitrato que están potencialmente disponibles para el metabolismo de la planta (Santi et al. 2013).

Las poblaciones endofíticas al igual que las poblaciones rizosféricas, están condicionadas por factores bióticos y abióticos, pero en todo caso el entorno endofítico es mejor controlado por las plantas que el entorno rizosférico, y de este modo las plantas ejercen una mayor selección sobre las poblaciones endofíticas que sobre las poblaciones rizosféricas (Lundberg et al. 2012; Kandel et al. 2017).

II.3.1. Diversidad de bacterias endófitas

En general, en diversos estudios, la división Proteobacteria, incluyendo las clases α , β y γ -proteobacteria son reportadas como endófitas dominantes, sin embargo miembros de Firmicutes y Actinobacteria también han sido encontradas constantemente como endófitas. Otras clases como Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Acidobacteria son menos comunes sin embargo, también se encuentran como endófitas.

Los géneros comúnmente encontrados como endófitas son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Microbacterium*, (Romero et al. 2014; Hallmann et al. 1997; Sturzet et al. 2000; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Marquez-Santacruz et al. 2010). Todos estos géneros descritos como bacterias endófitas, son comúnmente encontrados como habitantes de la rizósfera. Por lo tanto, se ha sugerido que el microbioma endofítico podría ser una subpoblación de bacterias habitantes de la rizósfera (Marquez-Santacruz et al. 2010; Germida et al. 1998). En este sentido Rosenblueth y Martínez-Romero (2004) mostraron que muchas de las bacterias rizosféricas son igualmente competitivas en la endosfera de la planta.

Recientemente Romero et al. (2014) demostraron el poder del método de pirosecuenciación del ARNr-16S en la determinación de la composición de comunidades endofíticas bacterianas en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Determinaron que las comunidades endófitas estaban compuestas principalmente por cinco phyla, siendo Proteobacteria la más abundante (90%) otros phyla detectados fueron Actinobacteria (1.5%) Planctomycetes (1.4%), Verrucomicrobia (1.1%) y Acidobacteria (0.5%) (Santoyo et al. 2016).

II.3.2. Factores que afectan la composición del microbioma endofítico

Se conoce que los factores geográficos y climáticos a gran escala proporcionan controles externos sobre las comunidades endofíticas debido a las diferentes condiciones ambientales óptimas de las especies, predeterminando así los microorganismos que

pueden habitar el suelo. Estos factores pueden influenciar la fisiología de la planta y por lo tanto alterar las interacciones planta-endófitas. La Latitud, elevación, temperatura y precipitación son algunos de estos factores, que pueden interactuar y afectar e influenciar la composición de la comunidad endofítica (Gairo et al. 2013). Por ejemplo, endófitas rizobias y no rizobias en *Sphaerophysa salsula* fueron capaces de ser claramente agrupadas por área muestreada, con distintas áreas que difieren en la precipitación, en la textura y en el contenido de nutrientes del suelo (Deng et al. 2011).

Por otra parte, las condiciones locales edáficas también pueden ser importantes en influenciar la estructura de la comunidad endofítica. El pH es uno de los principales determinantes de la composición de especies en el suelo (Baker et al. 2009). En plantas leguminosas, el incremento de la acidez en el suelo ha resultado en baja riqueza y diversidad endofita y en una gran abundancia de especies ácido tolerantes de rizobia (Lafay y Burdon, 1998; Bala et al. 2003). El tipo de suelo también es un determinante de la comunidad endofítica muy importante; suelos orgánicos tienen una alta capacidad de retención de humedad así como más nutrientes y carbono orgánico que sus contrapartes minerales y aloja diferentes comunidades (Gairo et al. 2013). En un estudio realizado por Long et al. en el 2010, se determinó que las comunidades endofitas de raíz fueron más diversas en tabaco (*Nicotiana attenuata*) de suelos orgánicos, comparadas con aquellas crecidas en suelos minerales (Gairo et al. 2013).

Influencia de factores en el microbioma asociado

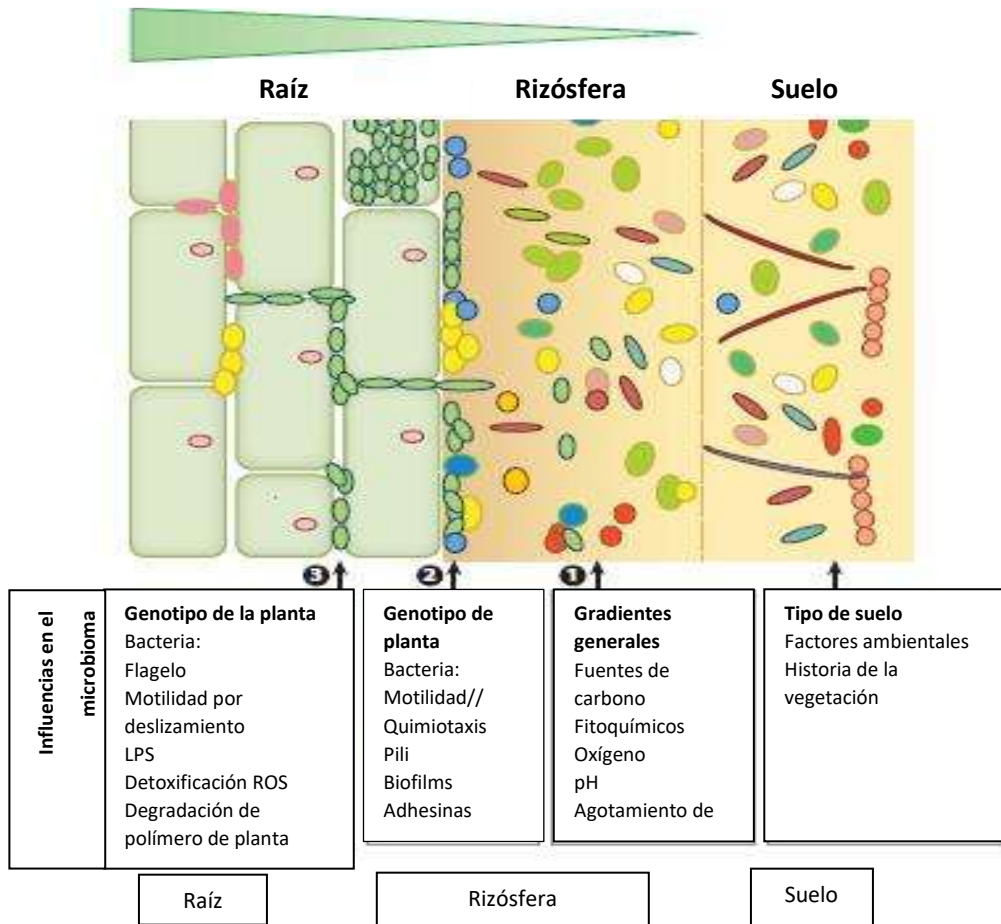


Figura 3. Modelo de enriquecimiento de tres pasos para microorganismos colonizando diferentes microambientes. En suelo entero, las comunidades microbianas dependen del tipo de suelo, factores ambientales e historia de la vegetación. Hacia la raíz, los gradientes en la rizósfera impuestos por la raíz (tales como, liberación de fuentes de carbono y fitoquímicos, gradiente de oxígeno y pH y agotamiento de nutrientes) afectan la composición de la comunidad y el genotipo de la planta tiene una influencia relativamente pequeña. Una comunidad más especializada es enriquecida en el rizoplano bajo la influencia de factores específicos del genotipo de la planta. La endorizósfera es habitada por una comunidad de menor complejidad. Rasgos bacterianos específicos son requeridos para el ingreso y establecimiento dentro de este compartimento, y el genotipo del huésped probablemente tenga la influencia más fuerte en la estructura de la comunidad en este compartimento. Abreviaciones: LPS, lipoquitooligosacáridos; ROS, especies reactivas de oxígeno. (Reinhold-Hurek et al. 2015. Annu. Rev. Phytopathol.53:403-424).

Experimentos de competencia con endófitas, han mostrado que algunas endófitas son más agresivas como colonizadoras debido a que desplazan a otras. Esto fue observado con *Pantoea* sp. La cual fue desplazada por *Ochrobactrum* sp. en arroz (Verma et al. 2004) y

por diferentes cepas de *Rhizobium etli* en maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero 2004). Además la presencia de diferentes especies endófitas en soja dependen del genotipo y la edad de la planta, de la muestra de tejido y de la estación en la que fue aislada (Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

El manejo antropogénico, como la aplicación de fertilizantes y pesticidas también puede influenciar la composición de la comunidad endófitas. Por ejemplo, el maíz modificado con fertilizante orgánico mostró un aumento en la riqueza de especies metanotróficas y una composición endófitas significativamente diferente comparada con la encontrada bajo la aplicación del fertilizante mineral (Seghers et al. 2004).

II.3.3. Efecto de la motilidad bacteriana en la colonización endofítica

Se ha mostrado que tanto la superficie como la composición de lipopolisacáridos de una bacteria así como el pili tipo IV y enzimas degradadoras de polímeros de plantas tales como celulasas o pectinasas, son requeridas para la colonización endofítica eficiente (Reinhold-Hurek y Hurek 2011) . Los pili tipo IV retroactivos son usados no solo para la adhesión sino también para la movilidad por deslizamiento en superficie sólidas, lo cual depende de la retracción mediada por pilT del pili. Una mutación en *pilT* de *Azoarcus* sp. BH72, el cual todavía produce pili pero no es capaz de movilidad “por deslizamiento”, fue particularmente alterada en la colonización endofítica sin embargo todavía coloniza la superficie de la raíz (Bohm et al. 2007). Igualmente una mutante que carece de flagelo sólo falló en la colonización endofítica. Por lo tanto, algunos rasgos de motilidad

requeridos para la para colonización de rizoplano podrían ser diferentes de los requeridos para la colonización endofítica.

II.3.4. Control de la planta sobre el microbioma endofítico

No obstante estudios previos señalan que el suelo ha sido identificado como un factor determinante en la composición de la comunidades bacterianas, ya que actúa como reservorio de microorganismos que pueden ser reclutados para colonizar las raíces (Tan Z et. al 2003; Schreiter et al. 2014), las plantas también ejercen una influencia determinante en el microbioma endofítico. Bajo suelos y condiciones ambientales idénticas, el genotipo de la planta es el principal conductor de cambios estructurales y funcionales de diversas comunidades de raíz, indicando que la planta actúa como un filtro para su propio microbioma (Reinhold-Hurek, 2015; Reinhold-Hurek B, 2011). Las plantas pueden determinar la composición de su microbioma de raíz por la secreción activa de componentes que específicamente estimulan o reprimen miembros de la comunidad microbiana (Doornbos et. al 2012).

Las bacterias endófitas fijadoras de Nitrógeno solo constituyen una pequeña proporción del total de las bacterias (Barraquio et al. 1997; Ladha et al. 1983; Martínez et al. 2003), y el incremento de las mismas ha sido considerado como una posibilidad para incrementar la fijación de nitrógeno, incluso la mejor interacción planta-bacteria descrita es la establecida entre plantas leguminosas-rizobias. Las interacciones de bacterias fijadoras pertenecientes a los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y

Sinorhizobium son capaces de inducir la diferenciación de la estructura de nódulo en raíz como se ha demostrado en plantas Fabaceae y Parasponia (Provorov et al. 2009). Síntomas típicos en las raíces de plantas leguminosas infectadas por rhizobia son la curvatura de los pelos radiculares y la aparición de hilos de infección y finalmente el nódulo primordio en las capas internas de raíz. Todos estos procesos son mediados por un intercambio de señalización entre plantas-rhizobia. En células primordio, la bacteria es rodeada por la membrana de la planta y juntas la bacteria y la planta forman un el simbiosoma, en el cual el nitrógeno atmosférico es fijado y transferido en intercambio por carbohidratos (Pawlowski K. 2009).

Iniguez y colaboradores (2005) usaron mutantes de *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana* para determinar el papel de las vías de defensa de las plantas en regular el número de bacterias endófitas. Ellos encontraron que el etileno, molécula señal que induce la resistencia sistémica en plantas, disminuye la colonización por *Klebsiella* sp. Kp342 y las cepas *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*). Una mutante de *Medicago truncatula* insensible a etileno fue hipercolonizada por Kp342 (Rosenblueth et al. 2006).

II.3.5. La bacteria endofítica *Arthrobacter agilis* UMCV2

Arthrobacter agilis UMCV2 es una actinobacteria rizosférica aislada de la rizósfera de maíz, capaz de promover el crecimiento de las leguminosas, frijol (*Phaseolus vulgaris*) y α -lfa (*Medicago sativa*) cuando es inoculada en las raíces de estas plantas (Valencia-Cantero et

al., 2007; Velázquez-Becerra et al. 2011), dicha promoción está dada por distintos mecanismos que incluyen i) el mejoramiento del estado nutricional de plantas mediante la promoción de mecanismos de adquisición de hierro involucrados en la disolución y reducción de Fe^{+3} presente en el suelo (Valencia-Cantero et al. 2007), ii) la emisión de compuestos orgánicos volátiles que actúa como molécula señal estimulando el crecimiento de la raíz y de los tejidos aéreos de *M. sativa* (Velázquez-Becerra et al. 2011) y iii) estimulando los mecanismos de absorción de hierro en la planta (Orozco-Mosqueda et al. 2013).

Aviles-Garcia et al. (2016) demostraron que *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar y prosperar como bacteria endófito en *M. truncatula*, y que esta capacidad es mayor cuando el Fe se encuentra más disponible para la planta.

Un estudio realizado por Montejano-Ramírez et al. (2018) mostró que la inoculación de *A. agilis* UMCV2 en plantas de *M. truncatula* incremento 12 veces la expresión de *MtDef2.1* (gen de respuesta a ácido jasmónico involucrado en la vía ISR). La inducción de este gen es aún mayor cuando las plantas fueron sometidas a deficiencia de hierro e inoculadas con la planta. La expresión de *MtPR1* (un gen de respuesta a ácido salicílico involucrado en la vía SAR) también se indujo en plantas inoculadas con la bacteria (hasta 12 veces), mostrando que la colonización endofítica de *A. agilis* produce una inducción duradera del sistema de defensa ISR y SAR de *M. truncatula* que es potenciado por la deficiencia de hierro.

Otro estudio realizado en plantas de *S. bicolor* en un sistema de compartimientos separados donde las plantas y las bacterias no entran en contacto físico, mostró que los

VOCs emitidos por *A. agilis* UMCV2 fueron suficientes para inducir tanto genes relacionados a las vías de defensa ISR y SAR (Hernández-Calderón et al. 2018) lo que sugiere que compuestos señal emitidos por rizobacterias podrían afectar la colonización endófitas de las plantas al estimular sus sistemas de defensa sistémica.

II.4. Dimetilhexadecilamina

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son definidos como todos aquellos compuestos que presentan una presión de vapor de 0.01 kPa o más a 293.15 °K (20 °C) (Insam y Seewald, 2010), por lo que son volátiles a temperatura ambiente. Uno de los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 es la N,N-dimetilhexadecilamina (dimetilhexadecilamina o DMHDA), compuesto estructuralmente relacionado a las alcanidas, capaz de promover el crecimiento vegetal de *M. sativa* (Velázquez-Becerra et al. 2011).

Se ha reportado que la DMHDA es producida por otras rizobacterias incluidas *Bacillus subtilis* G8 (Firmicutes) (Liu et al. 2008) *Sinorhizobium meliloti* 1021 (α -proteobacteria) (Orozco-Mosqueda et al. 2013) y *Pseudomonas fluorescens* UM270 (γ -proteobacteria) (Hernández-León et al. 2015); no obstante, estas bacterias pertenecen a divisiones y subdivisiones distintas, tienen en común además de producir DMHDA, su capacidad para promover el crecimiento vegetal en plantas. Esto sugiere que la DMHDA podría ser una característica de muy diversas PGPRs.

II.4.1. Dimetilhexadecilamina y resistencia sistémica

Diferentes rizobacterias pueden inducir el desarrollo coordinado y respuestas de defensas en plantas, ya que ambas acciones son típicamente mediadas por la fitohormona ácido jasmónico (Wasternack 2007; Raya-González et al. 2012). En un estudio realizado por Raya González et al. 2017 se analizó si la DMHDA podía activar la expresión de la vía ISR de respuesta al ácido jasmónico evaluando el efecto del compuesto en la expresión del gen marcador *pLOX2:uidA* que corresponde a una lipooxigenasa que participa en la síntesis del ácido jasmónico, encontrándose que la exposición de las plantas tanto a ácido jasmónico como a DMHDA enciende la expresión del gen marcador con intensidades semejantes. Esto muestra que la vía de ISR es activada por el compuesto bacteriano.

II.4.2. Efecto de la dimetilhexadecilamina en los microorganismos

Reportes previos han mostrado que la aplicación exógena de DMHDA a cultivos de *A. agilis* UMCV2 tiene un efecto sobre el crecimiento bacteriano en forma dosis dependiente, observándose que a concentraciones de 0.37 a 1.5 μM se estimula el crecimiento de la bacteria, mientras que concentraciones de 6 y 12 μM inhibe el crecimiento de esta bacteria (Velázquez-Becerra et al. 2011). Otro estudio realizado por Martínez- Cámara (comunicación personal) se analizó el efecto de la DMHDA sobre el crecimiento poblacional de *Bacillus subtilis* zap018-2, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 y la mutante *Pseudomonas aeruginosa* LasI, observando que la DMHDA tuvo un efecto estimulador del crecimiento de *B. subtilis* zap018-2 en un intervalo de concentraciones de 0.37 a 3 μM

mientras que a la concentración de 12 μM produjo un efecto inhibitorio sobre la misma. Sin embargo, este compuesto no mostró un efecto sobre la bacteria *P. aeruginosa* PA01 y la mutante LasI en el mismo intervalo de concentraciones. Con estos resultados, se concluyó que la DMHDA tiene un efecto de modulación sobre el crecimiento bacteriano, resultando distinto en diferentes microorganismos.

Otro reporte señala que la DMHDA inhibe fuertemente el crecimiento tanto del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* como del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* también en forma dosis dependiente. En el caso de *B. cinerea*, la inhibición del crecimiento fue alrededor del 35% a 12.5 μM de DMHDA mientras que la más alta concentración evaluada (100 μM) mostró una inhibición cercana al 70%. Un efecto inhibitorio mayor de DMHDA se evidenció para *P. cinnamomi* en el cual la concentración de 25 μM inhibe el crecimiento en un 80% comparados con los controles sin el compuesto; sin embargo *Trichoderma virens* y *T. atroviride* mostrarán una sensibilidad reducida a DMHDA comparado con *B. cinerea* y *P. cinnamomi*. La concentración de 12 μM de DMHDA que causó una fuerte inhibición de crecimiento de ambos no afectó el crecimiento de *T. virens* y solo se observó una ligera reducción del 7% a la concentración de 50 μM comparado con el control. La concentración más alta de DMHDA evaluada (100 μM) produjo una inhibición modesta cerca del 15% en el crecimiento de *T. virans*. Similarmente, el crecimiento *T. atroviride* no fue inhibido a bajas concentraciones de DMHDA (Velazquez- Becerra et al. 2013).

III. JUSTIFICACIÓN

Diversas PGPRs producen el compuesto DMHDA, el cual modula la morfogénesis, estimula las vías de defensa en plantas y regula el crecimiento de distintas bacterias en forma dosis dependiente. Asimismo, se conoce que algunas de estas PGPRs tiene la capacidad de colonizar endofíticamente a la leguminosa *Medicago truncatula*; sin embargo, se desconoce si la DMHDA interviene en dicha capacidad y si influye en la estructura de la microbiota endofítica.

IV. HIPÓTESIS

La DMHDA actúa como una molécula mediadora para la colonización endofítica de *Medicago truncatula* por bacterias del suelo.

IV.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la DMHDA sobre la colonización endofítica de *Medicago truncatula*.

IV.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana de un suelo modelo no desecado, rizósfera y la microbiota endofítica de *M. truncatula*.
- Determinar el efecto de la DMHDA en la estructura de la microbiota endofítica de *M. truncatula in vitro*.
- Examinar la especificidad de la DMHDA como molécula señal de *A. agilis* UMCV2 en el proceso de colonización endofítica de *M. truncatula*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Suelo modelo

Se utilizó un suelo tipo andosol ligeramente ácido (pH 6.2) obtenido del municipio de Uruapan en México (19°23_56.69_N, 102°02_41.17_W) con una capacidad de campo del 67.5%, 64.47% de arena, 27.44% de limo, 7.80% de arcilla, 1.74% de CO₃ total y 8.94% de materia orgánica. Este suelo fue usado como fuente de poblaciones bacterianas. El análisis del suelo se realizó en el laboratorio de Fertilidad de suelo y nutrición vegetal del Instituto Nacional de Agricultura y silvicultura (INIFAP) en Celaya, México. El suelo fue tomado de la capa superior del suelo (0–20 cm), se tamizó (4mm) y se mantuvo a 4 ° C hasta el análisis químico. *A. agilis* UMCV2 fue aislada de este suelo (Valencia-Cantero et al. 2007).

V.2. Condiciones de crecimiento de plantas de *Medicago truncatula*

Se usaron plantas de *Medicago truncatula* ecotipo Jemalong (A17-1). Las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico anhidro concentrado. El exceso de ácido fue removido por 6 lavados con agua desionizada estéril y la esterilización se realizó con una solución de hipoclorito de sodio 2.5% por 2 minutos, posteriormente se realizaron 6 lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en medio completo Murashige-Skoog (MS) (con 0.6% de fitagar) en cajas Petri envueltas en papel aluminio para evitar la exposición a la luz, estas se mantuvieron a 4°C durante 3 días.

Las plantas germinadas en las cajas Petri fueron transferidas a macetas (tres plantas por maceta) de 60 mL conteniendo 140 gr de suelo modelo.

Otras plantas fueron transferidas a frascos de vidrio de 170 mL cerrados con tapas translúcidas (magenta © Sigma-Aldrich) conteniendo 50 mL de medio Hoagland 1X, suplementado con 50 mL de extracto de suelo modelo desecado/L, 6 g/L de agar (Phytotechnology, X Shawnee Mission KS, US) y DMHDA a concentraciones de 1, 2, 4 y 8 μM .

Por otra parte, otras plantas fueron transferidas a frascos de vidrio de 170 mL cerrados con tapas translúcidas (magenta © Sigma-Aldrich) conteniendo 50 mL de medio Hoagland 1X, 50 mL de extracto de suelo desecado, 6 g/L de agar (Phytotechnology, X Shawnee Mission KS, US) y DMHDA a concentraciones de 1, 2, 4, 8 y 16 μM .

Las plantas en macetas o frascos fueron crecidas en una cámara de crecimiento Percival (ciclo de 16-h luz/8-h oscuridad) con una intensidad de luz de $200 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 22°C durante 21 días. Transcurrido el tiempo las plántulas fueron colectadas, medidas y pesadas. La concentración de clorofila se midió empleando el medidor de clorofila CCM-600 OPTI-SCIENCES el tejido vegetal se desinfectó y conservó para la obtención de ADN.

Todos los tratamientos se realizaron con tres réplicas biológicas.

V.3. Preparación de la microbiota de suelo modelo natural y la microbiota modificada de suelo modelo desecado.

Para la obtención de la microbiota de suelo no desecado, se preparó una solución del suelo modelo agregando 10 gr de suelo/100mL de agua desionizada, se agito durante 2 horas y posteriormente se filtró para eliminar residuos sólidos provenientes del suelo hasta obtener una solución clara, a esta solución se le considero extracto de suelo no desecado.

Para el desecamiento del suelo modelo, se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 meses dejándolo secarse. De este se obtuvo la microbiota, realizando una solución del suelo modelo agregando 10 gr de suelo/100 mL de agua desionizada, se agito durante 2 horas y posteriormente se filtró para eliminar residuos sólidos provenientes del suelo hasta obtener una suspensión clara a la que le fue adicionada 0.4 mL de una suspensión de *A. agilis* UMCV2 con una densidad óptica de 1 a 595 nm. A esta suspensión se le considero extracto de microbiota de suelo desecado.

V.4. Extracción de ADN metagenómico de suelo modelo

Se realizó la extracción del ADN total de muestras de suelo empleando el kit de aislamiento de ADN MO BIO PowerSoil® siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de ADN extraída fue completamente transparente y se analizó su integridad por

electroforesis en gel de agarosa (1%). El ADN se evaluó usando pequeñas cantidades de ADN metagenómico como un templado para la amplificación de genes ribosomales 16S con los oligonucleótidos universales FD1 y RD1: 5'-CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' y 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' (Weisburg et al. 1991; Velazquez-Sepulveda et al. 2012). Una vez analizado se procedió a conservar las muestras a - 20°C para su posterior uso en la caracterización de su comunidad bacteriana mediante qPCR.

V.5. Obtención de ADN rizósferico

Para la obtención de las muestras de suelo rizósferico, las raíces fueron cuidadosamente removidas de cada maceta y el exceso de suelo fue removido sacudiéndolo. Al suelo que permaneció adherido a las raíces se le consideró como suelo rizósferico (Sturz et al. 2001). El suelo fue separado en 3 muestras.

Para la extracción de ADN, se empleó el kit de aislamiento de ADN MO BIO PowerSoil® siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de ADN extraída fue completamente transparente y se analizó su integridad por electroforesis en gel de agarosa (1%). El ADN se evaluó usando pequeñas cantidades de ADN metagenómico como un templado para la amplificación de genes ribosomales 16S con los oligonucleótidos universales FD1 y RD1: 5'- (Weisburg et al. 1991; Velazquez-Sepulveda et al. 2012). En todos los casos el ADN fue cuantificado empleando el micro espectrofotómetro Nanodrop 2000c de Thermo SCIENTIFIC. El ADN analizado se procedió a conservar las muestras a - 20°C hasta su empleo en la caracterización del microbioma endofítico por qPCR.

V.6. Extracción de ADN total de plantas de *Medicago truncatula*

Los tejidos de las plantas fueron colectados tras 21 días de crecimiento (sección VI.2) y posteriormente se realizó la esterilización superficial de las plántulas sumergiendo raíces y brotes por separado en etanol al 70% por 3 min y 1 min respectivamente, enseguida realizando 5 lavados con agua desionizada estéril y sumergiendo en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 y 3 min respectivamente, enseguida se enjuagaron con etanol al 70% durante 30 s y por último se lavaron 5 veces con agua desionizada estéril. Para confirmar que el proceso de esterilización fue exitoso, las alícuotas de agua desionizada estéril usadas en el último lavado fueron plaqueadas en cajas Petri con agar nutritivo, las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C y posteriormente examinadas, considerándose que la ausencia de crecimiento bacteriano implicaba una desinfección exitosa las superficies de los tejidos (Márquez-Santacruz HA, 2010). Una vez corroborada que la desinfección, los tejidos fueron usados para el aislamiento de ADN total.

Se realizó la extracción del ADN total de brotes y raíces de cada una de las réplicas empleando la técnica de Mahuku, (2004) y enseguida se procedió a cuantificar la cantidad de ADN total en cada una de las muestras compuestas empleando el Nanodrop 2000c de Thermo SCIENTIFIC. Estas muestras fueron conservadas a -20°C para la posterior caracterización del microbioma endofítico mediante qPCR.

V.7. Cuantificación de las comunidades bacterianas por PCR en tiempo real (qPCR)

Para la implementación de esta técnica el primer paso fue la estandarización de las condiciones de PCR para cada par de oligonucleótidos utilizados específicos a nivel de subdivisión para α -proteobacteria (a682F-908aR), β -proteobacteria (β -1F- β -1R), y γ -proteobacteria (1080^yF-^y1202R), a nivel de división para Actinobacteria (Act920F3-Act1200R), Firmicutes (Lgc353-Eub518), Verrucomicrobia (Ver53-Eub518) y Bacteroidetes (Bac960F-Bac1100R) y por último en específico para la bacteria *A. agilis* UMCV2 (2CV2F-2CV2R). En todos los casos las combinaciones de cebadores se probaron utilizando muestras de ADN de bacterias pertenecientes a cada una de las subdivisiones y divisiones (*Sinorizhobium medicae*, *Herbaspirillum frisingense*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Bacillus cereus*) llevando a cabo la amplificación el gen 16S del ARN ribosomal (ARNr) mediante PCR con gradiente de temperatura, con el fin de confirmar la temperatura óptima de alineamiento a la cual amplificar según las condiciones sugeridas por la bibliografía de donde se obtuvieron dichos oligonucleótidos (**Tabla 1**). Los cebadores y las combinaciones probadas que no produjeron una única banda del tamaño esperado no fueron utilizados para ninguno de los análisis.

Tabla 1. Combinaciones de cebadores y condiciones de la PCR utilizadas para cuantificar mediante qPCR el número de copias del gen ARNr 16S de bacterias totales y grupo taxonómicos específicos.

Taxón	Cebadore susados	Secuencia de oligonucleótidos (5´-3´)	Temp. De alineació n	Especificidad	Long de amplic ón (pb)	Referencia
α-proteobacteria	a682F 908Ar	CIAGTGTAGAGGTGAAATTC CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	63°C	100%	180	Bachetti De Gregoris et al. 2011
β-proteobacteria	β- 1F β- 1R	AGCCGCGGTAATAC GGTATCTAATCCTG	48°C	92%	320	Patton et al. 2009
γ-proteobacteria	1080 ^y F ^y 1202R	TCGTCAGCTCGTGYGTGA CGTAAGGGCCATGATG	54°C	80%	170	Bachetti De Gregoris et al. 2011
Actinobacteria	Act920F3 Act1200R	TACGGCCGCAAGGCTA TCRTCCCCACCTTCCTCCG	61.5°C	83%	170	Bachetti De Gregoris et al. 2011
Firmicutes	Lgc353 Eub518	GCAGTAGGGAATCTTCCG ATTACCGCGGCTGCTGG	60°C	95%	180	Fierer et al. 2005
Bacteroidetes	Bac960F Bac1100R	GTTTAATTCGATGATACGCGAG TTAASCCGACACCTCACGG	60°C	99.2%	122	Yang et al. 2015
Verrucomicrobia	Ver1165F Ver1263R	TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT CAGTTTTYAGGATTTCTCCGCC	60°C	87%	186	Yang et al. 2015
<i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2	2CV2F 2CV2R	GTCCTGGTGGCATTTC ACGCAGAACAAGAGC	61°C	100%	162	Aviles- García et al. 2016

Para la cuantificación del ADN perteneciente a las subdivisiones, divisiones y en específico a *A. agilis* UMCV2 en suelo y dentro de los tejidos de *M. truncatula*, se utilizó la técnica de medición del incremento de fluorescencia del fluoróforo SYBR Green II unido al ADN de doble cadena generado durante la amplificación (Dorak 2006). Las reacciones las cuales consistieron de un volumen final de 20 µL conteniendo 10 µL de SYBR green Master Mix 2X (Applied Biosystems, UK), 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0.4 µL de ROX y 4 ng de ADN de la muestra, fueron llevadas a cabo en un equipo para PCR en tiempo real

termociclador StepOne (Applied Biosystems. Foster City, California, EU) comparando los valores de fluorescencia con curvas de estándares generadas a partir de diluciones seriadas (1:5) de un número conocido de copias del mismo gen. Como estándar se utilizó el ADN de bacterias específicas pertenecientes a cada división y subdivisión estudiadas. Las curvas de calibración cubrieron un intervalo de 4 ng a 640 fg de ADN como templado para las divisiones, subdivisiones y *A. agilis* UMCV2, en todos los ensayos de qPCR se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) > 0.98, una pendiente cercana o igual a -3.34 y una curva de disociación con un sólo máximo, lo cual muestra un patrón de amplificación lineal con un sólo amplicón. La cuantificación de ADN de las divisiones, subdivisiones así como de *A. agilis* UMCV2 en suelo y en tejidos de *M. truncatula* se realizó con base en las curvas de calibración, utilizando como templado 4 ng de ADN proveniente de las muestras de suelo y tejidos vegetales.

V.8. Análisis Estadístico

Todos los experimentos tuvieron 3 réplicas biológicas (o 3 muestras de suelo en su caso). Cada replica consistió de tres plantas (9 plantas en total). Los resultados fueron analizados usando Statistica 7.0 software (Statsoft Inc. 2001). La prueba de ANOVA y la prueba de separación de medias de Duncan fueron usadas para múltiples comparaciones ($p < 0.05$).

VI. RESULTADOS

VI.1. Curvas de calibración de qPCR de las comunidades bacterianas

Para poder realizar la cuantificación de cada una de las comunidades bacterianas presentes en las distintas muestras, fue necesario construir curvas de calibración de qPCR con un ADN bacteriano de concentración conocida, representativo y perteneciente a cada división o clase a cuantificar. Las curvas fueron validadas, obteniendo parámetros aceptados. La **figura 4** muestra las curvas de calibración realizadas con los cebadores seleccionados y probados a nivel de división y clase.

En la **figura 4a** se observa a la curva para α -proteobacteria y en su parte inferior se muestra la ecuación de la recta arrojada por el programa $Y=-3.567X+22.721$ donde el eje "X" corresponde a distintas diluciones de concentraciones conocidas del ADN bacteriano perteneciente a la clase, y el eje "Y" corresponde al ciclo menor en el cual cada dilución supera el valor del umbral de fluorescencia o "Ct". Los límites de detección van de los 4 ng hasta 1280 fg. Lo mismo se observa para las clases β -proteobacteria y γ -proteobacteria (**Fig. 4b y 4c**) así como para las divisiones Actinobacteria y Firmicutes (**Fig. 4d y 4e**) en las cuales se observa un límite de detección más amplio que va de los 4 ng a los 256 fg, y por último se muestra a la curva de la bacteria *A. agilis* UMCV2 (**Fig. 4f**) en la cual su límite de detección es el más amplio dado que con este se logró cuantificar a la bacteria en la muestra problema, este va de los 4 ng a los 51.2 fg. Es importante mencionar que dado a que no se tenía el ADN de bacterias pertenecientes a las divisiones Bacteroidetes y

Verrucomicrobia no se llevó a cabo la realización de sus curvas estándar y por lo tanto no fue posible su cuantificación.

El análisis de la especificidad de la reacción de qPCR realizada con los cebadores seleccionados para la cuantificación de cada división o clase, se llevó a cabo por medio de la visualización de una curva de disociación de los productos de amplificación o curva “melting”. En esta, los productos fueron sometidos a un gradiente de temperaturas y si la reacción fue específica, se observa un pico de melting único, correspondiente al cambio de fluorescencia existente entre el punto de máxima fluorescencia y el descenso de esta. Con esto se logró determinar la temperatura de fusión (T_m) para cada uno de los productos de amplificación, α -proteobacteria muestra una T_m de 85.88 °C, β -proteobacteria de 85.83 °C, γ -proteobacteria de 84.08 °C, Actinobacteria de 83.39 °C, Firmicutes de 83.92 °C y *A. agilis* UMCV2 de 87.52 °C. En todas las curvas de melt obtenidas se observa un pico único mayor lo cual indica que la reacción es específica (datos no mostrados).

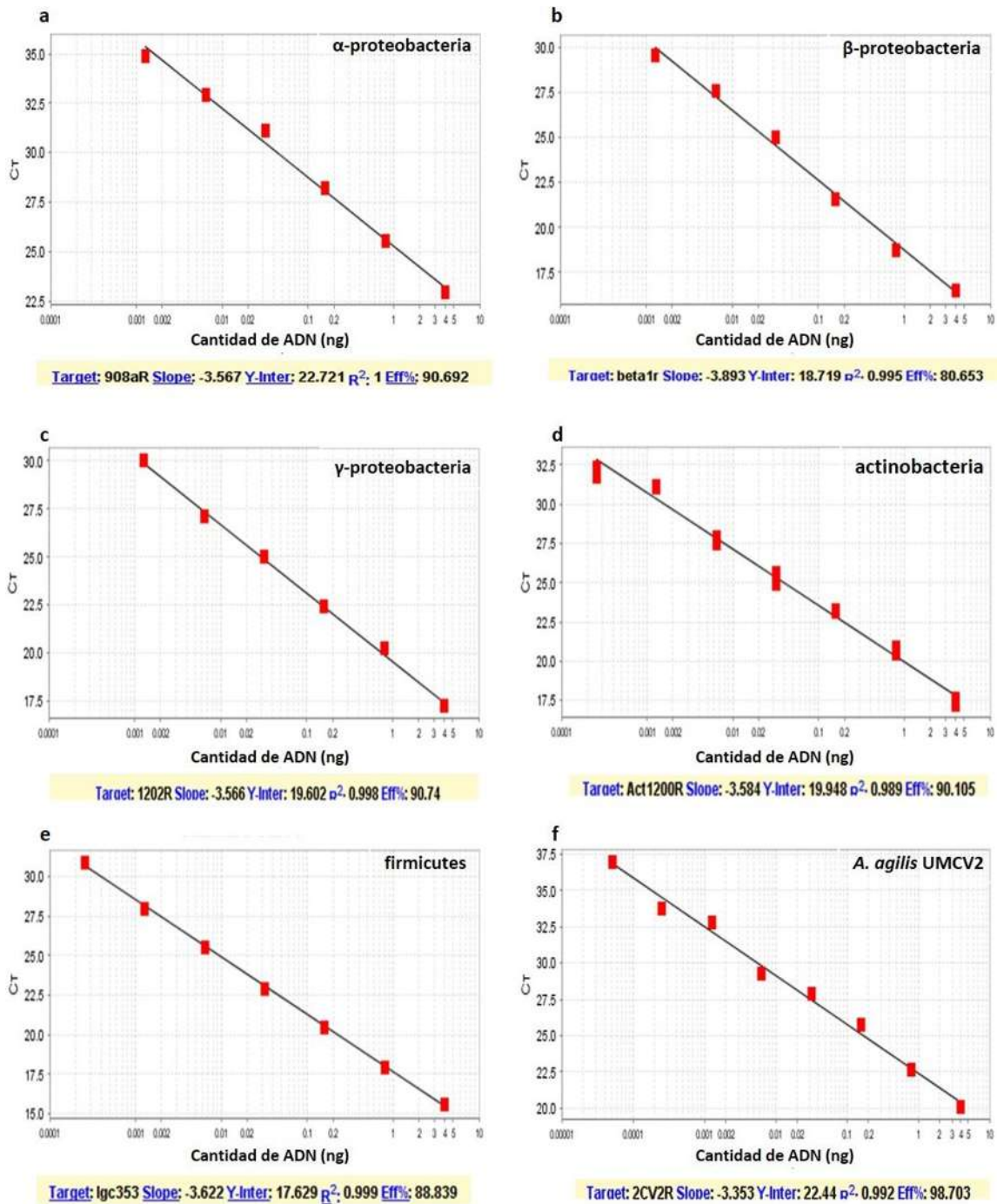


Figura 4. Curvas de calibración realizadas con los cebadores específicos a nivel de división, clase y en específico para *A. agilis* UMCV2. En la parte inferior se observa la ecuación arrojada por el programa: Ejemplo: a) α -proteobacteria $Y = -3.575X + 25.297$; donde "X" corresponde a la cantidad de ADN bacteriano perteneciente a la división en la muestra problema e "Y" al calor del Ct "threshold cycle". b) Curva de calibración de β -proteobacteria, c) Curva de calibración de γ -proteobacteria, d) Actinobacteria, e) Firmicutes, y f) *A. agilis* UMCV2

VI.2. Identificación molecular mediante la amplificación del gen 16S rDNA en suelo tipo 1

Una vez que se realizaron las curvas estándar en qPCR y se validaron, se procedió a obtener el ADN de cada una de las muestras a analizar.

Con la finalidad de identificar si el suelo modelo contenía inhibidores que causaran interferencias en la posterior caracterización de la comunidad bacteriana mediante la técnica de qPCR, se extrajo ADN con el kit MO BIO PowerSoil® y se usó para amplificar el gen 16S rDNA; en la **Figura 5**, se muestra un gel representativo donde se obtuvo un amplificado específico de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) el cual corresponde a el gen 16S rDNA con el cual se indica que es ADN puro, que no contiene inhibidores de la PCR, y que es útil para su caracterización.

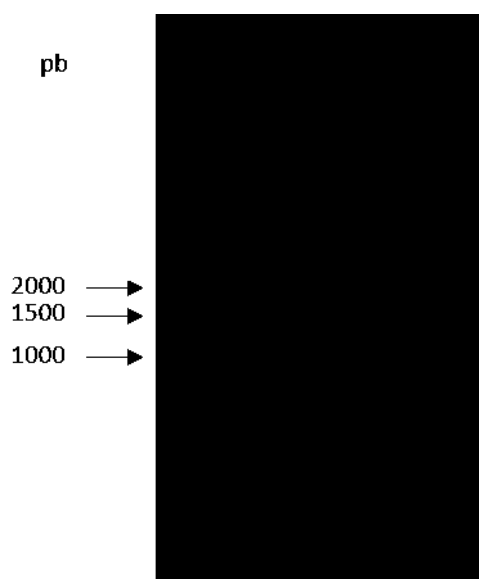


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% 90 Volts durante 45 min, mostrando el amplificado del gen 16S del tamaño esperado. Carril 1 Marcador de peso, Carril 2 muestra de suelo 1, muestra de suelo 2.

VI.3. Análisis de crecimiento de *M. truncatula* en suelo natural

Previó a la obtención del ADN total de *M. truncatula* para la caracterización de su comunidad bacteriana endófito a nivel de división o clase, se cultivaron plantas de *M. truncatula* en suelo modelo por 21 días en condiciones de invernadero y sin exposición a DMHDA con la finalidad de poder comparar su microbiota con la encontrada en plantas expuestas a diferentes concentraciones de DMHDA in vitro.

Bajo estas condiciones, se caracterizó el crecimiento de la planta con fines de referencia para tratamientos posteriores. Se observó el crecimiento característico de las plantas en maceta (**Fig. 6a**) y se registraron los parámetros de crecimiento de biomasa (0.18 g brote; 0.019 g raíz) (**Fig. 6c**), longitud (15.9 cm brote; 10.8 cm raíz)(**Fig. 6d**) y contenido de clorofila (4.9 unidades arbitrarias)(**Fig. 6b**) considerada debido a que es un indicador del estado nutricional de la planta, se determinó que *M. truncatula* crecida en este tipo de suelo son plantas sanas y de buen crecimiento.

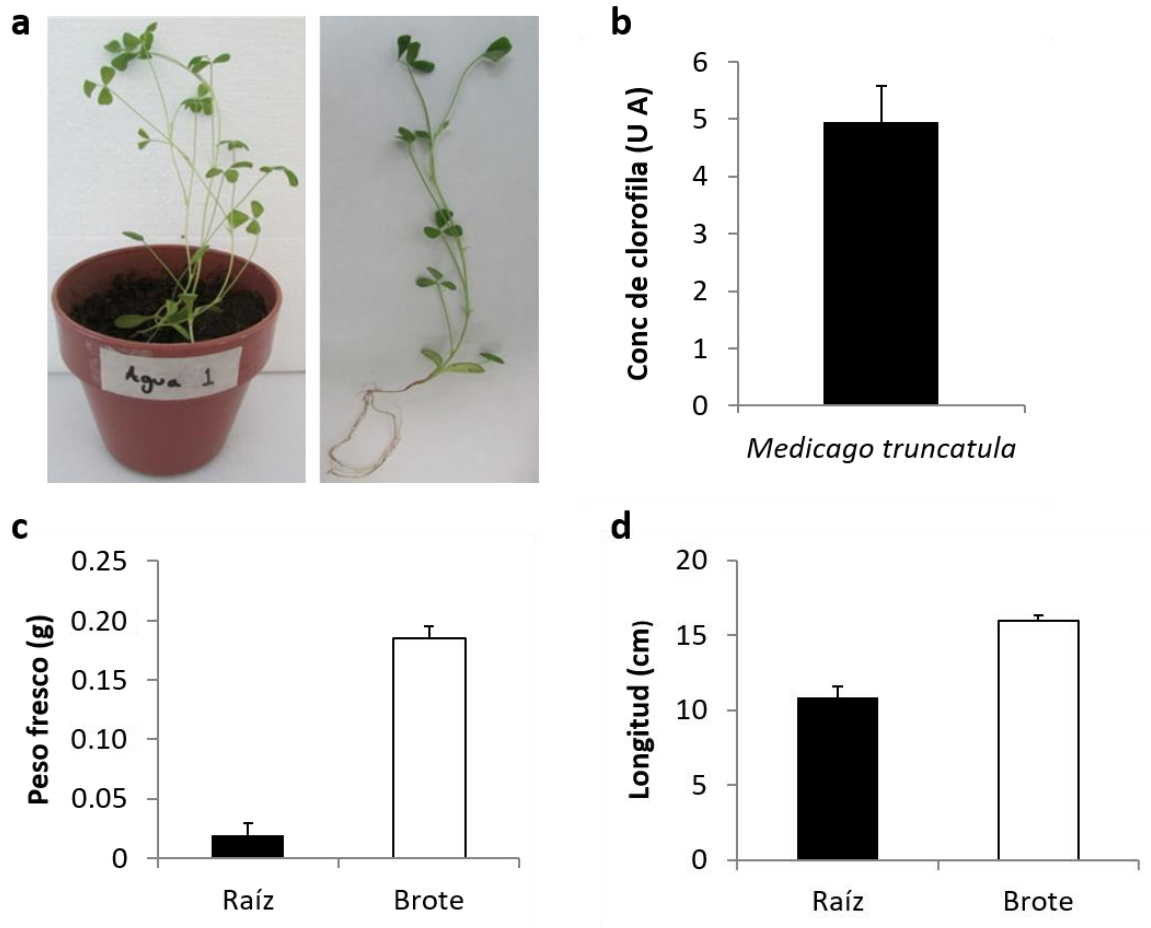


Figura 6. Crecimiento de *M. truncatula* en suelo modelo o no desecado bajo condiciones *in vitro*. Plántulas de 3 días de germinadas fueron colocadas en macetas con suelo no desecado durante 21 días con riego constante de agua. Los valores representan la media (error estándar [SE]) (n=9). **a** vista general del sistema de crecimiento en suelo, **b** planta control de 21 días de edad, **c** peso fresco de raíz y brote, **d** longitud de raíz y brote y **e** concentración de clorofila.

VI.4. Diversidad de comunidades bacterianas en suelo, rizósfera e interior de los tejidos de *M. truncatula*.

Obtenidas las muestras de ADN del suelo, rizósfera e interior de los tejidos de *M. truncatula* crecidas sin tratamiento, se procedió a caracterizar su composición bacteriana lo cual se realizó previo a la determinación del efecto de la DMHDA en las comunidades

bacterianas endófitas de *M. truncatula*, con el objetivo de comparar la composición bacteriana de estos compartimientos con la encontrada en los tejidos *M. truncatula* expuestos a DMHDA.

El ADN extraído de estos compartimientos fue amplificado y cuantificado a nivel de clase, división y en específico para *A. agilis* UMCV2 mediante qPCR. Los resultados mostraron una gran cantidad de bacterias en los cuatro compartimientos siendo mayor la cantidad en rizósfera y suelo (**Tabla 2**). El contraste más marcado en la abundancia relativa de taxones bacterianos fue observado en el brote de la planta respecto al tejido de raíz, rizósfera y suelo, sin embargo el perfil de la microbiota de la rizosfera también pudo ser diferenciada de la microbiota del suelo y la microbiota endofítica de raíz que mostraron una composición muy similar (**Fig. 7; Tabla 2**).

Diversas divisiones fueron encontradas en diferentes cantidades entre los cuatro compartimientos estudiados. Los taxones más dominantes en el suelo fueron Proteobacteria (69%), Actinobacteria (30%), Firmicutes (0.46%) y en específico se logró determinar la presencia de *A. agilis* UMCV2 en los cuatro compartimientos sin embargo; fue más abundante en el suelo (**Fig. 7; Tabla 2**). Notablemente, la rizósfera fue principalmente habitada por Proteobacteria (85%) entre esta, se representó a α -proteobacteria (56%), β -proteobacteria (19%) y γ -proteobacteria (10%). Proteobacteria fue enriquecida en la rizósfera en relación al suelo como se reportó previamente en la rizósfera de *Medicago sativa* (Khalloufi et al. 2016), este enriquecimiento fue ocasionado principalmente por β -proteobacteria y γ -proteobacteria. Sin embargo, en este

compartimiento se observó que hubo un agotamiento significativo de Actinobacteria representada únicamente con el 13% (Fig. 7; Tabla 2).

En el interior de los tejidos de *M. truncatula* se observó una diferencia marcada en el brote respecto de la raíz, dado por un enriquecimiento de casi siete veces de la división γ -proteobacteria (67%) y casi 20 veces en la división Firmicutes (9.6%). Sin embargo, α -proteobacteria y β -proteobacteria y Actinobacteria fueron significativamente agotadas en la microbiota endofítica de brote al comparar con los compartimientos de suelo, rizósfera y microbiota endofítica de raíz lo cual indica que no todas las poblaciones bacterianas son capaces de ascender a los tejidos aéreos de las plantas de la misma manera.

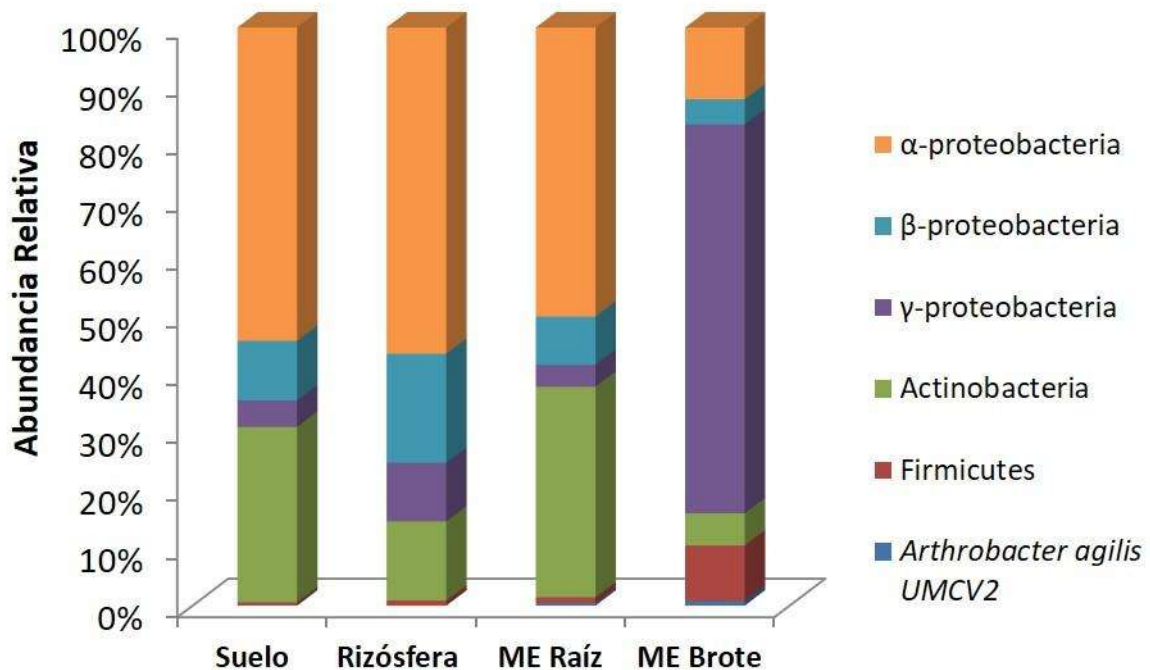


Figura 7. Porcentaje de abundancia relativa de diferentes clases, divisiones y de *A. agilis* UMCV2 presentes en las comunidades microbianas de suelo, rizósfera y en el interior de los tejidos de raíz y brote de *M. truncatula* (microbiota endofítica ME). La abundancia es expresada como el porcentaje del promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de cada una de las muestras biológicas.

Además se examinó la cantidad de ADN de cada una de las clases, divisiones y de *A. agilis* UMCV2 por gramo de suelo, rizósfera ó peso fresco de *M. truncatula* (ADN (μg) / g de PF), la cual varía al comparar entre compartimientos. Los resultados demostraron que existen diferencias significativas en los niveles poblacionales ($p < 0.05$). En términos generales la abundancia de bacterias es mayor en rizósfera y suelo, comparado con el interior de los tejidos de la planta. En la rizósfera, α -proteobacteria y β -proteobacteria son significativamente más abundantes que en el compartimiento de suelo e interior de los tejidos siendo mayor el decremento en estos últimos; sin embargo, fue interesante observar el enriquecimiento de γ -proteobacteria, Firmicutes y *A. agilis* UMCV2 en brote respecto de raíz, suelo y rizósfera (**Tabla 2**). Estos datos coinciden con los valores reportados en otros cultivos de interés agrícola en la cuantificación de microorganismos presentes en la planta, lo cual se atribuye a que en la rizósfera hay una mayor cantidad de microorganismos y actividad microbiana que en todo el suelo y por lo tanto mayor competencia por los sustratos, lo cual favorece a que las bacterias penetren en estos tejidos para la obtención de fuentes de carbono u otros nutrientes.

Un caso muy particular fue el de *A. agilis* UMCV2, que estuvo presente en cantidades muy pequeñas (43 pg de ADN/g suelo) en la rizósfera pero que tuvo una presencia entre mil y dos mil veces más alta en la raíz y los brotes, confirmado que esta bacteria tiene aptitudes como bacteria endofítica.

Tabla 2. Cantidad de ADN de las clases, divisiones y de *A. agilis* UMCV2 presentes en el ADN extraído de suelo, rizosfera y de los tejidos internos de *M. truncatula* basada en la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR[†].

Taxón	Cantidad de ADN µg/ g de suelo		Cantidad de ADN µg/g de PF de <i>Medicago truncatula</i>	
	Suelo	Rizósfera	Raíz	Brote
α-prot	11.748 b	26.604 c	5.869 a	1.271 a
β-prot	0.591 a	9.365 b	1.084 a	0.494 a
γ-prot	1.035 a	4.905 b	0.529 a	7.697 b
Actino	6.744 b	6.501 b	5.750 b	0.609 a
Firm	0.102 a	0.409 a	0.141 a	1.061 b
UMCV2	0.024 a	4 X 10 ⁻⁵ a	0.047 ab	0.090 b
Total	20.244	47.784	13.420	11.222

[†] La abundancia absoluta es expresada como el promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de muestra biológica (suelo o tejido). Las letras son usadas para indicar las medias que difieren significativamente para cada taxón por separado en los diferentes compartimentos por una prueba de rango múltiple de Duncan (p<0.05).

VI.5. DMHDA promueve el crecimiento de *M. truncatula* bajo condiciones *in vitro*

Para determinar el efecto del compuesto DMHDA en el crecimiento de *M. truncatula* se realizó un experimento en frascos donde plántulas fueron crecidas en Medio Hoagland 1X suplementado con microbiota de suelo natural únicamente (tratamiento control) o suplementado con microbiota de suelo natural y diferentes concentraciones del

compuesto puro estándar de DMHDA (**Fig. 8a**). Después de 21 días, se determinó el peso fresco de la planta (raíz y brote), así como longitud y contenido de clorofila. Observándose que bajo estas condiciones la DMHDA tuvo un efecto estimulador del crecimiento sobre los brotes a concentraciones de entre 1 a 4 μM pero con el mayor efecto a la concentración de 2 μM (**Fig. 8b y d**), un comportamiento semejante si bien menos claro se observó en la concentración de clorofila, donde la única diferencia estadísticamente significativas se registró entre el tratamiento con 1 μM y el 8 μM de DMHDA (**Fig. 8f**). Los parámetros de peso fresco y longitud de raíz tuvieron un comportamiento diferente, ya que las concentraciones mayores de DMHDA utilizadas en este experimento (4 y 8 μM) fueron las que produjeron un aumento en peso y longitud. El aumento en la relación brote/raíz ha sido interpretada como un indicador de estrés en la planta (Castulo-Rubio et al., 2015), este podría ser el caso en la concentración de 8 μM , mientras que las plantas crecidas en tratamientos con la concentración de DMHDA de 4 μM tuvieron un comportamiento menos característico de una condición de estrés, ya que la promoción del crecimiento de la raíz fue acompañada con una promoción en el crecimiento de los brotes (**Fig. 8 g**). Estos datos indican que la DMHDA modula el crecimiento de *M. truncatula* en forma dosis dependiente, como ya había sido observado en *Medicago sativa* (Velázquez-Becerra et al. 2011) pero sin la presencia de la microbiota bacteriana.

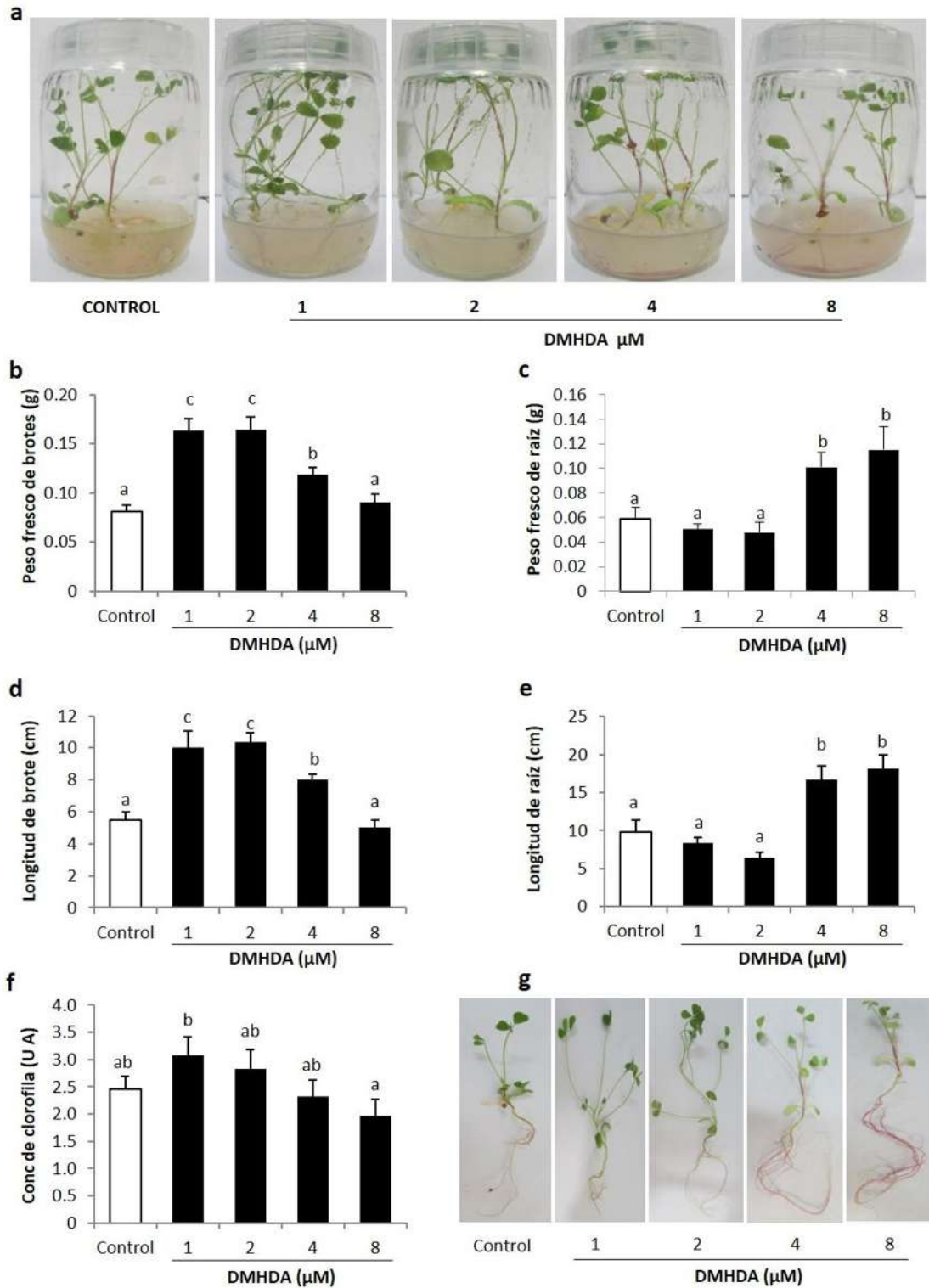


Figura 8. Efecto de la DMHDA en el crecimiento de la leguminosa *M. truncatula* suplementada con microbiota extraída de suelo natural. Plantulas de *M. truncatula* fueron transferidas a frascos con medio sólido Hoagland 1X adicionadas o no (tratamiento control) con DMHDA. Después de 21 días (a), se midió el peso fresco de brote (b) y raíz (c), longitud brote (d) y raíz (e), el concentración de clorofila (f y g). Las

barras representan la media \pm valores de error estándar (n = 9). Las letras son usadas para indicar las medias que difieren significativamente por una prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

VI.6. La DMHDA actúa como mediadora en la colonización de *M. truncatula* por bacterias provenientes del suelo natural en condiciones *in vitro*

El principal objetivo de este estudio fue evaluar los cambios mediados por la DMHDA en la estructura de las comunidades bacterianas endofíticas de *M. truncatula*. Para ello, ADN bacteriano extraído del tejido de raíces y brotes previamente estériles fue cuantificado mediante qPCR. Dicho análisis, reveló que la exposición a la DMHDA influyó la abundancia de las diferentes divisiones y clases; sin embargo, la manera en la que lo hizo varía considerablemente acorde a la concentración del compuesto y entre los tejidos de raíz y brote.

En ambos tejidos, se observó que la población bacteriana endofítica fue dominada por Proteobacteria en raíces (60-74%) y en brotes (47-91%), independientemente de la exposición a la DMHDA (**Fig. 9; Fig. 10**). Mientras que en raíces, β -proteobacteria fue la clase más abundante (47-60%) seguido de α -proteobacteria (6-11%) y γ -proteobacteria (4-10%), en los brotes β -proteobacteria fue menos abundante (17-42%) pero la dominancia de α -proteobacteria fue mucho mayor (17-67%); La abundancia de γ -proteobacteria fue comparable en ambos compartimientos. Seguido de esta división, Actinobacteria fue la segunda división más abundante en ambos compartimientos: en raíces (15-28%) y en brotes (6-32%) y por último Firmicutes de abundancia menor pero significativa en raíces (7-11%) y en brotes (2-22%)(**Fig. 9; Fig. 10**). Es importante

mencionar que *A. agilis* UMCV2 no fue detectada en el interior de los tejidos a pesar de que el inóculo de suelo fue del mismo en donde se aisló a la bacteria y en cual fue previamente cuantificada en el presente trabajo (**Fig. 7**), esto podría indicar que la presencia de *A. agilis* UMCV2 en el extracto de microbiota bacteriana empleado en este experimento fue muy limitada o nula, señalando limitaciones en la metodología empleada.

Fue interesante observar que el tratamiento con DMHDA fue responsable de las diferencias en la abundancia de los taxones al comparar entre tratamientos y controles en cada uno de los compartimientos. En raíz, α - y β - proteobacterias redujeron su abundancia a las concentraciones de 1, 2 y 4 μM siendo más notable el decremento en β -proteobacterias en la concentración de 2 μM que pasaron del 61 % (control) al 49 % (2 μM) (**Fig. 9**). El efecto de la adición de la DMHDA en las γ -proteobacterias fue menos claro, sin embargo a la concentración de 2 μM registró su menor abundancia, pasando de 5.1 % (control) a 4.5 (2 μM).

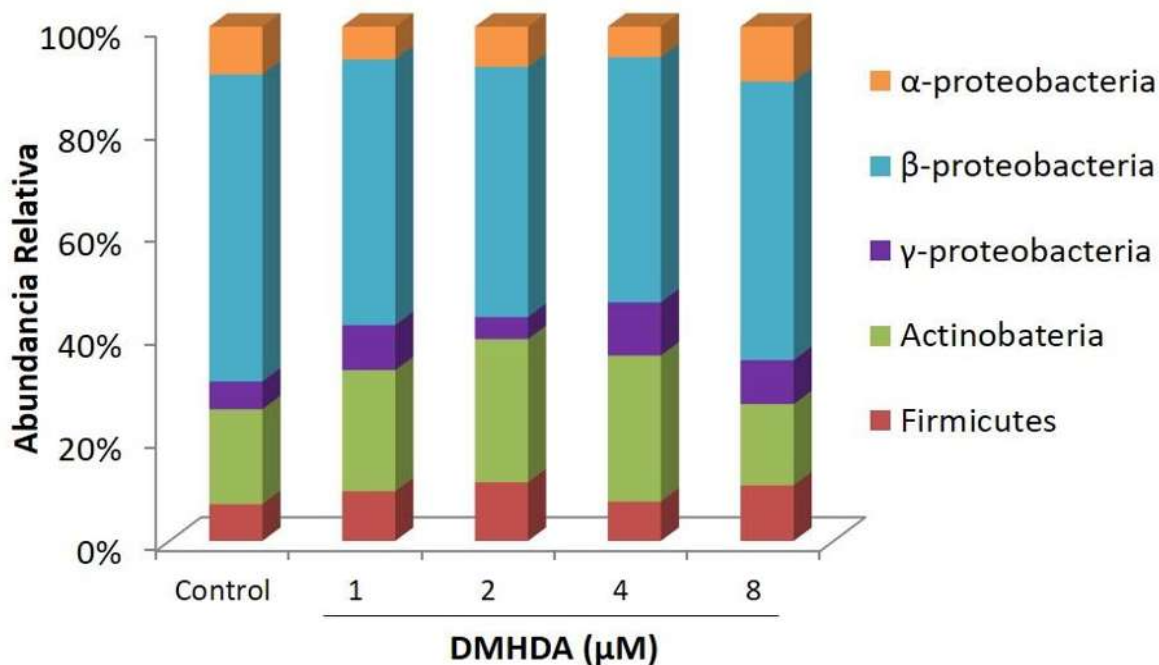


Figura 9. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de las raíces de *M. truncatula* basado en la cuantificación mediante qPCR. La abundancia es expresada como el porcentaje del promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de cada una de las muestras biológicas.

Por otra parte, tanto en raíz como en los brotes, la adición de 2 μM de DMHDA incremento significativamente la abundancia relativa de Actinobacteria y Firmicutes, sin embargo a 8 μM de DMHDA disminuyo la abundancia de ambas divisiones alcanzando un valor similar al control (Fig. 9 y 10).

En brote, fue más visible el efecto de la DMHDA sobre la abundancia de los taxones, α-proteobacteria disminuyo su abundancia relativa significativamente en todos los tratamientos respecto del control, siendo mayor este decremento a 2 μM. Por su parte las β-proteobacteria tuvieron su abundancia relativa mínima en el tratamiento de 2 μM de DMHDA y fueron incrementándose con un máximo a 8 μM, mientras que las γ-

proteobacteria incrementaron su proporción en todos los tratamientos respecto al control, siendo mayor en a 2 μM (Fig. 10).

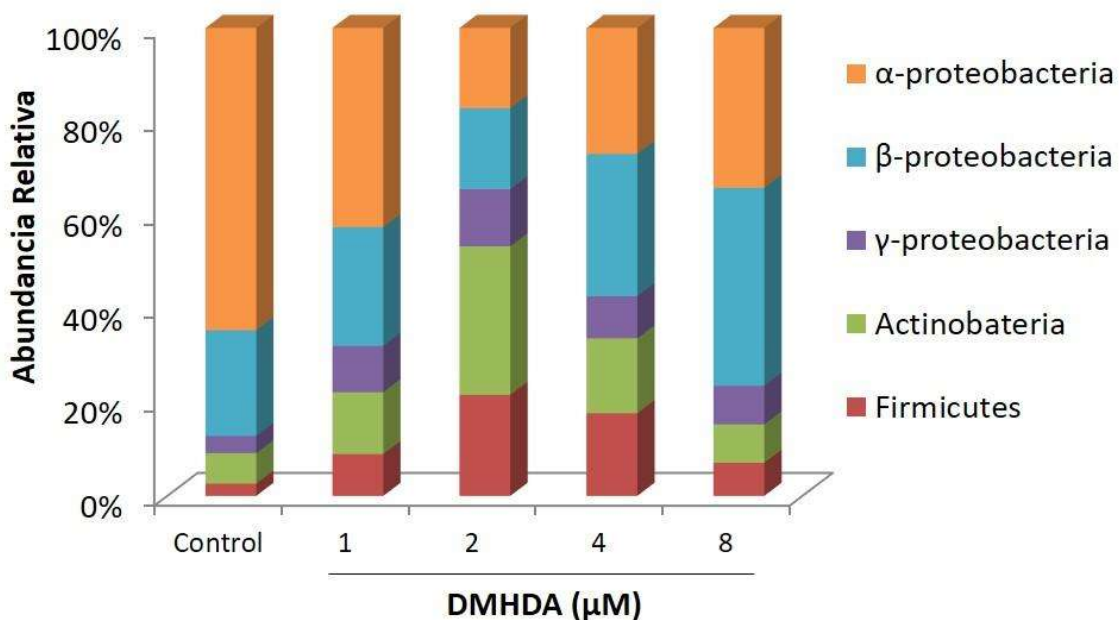


Figura 10. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de los brotes de *M. truncatula* basado en la cuantificación mediante qPCR. La abundancia es expresada como el porcentaje del promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de cada una de las muestras biológicas.

En general los resultados obtenidos muestran un efecto estimulador de la DMHDA sobre la abundancia relativa de las Actinobacterias y los Firmicutes que es dependiente de la concentración del compuesto y que resulta en detrimento de la abundancia relativa de las α -proteobacterias y β -proteobacterias.

La cantidad de ADN por gramo de peso fresco de *M. truncatula* (ADN (μg) /gr de PF) varía al comparar entre el compartimento de brote y raíz así como en función de la concentración de DMHDA. Tanto en raíces como en brotes la exposición a la DMHDA

disminuyo la abundancia absoluta de algunos de los taxones bacterianos comparando con plantas no expuestas. En el compartimiento de raíz, la abundancia de α -proteobacteria no se modificó ante la exposición al compuesto, sin embargo en brote disminuyo a partir de la concentración de 2 μ M a 8 μ M, en la raíz β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Actinobacteria disminuyeron en 8 μ M de DMHDA no fue así para Firmicutes la cual no se vio afectada en ninguna de las concentraciones, por otra parte en brote β -proteobacteria mostró sensibilidad de 2 a 4 μ M, en la abundancia de γ -proteobacteria el compuesto no tuvo un efecto y tanto Actinobacteria como Firmicutes se vieron disminuidas entre 2 y 8 μ M (**Tabla 3**).

Tabla 3. Cantidad de ADN de las divisiones, clases y de *A. agilis* UMCV2 en las comunidades microbianas presentes en el ADN extraído de los tejidos internos de *M. truncatula* obtenida de la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR[†].

Taxón	Raíz Cantidad de ADN (μg)/gr de PF					Brote Cantidad de ADN (μg)/gr de PF				
	Control	1μM	2μM	4μM	8μM	Control	1μM	2μM	4μM	8μM
α-prot	0.094 a	0.061 a	0.065 a	0.093 a	0.114 a	9.770 b	2.796 ab	0.068 a	0.741 a	0.394 a
β-prot	0.624 b	0.453 ab	0.448 ab	0.234 ab	0.187 a	2.638 b	0.760 ab	0.057 a	0.181 a	0.527 ab
γ-prot	0.052 ab	0.072 b	0.041 ab	0.048 ab	0.029 a	0.375 a	0.242 a	0.044 a	0.047 a	0.080 a
Actino	0.179 bc	0.187 bc	0.250 c	0.133 ab	0.053 a	0.315 b	0.201 ab	0.104 a	0.066 a	0.072 a
Firm	0.070 ab	0.078 b	0.101 b	0.036 a	0.036 a	0.131 b	0.108 ab	0.070 a	0.070 a	0.063 a
UMCV2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	1.019	0.851	0.905	0.544	0.419	13.229	4.107	0.343	1.105	1.136

[†]La abundancia es expresada como el promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de muestra biológica. Las letras son usadas para indicar las medias que difieren significativamente para cada taxón en los diferentes compartimentos por una prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

VI.7. Efecto de la DMHDA en el crecimiento de *M. truncatula* crecidas en suelo desecado bajo condiciones *in vitro*

Una vez que se observó que la DMHDA tiene un efecto promotor sobre el crecimiento de *M. truncatula* en forma dosis dependiente y crecidas en suelo no desecado, se decidió analizar si al usar una microbiota diferente, la DMHDA mantenía el mismo efecto. Para ello, semillas de 3 días de germinadas fueron crecidas en frascos los cuales contenían

medio Hoagland 1X suplementado con microbiota extraída de suelo desecado y diferentes concentraciones de DMHDA. Después de 21 días (**Fig. 11a**) se midieron parámetros de crecimiento y los resultados obtenidos mostraron que la adición de un suelo diferente modificó el efecto de la DMHDA sobre el crecimiento de *M. truncatula*. Se observó que el peso de los brotes de las plantas, se registró un ligero incremento a la concentración de 4 μM sin embargo no fue estadísticamente significativo respecto al control lo cual coincide con el efecto no visto en su longitud en ninguna de las concentraciones de DMHDA (**Fig.11b y 11d**).

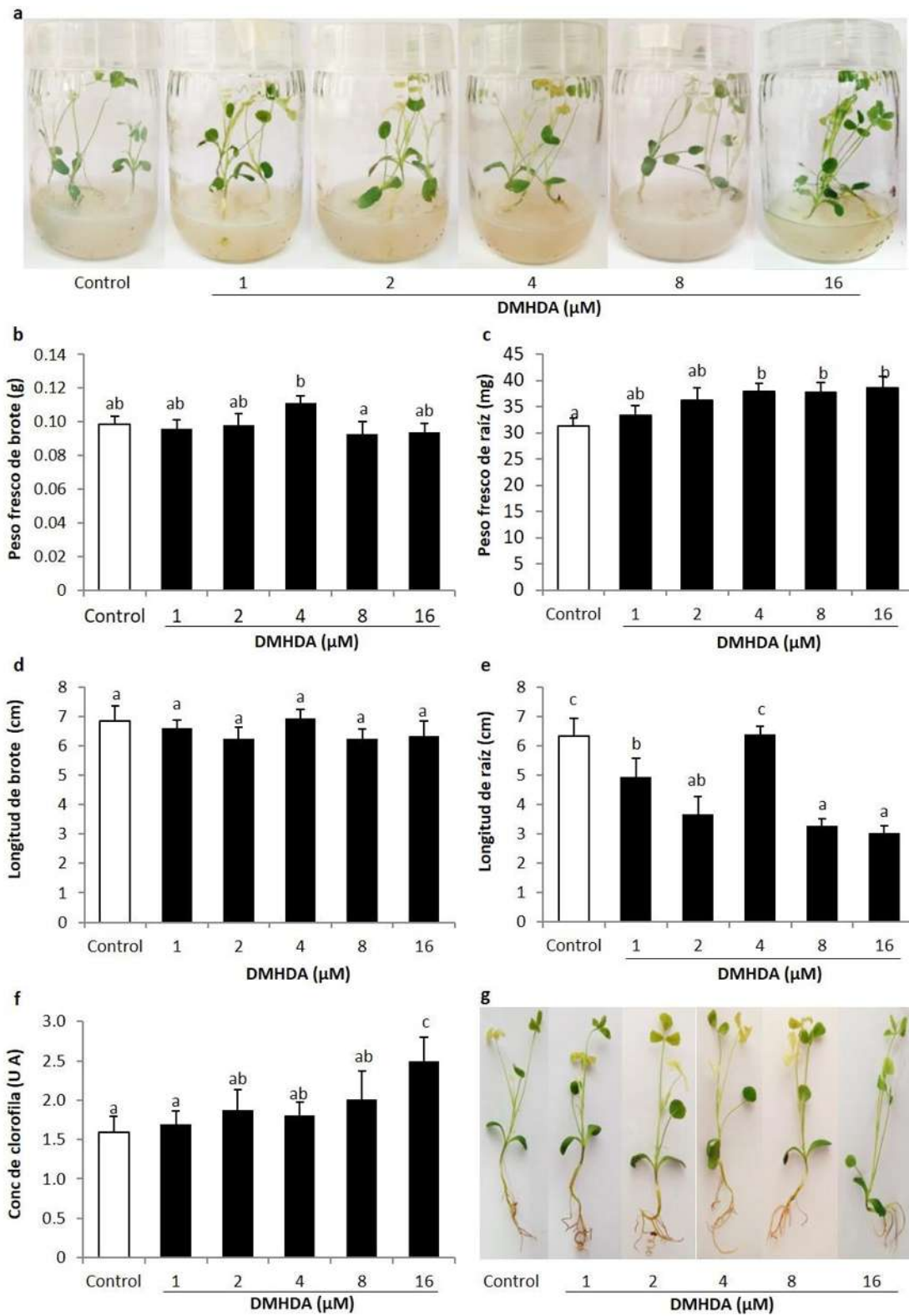


Figura 11. Efecto de la dimetilhexadecilamina en el crecimiento de la leguminosa *M. truncatula* suplementada con microbiota extraída de suelo desecado. Plantulas de *M. truncatula* de 3 días de germinadas fueron trasferidas a frascos con medio sólido Hoagland 1X suplementado o no (tratamiento

control) con concentraciones crecientes de DMHDA, después de 21 días de la germinación (**a**), de semillas se graficó el peso fresco de brote(**b**) y raíz (**c**), longitud de brote (**d**) y raíz (**e**), y concentración de clorofila (**f y g**). Las barras representan la media \pm valores de error estándar (n = 9). Las letras son usadas para indicar las medias que difieren significativamente por una prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

Por otra parte las plantas crecidas en medio suplementado con este tipo de suelo incrementaron su contenido de clorofila únicamente ante la exposición de 16 μM con respecto al control (**Fig 11f**). El peso fresco de raíz incrementó a partir de la concentración de 4 μM y hasta 16 μM respecto al control; sin embargo en estas condiciones, la DMHDA produjo una disminución en la longitud de la raíz en todos menos uno (4 μM) los tratamientos en comparación con el control (**Fig.11c y 11e**).

Pudo observarse que con bajo estas condiciones las raíces de las plantas fueron notoriamente menores que las encontradas en los tratamientos del experimento realizado con microbiota de suelo natural (**Fig 8g y 11g**).

VI.8. La microbiota inicial y la DMHDA influyen cambios en la estructura de las comunidades bacterianas endófitas de *M. truncatula*

Después de haber evaluado los efectos sobre los parámetros del crecimiento vegetativo dados por la DMHDA y el suelo desecado en condiciones *in vitro*, se analizó el efecto de la DMHDA en la colonización bacteriana de *M. truncatula* al utilizar como fuente de microbiota a este tipo de suelo distinto. Este análisis reveló una dominancia de Proteobacteria tanto en el compartimiento de raíz (71-92%) como en brote (50-70%).

En raíz, la división estuvo comprendida principalmente por γ -proteobacteria (24-54%), seguido de β -proteobacteria (20-38%) y por último de α -proteobacteria (2-12%) en donde de acuerdo a la concentración aplicada de DMHDA se observó un cambio en la abundancia relativa de estas clases respecto del control. γ -proteobacteria incremento su abundancia pasando de 38 % (control) a 47 % ante la exposición de 4 μ M de DMHDA y un 54 % a 8 μ M (**Fig. 12**), además de que el tipo de suelo favoreció la dominancia de esta clase ya que con el suelo natural la clase dominante fue β -proteobacteria (**Fig.11**). En suelo desecado, esta clase se vio disminuida con la adición de DMHDA variando su abundancia de 34 % en el control a 20 y 22 % en las concentraciones de 4 y 8 μ M respectivamente. α -proteobacteria se mostró altamente enriquecida en la máxima concentración probada de DMHDA, pasando de 7 % de abundancia en el control a 2% en la concentración de 2 μ M de DMHDA a 24 % en 16. La segunda división más abundante en raíces fue Firmicutes (7.5-28%) la cual fue favorecida con el tratamiento de desecación que sufrió el suelo previamente a la extracción de la microbiota. La abundancia relativa de los Firmicutes fue modificada por la DMHDA de forma dependiente de la dosis, teniendo una abundancia relativa de 15 % en los controles, de 30 % en el tratamiento con 4 μ M y de 13 % en el tratamiento con 16 μ M. Por último, Actinobacteria disminuyo su abundancia relativa en este tipo de suelo comparado con el suelo no desecado, ya que solo se encontró en una muy pequeña cantidad, en la condición control estuvo representada por el 4.5% fluctuando en torno a este valor sin un efecto claro debido a la adición de DMHDA (**Fig.12**).

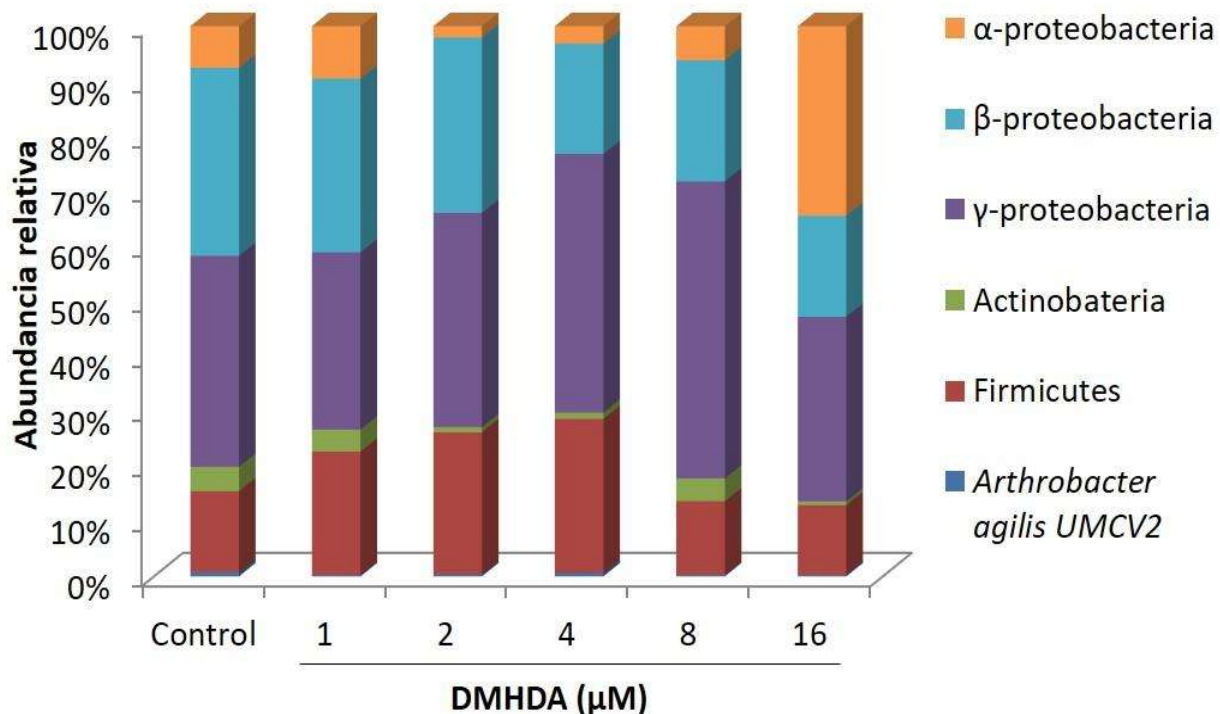


Figura 12. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de las raíces de *M. truncatula* crecidas en medio suplementado con microbiota extraída de suelo desecado basado en la cuantificación mediante qPCR. La abundancia es expresada como el porcentaje del promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de cada una de las muestras biológicas.

La presencia de *A. agilis* UMCV2 también fue determinada, detectándose abundancias bajas de la bacteria que fluctuaron entre 0.7 % y 0.25 y que no mostraron una variación clara en función de la concentración de la DMHDA.

Por otra parte en brotes, como se mencionaba anteriormente Proteobacteria fue dominante (50-70%) y esta a su vez estuvo comprendida principalmente por γ -proteobacteria, lo cual también fue observado en la raíces de estas plantas crecidas en suelo desecado; sin embargo, en este compartimiento estuvo representada con una

abundancia relativa menor. Al igual que en raíces la aplicación de la DMHDA indujo un decremento en la abundancia relativa de γ -proteobacterias que pasó de del 40 % en el control a 31% en 4 μ M y 25% en 16 μ M de DMHDA.

Seguido de esta clase, β -proteobacteria comprendió del 11 al 26% de abundancia relativa, teniendo las abundancias más bajas en concentraciones de DMHDA de 1 y 2 μ M y (10 y 13% respectivamente) y las más altas en 8 y 16 μ M (23 y 26% respectivamente). En el caso de α -proteobacteria su abundancia relativa entre tratamientos no vario claramente en función de la adición de la DMHDA fluctuando alrededor del 10% en todos los tratamientos, con excepción de el de 4 μ M de DMHDA en el que las α -proteobacterias tuvieron una abundancia relativa del 20%.

La segunda división dominante fue Firmicutes como también se observó en raíces, no obstante en este compartimiento fue más abundante (21-33%) y se mostró un ligero incremento en todas las concentraciones de DMHDA a excepción de 4 μ M en donde se vió un decremento del 5% comparado con el control. Por ultimo Actinobacteria tuvo una abundancia relativa de 5% en plantas control y se mostró incrementado fuertemente (entre dos y tres veces) en todos los tratamientos registrándose mayor incremento en el tratamiento con 2 μ M de DMHDA donde alcanzó la abundancia relativa de 18%.

También de manera similar a lo ocurrido en el compartimiento de raíz, se detectó la presencia de *A. agilis* UMCV2 en brotes en bajas abundancias sin encontrarse una estimulación clara por la presencia de DMHDA pero si una inhibición a la concentración de 16 μ M (20 veces menor que en la concentración de 1 μ M).

En general los resultados obtenidos muestran un efecto estimulador de la DMHDA sobre la abundancia relativa de las Actinobacterias (brotes) y los Firmicutes (brotes y raíz) que es dependiente de la concentración del compuesto y que resulta en detrimento de la abundancia relativa de las γ -proteobacterias y β -proteobacterias.

Interesantemente, se observó que las plantas crecidas en suelo natural y desecado expuestas a 2 μM de DMHDA y más notable en el compartimiento de brote mostraron un incremento significativo de Actinobacteria y Firmicutes (**Fig. 13**).

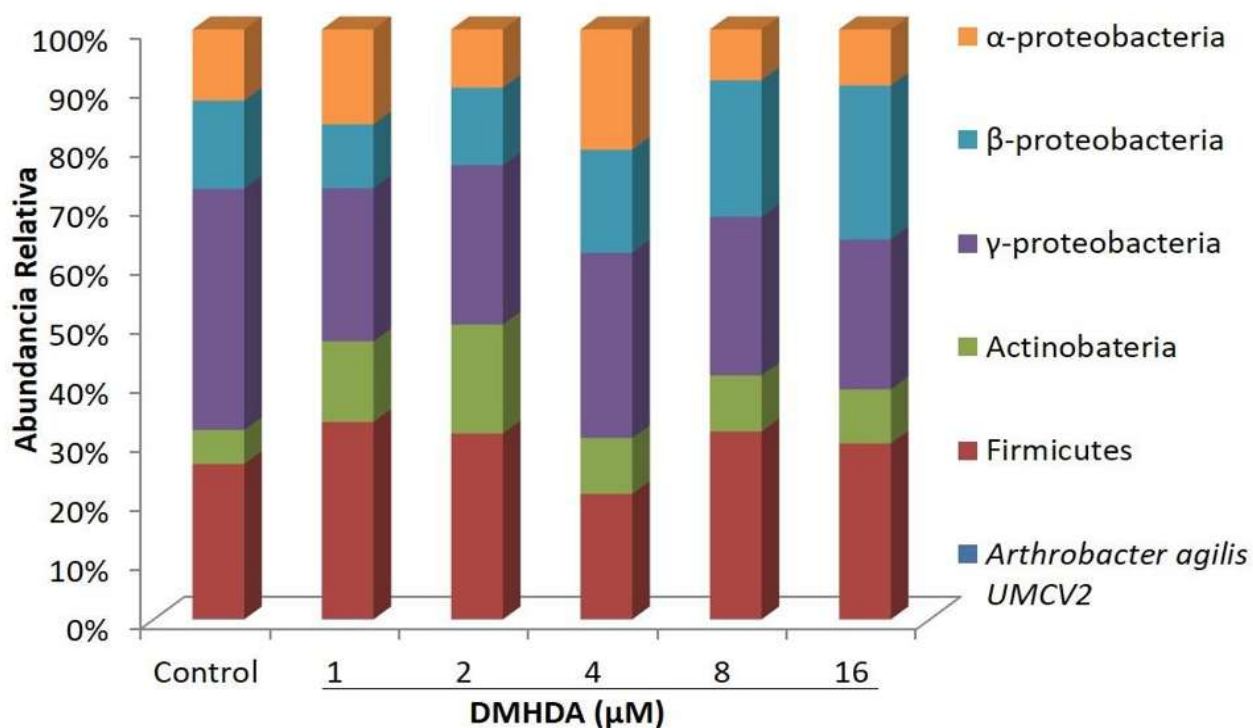


Figura 13. Efecto de la DMHDA en el porcentaje de abundancia relativa (%) de los principales taxones bacterianos presentes en las comunidades microbianas de los brotes de *M. truncatula* crecidas en medio suplementado con microbiota extraída de suelo desecado basado en la cuantificación mediante qPCR. La abundancia es expresada como el porcentaje del promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de cada una de las muestras biológicas.

Por otra parte, se determinó que la abundancia absoluta de ADN bacteriano ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de PF) para cada una de las divisiones y clases en los compartimientos de raíces y brotes de plantas crecidas en suelo desecado varió en función de la concentración de DMHDA aplicada.

En las raíces de plantas expuestas a $16 \mu\text{M}$ se observó un incremento estadísticamente significativo de α -, β - y γ -proteobacteria sin embargo en brote la DMHDA no tuvo un efecto tan notable sobre la cantidad de ADN bacteriano perteneciente a estas clases, ya que solo β -proteobacteria tuvo un incremento significativo a $16 \mu\text{M}$. Además, la aplicación de DMHDA no tuvo un efecto sobre Actinobacteria ya que en ninguna de las concentraciones se observó un cambio estadísticamente significativo en su abundancia absoluta.

En el caso de las bacterias de la división Firmicutes fue especialmente claro, la adición de DMHDA en todas las concentraciones produjo un aumento numérico en la cantidad de ADN de esta división que fue significativo a concentración de $1, 4$ y $16 \mu\text{M}$ en raíz y a concentración de brotes y $4, 8$ y $16 \mu\text{M}$ en brote (**Tabla 4**).

En cuanto a *A. agilis* UMCV2, con una sola excepción (tratamiento de $16 \mu\text{M}$ en brote) fue encontrada en todos los tratamientos, sin embargo sólo se encontró una cantidad de ADN significativamente superior entre las muestras con DMHDA $4 \mu\text{M}$ en raíz respecto de su control sin el compuesto (**Tabla 4**).

Tabla 4. Cantidad de ADN de las clases y divisiones en las comunidades bacterianas presentes en el ADN de los tejidos internos de *M. truncatula* basada en la amplificación y cuantificación de las secuencias de RNAr 16S mediante qPCR[†].

Taxón	Brote						Raíz					
	Cantidad de ADN ng/gr de PF						Cantidad de ADN ng/gr de PF					
	Control	1µM	2µM	4µM	8µM	16µM	Control	1µM	2µM	4µM	8µM	16µM
α-prot	78.8 a	97.0 a	73.8 a	246.2 b	84.0 a	117.9 a	40.0 a	111.1 a	18.6 a	26.5 a	81 a	1819 b
β-prot	96.7 a	121.6 a	89.2 a	226.9 ab	223.2 ab	343.4 b	179.4 a	302.7 a	301.8 a	169.5 a	257 a	1513 b
γ-prot	273.8 ab	155.4 a	157.5 ab	215.6 ab	258.7 ab	315.8 b	183.4 a	323.7 a	369.9 a	411.5 a	663 ab	1211 b
Actino	36.9 a	82.2 a	114.0 a	167.0 a	95.8 a	118.4 a	23.8 a	50.0 a	7.8 a	7.3 a	63 a	27 a
Firm	171.49 a	197.0 ab	218.2 ab	300.2 bc	298.9 bc	361.6 c	77.5 a	224.2 c	149.5 ab	237.5 c	183 ab	215 c
UMCV2	0.7 a	0.5 a	0.3 a	0.6 a	0.3 a	0.0 a	3.2 ab	2.5 a	3.7 ab	8.0 c	2.8 a	7 bc
Total	658.39	654.2	653.0	1156.5	960.9	1257.1	507.3	1014.2	851.3	860.3	1249	4792

[†]La abundancia es expresada como el promedio de la cantidad total de ADN de cada taxón por gramo de muestra biológica. Las letras son usadas para indicar las medias que difieren significativamente para cada taxón en los diferentes compartimentos por una prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las plantas están asociadas con diversas comunidades microbianas que influyen en su salud y nutrición (Berendsen et al. 2012). Estos organismos se conocen colectivamente como la microbiota de la planta y podrían usarse para mantener o mejorar de forma sostenible la seguridad alimentaria mundial (Liu et al. 2017). La manipulación del microbioma tiene el potencial de reducir la incidencia de enfermedades de las plantas (Bloemberg et al. 2001; Andrews et al. 1992), aumentar la producción agrícola (Bakker et al. 2012), reducir los insumos químicos (Adesemoye et al. 2009) y las emisiones de gases de efecto invernadero (Singh et al. 2010); sin embargo para llevar a cabo esto, es importante conocer formas de manipular o mediar la estructura de las comunidades microbianas asociadas a las plantas.

En este estudio, se evaluó el efecto de la DMHDA, un compuesto orgánico volátil producido por diversas rizobacterias, sobre la colonización de la leguminosa *M. truncatula* por bacterias provenientes de un suelo modelo natural y desecado. De esta forma y con un enfoque molecular se analizó la composición de las comunidades bacterianas endofíticas de *M. truncatula*. Fue primordial de inicio analizar la estructura bacteriana del suelo, la rizosfera y de los tejidos internos (brotes y raíces) de *M. truncatula* crecidas en suelo sin tratamiento, esto con la finalidad de comparar el efecto de la DMHDA sobre la comunidad bacteriana endófito de la planta con la estructura bacteriana endófito encontrada de forma natural.

Todas las muestras estuvieron compuestas por comunidades bacterianas diversas. Como se ha observado en otros estudios (Reinhold-Hurek et al. 2015; Edwards et al. 2015) la composición en las comunidades bacterianas en la rizósfera difieren de aquellas asociadas al suelo (**Tabla 2**). La rizósfera estuvo asociada con abundancias relativas más grandes de β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Firmicutes y abundancias absolutas mayores de α -proteobacteria, β -proteobacteria y γ -proteobacteria, mientras que en el suelo se encontraron cantidades menores pero significantes de estas divisiones y clases; sin embargo, fue positivamente asociado con una abundancia relativa más grande de Actinobacteria (**Figura 7; Tabla 2**). Estos resultados reafirman que los nutrientes específicos están más disponibles en la proximidad de raíces y mucho más en la superficie de la raíz, principalmente en partes jóvenes donde se liberan exudados de raíz. Además nuestros datos concuerdan con un estudio realizado por Khalloufi et al 2016 en el cual se determinó que Proteobacteria fue enriquecida en la rizósfera en relación con el suelo lo cual subraya el efecto rizósfera.

Las plantas crecidas en suelo natural sin ningún tratamiento mostraron buen crecimiento (**Fig. 6**) y su comunidad bacteriana endofítica tanto en raíz como en brote se observó dominada por Proteobacteria 68% y 84% respectivamente, a pesar de esto, la composición de las comunidades endofíticas difirieron significativamente entre raíces y brotes. Las endófitas de brote fueron mayormente asociadas a α -proteobacteria (55%) y Actinobacteria (40%) el resto estuvo comprendido por β -proteobacteria, γ -proteobacteria y Firmicutes. Por otra parte, las endófitas de raíz fueron positivamente asociadas a γ -proteobacteria (67%) dicho enriquecimiento hizo que el compartimiento de

brote se diferenciara del de raíz (**Figura 7**). Estos resultados sugieren que puede ser debido al efecto que la planta huésped ejerce sobre las poblaciones a través de la producción de metabolitos atrayentes o antibacterianos o por moléculas efectoras producidas por bacterias que le permiten ascender a los tejidos aéreos, ya que se conoce que miembros de esta división tienen la capacidad de formar parte de dicha microbiota, como es el caso de *Pseudomonadales*, en particular el género *Pseudomonas* pero también *Acinetobacter*, los cuales son colonizadores bien conocidos de plantas (Weller, 2007; Rolli et al., 2015).

A. agilis UMCV2 es una actinobacteria con capacidades de promoción del crecimiento vegetal que fue aislada de la rizósfera de una planta de maíz crecida en suelo de jardín extraído doce años antes de exactamente la misma localidad que el suelo empleado en este estudio (Valencia-Cantero et al 2007), adicionalmente ya se había observado que esta bacteria es capaz de colonizar y prosperar como bacteria endófito de *M. truncatula* (Aviles-García et al. 2016). Con esto en mente se decidió cuantificar a la bacteria en los compartimientos de suelo, rizósfera y tejidos internos de *M. truncatula*, logrando identificarla en todos los compartimientos, en orden descendente de su abundancia absoluta brote>raíz>suelo>rizósfera (**Fig. 7**). Esto muestra que la bacteria persistió en el suelo y está bien adaptada a un ambiente endofítico. Otra de las características de *A. agilis* UMCV2 es la capacidad de producir DMHDA compuesto que promueve el crecimiento vegetal, que es capaz de modular el crecimiento de la propia bacteria (Velázquez-Becerra et al., 2011) y que es capaz de encender en *A. thaliana* la vía de defensa ISR dependiente de ácido jasmónico (Raya-González et al. 2016).

La producción de DMHDA no es exclusiva de *A. agilis* UMCV2, también se ha detectado en los VOCs del firmicute *B. subtilis* G8 (Liu et al., 2008), la α -proteobacteria *Sinorhizobium meliloti* (Orozco-Mosqueda et al., 2013b) y la γ -proteobacteria *P. fluorescens* UM270 (Hernández-León et al., 2015). Todo lo anterior llevo a decidir probar el efecto de la DMHDA sobre el crecimiento de *M. truncatula* y especialmente, sobre la composición de su microbiota endofítica, poniendo a prueba la hipótesis central del presente trabajo sobre la función de la DMHDA como una molécula mediadora para la colonización endofítica de *M. truncatula* por diversas bacterias.

Se observó que a la concentración de 1 y 2 μ M de DMHDA produjo un incremento en el peso y longitud de brote, sin embargo altas concentraciones (4 y 8 μ M) afectaron su crecimiento e incrementaron únicamente la longitud y el peso fresco de raíz (**Fig. 8**), lo cual podría indicar un estado de estrés biótico. Un decremento en la relación brote/raíz es considerado como un indicador de estrés (Castulo-Rubio et al., 2015). En todo caso lo anterior muestra que en el sistema empleado en el presente trabajo la DMHDA modula el proceso de desarrollo y crecimiento de *M. truncatula* en forma dosis dependiente.

Posteriormente se analizó el efecto mediador de la DMHDA sobre la colonización de *M. truncatula* por bacterias provenientes del extracto de microbiota de suelo modelo natural. Existe poca información acerca de la relación entre la comunidad bacteriana endofítica de una planta y su crecimiento. En el presente trabajo, se observaron algunas relaciones entre los parámetros de crecimiento de *M. truncatula* con el cambio en su estructura endofítica. Por un lado se determinó que la composición de las comunidades bacterianas endofíticas de *M. truncatula* difiere en su abundancia entre compartimientos (brote y

raíz); sin embargo los principales componentes de la comunidad fueron Proteobacteria. En raíz, la clase dominante fue β -proteobacteria en menor proporción estuvo conformada por α -proteobacteria y γ -proteobacteria (**Fig. 9**) y en brote domino α -proteobacteria seguido de β -proteobacteria y γ -proteobacteria (**Fig. 10**). Actinobacteria fue representativa en el interior de los tejidos de los dos compartimientos lo cual concuerda con otros estudios realizados en donde Actinobacteria particularmente *Streptomyces* spp., han sido frecuentemente aislado de los ambientes endofíticos de raíces y brotes de maíz (*Zea mays* L.) (Araújo et al. 2000), arroz (Kampapongsa et al. 2015), tomate (Cao et al. 2004) y trigo (Sadрати et al. 2013), por otra parte, se han encontrado miembros de *Streptomycetaceae* como componentes clave de las comunidades endófitas de raíces de *Arabidopsis thaliana* (Lundberg et al. 2012). A su vez, Firmicutes se encontró en muy pequeñas cantidades lo cual no es común dado a que es una de las divisiones más abundantes en suelo, sin embargo coincide con los resultados previamente obtenidos en la caracterización del suelo en donde se logró cuantificar a una muy pequeña cantidad de esta división (**Fig. 7; Fig. 9 y 10**).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que la exposición de *M. truncatula* a diferentes concentraciones de DMHDA modifico la estructura de las comunidades bacterianas endofíticas presentes en raíces y brotes de plantas crecidas con microbiota de suelo natural. La aplicación de DMHDA en concentraciones de 1, 2 y 4 μ M produjo un aumento en la abundancia relativa tanto de Actinobacterias como de Firmicutes mientras α -proteobacteria y β -proteobacteria disminuyeron en la misma proporción, tanto en raíces como en tallos. Interesantemente las plantas crecidas en estos tratamientos

también fueron las que mostraron mayor crecimiento y una mayor concentración de clorofila.

La división actinobacteria, incluye muchas especies que han demostrado promover el crecimiento de las plantas, movilizar nutrientes y suprimir fitopatógenos bacterianos, fúngicos o virales (Passari et al. 2015; Xue et al. 2013; Mahajan et al. 2011; El-Tarabily et al. 2009; Zeng et al. 2013). Por esta razón, los cambios observados en nuestro estudio en las abundancias relativas de las poblaciones de actinobacterias ante la exposición de bajas concentraciones de DMHDA pueden haber tenido consecuencias funcionales para el huésped lo cual lo podemos relacionar al crecimiento observado en los brotes de plantas expuestas a bajas concentraciones que fue más notable a 2 μ M. Sin embargo, el efecto que la DMHDA tiene *per se* en la planta no permite valorar con la metodología del presente trabajo si el enriquecimiento de Actinobacterias y Firmicutes como endófitas en la planta tuvo un aporte real en la inducción del crecimiento vegetal o estas bacterias sólo lograron una mejor colonización de una planta con un mejor crecimiento producido por la DMHDA.

En cuanto a la abundancia absoluta de las comunidades bacterianas endofíticas encontradas en dichas plantas, se observó que a partir de la concentración de 2 μ M hubo un decremento estadísticamente significativo siendo mayor conforme aumentaba la concentración a 8 μ M; a pesar de ello hubo poblaciones que no se observaron afectadas por el tratamiento, como fue el caso de α -proteobacteria en raíz y γ -proteobacteria en brote (**Tabla 3**). Este decremento conforme incrementaba la concentración puede haber ocurrir por diversos mecanismos. Raya-González et al. (2016) Reportaron que la DMHDA activa la ruta de señalización del ácido jasmónico en plantas de *Arabidopsis* y

recientemente se demostró que la activación de esta vía de defensa de ácido jasmónico (JA) de la planta, está involucrada en supresión de patógenos necrotróficos e insectos herbívoros (Glazebrook et al. 2005), alterando la composición del microbioma de raíz de *Arabidopsis thaliana* (Carvalhais, et al. 2013), lo cual abre la posibilidad de que en plantas de *M. truncatula* tenga el mismo efecto, explicando de cierta manera el decremento de las diferentes poblaciones bacterianas en plantas expuestas a mayores concentraciones de DMHDA, sin embargo son necesarios más análisis para corroborar dicho efecto.

No obstante *A. agilis* UMCV2 fue detectada en el suelo, la rizósfera y como endófita en plantas crecidas en suelo natural (**Tabla 2**), no fue detectada en ninguno de los tratamientos de plantas crecidas en medio suplementado con extracto de microbiota de suelo natural, esto mostró que el extracto de microbiota en el presente sistema experimental no recogió la totalidad de la microbiota del suelo, por otra parte se consideró interesante observar si el efecto producido por la DMHDA en la microbiota endofítica de *M. truncatula* se reproducía en plantas crecidas en un medio suplementado con una microbiota inicial diferente, ya que se conoce que la comunidad bacteriana endofítica es modificada por la fisiología de la planta, el tipo de suelo y el manejo agrícola (Hardoim et al. 2012). Con esto en mente, se sometió al suelo a un proceso de desecación por tres meses buscando inducir una modificación en la estructura de la microbiota y una posible disminución en la diversidad de la misma (Pilatti et al. 1988), adicionalmente al extracto de microbiota obtenido de este suelo se agregó con *A. agilis* UMCV2 para asegurar su presencia. Los brotes de plantas crecidas en presencia de esta microbiota modificada no mostraron un incremento en el crecimiento en respuesta a la DMHDA, si

bien su tamaño fue comparable al de las plantas en la condición control de los experimentos anteriores y sólo las raíces fueron discretamente mayores en tratamiento con mayor concentración de DMHDA (**fig 11**). La estructura de las comunidades endofíticas derivadas del extracto de microbiota de suelo natural y de suelo desecado fueron efectivamente diferentes, en particular fue notorio un enriquecimiento de las γ -proteobacterias y en los Firmicutes en la segunda comunidad (**Fig. 12 y 13**). Estudios previos señalan la asociación entre una mayor abundancia de la división Firmicutes y la baja actividad de agua en suelos (α y Hedges, 2009), también es conocida la capacidad de esporular de diversos géneros de Firmicutes (Ej. *Bacillus* y *Clostridium*) en condiciones ambientales extremas que son desfavorables para su crecimiento y que eliminan a las células vegetativas (Nicholson et al. 2000); paralelamente se ha reportado que miembros del género *Methylophaga* (γ -proteobacteria) son conocidos por su capacidad de utilizar compuestos de un carbono (C1) y se han aislado principalmente de hábitats de baja actividad de agua (Boden et al. 2012).

No obstante estas diferencias con la primera comunidad endofítica, la aplicación de las diferentes concentraciones de DMHDA también modificó la abundancia relativa de las diferentes divisiones y clases, estimulando la abundancia relativa de las Actinobacterias (brotes) y los Firmicutes (brotes y raíz) de forma dependiente de la concentración del compuesto y en detrimento de la abundancia relativa de las γ -proteobacterias y β -proteobacterias, lo cual fue semejante a lo visto en plantas crecidas con extracto de suelo no desecado y expuestas a las mismas concentraciones.

Finalmente fue interesante observar la presencia de *A. agilis* UMCV2 prácticamente en todos los tratamientos de plantas crecidas con el extracto de microbiota de suelo desecado, especialmente en el compartimiento de raíces donde se pudo localizar una cantidad de bacteria significativamente mayor sólo entre el tratamiento de 8 μ M y su control sin el compuesto (**Tabla 4**). Esto muestra que si bien la DMHDA podría estar teniendo un efecto en la colonización endofítica de *M. truncatula* por *A. agilis* UMCV2, este efecto no es específico de esta bacteria, ya que en general Actinobacterias y Firmicutes respondieron positivamente a concentraciones medias (2-8 μ M) del compuesto lo que indica que *A. agilis* UMCV2 está implicada en un proceso de competencia con amplios grupos de bacterias en respuesta a la presencia del compuesto DMHDA.

En conjunto los resultados anteriores permiten llegar a la siguiente

CONCLUSIÓN:

La DMHDA actúa como una molécula mediadora en la colonización endofítica de *Medicago truncatula* por bacterias presentes en suelo.

VIII. LITERATURA CITADA

Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929.
<https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>

Andrews JH (1992) Biological-control in the phyllosphere. *Annu Rev Phytopathol* 30: 603-635.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.00313>

Araújo JM, Silva AC, Azevedo JL. (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Braz Arch Biol Technol* 43:0-0
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132000000400016>

Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272:201-209.
<https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>

Aviles-Garcia ME, Flores-Cortez I, Hernández-Soberano C, Santoyo G, Valencia-Cantero E (2016) La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Rev Argent Microbiol* ISSN: 1435-8107.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.004>

Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG (2011) Improvement of phylum and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 86:351–356. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>

Badri, DV, Chaparro JM, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2013) Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J Biol Chem* 288: 4502–4512 <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433300>.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>

Baker AC, Dopson M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol* 15:165–171 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>

Baker KL, Langenhed S, Nicol GW, Ricketts D, Killham K, Campbell CD, Prosser JI (2009) Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biol Biochem* 41:2292-2298 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.010>

Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM, Weir TL, Vivanco JM (2012) Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil* 360: 1-13.

<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1361-x>

Bala AP, Murphy, Giller KE (2003) Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. *Mol Ecol* 12:917-929

<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01754.x>

Barraquio WL, Revilla L, Ladha JK (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194:15-24.

Battistuzzi FU, Hedges SB (2009) A major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Molecular Biology and Evolution* 26: 335-343.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msn247>

Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray DJ, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 55:504–513

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x>

Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health.

Trends Plant Sci 17:478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>

- Berg G, Smalla K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bertin C, Yang XH, Weston L (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67–83 <https://doi.org.10.1023/A:1026290508166>
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 4: 343-350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- Boden R (2012) Emended description of the genus *Methylophaga janvier* et al. 1985. *Int. J Syst Evol Microbiol* 62:1644–1646. <https://doi.org.10.1099/ijs.0.033639-0>
- Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 526–533 <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0526>
- Bulgarelli D et al. (2012) Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95 <https://doi.org.10.1038/nature11336>
- Campbell R, Graves M (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: Lynch J (ed) *the rhizosphere*. Wiley, England. pp 11-34

Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S (2004) Isolation and characterization of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett. Appl. Microbiol. 39:425–430 <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01606.x>

Carvalhais LC *et al.* (2013) Activation of the jasmonic acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities. *PLoS One* **8**, e56457 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056457>

Castulo-Rubio DY, Alejandre-Ramírez NA, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez Lourdes I, Valencia-Cantero E (2015), Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control* 81: 83-92 <https://doi.org/10.1007/s00344015-9495-8>

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Mechanisms of biological control of phytopathogenic fungi by *Pseudomonas* spp. In *Plant-Microbe Interactions*, Am. Phytopathol. Soc 6:173–224.

Compant S, Clement C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669–678 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Cook D (1999). *Medicago truncatula*: A model in the making!. *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-304.

Cook RJ, Baker KF (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*.
Am. Phytopathol. Soc. 539 pp

Coombs JT, Franco CM (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microb* 69:5603–5608.
<https://doi.org.10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003>

Dakora FD, Phillips DA. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245:35–47 <https://doi.org.10.1023/A:1020809400075>

Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, et al. (2011) Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol Ecology* 76:463-475 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x>

Doornbos, RF, van Loon LC, Bakker PAHM (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review *Agron Sustain Dev* 32:227–243 <https://doi.org.10.1007/s13593-011-0028-y>

Dorak MT (2006) Real-time PCR. In: Owen, E. (Ed.), *BIOS Advanced Methods*. Taylor and France Group, pp. 39–61.

Durán P. et al. (2014) Endophytic bacteria from selenium-supplemented wheat plants could be useful for plant-growth promotion, biofortification and *Gaeumannomyces graminis* biocontrol in wheat production. Biol Fert Soils 50:983–990 <https://doi.org.10.1007/s00374-014-0920-0>

Edwards J et al. (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. P Natl Acad Sci 112:E911–E920 <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>

El-Tarabily K, Nassar A, Hardy GSJ, Sivasithamparam K, Plant growth promotion and biological control of *Pythiumaphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. J Appl Microbiol 106:13–26 <https://doi.org.10.1111/j.1365-2672.2008.03926.x>

Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Appl Environ Microbiol 71:4117–4120 <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>

Frioni L (1999) Procesos microbianos. Editorial de la Fundación de la UNRC (II), p 273

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

Germida JJ, Siciliano SD, Renato de Freitas J, Seib AM (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with fieldgrown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). FEMS Microbiol Ecol 26:43–50 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb01560.x>

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol 43:205–227 <https://doi.org.10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>

Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol Lett 251:1-7 <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.030>

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

Glick BR (2015) Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer <https://doi.org.10.1007/978-3-319-13921-0>

Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK

Goel R, Kumar V, Suyal DK, Dash B, Kumar P, Soni R (2017) Root-associated bacteria: Rhizoplane and endosphere. En: Singh D, Singh H, Prabha R (eds) Plant-Microbe

Interactions in Agro-Ecological Perspectives. Springer pp 161-176.

https://doi.org/10.1007/978-981-10-5813-4_9

Gonzalez JMP, Manero FJG, Probanza A, Acero N, Decastro FB (1995) Effect of alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) roots on distribution of proteolytic, ammonifying, and nitrifying bacteria in soil. Geomicrobiol J 13:129–138. <https://doi.org/10.1080/01490459509378011>

Gottschalk, G. 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York.

<https://doi.org/10.1002/food.19870310532>

Graham PH, Vance CP (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol 131:872–7. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>

Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annu Rev Phytopathol 41:117–53 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>

Hallman J, Quadt-Hallman A, Mahafee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 43:895-914 <https://doi.org/10.1139/m97-131>

Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary

considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320 <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>

Hardoim PR, Hardoim CCP, van Overbeek LS, van Elsas JD (2012) Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE* 7, e30438 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>

Hernández-Calderón E, Aviles-Garcia MA, Castulo-Rubio DY, Macías-Rodríguez L, Montejano-Ramírez V, Santoyo G, López-Bucio J, Valencia-Cantero E. (2018) Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant Molecular Biology* 96:291–304. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0694-5>

Hernández-León R, Rojas-Solís D, Contreras-Pérez M, Orozco-Mosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Reyes-de la Cruz H, Valencia-Cantero E, Santoyo G (2015) Characterization of the antifungal and plant-growth promoting effects of diffusible and volatile organic compound produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control* 81: 83–92 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>

Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb DLG* 98:59–78

Hurek R, Bunger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T (2015). Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Rev Phytopathol* 53:403–24
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>

Iniguez, AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW (2005) Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:169–178 <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0169>

Insam H, Seewald MSA (2010) Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol Fertil Soils* 46:199–213 <https://doi.org.10.1007/s00374-010-0442-3>

Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar, S (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology* 160:778–788
<https://doi.org.10.1099/mic.0.074146-0>

Kampapongsa D, Kaewkla O (2015) Biodiversity of endophytic actinobacteria from jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) grown in Roi-Et Province, Thailand and their antimicrobial activity against rice pathogens. *Ann Microbiol* 66:587–595
<https://doi.org.10.1007/s13213-015-1140-z>

Kandel SL, Firrincieli A, Joubert PM, Okubara PA, Leston ND, Mc George KM, Mugnozza GS, Harfouche A, Kim S-H, Doty SL (2017) An in vitro study of bio-control and plant growth

promotion potential of Salicaceae endophytes. *Front Microbiol* 8:386
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00386>.

Kawasaki A, Donn S, Ryan PR, Mathesius U, Devilla R, Jones A, et al. (2016) Microbiome and Exudates of the Root and Rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a Model for Wheat. *PLoS ONE* 11:e0164533 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164533>

Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growthpromoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473–480
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>

Kloepper JW, Lifshitz K, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39–43. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(89)90057-7)

Kost T, Stopnisek N, Agnoli K, Eberl L, Weiskopf L (2014) Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by Burkholderia phytotfirmans. *Front Microbiol* 4:1–9
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00421>

Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant

growth promotion. Environ Microbiol 6:1244-1251 <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>

Ladha JK, Barraquio WL, Watanabe I (1983) Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. Can J Microbiol 29:1301-1308 <https://doi.org/10.1139/m83-203>

Lafay B, Burdon JJ (1998) Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in South Eastern, Australia. Appl Environ Microbiol 64:3989-3997.

Lindow SE, Brand MT (2003) Microbiology of the Phyllosphere. Appl Environ Microbiol 69:1875–1883 <https://doi.org.10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>

Liu W, Wei M, Bingyu Z, Feng L (2008) Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. Curr Res Bacteriol 1:28–34 <https://doi.org/10.3923/crb.2008.28.34>

Long HH, Sonntag DG, Schmidt DD, Baldwin IT (2010) The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. New Phytol 185:554–567 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03079.x>

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–56 <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Lundberg DS et al. (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86–90 <https://doi.org.10.1038/nature11237>

Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, et al (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86–90 <https://doi.org.10.1038/nature11237>

Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 1-10

Mahajan GB, Balachandran L (2011) Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Front Biosci* 4:240–253 <https://doi.org.10.2741/373>

Mahuku GS (2004) A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Mol Biol Rep* 22:71–81 <https://doi.org/10.1007/bf02773351>

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. *Genet Mol Res* 9:2372–2380 <https://doi.org.10.4238/vol9-4gmr921>

Martínez L, Caballero J, Orozco J, Martínez-Romero E (2003) Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant Soil* 257:35-47. <https://doi.org/10.1023/A:1026283311770>

Montejano-Ramírez, Martínez-Cámara R, García-Pineda E, Valencia-Cantero E (2018) Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of FRO genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40:138. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2712-x>

Morris PF, Bone E, Tyler BM (1998) Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soy bean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol* 117:1171–78 <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1171>

Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA (2016) The plant microbiota: systems biology insights and perspectives. *Annu Rev Genet* 50:211–234 <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>

Ofek M, Voronov-Goldman M, Hadar Y, Minz D (2014) Host signature effect on plant root-associated microbiomes revealed through analyses of resident vs. active communities. *Environ Microbiol* 16:2157–2167 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12228>

Oger PM, Mansouri H, Nesme X, Dessaux Y (2004) Engineering root exudation of Lotus toward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microb Ecol* 47:96–103
<https://doi.org/10.1007/s00248-003-2012-9>

Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994) Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26: 1591–1601.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)

Orozco-Mosqueda MC, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Farías-Rodríguez R, Valencia-Cantero E (2013a) *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol* 58:579–585. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0243-9>

Passari AK et al. (2015) *In vitro* and *in vivo* plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *Plos One* 10, e0139468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139468>

Patton TG, Scupham AJ, Bearson SM, Carlson SA (2009) Characterization of fecal microbiota from a Salmonella endemic cattle herd as determined by oligonucleotide fingerprinting of rDNA genes. *Vet Microbiol* 136: 285–292 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.032>

Pawlowski K. 2009. Prokaryotic symbionts in plants. Springer-Verlag, Dordrecht, Netherlands.

<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-75460-2>

Pilatti MA, de Orellana JA, Priano LJ, Felli OM, Grenon DA (1988) Incidencia de manejos tradicionales y conservacionistas sobre propiedades físicas, químicas y biológicas de un argiudol en el sur de Santa Fe. Ciencia del Suelo 1: 19-29.

Provorov NA, Vorobyov NI. 2009. Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses. Phytochem Rev 8:519–534. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-009-9140-x>.

Raaijmakers, JM, Vlami M, de Souza JT (2002) Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. Antonie Van Leeuwenhoek 81:537-547 <https://doi.org/10.1023/A:1020501420831>

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. <http://dx.doi.org/10.1079/9781780645216.0000>

Raya-González J, Pelagio-Flores R, Lopez-Bucio J (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol 169:1348–1358 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.002>

Raya-González J, Velázquez-Becerra C, Barrera-Ortiz S, López-Bucio J, Valencia-Cantero E (2017) N,N-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1031-6>

Reinhold-Hurek B, Buenger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T (2015) Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annu Rev Phytopathol* 53:403–24 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>

Reinhold-Hurek B, Hurek T, (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14:435–443 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>

Reiter B, Bürgmann H, Burg K, Sessitsch A (2003) Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Can J Microbiol* 49:549-555 <https://doi.org/10.1139/w03-070>

Rodriguez R, Redman R (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot* 59:1109–1114 <https://doi.org/10.1093/jxb/erm342>

Rolli E, Marasco R, Vigani G, Ettoumi B, Mapelli F, Deangelis ML, et al. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>

Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL (2014) The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiol Lett* 351:187–194 <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12377>

Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2004) Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch Microbiol* 181:337–344 <https://doi.org.10.1007/s11104-007-9458-3>

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

Ruscitti MF, Arango MC, Ronco MG, Peluso O, Beltrano A (2007). Efecto del estrés hídrico simulado y la inoculación con esporas de *glomus mosseae* sobre el crecimiento y la partición de biomasa en avena. *Terra Latinoamericana* 25: 135-143.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 100:4927-4932 <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>

Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S (2013) Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). J Plant Prot Res 53:128–136 <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0019>

Santi C, Bogusz D, Franche C (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot 111:743–767 <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>

Santoyo, G, Orozco-Mosqueda MC, Govindappa C (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Sci Technol 22:855-872 <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P, Janssen PH (2004) Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representing the phylum-level diversity of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 70:4363-4366 <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4363-4366.2004>

Schreiter S, Ding GC, Heuer H, Neumann G, Sandmann M, et al (2014) Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. Front Microbiol 5:144 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00144>

Seghers D, Wittebolle L, Top EM, Verstraete W, Siciliano SD (2004) Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. Appl Environ Microbiol 70:1475-1482. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1475-1482.2004>

Sexton DJ, Glover RC, Loper JE, Schuster M (2017) *Pseudomonas protegens* Pf-5 favours self-produced siderophore over free-loading in interspecies competition for iron. Environ Microbiol 19: 3514-3525. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13836>

Sharifi R, Ryu CM (2018) Sniffing bacterial volatile compounds for healthier plants. Curr Opin Plant Biol 44:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.004>

Shaw LJ, Morris P, Hooker JE (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. Environ Microbiol 8:1867–1880
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>

Shidore T, Dinse T, Ohrlein J, Becker A, Reinhold-Hurek B (2012) Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. Environ.Microbiol 14:2775–87
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02777.x>

Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS: Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. Nat Rev Microbiol. 2010, 8: 779-790.
<https://doi.org.10.1038/nrmicro2439>

Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci* 19:1-30

<https://doi.org/10.1080/07352680091139169>

Sturz AV, Matheson W, Kimpinski AL, Christie BR (2001) Weeds as a source of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural soils. *Can J Microbiol* 47: 1013–1024.

<https://doi.org/10.1139/cjm-47-11-1013>

Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2003) Effect of N fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol* 5:1009–15

<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00491.x>

Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*.

Plant J 22: 531-541 <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00757.x>

Turner TR, James EK, Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome Biol* 14:209

<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez- Becerra C, López-Meza JE, α -ro-Cuevas R, Lopez-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 Soil 291:263-73. <http://doi.org/10.1007/s11104-007-9191-y>

Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E (2011) A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro. Plant and Soil 339: 329-340 <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0583-z>

Velazquez-Sepulveda, I, Orozco-Mosqueda MC, Prieto- Barajas CM, Santoyo G (2012). Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): Toward a metagenomic analysis. PHYTON-INT J EXP BOT Journal 81: 81-87.

Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, and Tripathi AK (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. Biotechnol Lett 26:425-429. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000018263.94440.ab>

Wagner MR, Lundberg DS, del Rio TG, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T (2016) Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. Nat Commun 7:12151. <https://doi.org/10.1038/ncomms12151>

Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* 100:681–697

<https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703 [https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991)

[703.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991)

Weller DM (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250–256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>

Xue L et al. (2013) Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Prot* 43:231–240

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.002>

Yang YW, Chen MK, Yang BY, Huang XJ, Zhang XR, He LQ, Zhang J, Hua ZC (2015) Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces. *Appl Environ Microbiol* 81:6749–6756

<https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>

Young ND, Debelle F, Oldroyd GE, Geurts R, et al. (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520-524.

<https://doi.org/10.1038/nature10625>

Yuan J, Zhang N, Huang Q, Raza W, Li R, Vivanco JM, et al. (2015) Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci. Rep.* 5:13438. <https://doi.org.10.1038/srep13438>

Zeng Q et al. (2013) A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *A Van Leeuw J Microb* 103:1107–1111 <https://doi.org.10.1007/s10482-013-9890-8>