



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

**Análisis de la variación del metaboloma de las
hojas de *Medicago truncatula* asociada a la
inoculación foliar con *Arthrobacter agilis*
UMCV2**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el título
profesional de**

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

presenta

Biól. Arturo Ramírez Ordorica

Asesora: Dr. Lourdes Iveth Macías Rodríguez

Coasesor: Dr. Robert Winkler

Morelia, Michoacán. Noviembre de 2018



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH**

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE BIOQUÍMICA ECOLÓGICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA ANALÍTICA E INSTRUMENTAL DEL CINVESTAV UNIDAD IRAPUATO, BAJO LA ASESORÍA DE LOS DOCTORES LOURDES IVETH MACÍAS RODRÍGUEZ Y ROBERT WINKLER. ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR EL CONSEJO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO CLAVE 2.24.

Agradecimientos

A mis amados padres y mi hermano, porque su infinito amor es la inspiración de cada día, y a quienes les debo todo lo que soy, porque ellos son verdaderamente el motor que me mueve y en donde reposa siempre mi corazón, a ellos dedico este trabajo.

Mi profundo agradecimiento a la D. en C. Lourdes Macías Rodríguez, por brindarme todo su apoyo, orientación y facilidades tanto materiales como técnicas en esta etapa de mi formación académica, y a la que considero no solo como mi asesora, sino mucho más como mi amiga. Gracias.

Al Dr. Robert Winkler por brindarme su coasesoría y apoyo material, y a los integrantes del Laboratorio de Bioquímica Analítica e Instrumental del CINVESTAV, unidad Irapuato.

Muchas gracias a mi comité sinodal por las valiosísimas observaciones realizadas en el presente proyecto, tanto en seminarios como en las versiones finales de este escrito; los doctores Eduardo Valencia Cantero, José López Bucio, Josué Altamirano Hernández y Ernesto García Pineda.

A todos aquellos que de una u otra forma, con su apoyo tanto moral como con sus observaciones y consejos permitieron la realización de este proyecto. Su amistad y profundo cariño son un tesoro que llevo siempre en mi corazón. Mencionar algunos y omitir a otros es una injusticia, pero no puedo dejar de agradecer a mi amigo querido Abdieel Qusiehuatl, a Angélica Quintero y Guadalupe Báez, a mis amigas de laboratorio Andrea Aldaco, Idolina Flores y Perla García.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de éste proyecto.

Índice

1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)	8
2.2. Colonización endófitas de las bacterias rizosféricas	10
2.3. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de los endófitos	13
2.4. Aplicación foliar de bacterias endófitas como bioestimulantes	16
2.5. <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2.....	18
2.6. <i>Medicago truncatula</i> como modelo de estudio	20
2.7. Aspectos relevantes en la química de las leguminosas.....	21
2.8. Aplicación de la metabolómica en el estudio de la interacción planta- microorganismo	24
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivo general.....	31
6. Metodología.....	32
7. Resultados.....	41
7.1. Perfil químico de hojas de <i>Medicago truncatula</i>	41
7.2. Cuantificación de la colonización bacteriana durante la inoculación foliar.....	44
7.3. Perfil químico de las hojas inoculadas con <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2	48
7.4. Cambios en el perfil de carbohidratos entre hojas de <i>M. truncatula</i> y asociados con la inoculación foliar con <i>A. agilis</i> UMCV2.....	52
8. Discusión	55
8.1. Diferencias metabólicas entre hojas de <i>M. truncatula</i>	55
8.2. Características bioquímicas de las hojas de <i>M. truncatula</i>	56
8.3. Patrones de colonización de <i>A. agilis</i> UMCV2 en hojas y diferencias químicas asociadas.....	60
9. Perspectivas	66
10. Conclusión	67
11. Bibliografía.....	68
12. Apéndice	81

Resumen

Los endófitos son microorganismos que residen en el interior de los tejidos de la planta huésped de forma comensal o benéfica. Los endófitos juegan un papel muy importante en la estimulación del crecimiento vegetal y la defensa de sus plantas hospederas por lo que poseen un gran valor en la agricultura sustentable. Debido a lo anterior, existe un gran interés en estudiar cómo las plantas reclutan a los endófitos y regulan su colonización. *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una rizobacteria de hábito endófito que reduce hierro y promueve el crecimiento de la leguminosa *Medicago truncatula*. En este trabajo analizamos el perfil metabólico de las hojas en diferentes metámeros (m1, m2 y m3) de plantas de *M. truncatula* e investigamos si estos metabolitos están asociados con la colonización de la hoja por *A. agilis* después de su aplicación foliar. Los análisis químicos se realizaron mediante espectrometría de masas por introducción directa de líquidos con ionización por electroespray (DLI-ESI) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Los perfiles metabólicos de las hojas trifoliadas m2 y m3 fueron diferentes al de la hoja unifoliada m1. Empleando modelos de minería de datos, se lograron identificar 30 iones que mejor discriminan las hojas m1 de m2 y m3. Los iones correspondieron al indol-3-acetaldehído, isocorismato, así como a diferentes fosfolípidos y triterpenos. La cuantificación bacteriana estimada por qPCR y el análisis obtenido por microscopía confocal, indicaron que las hojas m1 mostraron la mayor colonización bacteriana, e interesantemente durante la interacción se incrementó el contenido de azúcares totales, lo que refuerza la importancia de los carbohidratos en el establecimiento de la simbiosis. Las diferencias en el perfil bioquímico y la etapa de desarrollo de las hojas probablemente den cuenta de la preferencia de la bacteria durante la colonización.

Palabras clave: Endófitas, PGPB, inoculación foliar, metabolómica, DLI-ESI, carbohidratos.

Abstract

Endophytes are microorganisms that reside in the interior of the tissues' host plant in a commensal or beneficial manner. Endophytes play a very important role in the stimulation of plant growth and defense in their host plants, so they are very useful in sustainable agriculture. For this reason, there is great interest to study how plants recruit endophytes and regulate the colonization. *Arthrobacter agilis* UMCV2 is a rhizosphere and endophytic bacteria that reduce iron and promote the growth of the legume *Medicago truncatula*. In this work, we analyzed the metabolic profiling from the leaves (m1, m2 and m3) of *M. truncatula* plants and also we investigated if there are metabolites associated with the foliar colonization of *A. agilis*. The chemical analysis were performed by direct liquid introduction-electrospray ionization (DLI-ESI) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The metabolic profiles from the trifoliolate leaves m2 and m3 were different from those obtained in the unifoliolate leaf m1. With data mining models, we identified 30 ions that discriminate m1 from m2 and m3 leaves. These ions were indole-3-acetaldehyde, isocorismate, as well as to different phospholipids and triterpenes. The bacterial quantification estimated by qPCR and the analysis obtained by confocal microscopy, indicated that the m1 leaves had the highest bacterial colonization, and interestingly during the interaction, the total sugar content was increased, which reinforce the role of carbohydrates in the establishment of symbiosis. Differences found in the biochemical profile from m1, m2, and m3 leaves with a specific leaf stage development might account the preference of UMCV2 for internalization and colonization.

Keywords: Endophyte, PGPB, foliar inoculation, metabolomics, DLI-ESI, carbohydrates.

1. Introducción

Nuestro mundo enfrenta serios desafíos medioambientales como producto de la explotación desmedida de los recursos naturales y una de sus consecuencias más perniciosas es, sin duda alguna, la degradación de aquellos recursos clasificados como “no renovables”; el suelo entraría dentro de esta categoría (FAO, 2015), lo que evidentemente compromete la seguridad alimentaria a mediano y largo plazo. Esta ha sido la principal motivación para la búsqueda de nuevas técnicas para incrementar la producción agrícola que sean compatibles con la disminución en el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos, principales responsables de la continua degradación del suelo y la contaminación de los depósitos de agua subterráneos (Kassir et al., 2012; Savci, 2012).

Una alternativa biotecnológica implica el uso de microorganismos del suelo (en particular bacterias y hongos) para incrementar la productividad y mejorar el desempeño de los cultivos. El potencial de este enfoque radica en la riqueza funcional de estas comunidades microbianas y que son responsables de la síntesis de una gran variedad de compuestos clave en los procesos de reciclado de elementos en la biósfera, la producción de fitoestimuladores y compuestos bactericidas y fungicidas; estos atributos han permitido explicar muchos de los mecanismos por los cuales cumplen con su función promotora del crecimiento vegetal (Pérez-Montaña et al., 2014; Compant et al. 2005). Por otro lado, si bien la rizósfera (la interface entre las raíces y el suelo libre), alberga una buena parte de los microorganismos que cohabitan con las plantas (Philippot et al., 2013), en la actualidad es evidente que hay al menos dos regiones más de la planta que son colonizadas por microorganismos que pueden ejercer un fuerte efecto en el crecimiento vegetal: la parte aérea, dominada principalmente por el follaje y que ha recibido el nombre de filósfera, y el interior de los tejidos vegetales o endósfera (Lindow et al., 2002; Hardoim et al., 2008). Una de las limitantes para la implementación generalizada del uso de estos organismos como biofertilizantes es la dificultad en el establecimiento de la relación planta-microorganismo que se refleje en una mejora en parámetros de producción; por lo que diferentes estrategias

de inoculación deben ser exploradas con el fin de encontrar aquellas que ofrezcan mejores resultados. En particular, nuestro interés se enfocará por las bacterias endófitas, sin olvidar que el estilo de vida endófito de ningún modo se restringe a este grupo, pues los hongos con este hábito han sido también estudiados y se tiene bastante información al respecto.

2. Antecedentes

2.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Se denominan como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*plant growth-promoting rizobacteria*, por sus siglas en inglés, PGPR) a aquellas bacterias de origen rizosférico que son capaces de promover el crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1978). Los criterios para definir a un grupo bacteriano como PGPR han variado desde su primera definición, pero en general cumplen con al menos los siguientes criterios: colonizar activamente la rizósfera, sobrevivir, multiplicarse y competir con la microbiota, y promover el crecimiento de la planta (Kloepper, 1994). Las mismas PGPR pueden ser incluidas en un grupo más grande de habitantes del suelo, conocidos como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (*plant growth-promoting microbes*, por sus siglas en inglés, PGPM), que incluyen principalmente a hongos y bacterias que benefician a su hospedero por diferentes mecanismos, promoviendo su desarrollo (Abhilash et al., 2016).

Es importante destacar que la definición previa de PGPM no se restringe a aquellos microorganismos que viven, o bien en el rizoplano, o en la rizósfera, sino que además incluye a aquellos que son capaces de colonizar compartimientos internos de las plantas (endósfera), y desde allí ejercer sus efectos benéficos. A este grupo de organismos se les conoce como organismos endófitos (Christina et al., 2013).

La definición más ampliamente utilizada para los organismos endófitos es considerar bajo este término a aquellos microorganismos que se pueden recuperar

de tejidos esterilizados superficialmente y que no causan un daño aparente a su huésped (Christina et al., 2013). Bajo esta denominación se incluyen tanto hongos como bacterias que poseen este modo de vida.

La importancia de este grupo de organismos es puesta en contexto fácilmente si tomamos en cuenta que su presencia ha sido detectada en casi todos los grupos de plantas terrestres, desde briofitas hasta plantas con flores (Hardoim et al., 2015). Sin embargo, esta interacción ha sido explorada para muy pocas especies vegetales, por lo que sin duda es de esperar que con el tiempo se descubran tipos inesperados de grupos bacterianos con mecanismos diferentes de promoción vegetal, lo que ha estimulado recientemente las investigaciones con miras a su potencial biotecnológico (Backman et al., 2008).

En lo que respecta a bacterias endófitas, la mayoría de estas se agrupan en 23 divisiones bacterianas diferentes, pero el 96% de las secuencias reportadas se distribuyen principalmente en cuatro divisiones: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, y Bacteroidetes. Dentro del primero (que cuenta con cerca de la mitad de los reportes a la fecha), la subclase Gammaproteobacteria se encuentra ampliamente representada, con géneros tales como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, además se tienen numerosos reportes de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* (ambos de la división Firmicutes), *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Mycobacterium* (pertenecientes a Actinobacteria) (Ibáñez et al. 2017).

Los endófitos se dividen en dos grandes grupos: obligados y facultativos; los primeros completan su ciclo de vida en el interior de los tejidos vegetales y requieren de su huésped para poder perpetuarse, su modo de transmisión es por medio de vectores; mientras que los endófitos facultativos pueden alternar entre una forma de vida endófito y una forma libre. Por otro lado, tenemos a un grupo de endófitos oportunistas, cuya presencia es ocasional. Es también importante destacar que existen cepas bacterianas patogénicas que pueden vivir en formas avirulentas en el interior de los tejidos, tal es el caso de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, que puede

tener una forma libre acuática y otra intratisular (Hardoim et al., 2008, Van Overbeek et al., 2004).

Las comunidades bacterianas en el interior del tejido vegetal pueden formar complejos entramados de relaciones tróficas. Se sabe que las bacterias endófitas son capaces de especializarse en metabolizar diferentes fuentes de carbono en el interior de las plantas. Así, por ejemplo, Asis y col. (2003), demostraron que las endófitas diazótrofes *Gluconoacetobacter diazotrophicus* ATCC 49037 y *Herbaspirillum rubrisubalbicans* PA18; colonizan el apoplasto de la caña de azúcar, pero *G. diazotrophicus* metaboliza principalmente glucosa y fructosa por medio de la acción de enzimas sacarolíticas exógenas, mientras que *H. rubrisubalbicans* utiliza el aconitato como fuente de carbono. Además, reportes previos (Boddey et al. 1995) sugieren que los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo fermentativo de *G. diazotrophicus* sirven como sustrato para el crecimiento de *H. rubrisubalbicans*, todo esto nos permite ilustrar las complejas relaciones que se forman entre estas comunidades intratisulares.

2.2. Colonización endófitas de las bacterias rizosféricas

El establecimiento de la relación endófitas se puede entender como una serie de pasos secuenciales en el que la bacteria atraviesa diferentes barreras a la colonización; siendo la primera y más importante la epidermis de la planta. El principal punto de entrada de las endófitas es a nivel del sistema radicular, por medio de heridas o quiebres, por lenticelas, o por las aberturas producidas durante la emergencia de radículas. También estas bacterias pueden internalizarse por los orificios estomáticos a nivel de la filósfera (Santoyo et al., 2015). Durante esta etapa, la señalización química por parte de la planta juega un papel muy importante, el ejemplo arquetípico lo encontramos en la percepción de flavonoides por parte de rizobias y de esta forma iniciar los eventos de señalización que llevarán a la nodulación (Stougaard, 2000). Es también relevante la importancia de los mecanismos de adhesión de la bacteria desde las primeras etapas de penetración y colonización, por ejemplo, se ha reportado que *Azoarcus* sp. endófitas mutantes, deficientes en la producción de pilina tienen serias limitaciones para poder colonizar

plantas de arroz. La pilina es el componente mayoritario de las proyecciones celulares de los llamados pili tipo IV, presentes en la superficie de muchas bacterias Gram-negativas y cuya función es contribuir a la locomoción y a la adherencia, de manera independiente a los flagelos (Dörr et al. 1998; Melville et al. 2013).

Posteriormente, estas bacterias endófitas son reconocidas por las plantas y activarán respuestas de defensa por medio del reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (*microbe-associated molecular patterns*, por sus siglas en inglés, MAMP's), que son detectados por la planta desde los primeros estadios de colonización, induciendo una respuesta semejante a la que se esperaría de la colonización por patógenos, pero de una forma atenuada (Fig. 1A) (Bordiec et al., 2011). Esta respuesta inicial es mitigada por los endófitos principalmente a través de la producción de moléculas efectoras que bloqueen la señalización hormonal. Un ejemplo concreto de esto se encuentra en la supresión de la respuesta inmune en *M. truncatula* en respuesta a lipopolisácaridos y exopolisácaridos de membrana en *Sinorizobium meliloti*. Además de éstos, la supresión de la respuesta en etapas tardías se atribuye en parte a la secreción de proteínas Nops por la rizobia (*nodulation outer proteins*, en inglés) haciendo uso del sistema de secreción tipo III (Zamioudis et al., 2012). Una vez establecida las endófitas en el tejido, muchas tienen la capacidad de moverse a través del tejido vascular a regiones muy alejadas del punto de entrada a la planta (Fig. 1B y C) (Chi et al., 2005).

Los factores intrínsecos en la planta que son determinantes de la exitosa relación endófitas siguen siendo objeto de estudio en la actualidad, sin embargo, cada vez se acumula mayor evidencia a favor de la idea de que el huésped vegetal posee un papel activo en la selección de la comunidad endófitas y el éxito en el establecimiento de la relación, en donde la producción de uno o varios compuestos claves podrían facilitar o no la colonización. Un ejemplo se encuentra en el papel del etileno en el establecimiento de estas comunidades bacterianas. Por ejemplo, Iniguez y col. (2005) mostraron que mutantes de *M. truncatula* insensibles a la señalización por etileno son hipercolonizadas por *Sinorizobium meliloti*, mostrando

una mayor cantidad de nodulación que sus contrapartes silvestres. Más aún, otras cepas endófitas tales como *Klebsiella pneumoniae* 342 o *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mostraron también una alta afinidad por las plantas mutantes, lo que indica que esta deficiencia en la señalización de etileno afecta el estado general de la planta para responder a la colonización bacteriana. Con estas observaciones, no parece entonces una casualidad el que en general las bacterias con estilo de vida endófito se hayan correlacionado con la posesión de mecanismos para bloquear la síntesis de etileno; sobre este punto se volverá más adelante.

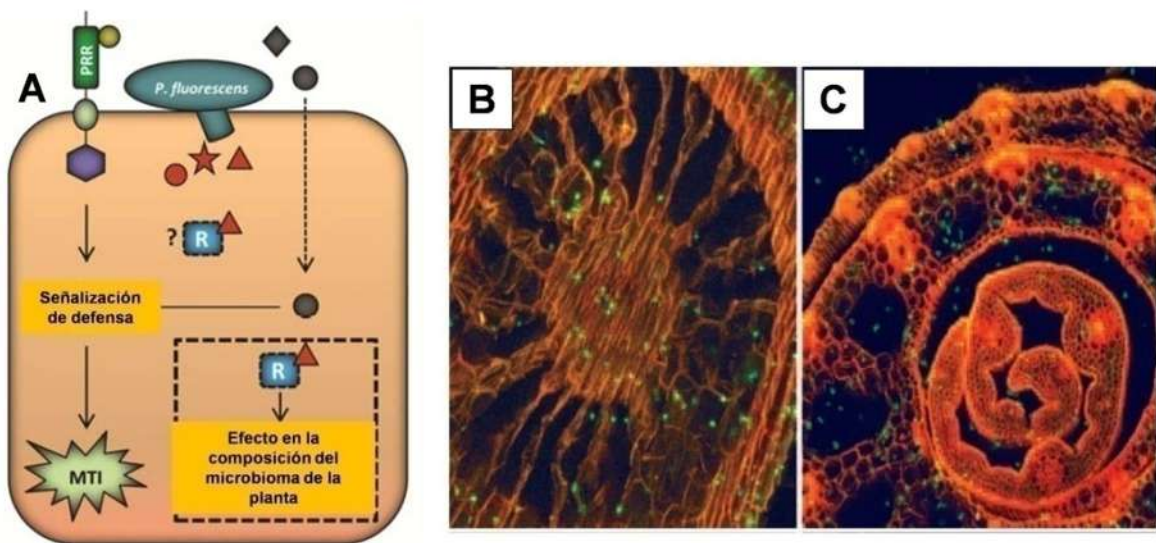


Figura 1. Mecanismo de interacción planta-endófito. (A) Las endófitas producen moléculas efectoras que modulan la respuesta inmune al colonizar el tejido vegetal, tal es el caso de *Pseudomonas fluorescens* WCS417 (círculos grises). La planta reconoce los MAMP's emitidos por las bacterias por medio de sus receptores PRR (del inglés *pattern recognition receptors*, en verde), y a su vez por el reconocimiento de efectores por proteínas de resistencia R (caja azul) (Modificado de Zamioudis et al., 2012). (B y C) Ejemplo de la colonización del endófito *S. meliloti* 1021 en plantas de arroz marcadas con proteína verde fluorescente. Se observa las señales a nivel de haces vasculares y en apoplasto principalmente (Chi et al., 2005).

2.3. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de los endófitos

La presencia de microorganismos en las plantas tiene consecuencias importantes para la diversidad genética y la plasticidad funcional de la planta con su medio. El suelo representa el mayor reservorio de diversidad genética en la naturaleza por la cantidad de microorganismos que lo habitan, y los genomas de las bacterias asociadas con las plantas supera en tamaño y complejidad a las de sus huéspedes (Berendesen et al. 2012). Existen varios paralelismos claros entre las funciones de esta microbiota asociada a las plantas y la microbiota de los mamíferos, a tal grado que diferentes autores han propuesto la denominación de “probióticos de plantas” para los organismos endófitos (Teotia et al., 2017). Hasta la fecha, se conocen relativamente bien el tipo de mecanismos generales que promueven la salud de las plantas, que en general son similares a los usados por otras PGPR, con la ventaja de que las bacterias endófitas en general se ven liberadas de la presión ambiental que ocurre por las condiciones cambiantes del suelo, además de que sería de suponer que estas bacterias son más persistentes en el ambiente que sus contrapartes rizosféricas (Santoyo et al., 2015). En general se pueden enunciar como principales mecanismos de promoción del crecimiento a la adquisición incrementada de nutrientes mediada por las endófitas a la planta, la producción de fitohormonas, la inducción de mecanismos de resistencia a patógenos, y la antibiosis directa de estas especies contra patógenos (Partida-Martínez et al., 2011).

La estimulación en la adquisición de nutrientes por parte de bacterias endófitas se da por diferentes mecanismos; el ejemplo más ampliamente estudiado es la fijación de nitrógeno por parte de rizobias en las leguminosas, que inducen la formación de nódulos. Dentro de estos nódulos se transforman en formas no móviles que reciben el nombre de “bacteroides”, los cuales dependerán de la adquisición del carbono suministrado por los fotosintatos de la planta, y que a su vez subministrarán nitrógeno fijado de la atmósfera (Partida-Martínez et al., 2011). Sin embargo, la fijación de nitrógeno no se restringe de ningún modo a la interacción rizobias-leguminosas, un ejemplo lo encontramos en el diazótrofo *Azospirillum* sp.

B510 en plantas de arroz, y que además confiere resistencia a la infección con *Xantomonas oryzae* (Yasuda et al. 2009), esto es además una muestra de cómo una misma cepa bacteriana confiere beneficios a su hospedero por más de un mecanismo.

Además de nitrógeno, la solubilización de fósforo se ha reportado para cepas bacterianas endófitas, como es el caso de cepas de *Pseudomonas fluorescens* que estimulan el crecimiento de *Pisum sativum*, a través de la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, lo que libera el fósforo en una forma asimilable para la planta (Oteino et al., 2015). Otro nutriente limitante cuya adquisición se ha visto estimulado por endófitas es el hierro, tal es el caso de la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2, de la que se ha demostrado no solamente su capacidad de colonizar endófitamente los tejidos de *M. truncatula*, sino que además estimula los mecanismos de adquisición de hierro característicos de la estrategia I que posee la misma planta, en particular, estimula su capacidad de acidificar el medio y el aumento de la actividad de la férrico quelato reductasa en la raíz (Orozco-Mosqueda et al., 2013).

Muchas cepas endófitas han demostrado su capacidad para producir fitohormonas, entre las que destacan las auxinas, y en particular el ácido indol acético (AIA), giberelinas y citocininas. El ácido indol acético está implicado en un gran número de procesos que tienen lugar durante el desarrollo y crecimiento vegetal, y en la diferenciación de casi todos los órganos vegetales en coordinación con otras rutas de señalización (Woodward et al., 2005; Bohn-Courseau et al., 2010). Así, por ejemplo, Shi y col. (2009) aislaron tres cepas endófitas productoras de este compuesto, al que se le atribuyeron los efectos promotores del crecimiento en caña de azúcar, esto efectos eran aún mayores cuando el suelo donde se mantenían las plantas era suplementado con triptófano, lo que demostraba la importancia de la presencia del precursor en el medio, es importante destacar que estas cepas tenían además la capacidad de producir giberelinas y zeatina, también fitorreguladores. El papel del AIA no se limita a la promoción del crecimiento vegetal durante esta interacción, sino que además parece importante en la capacidad de

colonización de ciertas cepas endófitas, como es el caso de la limitada capacidad de colonización de la cepa HP72LI de *Pseudomonas fluorescens*, mutante deficiente en la producción de AIA por vía de la enzima oxidasa de cadena lateral del triptófano (*tryptophan 2'-dioxygenase*, por sus siglas en inglés, TSO) comparada con su contraparte silvestre HP72, en ensayos al colonizar raíces de *Agrostis palustris* (Susuki et al., 2003). A este respecto es importante recordar que el AIA también está implicado en la manifestación de síntomas por infección de bacterias patógenas productoras de callos o tumores, como *Agrobacterium tumefaciens* o *Pseudomonas syringae* (Spaepen et al., 2011).

Sin lugar a dudas, la estimulación de los mecanismos de resistencia es muy importante como medio por el cual las endófitas mejoran el desempeño de las plantas frente al estrés biótico, protegiéndoles contra un amplio grupo de patógenos. En las plantas, la respuesta sistémica puede dividirse en dos tipos; la respuesta sistémica adquirida (*systemic acquired response*, SAR), y la respuesta sistémica inducida (*induced systemic response*, ISR); la primera se activa por el ataque de microorganismos patógenos y es dependiente de señalización por ácido salicílico (*salicylic acid*, SA), que actúa como señal molecular móvil y que se acumula inicialmente en el sitio de infección, para después moverse a tejidos alejados e inducir una respuesta de resistencia coordinada por la activación de grupos de genes relacionados a patogénesis (*pathogenesis-related*, PR), muchos de los cuales poseen actividad antimicrobiana, y en donde el factor transcripcional NPR1 juega un papel importante como elemento regulador (Zhao et al., 2008). Por su parte, ISR se activa en respuesta a la colonización por parte de bacterias benéficas; entre ellas bacterias endófitas. ISR es dependiente de la señalización por ácido jasmónico (*jasmonic acid*, JA) y etileno (*ethylene*, ET), y además no se encuentra asociada con la activación de genes PR, y en su lugar se presenta la activación de genes de respuesta a jasmonato y etileno, como la defensina PDF1.2, o el inhibidor de proteasas de tripsina TPI (Maag et al., 2014). Es muy probable que esta inducción de resistencia sistémica sea debido a la activación de mecanismos mediados por el reconocimiento de MAMP's de la bacteria endófitas, durante los primeros estadios de colonización.

La activación de ISR se puede entender como un mecanismo de antagonismo indirecto entre las bacterias endófitas y posibles patógenos, sin embargo también estas cepas son capaces de sintetizar compuestos con fuerte actividad antimicrobiana o que les proveen de ventaja competitiva sobre otras bacterias, entendido como una forma de antagonismo directo como es el caso de la sespenina; producida por cepas de *Streptomyces* sp. en asociación con sauce que posee actividad antimicrobiana contra múltiples cepas, o la serobactina A, un lipopéptido producido por *Herbaspirillum seropedicae* que tiene actividad sideróforo (Brader et al., 2014; Dong-Bo et al., 2014). Las endófitas también son capaces de conferir tolerancia al estrés abiótico, en diferentes manifestaciones. Por ejemplo, las Rhizobiales de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que confieren resistencia a estrés por sequía en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y frijol castilla (*Vigna unguiculata*) (da Silva et al., 2013; Mohammad et al., 1991). Por otro lado, el etileno es la principal molécula de señalización en plantas que media la respuesta al estrés a múltiples factores; muchas cepas promotoras del crecimiento rizosféricas y endófitas han demostrado su capacidad para producir la enzima 1- aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa), que disminuye la síntesis de etileno al degradar este precursor (Glick, 2015). Un ejemplo son las cepas *Pseudomonas fluorescens* YsS6 y *P. migulae* 8R6 en plantas de jitomate poseedoras del gen ACC desaminasa, y cuyas contrapartes mutantes no tienen la capacidad de aminorar el estrés salino (Ali et al., 2014).

2.4. Aplicación foliar de bacterias endófitas como bioestimulantes

Se denomina bajo la categoría de bioestimulantes a cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el fin de estimular su eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o características de calidad de los cultivos (du Jardin, 2015). Esta definición engloba a todos los preparados comerciales bajo la categoría (menos inclusiva) de biofertilizantes.

Para sus aplicaciones biotecnológicas, el buen uso de bioestimulantes a base de bacterias endófitas implica incrementar el conocimiento de los principales determinantes en el establecimiento de estas comunidades y relacionarlo con

estrategias de manejo e inoculación que mejor optimicen el uso de las mismas. Así, en lo que respecta a la manera de aplicación, existen reportes que sugieren que la aplicación foliar tiene ventajas sobre la aplicación más común en estos inoculantes bacterianos que es en el suelo. Por ejemplo; Canellas y col. (2015), mostraron los efectos que tiene la aplicación del inóculo bacteriano preparado en una solución líquida del diazótrofo endófito *Herbaspirillum seropedicae* a una concentración aproximada de 2×10^8 células/mL con ácidos húmicos a un pH de 7, sobre el rendimiento neto en maíz, en combinación con diferentes factores controlados: diferentes niveles de nitrógeno en suelo, diferentes tiempos de inoculación de plantas y siembra suelos de alta fertilidad. Los resultados indicaron una mejora substancial en los diferentes parámetros de rendimiento, como biomasa total, rendimiento de grano, y peso seco de raíz comparados con controles sin inocular.

De forma semejante, da Silva y col. (2017), reportó el uso de un bioinoculante a base del consorcio *H. seropedicae* HRC54, *H. rubrisubalbicans* HCC103 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar en condiciones de campo, utilizando un sistema de aspersion foliar en una solución que incluía también ácidos húmicos a pH neutro. Se comparó además con la inoculación a nivel de surco, utilizando la misma formulación que en aspersion foliar. Los autores reportan un considerable aumento en el rendimiento de la planta; medido en términos de toneladas de caña por hectárea, grados Brix (B°) del jugo de caña y el contenido total de nitrógeno en hojas; de todos estos parámetros se reportaron incrementos de hasta un 20% cuando el método de aplicación era por aspersion foliar, comparado con la inoculación a nivel de surco.

Es en este contexto que el estudio del potencial uso de bacterias endófitas como bioinoculantes depende del conocimiento de aquellos factores intrínsecos y extrínsecos que facilitan la colonización foliar. Un modelo de estudio adecuado que permita entender este proceso no existe hasta la fecha, por lo que *A. agilis* UMCV2 representa un potencial candidato para este fin.

2.5. *Arthrobacter agilis* UMCV2

Arthrobacter agilis pertenece a la división Actinobacteria, familia Micrococcaceae. Es una bacteria gran positiva, de morfología cocoide, generalmente presente en duplas o tétradas de células. Forma colonias circulares de color rosado, brillantes, de bordes enteros y elevación convexa (Hans-Jürgen et al., 2012). Esta bacteria adquiere su coloración característica gracias a la presencia de bacterioruberina, un carotenoide C-50 del que se sabe le confiere capacidad de sobrevivir en temperaturas de hasta cero grados centígrados, posiblemente al disminuir la fluidez de la membrana bacteriana y aumentando su resistencia mecánica (Fong et al., 2001; Kirty et al. 2014).

Arthrobacter agilis UMCV2 fue aislada durante un escrutinio en busca de bacterias reductoras de hierro, de un vertisol alcalino muestreado del municipio de Uruapan, Michoacán, por Valencia-Cantero y col. (2007). Los cuatro aislados que se muestran en dicho trabajo, entre ellos UMCV2, se obtuvieron recuperando el suelo de la rizósfera de maíz crecido en dichos suelos. En este trabajo los autores reportaron cuatro aislados bacterianos, entre los que se encontró *Arthrobacter* spp. UMCV2, caracterizado por la coincidencia de la secuencia del rDNA 16S. Se encontró que en particular este aislado es capaz de aumentar la concentración de hierro asimilable en la filósfera de plantas de frijol. Adicional a esto se determinó que la inoculación también aumentaba el peso fresco de las plantas y la concentración de hierro en el tejido.

Velázquez-Becerra y col. (2011), reportaron la capacidad de la UMCV2 de promover el crecimiento de plántulas de *M. sativa* a los 10 días de interacción, con un patrón característico de aumento de biomasa y de talla del brote, comparado con un acortamiento de la raíz y un aumento en la ramificación de la misma, esto se observó en ensayos usando un sistema de contacto directo en caja con medio Hoagland, además de ensayos en caja dividida sin contacto con la bacteria, lo que sugirió un efecto promotor por parte de compuestos volátiles. De esta forma se analizaron los volátiles emitidos por *A. agilis* UMCV2, identificando la presencia del compuesto N,N-dimetil-hexadecanamina (dimetilhexadecilamina, DHA), con

semejanza estructural a las N-acil-homoserin lactonas, un grupo de alcaloides con capacidad moduladora del crecimiento vegetal. Los autores también demuestran que este mismo compuesto también es capaz de modular el crecimiento microbiano de manera dosis-dependiente, en dosis bioactivas de hasta 0.37 μM .

También se han estudiado los efectos promotores de *A. agilis* UMCV2 en interacción con *M. truncatula*. Al respecto, Orozco-Mosqueda y col. (2013), estudiaron la capacidad de los volátiles emitidos; en particular por medio de la DHA, de promover la adquisición de hierro por parte de la planta, por medio de la acidificación de la rizósfera y el estímulo de la enzima férrico quelato reductasa, ambas son características de la llamada “estrategia I” de adquisición de hierro.

Recientemente, Aviles-Garcia y col. (2016), demostraron que *A. agilis* UMCV2 posee la capacidad de colonizar los tejidos internos de *M. truncatula*, o sea que posee hábito endófito. En dicho trabajo, plántulas de 3 días de edad se inocularon a nivel de raíz con la bacteria, utilizando una suspensión con una densidad óptica de DO_{590} de 0.1, utilizando un sistema de crecimiento en medio Hoagland en el que se ensayó un lote de plantas en medio con hierro adicionado en forma férrica (Fe^{+3} , en forma del mineral ferrhidrita) o ferrosa (Fe^{+2} , en forma de sulfato ferroso). Así, el experimento siguió hasta que transcurrieran 3 semanas de interacción con la bacteria. Seguido de la cosecha de las hojas cero, uno y dos, se ensayó la presencia de la cepa en el interior del tejido por qPCR, encontrándose efectivamente en tejido foliar y tanto en raíz proximal como distal. Una observación importante es el hecho de que la distribución de esta comunidad bacteriana endófito mostró un patrón de distribución que sugiere una acumulación preferencial de las mismas en raíz proximal y en hoja 1, que los autores explican por un lado con el flujo del xilema en dirección acropétala en la parte aérea, y con una colonización activa por parte de la bacteria en la región de la raíz, sin embargo permanecería abierta también la posibilidad de la existencia de una afinidad de la bacteria por colonizar cierto órganos vegetales en la plántula.

2.6. *Medicago truncatula* como modelo de estudio

Medicago truncatula (Familia Fabaceae, División Magnoliophyta) es una leguminosa perteneciente a la subfamilia Papilionoideae, y es utilizada ampliamente en estudios de interacción planta-microorganismo, así por ejemplo su uso ha sido fundamental para entender el establecimiento de la relación con rizobias así como micorrizas. Es una especie diploide, monoica, con autofecundación, y cuyo genoma se encuentra secuenciado en totalidad; estas características facilitan su manejo experimental (Reynoso et al., 2013). *M. truncatula* posee un ciclo de vida corto, capaz de llevar a cabo la floración a los 40 días post-germinación. El crecimiento de la planta en sus primeros días es por la aparición de los primeros cuatro “metámeros”; cada uno de ellos constituido de un internodo, una hoja, y un meristemo axilar (Fig. 2). La primera hoja en emerger de las plántulas que es de tipo unifoliado y corresponde al primer metámero (m1), y posteriormente surgen las primeras hojas trifoliadas de forma secuencial, llamadas m2 y m3. La planta adquiere una filotaxia espiralada a lo largo del tallo (Bucciarelli et al., 2006).

Las leguminosas son uno de los grupos vegetales más diversificados de plantas superiores, con alrededor de 700 géneros y 20000 especies descritas, son la tercera familia más numerosas de angiospermas, solo detrás de las orquídeas y las asteráceas, cubriendo una gran variedad de ambientes del planeta, por lo que es entendible la diversidad funcional presente en este grupo, que se ve reflejado a su vez en la vasta cantidad de compuestos químicos encontrados en ellas (Doyle et al., 2003).

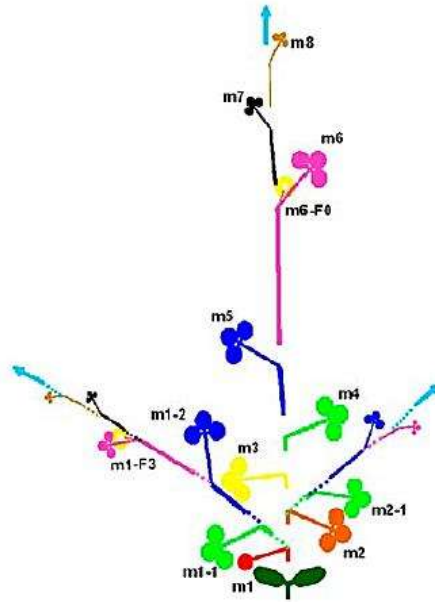


Figura 2. Diagrama del crecimiento de *M. truncatula* en la fase de 8 metameros. Las flechas azules indican la dirección de crecimiento apical y laterales. Se enumera a la hoja del metámero como m1, m2, m3, ...m(n). Los metameros que emergen posteriormente de los tallos se denominan m(N)-(K), para k=1,2,3,4...n. Así, un metámero lo constituye un internodo, una hoja, y una yema axilar. Metámeros del mismo color emergen al mismo tiempo (Bucciarelli et al., 2006).

Un aspecto a destacar sobre las leguminosas es su capacidad de establecer simbiosis con rizobias fijadoras de nitrógeno, y si bien esta capacidad no es exclusiva de las leguminosas, sí representan una familia ecológicamente importante por esta capacidad (Graham et al., 2003). La disponibilidad de nitrógeno de la planta ayuda a explicar en parte la enorme cantidad de metabolitos nitrogenados que se encuentran en esta familia, que van desde glucosinolatos, amidas, alcaloides y aminoácidos no proteicos (Wink, 2013).

2.7. Aspectos relevantes en la química de las leguminosas

Se puede definir como metabolito secundario a aquellos compuestos con una ocurrencia restringida a ciertos grupos taxonómicos, que no son necesarios para el organismo al cumplir con sus funciones bioquímicas vitales, pero juegan una función importante en la interacción del organismo con su medio, asegurando su supervivencia como miembro de un ecosistema (Verpoorte, 2000). Bajo esta

definición, el metabolismo secundario es entonces el conjunto de reacciones de biosíntesis y degradación que involucran estos metabolitos. Si bien esta definición no es totalmente restrictiva, deja en claro la compleja interrelación que se entreteje entre estos compuestos y aquellos del metabolismo primario, así como su importancia en el desarrollo de diversas interacciones ecológicas, en particular a los que se refiere en la interacción planta-microorganismo.

Los compuestos producto del metabolismo secundario se pueden clasificar en tres categorías en base a su naturaleza química: terpenos, fenoles, y nitrogenados. Estos compuestos dependen para su síntesis de precursores provenientes del metabolismo primario, principalmente derivados de la glucólisis, del ciclo de Krebs, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Calvin, así pese a la variedad de compuestos pertenecientes al metabolismo secundario, la mayoría de ellos se derivan de una limitada cantidad de rutas de biosíntesis general (Taiz, 2002).

De los compuestos relevantes para la interacción planta-microorganismo, los fenoles son un grupo muy importante a destacar. Todos estos compuestos son derivados de dos vías principales. La vía del ácido shikímico tiene como precursores al fosfoenolpiruvato y a la eritrosa-4-fosfato, que a través de siete pasos enzimáticos dan como producto al ácido corísmico (Fig. 3). Este compuesto, a su vez, es el precursor de una gran cantidad de metabolitos, entre ellos el ácido antranílico, el ácido prefénico y el L-arogenato, de éste último se deriva el ácido fenilpirúvico y finalmente por reducción se transforma en L-fenilalanina. A partir de aquí comienza la ruta de los fenilpropanoides, que inicia con la formación del ácido cinámico por medio de la acción de la fenilalanina amonio liasa (*phenylalanine ammonia-lyase*, por sus siglas en inglés, PAL), es de aquí donde se derivarán la gran mayoría de los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, como los fenoles simples, las cumarinas, los taninos, y los flavonoides (Kougan et al., 2013). Los flavonoides exudados por las raíces son compuestos que juegan un papel muy importante en la señalización temprana para el establecimiento de la simbiosis entre las leguminosas y las rizobias, al inducir la transcripción de genes de la nodulación de forma

específica con el huésped, conocidos como genes *Nod*, cuyos productos sintetizan y transportan los factores Nod; moléculas de bajos peso molecular compuestas por cadenas cortas de N-acetil glucosaminas unidas por enlaces β 1-4, generalmente llevando un ácido graso en el extremo no reductor y sulfúrico, fucosil, manosil o arabinosil en el extremo reductor; este intercambio de señales químicas permite el inicio del establecimiento de la relación simbiótica (Stougaard, 2000). Existe una gran variedad estructural de flavonoides capaces de inducir esta respuesta, entre ellos podemos mencionar a la giestina, isoliquiritigenina, formononetina glicosilada, luteolina, genisteina, entre otros (Jain, 2002).

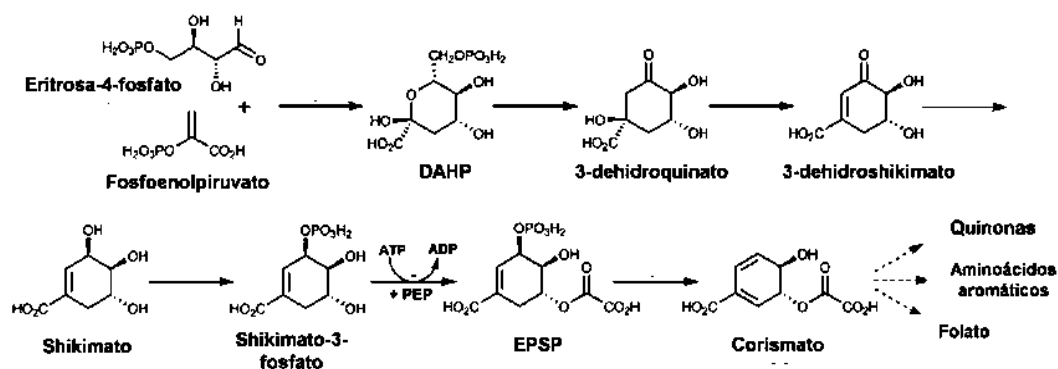


Figura 3. Ruta del ácido shikímico. DAHP: 3-Deoxi-d-arabino-heptulosonato 7-fosfato, EPSP: 5-Enolpiruvilshikimate-3-fosfato (Modificado de Kougan et al., 2013).

Los terpenoides son sintetizados por dos rutas: la ruta del ácido mevalónico que se localiza en el citoplasma, y la ruta del metileritritol fosfato (MEF) localizada principalmente en el cloroplasto. La primera inicia con la condensación de tres moléculas de acetil-CoA para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, del cual se deriva el mevalonato, que posteriormente es transformado en isopentenil difosfato y su forma isomérica dimetilalil difosfato; ambos son los precursores estructurales de los terpenoides de cadena larga. La ruta del MEF deriva en los mismos dos productos, pero tiene como precursores al gliceraldehido 3-fosfato y al piruvato. Si bien en un principio se creía que estas rutas estaban completamente separadas en la actualidad se sabe que existe un intercambio de precursores entre éstas. Sin embargo, en general es aceptado que la ruta del mevalonato tiene como productos principales a los sesquiterpenos (C_{15}) y triterpenos (C_{30}), por medio del precursor

farnesil difosfato, mientras que los monoterpenos (C₁₀), diterpenos (C₂₀) y tetraterpenos (C₄₀) derivan de la ruta del MEF, por medio de los precursores geranil difosfato (GPP) y geranil-geranil difosfato (GGPP) (Taiz, 2002; Gerd-Joachim, 2015). Las leguminosas poseen una gran variedad de compuestos terpénicos, de donde es importante destacar a los triterpenos. Todas las clases conocidas de triterpenos se encuentran representadas dentro de las leguminosas. Las saponinas son un grupo de triterpenos con una enorme importancia biológica, muchos presentan actividad antimicrobiana, alelopática e insecticida, además de servir como disuasivo a la herbivoría al dotar de un sabor desagradable los tejidos de la planta o reducir la digestibilidad de los mismos. Estas se encuentran glicosiladas con uno o más monosacáridos, lo que le confiere una alta solubilidad y la característica tendencia a la formación de espuma en solución acuosa (Dixon et al., 2003; Vincken et al., 2007).

2.8. Aplicación de la metabolómica en el estudio de la interacción planta-microorganismo

Se conoce como metabolómica al enfoque metodológico que consiste en la identificación y determinación de los metabolitos totales (“metaboloma”) bajo condiciones normales y en comparación con condiciones alteradas por uno o más factores de interés (Klassen et al., 2017). Este enfoque se posiciona entre las disciplinas conocidas como “ómicas”; que buscan el análisis global de los sistemas vivos a nivel de genoma (genómica), de los transcritos producidos (transcriptómica) y de los productos de las rutas metabólicas (metabolómica), y se encuentra íntimamente relacionado con el paradigma conocido como “biología de sistemas”, y cuyo auge se ha acelerado gracias al avance del desarrollo de la espectrometría de masas que se ha dado en décadas recientes (Weckwerth, 2010).

La metabolómica se divide en dos tipos principales: la metabolómica dirigida y la no dirigida. La primera se enfoca al estudio y cuantificación de uno o más compuestos, cuyo interés principal es monitorear y cuantificar de forma absoluta. Por su parte, la metabolómica no-dirigida se restringe al análisis de una gran cantidad de metabolitos y generalmente es de carácter semi-cuantitativo; así, el

enfoque no-dirigido puede restringirse a una familia particular de metabolitos o una ruta de biosíntesis (llamado entonces perfilado metabólico) o bien a todos los metabolitos que sea posible detectar por la técnica utilizada (denominado huella metabólica). Entre mayor es la cantidad de datos obtenida, la resolución de la información disminuye, y viceversa (Courant et al., 2014).

Como el resto de las disciplinas “ómicas”, el abordaje de los problemas de investigación implica la adquisición masiva de grandes volúmenes de datos, producto del escrutinio de diferentes entradas de información tomadas con una alta resolución en un margen de tiempo variable, de tal manera que surge la necesidad de utilizar herramientas numéricas más poderosas que las aplicadas de forma ordinaria. Así, la parte experimental se encuentra íntimamente ligada a la aplicación de procedimientos de análisis que por su naturaleza y consumo de recursos requieren de herramientas computacionales más especializadas, como algoritmos de aprendizaje, estrategias de minería de datos y análisis multivariado. Por este motivo, tanto el capital técnico como el poder computacional y analítico representan los pilares más fundamentales para su implementación, además de ser una de sus mayores limitaciones (Fig. 4).

La espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) de inserción directa o en combinación con alguna técnica de separación cromatográfica como cromatografía de gases (*gas chromatography-mass spectrometry*, CG-MS) o cromatografía de líquidos de ultra alta presión (*ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry*, UPLC-MS) es el método de análisis de preferencia en este tipo de estudios. Junto con éstas, la resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) es ampliamente utilizada por la enorme cantidad de información estructural que es capaz de proveer.

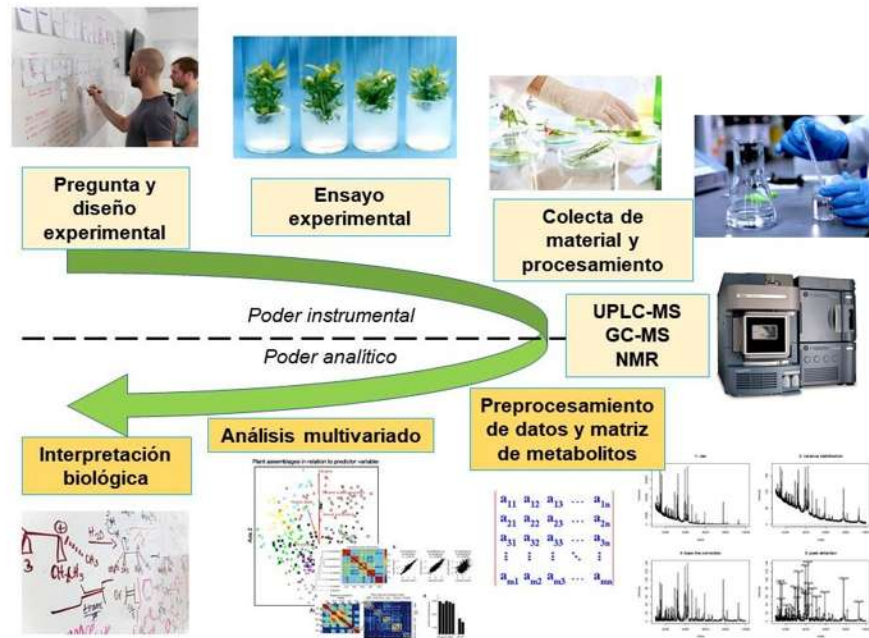


Figura 4. Línea de trabajo de un estudio metabolómico general. Desde el diseño del experimento hasta la salida de datos y su interpretación, tanto la capacidad de los instrumentos utilizados (poder instrumental) y la capacidad de computo (poder analítico) actúan como factores principales en el adecuado avance del estudio.

El espectrómetro de masas de inserción directa (*direct insertion*, DI) es una alternativa utilizada para el perfilado químico global y de manera general consiste en introducir la muestra de forma directa en un módulo de ionización sin una separación previa de los componentes de la muestra problema. La ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI) de la muestra ocurre mediante nebulización pasando la muestra por un capilar con alto voltaje y temperatura, de las gotas así formadas se evapora (desolvata) el solvente usando un chorro de gas nitrógeno caliente. Al perder volumen, las especies químicas presentes en las gotas de solvente, que generalmente se presentan protonadas por la adición de un ácido a la muestra, se agregan a tal punto que sus cargas se repelen con la suficiente fuerza para disociarse en una fase gaseosa ionizada, un fenómeno conocido como explosión coulombiana. Los iones así formados entran a los módulos analizadores, donde serán separados en función a su masa-carga (m/z), y finalmente al detector

donde serán expresadas como una salida de datos para el operador, en su forma más elemental.

La metabolómica ha comenzado recientemente a ser implementada como una herramienta de trabajo para explorar los procesos bioquímicos que ocurren durante la interacción planta-microorganismo. Durante la interacción entre estos dos actores, se produce una respuesta diferencial a los compuestos emitidos por la contraparte que se refuerza y se retroalimenta, a este conjunto de señales se le ha designado bajo el término “*signaloma*” (de *signal*; “señal” en inglés). Así, la metabolómica ha permitido investigar las identidades y cantidades de los compuestos presentes en los exudados de plantas y de bacterias, así como los posibles procesos en los que estos están involucrados (Mhlongo et al., 2018).

Los estudios más relevantes usando este enfoque metodológico provienen del estudio de la interacción planta-patógeno. Por poner un ejemplo; López-Gresa y col. (2017), estudiaron el perfil de volátiles asociados a la infección de *Pseudomonas syringae* DC3000 en plantas de tomate, usando metabolómica no dirigida por SPME-GC-MS. Los autores utilizaron dos cepas, una avirulenta silvestre *Pseudomonas syringae* DC3000, y otra en la cual los genes de virulencia *avrPto* fueron suprimidos, dotándola con la capacidad de invadir la planta al no poseer el ligando de la proteína R del jitomate. El perfil de volátiles del jitomate inoculado con la cepa avirulenta se caracterizó por la presencia de derivados esterificados del 3-hexenol (3 hexenil acetato, 3 hexenil butirato y 3 hexenil propionato), y monoterpenos hidroxilados (linalol y terpineol). Por el contrario, el perfil de las plantas inoculadas con la cepa virulenta produce monoterpenos y derivados del ácido salicílico. Además de lo anterior los autores señalan que estas diferencias químicas se correlacionaron con el aumento de la expresión de genes involucrados en las rutas de biosíntesis de oxilipinas y terpenos, esto se logró monitoreando la expresión de los genes *TomLoxF* (13-lipooxigenasa de tomate), *AAT* (que codifica para una alcohol acil transferasa) y *MTS1* (terpeno sintetasa 5) (López-Gresa et al., 2017).

Ryffel y col. (2016), monitorearon la dinámica de los compuestos en la superficie de hojas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con tres especies de

bacterias: *Sphingomonas melonis* (un heterótrofo comensal), *Pseudomonas syringae* pv. Tomato (patógeno) y *Methylobacterium extorquens* (un metilotrofo), con el fin de estudiar la influencia que la inoculación bacteriana tenía sobre la huella de metabolitos en la superficie del órgano, haciendo uso de MALDI-IMS (por las siglas en inglés de *matrix-assisted laser desorption/ionization imaging high-resolution mass spectrometry*) y NMR. Los autores fueron capaces de monitorear una clara disminución en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa debido al consumo por parte de *S. melonis* y *P. syringae*, sin que hubiera modificaciones significativas inducidas por *M. extorquens*; cuya fuente de carbono es principalmente el metanol, sino que además lograron correlacionar los cambios en los contenidos de estos carbohidratos con la ubicación de las colonias bacterianas en la hoja, por medio de microscopia de fluorescencia. Adicionalmente, se monitoreó la distribución de la camalexina; un indol alcaloide con propiedades bacteriostáticas y reportada como una fitoalexina, distribuyéndose principalmente en la superficie de la hoja infectada con *P. syringae*. Este estudio demuestra el potencial del enfoque metabolómico para estudiar nuevos aspectos de la dinámica bacteriana en la filósfera en tiempo real y con una resolución de alrededor 100 μm sobre la superficie de la hoja (Ryffel et al., 2016).

Son pocos los estudios metabolómicos que abordan la interacción entre plantas y microorganismos endófitos. Entre estos podemos mencionar el realizado por Hartley y col. (2014). Este estudio se centra en el hongo endófito *Chaetomium cochlioides* en interacción con *Cirsium arvense*, donde se buscaron efectos en forma de modificaciones de la química foliar en respuesta a la colonización por un sistema de inoculación por inmersión de las plántulas de 8 semana de edad en una solución de agua-aceite con esporas, a las que se les cosechó las hojas dos semanas después. El resultado más notable fue la observación de que las plantas colonizadas presentaban cambio en el perfil químico global en hojas, de donde destacan los perfiles de galactolípidos; ácidos grasos esterificados con galactosa, principalmente ácido oxofitodienoico, dihidroxijasmonato, ácido linoléico y α -linolénico, principalmente. También se observó que la respuesta variaba si se hacía la comparación entre el tejido joven (de hojas que emergieron posteriormente a la

inoculación) y el tejido viejo (hojas presentes desde el momento que se realizó la inoculación).

Gargallo-Garriga y col. (2016), realizaron un estudio sobre el efecto que tiene la supresión de la microbiota epífita en hojas y en flores de *Sambucus nigra* en la química de los extractos del órgano y en la composición de los enjuagues superficiales de dichos órganos. Esto se consiguió usando plantas de 24 años de edad en macetas a las cuales se les aplicó un tratamiento superficial por aspersión de una mezcla de estreptomycina, oxitetraciclina y cloranfenicol; pues estos antibióticos son también usados en agricultura como profilácticos para enfermedades de los cultivos. Los extractos tanto de órganos como de la superficie del tejido son ricos en especies químicas, con alrededor de 1600 compuestos detectados, siendo los extractos del tejido más ricos en compuestos (tanto para flores como para hojas), entre los que destacan principalmente aminoácidos y terpenos. Por otra parte, la supresión de la microbiota epífita muestra la enorme contribución que estas biotas microbianas tienen en la composición química global, pues múltiples compuestos se vieron modificados en respuesta a la aplicación del antibiótico, entre ellos destacan la disminución en las concentraciones de lactato (producto de fermentación) y del ácido citracónico; este último es producto del metabolismo bacteriano de compuestos isoprenoides. A su vez se observó una disminución en la concentración de acetil-CoA y del aminoácido isoleucina, del cual el primero es su precursor. Como los autores señalan, la aplicación del antibiótico no solamente generó la supresión de la microbiota epífita, sino que además debió de eliminar la microbiota endófito de los órganos tratados, sin embargo el diseño experimental no permite discernir la contribución de estos en los cambios reportados en el metaboloma.

3. Justificación

Uno de los elementos más valiosos a considerar en la agricultura sostenible lo constituye el uso de biofertilizantes que derivan principalmente de la rizósfera. La aplicación foliar de bioinoculantes a base de endófitos incrementa la productividad de los cultivos y supera diversas limitaciones que la aplicación convencional en suelo, por lo que es importante estudiar si la química foliar es un factor determinante para el éxito del establecimiento de la relación simbiótica. *A. agilis* UMCV2 es una bacteria rizosférica y endófito que promueve el crecimiento vegetal y la salud de las plantas que permitirá estudiar si el perfil químico de las hojas se correlaciona con la colonización foliar.

4. Hipótesis

La colonización foliar de la bacteria endófito *Arthrobacter agilis* UMCV2 está asociada a variaciones en el metaboloma de las hojas de *Medicago truncatula*

5. Objetivo general

Buscar biomarcadores asociados a la inoculación foliar de *M. truncatula* con la rizobacteria y endófito *A. agilis* UMCV2

Objetivos Particulares

- Analizar el perfil de metabolitos de las hojas en distintos metámeros de *M. truncatula*
- Determinar el patrón de colonización bacteriana en las hojas después de la inoculación foliar
- Analizar cambios en el perfil químico asociados a la colonización bacteriana

6. Metodología

6.1. Material biológico

La cepa *A. agilis* UMCV2 y las semillas de *M. truncatula* variedad Jemalong A17 fueron donadas por el laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La cepa bacteriana fue reactivada y crecida en agar nutritivo para su posterior uso. Por su parte las plántulas se crecieron en medio mineral agar Hoagland sin carbono adicionado.

6.2. Establecimiento del sistema *in vitro* de *M. truncatula*

Para la inducción de la germinación, las semillas fueron escarificadas y desinfectadas con 1 mL de ácido sulfúrico y en agitación constante por 8 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se enjuagó con agua esterilizada por 1 minuto. Después se adicionó 1mL de una solución de hipoclorito de sodio al 12%, y se mantuvo en agitación por 3 minutos más. Finalmente se decantó el sobrenadante para posteriormente enjuagar con agua estéril abundante. Las semillas así tratadas se colocaron sobre cajas de Petri con medio agar-agua al 1% mas 0.6% de glucosa. De esta manera se llevaron a 4°C por 3 días (d). Posteriormente se colocaron en cámara de incubación por un lapso de 2 a 3 d, hasta que la raíz principal alcanzara una longitud de 2 a 3 cm. Pasado este tiempo se sembraron en frascos de vidrio de 150 mL con tapa blanca que contenían 20 mL de agar Hoagland. Las plantas se dejaron crecer por 10 d con un régimen de 16 horas de luz por 8 de oscuridad a 22°C (Fig. 5). Al momento de la cosecha del material, las plantas tenían 15 d de edad y presentaban tres hojas, la del metámero m1 que es unifoliada y la de los metámeros m2 y m3 que son trifoliadas. La nomenclatura utilizada para la designación de las hojas fue propuesta por Bucciarelli y col. (2006).

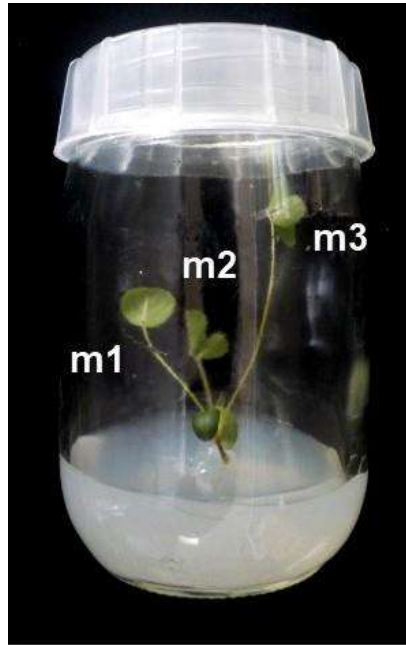


Figura 5. Fotografía representativa de *M. truncatula* crecida en medio Hoagland a los 10 d post germinación. A ese tiempo se observa la emergencia del metámero m1 con una hoja unifoliada y los metámeros m2 y m3 con hojas trifoliadas.

6.3. Determinación del metaboloma de hojas de plantas axénicas

Las hojas m1, m2 y m3 de las plantas de *M. truncatula* se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y fueron conservadas a -80°C hasta su uso. El material se sometió a liofilización y posteriormente cada hoja se molió utilizando un molino Restch, por un periodo de 30 s^{-1} , por 20 segundo (s). Cada hoja molida y liofilizada se mezcló con 0.5 mL de una solución de metanol al 75% y ácido fórmico al 0.1% en agua desionizada fría, posteriormente se llevó a sonicación por 30 min. Las muestras así procesadas finalmente se centrifugaron a 15000 rpm por 10 min a 4°C . Este extracto se filtró con filtros Whatman de $0.2\ \mu\text{m}$ para su análisis. Todas las muestras se analizaron por espectrometría de masas por introducción directa de líquidos con ionización por electroespray (DLI-ESI), utilizando un espectrómetro de masas ZQ-detector 2 de la marca Waters en modo scan con un rango de 50 a 2000 m/z , programado con una temperatura del cono de 135°C , voltaje del capilar de 3 V, tomando 1 scan por segundo, hasta completar el minuto de adquisición. Se

inyectaron muestras blanco al inicio y al final de cada ronda de muestras, y se incluyeron tres muestras técnicas a diferentes días para corroborar la reproducibilidad en el tiempo. Estos análisis se realizaron en el Cinvestav unidad Irapuato, en el Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental, bajo la supervisión del D. en C. Robert Winkler.

6.4. Determinación del metaboloma de las hojas de plantas inoculadas con A. agilis UMCV2

Las plantas fueron inoculadas foliarmente a los 10 d de edad con un inóculo ajustado a una densidad óptica de 0.2 empleando un pincel de pelo natural de un calibre de 3 mm. Para la inoculación se realizaron dos pinceladas sobre las hojas, una en el haz y otra en el envés de la misma, procurando que no cayera solución al medio de cultivo o que escurriera por el peciolo de la hoja. En total se inocularon 45 unidades experimentales, es decir se destinaron 15 plantas para la inoculación de cada metámero. Hecho esto, se permitió que la interacción progresara por 5 d más, hasta que las plantas tuvieran 15 d de edad, momento en que se cosecharon las hojas y se congelaron en nitrógeno líquido, para ser procesadas y analizadas por DLI-ESI de la misma forma que se describió anteriormente.

6.5. Procesamiento y depuración de datos

Los datos obtenidos por DLI-ESI se analizaron utilizando una estrategia de minería de datos. De los espectros de masas obtenidos para cada una de las muestras analizadas incluidos los blancos se obtuvo un espectro promedio usando cada uno de los scans obtenidos en el minuto de adquisición. Se restaron las señales de las muestras blanco de las muestras de hojas para eliminar posibles señales de contaminación. Para el procesamiento de los espectros, se utilizó el paquete *MALDIquant*, implementado en lenguaje R versión 3.4.4 (R Core Team, 2018), realizando una normalización de las intensidades al pico base, seguido de la corrección de la línea base utilizando el algoritmo *Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping algorithm* (SNIP) (Ryan et al. 1988), posteriormente se realizó la detección de picos usando como estimador del ruido el algoritmo de desviación

media absoluta (MAD), y un umbral *signal-to-noise ratio* (SNR) de 6. Posteriormente se realizó el alineamiento de las señales detectadas usando una tolerancia de ± 0.35 m/z. Las matrices de datos se almacenaron en formato de texto (extensión .txt) para su posterior uso.

Para cada matriz se procedió a la eliminación de todas las señales que tuvieran valores de cero en más del 20% de las muestras totales, y se realizó la imputación del resto de ceros usando la mediana (por ser esta menos sensible a valores extremos que la media aritmética y con el fin de no introducir sesgos). Con estas matrices depuradas se procedió a realizar un análisis de componentes principales (PCA), usando *singular value decomposition* (SVD) con los datos centrados en la media y escalados usando su varianza. De esta forma se realizó el análisis de ordenación tanto para los datos de plántulas axénicas como de las inoculadas.

6.6. Identificación de iones relevantes por bosques aleatorios

Con el fin de detectar aquellos iones que explicaran mejor las posibles diferencias en el perfil químico, se procedió a la construcción de un modelo de bosques aleatorios, usando el paquete *rattle* de R. De manera general, éste es un algoritmo de reconocimiento de patrones que crea una gran cantidad de árboles de decisión que clasifiquen con una alta predictibilidad la pertenencia de una unidad experimental a un tratamiento en función de un conjunto de variables predictivas de entrada y que en el caso del presente estudio son todos los iones detectados por los ensayos de espectrometría. Después de esto, se genera un árbol de decisiones consensuado que mejor define la formación de grupos homogéneos de tratamientos, lo que permite identificar cuáles de estas variables predictivas explican mejor la estructura de los datos, entendido como la probabilidad de pertenencia de una unidad experimental a un tratamiento o a otro (Paliy et al., 2016). Se utilizó el 70% de la matriz para el entrenamiento del modelo, 15% para su validación, y 15% para su prueba. La construcción del modelo se hizo con 500 árboles de decisión. Posteriormente se identificaron los 30 iones más importantes para la clasificación, usando como criterio de selección la disminución promedio en el índice de Gini. Esto

se realizó tanto para la clasificación entre plantas axénicas e inoculadas, las hojas m1, m2 y m3, y las combinaciones de estos niveles. Con los iones “clasificadores” se volvió a reconstruir el análisis de ordenación por PCA y de esta manera confirmar la formación de grupos afines.

6.7. Análisis de conglomerados jerárquicos

Con el fin de validar la separación de los datos obtenida entre tratamientos, se realizó la construcción de un mapa de calor combinado con un análisis de conglomerados jerárquicos, usando distancia euclidiana entre unidades experimentales y el algoritmo de Ward para su clasificación (Kabacoff, 2017).

6.8. Identificación putativa

Se construyó una base de datos para compuestos de *M. truncatula* haciendo uso de la base Plant Metabolomic Network (<https://www.plantcyc.org/>), que en total contabilizan 2179 entradas. Con esta base de datos se alimentó el software SpiderMass (Winkler, 2015). Con el uso de este software se hizo la identificación basado en las masas-carga (m/z) de los iones identificados, usando una tolerancia de $\pm 0.35 m/z$.

6.9. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectro de masas de los azúcares de las hojas

Debido a la importancia de los azúcares durante el establecimiento de las simbiosis planta-microorganismo en la rizósfera, se decidió analizar posibles cambios en el perfil de azúcares en las hojas debidos a la inoculación por GC-MS. Todas las muestras procesadas se analizaron en un equipo de la marca 6850 serie II de Agilent technologies con una columna HP-5 y usando helio como gas acarreador.

La extracción de carbohidratos en hojas axénicas e inoculadas, se realizó con etanol al 80 %. Brevemente; se pesaron 50 mg de tejido fresco en forma de muestras compuestas, las cuales se pasaron a tubos Eppendorf para molerse con ayuda de pistilo y nitrógeno líquido hasta tener un polvo homogéneo, posteriormente

se agregó 1 mL de etanol al 80% v/v y las muestras se sonicaron por 30 minutos, y se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Pasado este lapso, las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm por 15 minutos, y se recuperó el sobrenadante que se recolectó en un tubo nuevo.

Para derivatizar los carbohidratos, 1 mL del extracto etanólico se colocó en un vial de reacción y se llevó a sequedad usando nitrógeno gaseoso, después de lo cual se agregaron 1.5 mL de cloruro de hidroxilamina disuelta en piridina en proporción de 17.66 mg/mL. De esta manera las muestras se llevaron a sonicación por un lapso de 30 minutos, para posteriormente calentarse a 85°C por una hora. Después de esperar a que los viales se enfriaran, se agregaron 0.5 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, después de lo cual se calentaron nuevamente a 85°C por un lapso de 20 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente diluirla en un mililitro de cloroformo y realizar dos enjuagues con 1 mL de agua desionizada. Finalmente, la fase orgánica se evaporó con nitrógeno líquido en viales ámbar para ser analizadas. Para el análisis de carbohidratos, se utilizaron las siguientes condiciones de análisis cromatográfico, temperatura del inyector de 230°C, en modo split con una proporción 1:20, con helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, y una temperatura del detector de 300°C; el horno se programó con una temperatura inicial de 150°C por 3 minutos, seguido de una rampa de 6°C/min, hasta alcanzar los 270°C por 13 minutos, con una post-corrída a 300°C por 3 minutos. La adquisición de datos se realizó en modo scan en un rango de masas de 20 a 750 *m/z*. Se estudió la respuesta del detector y el tiempo de retención con una mezcla de estándares de glucosa, sacarosa, fructosa, mio-inositol y sacarosa, todos en una proporción de 1ug, mismos que se utilizaron para realizar una cuantificación absoluta. La cuantificación se realizó por regla proporcional a la intensidad de la señal de los estándares, y las cantidades obtenidas fueron promediadas y posteriormente analizadas por un ANOVA de dos vías de factores fijos, realizando contrastes de medias por la prueba de Tukey, con una significancia de 0.05.

6.10. Cuantificación bacteriana

Las hojas cosechadas (de plantas axénicas e inoculadas) fueron enjuagadas en una solución de hipoclorito de sodio al 12% con agitación en tubos Eppendorf individuales, agitando por 2 minutos, seguido de abundantes enjuagues con agua desionizada esterilizada. Esto se hizo con el fin de remover toda bacteria que estuviera en la superficie de la hoja y, de esta manera, solamente considerar para la cuantificación bacteriana aquellas que se internalizaron en la hoja, o sea de hábito endófito. La cuantificación absoluta de DNA bacteriano se llevó a cabo por una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) usando hojas de plantas de 15 d de edad inoculadas foliarmente como se describió anteriormente (Mahuku, 2004). Brevemente; el material utilizado se procesó para hacer la extracción de DNA total, primeramente, se molió el tejido en tubos Eppendorf con nitrógeno líquido, para después adicionar 300 μ L de buffer de extracción TES con la siguiente formulación: Tris-HCl 0.2 M pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, SDS 1% (p/v). Las muestras se llevaron a agitación en vórtex por 5 minutos, posteriormente se adicionaron 200 μ L de TES y 1.25 μ L de proteinasa K, en una concentración de 20 mg/ml (para llegar a una concentración final de 50 μ g/mL en la reacción). Las muestras se llevaron a calentamiento a 65°C por un intervalo de 30 minutos. Después de esto se adicionaron 250 μ L de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló suavemente y se dejó incubar en hielo por 10 minutos. Estas muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo donde se adicionó 1 volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se decantó cuidadosamente el sobrenadante para conservar la pastilla de precipitado en el fondo. Esta pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos para nuevamente descartar el sobrenadante por decantación, así se dejó secar la pastilla del fondo para después resuspenderla en 50 μ L de agua grado biología molecular.

Los ensayos de qPCR se realizaron en un termociclador StepOne (Applied Biosystems), utilizando 50 ng de DNA total como templado y oligonucleótidos

dirigidos a la secuencia intergénica entre los genes del rRNA del 16S y 23S de *A. agilis* UMCV2 con las siguientes secuencias: 5'-GTCCTGGTGGCATTTC-3' y 3'-ACGCAGAACAAGAGC-5' (Aviles-García et al., 2016). Se utilizó Master Mix Green USB para ejecutar la reacción, y se programaron las siguientes condiciones: 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos, y 40 ciclos de 95°C por 3 s y con una temperatura de alineamiento de 61°C por 3 s. Las curvas de disociación se llevaron a cabo con incrementos de 0.3°C cada 15 s hasta llegar a 95°C partiendo de la temperatura de alineamiento; el amplicón tiene una temperatura de disociación de 83.78°C. Se incluyó una curva de calibración para realizar la cuantificación absoluta de la bacteria, cubriendo un intervalo de 100 ng a 20 fg con un coeficiente de correlación (r^2) superior a 0.98.

Con el fin de estudiar la dinámica de movilidad bacteriana al inocular las hojas m1 y m2, se ensayó el mismo protocolo de cuantificación en el que después de inocular m1, se cuantificó el DNA bacteriano en m2 y m3 y cuando se inoculó m2, se realizaron mediciones en m3, y finalmente se cuantificó en m1 y m2 para las que fueron inoculadas en m3.

6.11. Hibridación in situ con fluorescencia y microscopía confocal

Con el fin de observar la presencia de la bacteria en el interior de las hojas, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por las siglas en inglés de *fluorescence in situ hybridization*) de la siguiente manera. Las hojas utilizadas para este ensayo se clarificaron utilizando inmersiones en etanol absoluto con el fin de retirar la mayor cantidad de pigmentos posibles, de tal forma que diariamente se realizaban cambios del etanol donde se mantenían sumergidas las hojas. Esto se hizo por un lapso de al menos 15 d, o bien hasta que las hojas tuvieran un aspecto blanquecino. Hecho esto, las hojas se calentaron en hidróxido de potasio al 10% por 10 minutos y posteriormente se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 30% a temperatura ambiente hasta su completa clarificación, en un lapso de entre 20 a 40 minutos. En seguida se llevaron a una inmersión en ácido clorhídrico al 10% por unos segundos, para finalizar con tres enjuagues de agua desionizada estéril. Las hojas clarificadas se colocaron en portaobjetos recubierta

con poli-L-lisina y fueron fijadas usando un buffer compuesto de formaldehído al 4%, NaOH 3 mM, PBS 1X, a pH 7.2. Este buffer se aplicó sobre las hojas que permanecieron por un lapso de 150 minutos montadas sobre el portaobjetos. Posteriormente se retiró el buffer de las hojas y se les aplicó PBS, manteniéndolas a 46°C por un lapso de 10 minutos. En seguida se realizó la deshidratación en inmersiones sucesivas de las hojas en etanol al 50%, 80% y absoluto, manteniéndolas en cada uno de los enjuagues por 3 minutos, posteriormente se dejó evaporar el etanol. Las hojas ya deshidratadas se trataron con 20 μ L de una solución de lisozima a 0.1 mg/mL por 20 minutos, dejando las muestras en hielo durante este tiempo, para finalizar con un enjuague de PBS frío y dos enjuagues con agua desionizada estéril.

Para realizar la hibridación, se trató cada hoja con 20 μ L de buffer de hibridación (NaCl 162 mM, Tris-HCl 20 mM, formamida 5%, 0.01% SDS) con 62.5 ng/ μ L de sonda fluorescente HGC dirigida contra el ARNr de 23S de actinobacterias y unida a verde de rodamina como fluoróforo (Aviles-García et al., 2016). Las hojas así tratadas se dejaron incubar en una cámara de humedad toda la noche por 46°C. Posterior a la hibridación se procedió a lavar las muestras incubándolas por buffer de lavado (NaCl 626mM, Tris-HCl 20mM, EDTA 5mM, SDS 0.01%) a 46°C por 30 minutos. Finalmente, las muestras se lavaron con abundante agua desionizada estéril previo a su observación en microscopio. Para las observaciones se utilizó microscopio confocal FV1200, de la marca Olympus Corporation.

7. Resultados

7.1. Perfil químico de hojas de *Medicago truncatula*

El perfil químico global de las hojas de *M. truncatula*, se analizó por la técnica DLI-ESI, que recupera principalmente especies protonadas $[M+H]^+$ y aductos de sodio $[M+Na]^+$, donde M representa un compuesto cualquiera con una masa definida y sin carga. En total se detectaron 1,121 iones que fueron usados para la construcción de una matriz de datos, de los cuales después de la depuración, se conservaron 751 iones para la construcción de los modelos. El ion base en todas las muestras fue $103.87\ m/z$. Las principales diferencias en la intensidad de los iones de los espectros de las hojas m1, m2 y m3 se presentaron en la región de 250 a $750\ m/z$ (Fig. 6A-C).

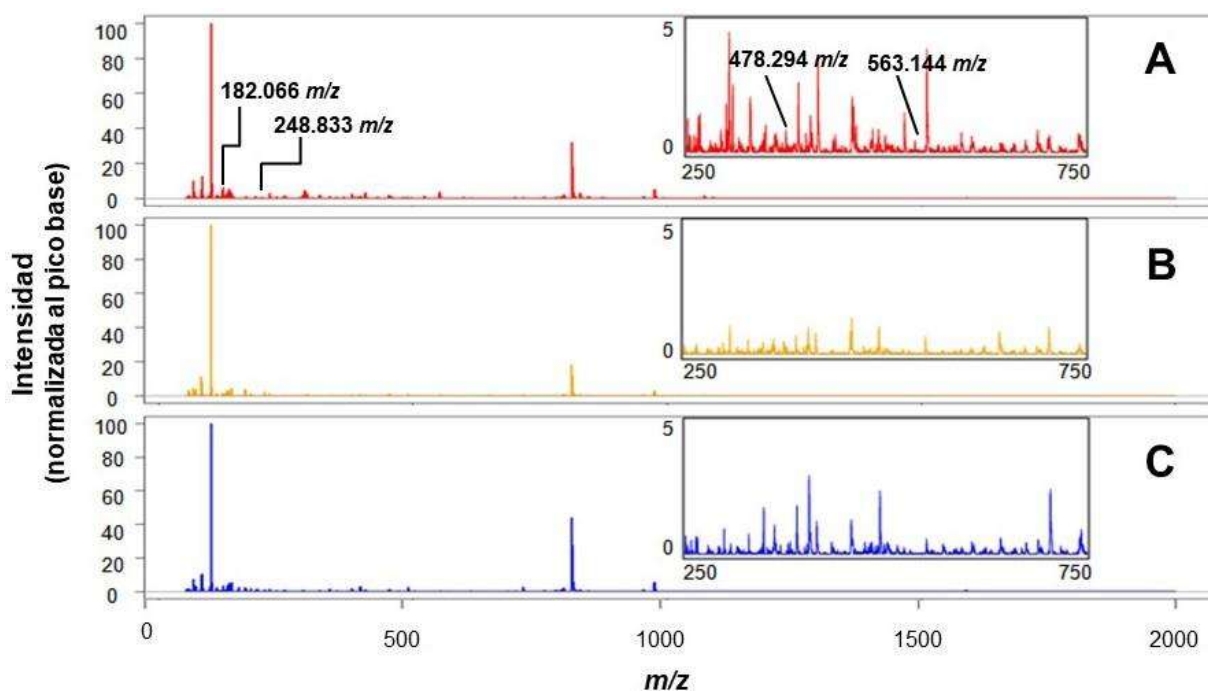


Figura 6. Espectros de masas de las hojas de *M. truncatula*, obtenidos por DLI-ESI. Los espectros pertenecen a las hojas (A) m1, (B) m2 y (C) m3. Se realizó una ampliación de la región 250 a $750\ m/z$ para cada caso con la finalidad de que se visualicen con mejor detalle las diferencias entre los diferentes órganos.

Con la matriz de iones, se realizó un análisis de ordenación por análisis de componente principales (*principal component analysis*, PCA). Este análisis permite realizar la exploración de datos por medio del acomodo de las unidades experimentales en un plano que representa la mayor variación observada en el experimento, atribuible a diferencias en el perfil químico global. Los dos primeros componentes permitieron explicar alrededor del 87.6% de la variación total observada. Claramente fue posible observar la formación de dos regiones que agrupan, por un lado, a las hojas m2 y m3 cuyos intervalos de confianza muestran un claro traslape entre ellos, mientras que la hoja m1 se agrupa en una región diferente del plano; estas diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.001$) (Fig. 7).

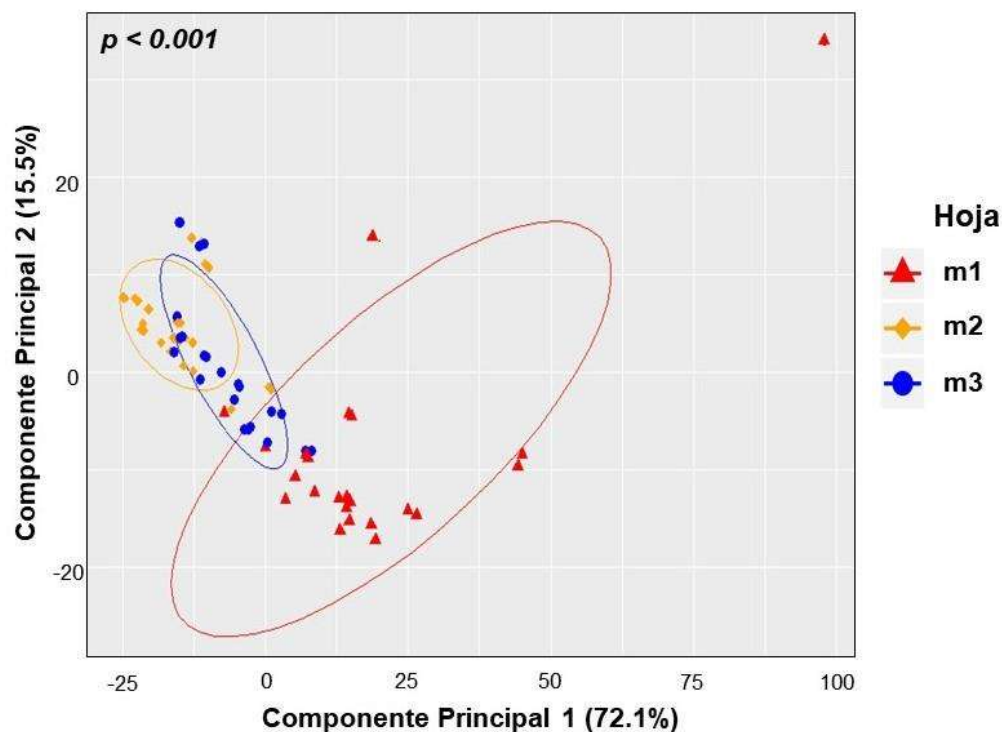


Figura 7. Análisis de ordenación (PCA) de la matriz total de 1121 iones representando el agrupamiento de las unidades experimentales por el factor hoja. Se observa una clara separación de las unidades experimentales sobre el plano de ordenación. $n=24$.

Para identificar los iones más importantes que distinguen a m1 de m2 y m3, se realizó una técnica de modelado conocida como bosques aleatorios. El modelo permitió aislar una lista de 30 iones de acuerdo a los valores más altos en la disminución promedio del índice de Gini, lo que indica la importancia de un ion particular en la predictibilidad del modelo (Fig. 8A). El error observado en el modelo fue de 11.76 %, lo que muestra una buena capacidad para distinguir entre los tipos de hojas. Al reconstruir el análisis de ordenación con los iones seleccionados, se observó que los dos primeros componentes principales explicaban el 93.9% de la variación observada, lo que indica que los iones clasificadores explican la mayoría de las diferencias observadas entre las hojas (Fig. 8B). La identificación putativa de 15 de los 30 iones se realizó mediante el software de análisis *SpiderMass* (Tabla 1).

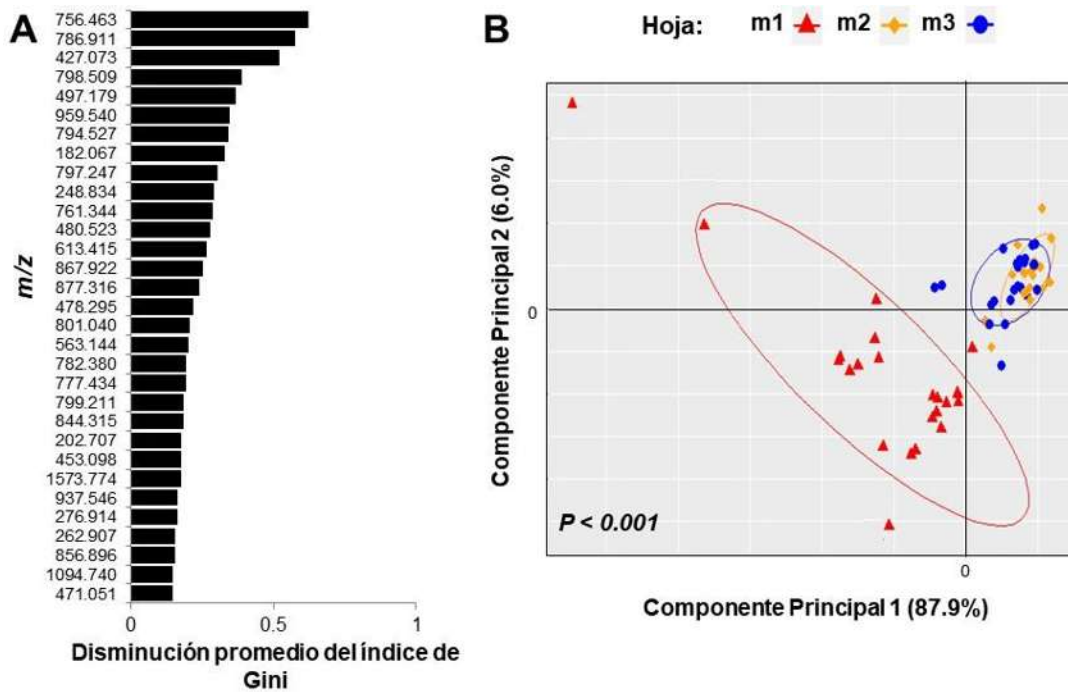







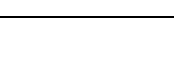





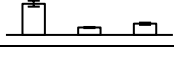
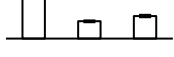

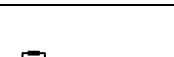
Figura 8. Clasificación usando los iones más importantes para diferenciar las hojas de *M. truncatula* de acuerdo a su etapa de desarrollo. (A) Lista de los 30 iones recuperados por bosques aleatorios con la mayor contribución en el modelo. (B) Análisis de ordenación reconstruido con los iones importantes. n=24.

Entre los compuestos identificados se encuentra el indol-3-acetaldehído (IAD) (182.066 m/z), cuya magnitud relativa fue mayor en las hojas m2 y m3 ($1.87\% \pm 0.59$ y $2.13\% \pm 0.48$) comparado con m1 ($0.89\% \pm 0.59$) ($p < 0.001$). El IAD es un precursor directo del ácido indol acético, por la ruta del ácido indol-3-pirúvico (Woodward et al. 2005; Zhao, 2010). Otro compuesto destacable es el isocorismato, el primer intermediario en la ruta de biosíntesis del mismo nombre (vía del isocorismato) para la síntesis de ácido salicílico (Sadeghi et al., 2013). Éste compuesto al igual que el resto de los iones que lograron ser identificados, se incrementaron significativamente en la hoja m1, comparado con las hojas m2 y m3. La mayoría de estos compuestos corresponden a triterpenos (amirina, oleanolato, y la soyasaponina III), fosfolípidos (como la 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina) y precursores de la clorofila (la protoporfirina IX, protoclorofilida a y el preuroporfirinógeno), así como el 26-hidroxibrasinólido perteneciente a los brasinoesteroides (Tabla 1).

7.2. Cuantificación de la colonización bacteriana durante la inoculación foliar

Una vez que se determinó que el perfil químico de las hojas m1 fue distinto de m2 y m3, se estudió si *A. agilis* UMCV2 podía colonizar las plántulas por inoculación foliar, y si existía una preferencia de la colonización bacteriana en función del tipo de hoja. Para ello, se realizó un experimento de inoculación a nivel de hojas en plántulas de 10 d de edad, permitiendo que la interacción progresara durante 5 d y se ensayó una extracción de DNA total por qPCR. Como resultado de este experimento se encontró una clara tendencia de la cepa UMCV2 a colonizar las hojas m1, con un promedio de $696,653 \pm 406,608$ genomas por hoja, comparado con m2 y m3 con $1,730 \pm 1,063$ y $6,838 \pm 2,608$ genomas por hoja, respectivamente ($p=0.0476$) (Fig. 9).

Tabla 1. Identificación putativa de los principales iones obtenidos por el modelo de bosques aleatorios.

m/z (± 0.35)	Masa monoisotópica [Da]	Nombre común	Función biológica	Magnitud relativa		
				m1	m2	m3
182.066	159.068	Indol-3-acetaldehído	Fitohormona, precursor del ácido indol-3-acético en la ruta del indol piruvato (Woodward et al. 2005; Zhao, 2010)			
248.833	226.047	Isocorismato	Intermediario en la biosíntesis de ácido salicílico (Sadeghi et al., 2013).			
427.073	426.386	Amirina	Intermediario en la síntesis de triterpenos (Gholami et al., 2014).			
478.294	455.353	Oleanolato	Intermediario en la síntesis de triterpenos y con actividad antimicrobiana demostrada (Gholami et al., 2014; Jesus et al., 2015).			
497.178	496.339	26-Hidroxibrasinólido	Forma inactivada de un brasinoesteroide (Pharis et al., 2001).			
563.144	562.257	Protoporfirina IX	Intermediario en la biosíntesis de la clorofila (Leeper, 1985)			
613.415	612.222	Protoclorofilida a	Intermediario en la biosíntesis de la clorofila (Leeper, 1985; Quesada et al., 2013)			
756.463	733.562	1,2-Dipalmitoil-fosfatidilcolina	Fosfolípido de membrana celular (Harwood et al., 1984)			
777.434	776.543	1-Linolenoil-2-linoleoil-monogalactosildiacilglicerol	Componente de membrana tilacoidal (Wanner et al., 1991)			
782.380	759.577	1-Palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina	Fosfolípido de membrana celular (Harwood et al., 1984)			
786.911	785.593	1-Oleoil-2-oleoil-fosfatidilcolina	Fosfolípido de membrana celular (Harwood et al., 1984)			
797.246	796.460	Soyasaponina III	Saponina con efecto en defensa (Lacaille-Dubois et al., 1996)			
867.922	867.131	Metilmalonil-CoA	Producto de degradación de aminoácidos ramificados, posiblemente implicado en la biosíntesis de ceras (Wettstein-Knowles, 2017; Wettstein-Knowles, 2018).			
877.315	854.285	Preuroporfirinógeno	Intermediario en la biosíntesis de la clorofila (Leeper, 1985, Quesada et al., 2013)			
959.540	936.580	1,2-Dilinoil-digalactosildiacilglicerol	Componente de membrana tilacoidal (Wanner et al., 1991)			

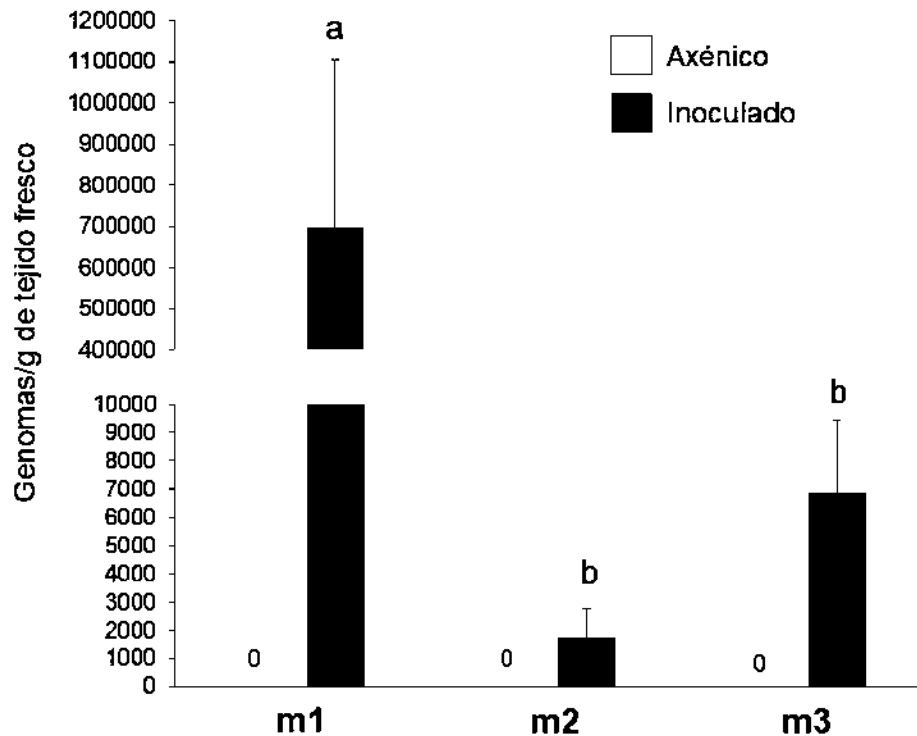


Figura 9. Cuantificación DNA bacteriano de *A. agilis* UMCV2 por qPCR a los 5 d de la inoculación foliar sobre *M. truncatula* UMCV2. n=9. Tukey, $\alpha=0.05$.

Usando hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) se localizó la presencia de *A. agilis* UMCV2 en el interior del tejido foliar. De esta manera, se pudo encontrar la presencia de esta comunidad bacteriana en cada una de las hojas (Figs. 10A-D), cuyo tamaño y forma irregular sugieren que se tratan de grupos de células más que bacterias individuales. Esto confirma los datos obtenidos por qPCR de que la bacteria tiene la capacidad de colonizar el interior del tejido.

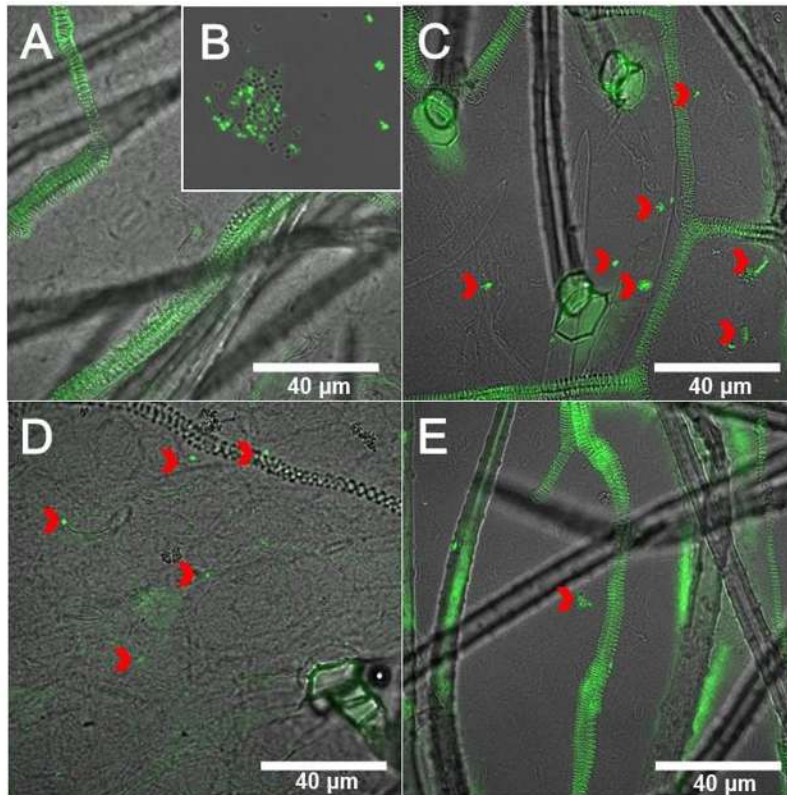


Figura 10. Hibridación *in situ* de hojas de *M. truncatula* de 15 d de edad inoculadas foliarmente con *A. agilis* UMCV2 con 5 d de interacción (A) hoja m1 axénica y (B) cepa UMCV2 como control positivo. Presencia de la bacteria en (C) hoja m1, (D) hoja m2 y (E) hoja m3. Las puntas en flecha indican la presencia de una colonia dentro del tejido.

Con el fin de revelar con más detalle la dinámica de movimiento bacteriano al interior de los órganos foliares se realizó una cuantificación por qPCR en busca de la presencia bacteriana en hojas diferentes a las que fueron inoculadas. De esta forma se observó una acumulación bacteriana de forma generalmente acropétala; es decir, de la base de la planta en sentido foliar (Fig. 11). En plántulas inoculadas a nivel de m1, se observó una tendencia a la recuperación de bacteria en la hoja distal m3, con menor recuperación en m2. En aquellas inoculadas en m2, se observó una colonización mayor en m3 nuevamente. Por otro lado, al inocular en m3, muchas de estas se recuperaron en m2. Esto demuestra el hecho de la alta movilidad del endófito en el tejido de la planta huésped.

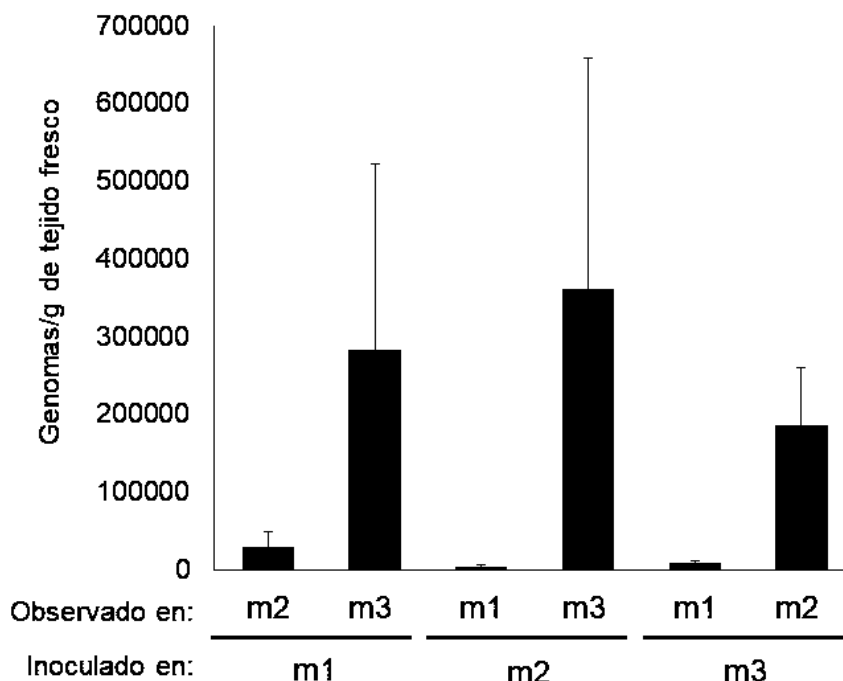


Figura 11. Patrones del establecimiento bacteriano de *A. agilis* UMCV2 en hojas distales al punto de entrada. n=10. Tukey, $\alpha=0.05$.

7.3. Perfil químico de las hojas inoculadas con *Arthrobacter agilis* UMCV2

En vista del patrón de colonización observado por los ensayos anteriores, se analizó el perfil químico asociado con la presencia de la bacteria por DLI-ESI. A partir de los iones obtenidos, se realizó un análisis de ordenación y no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos axénicos e inoculados ($p=0.463$) (Fig. 12a). También se realizó un análisis de ordenación en búsqueda de interacciones entre los factores hoja e inóculo, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.438$) (Fig. 12b). Esto indica que el perfil químico global de m1, m2 y m3 a los 5 d de la interacción con la bacteria es similar.

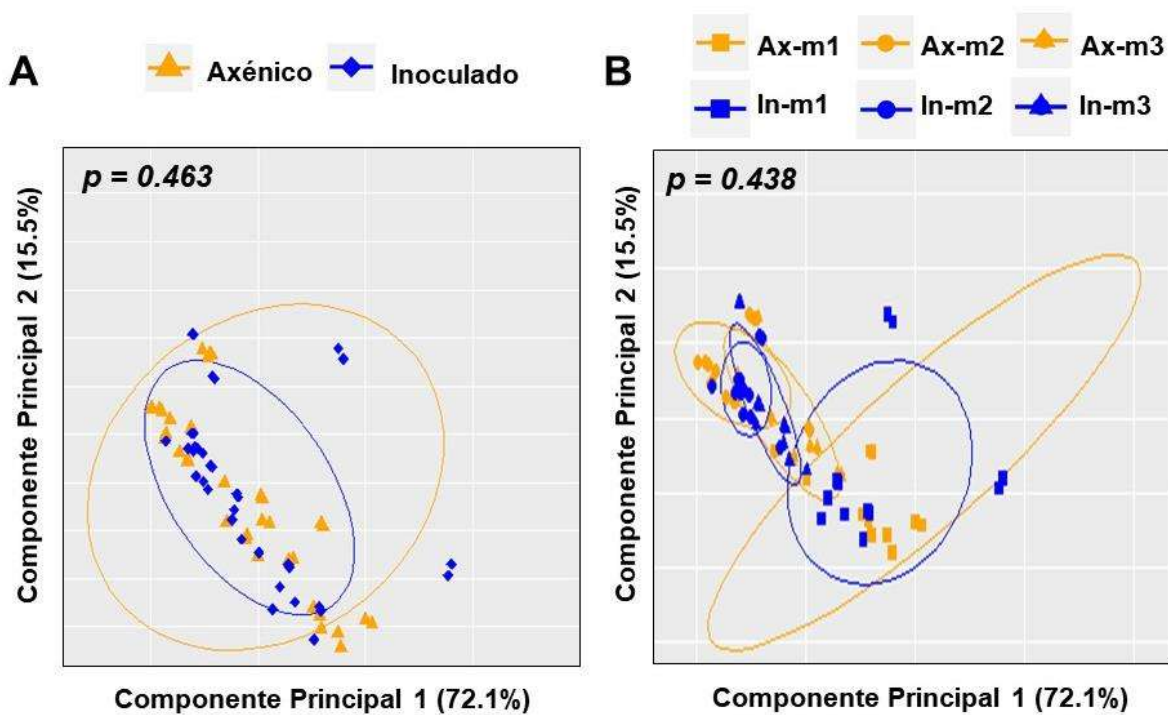


Figura 12. Análisis de ordenación representando el agrupamiento de unidades experimentales por el factor de inoculación (A) y por la combinación de los factores: tipo de hoja e inoculación (B). $n=24$.

Nuevamente, ensayando el modelo de bosques aleatorios con estos datos, se encontró que el error del modelo fue de alrededor del 49.02%, lo que sugiere que el modelo no es eficiente para clasificar entre las hojas axénicas e inoculadas, si lo comparamos con el modelo para distinguir entre los tipos de hojas (Fig. 13A). De manera semejante, se obtuvieron los iones clasificadores de mayor importancia para reconstruir con ello el análisis de ordenación. Sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas utilizando estos iones ($p=0.454$) (Fig. 13B). Por lo tanto, no se pudieron detectar modificaciones globales en el metaboloma asociados al factor de inoculación foliar con la cepa UMCV2.

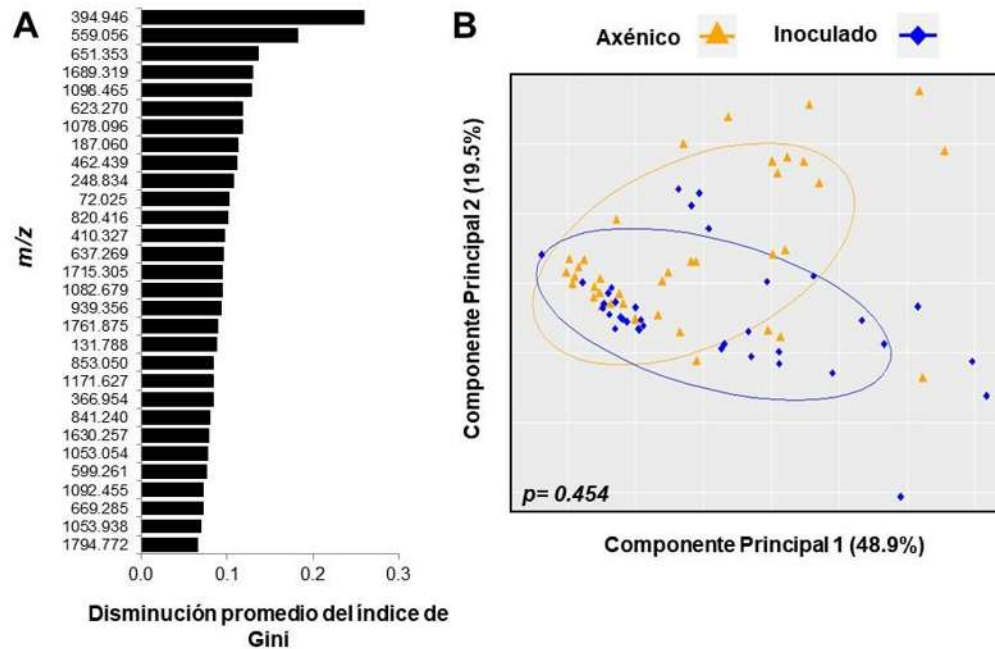


Figura 13. Clasificación usando los iones más importantes para diferenciar las hojas de *M. truncatula* por la inoculación con *A. agilis*. (A) Lista de los 30 iones recuperados por bosques aleatorios con la mayor contribución en la separación de hojas axénicas e inoculadas, (B): Análisis de ordenación reconstruido con los iones anteriores. n=24.

Nuevamente, se realizó el análisis de bosques aleatorios con el fin de encontrar si la combinación de factores (tipo de hoja e inoculación con *A. agilis* UMCV2) podía ser clasificada por el modelo (Fig. 14A), de donde se encontró que el modelo generado no es capaz de clasificar exitosamente las hojas, con un error de 37.25%. Nuevamente se seleccionaron los iones clasificadores de mayor importancia, y al reconstruir los análisis de ordenación se observó que no se formaban grupos que separaran las diferentes combinaciones de niveles ($p = 0.128$) (Fig. 14B). Todo esto indica que la presencia de *A. agilis* UMCV2 a los 5 días de la interacción no muestra efectos globales en el metaboloma que sean dependientes de la hoja, lo que también es consistente con lo observado en el resultado anterior.

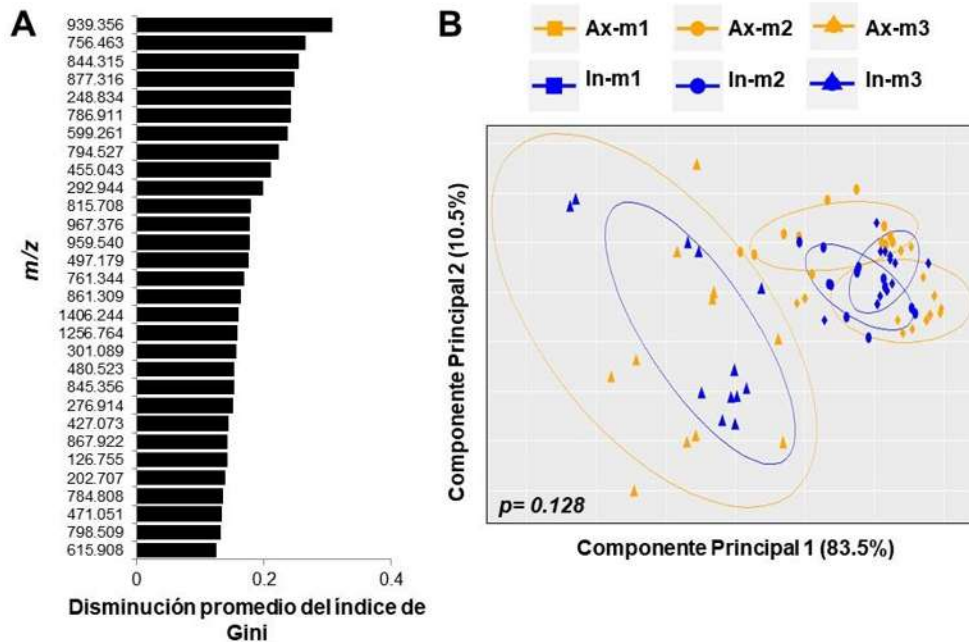


Figura 14. Clasificación usando los iones más importantes para diferenciar las hojas de *M. truncatula* por la combinación de tipo de hoja e inoculación con *A. agilis*. (A) Lista de los 30 iones recuperados por bosques aleatorios con la mayor contribución en la separación de las combinaciones entre tipos de hojas y el factor inoculación. (B) análisis de ordenación reconstruido con los iones anteriores. n=24.

Para cotejar los patrones obtenidos por estos métodos y con el fin de detectar la presencia de patrones de acumulación más discretos, se ejecutó un análisis de conglomerados jerárquicos utilizando una métrica euclidiana y como algoritmo de agrupamiento al método de Ward. En el resultado se observó una separación clara de hoja m1 con respecto a las hojas m2 y m3, y en el que es posible observar una acumulación en la intensidad de la señal para la mayoría de los iones utilizados en m1, con una tendencia a ser menores en m2 y m3. Estos últimos no se separan en grupos diferentes, y en contraste se encuentran combinados dentro de un mismo clado. Con respecto al factor inoculación, nuevamente no se observa una distinción clara entre controles axénicos y hojas inoculadas con la cepa UMVC2. Esto sugiere que las diferencias observadas son atribuibles a un patrón de acumulación de la mayoría de estos iones en la hoja m1 y que no es posible asociar cambios químicos globales con la inoculación foliar (Fig. 15).

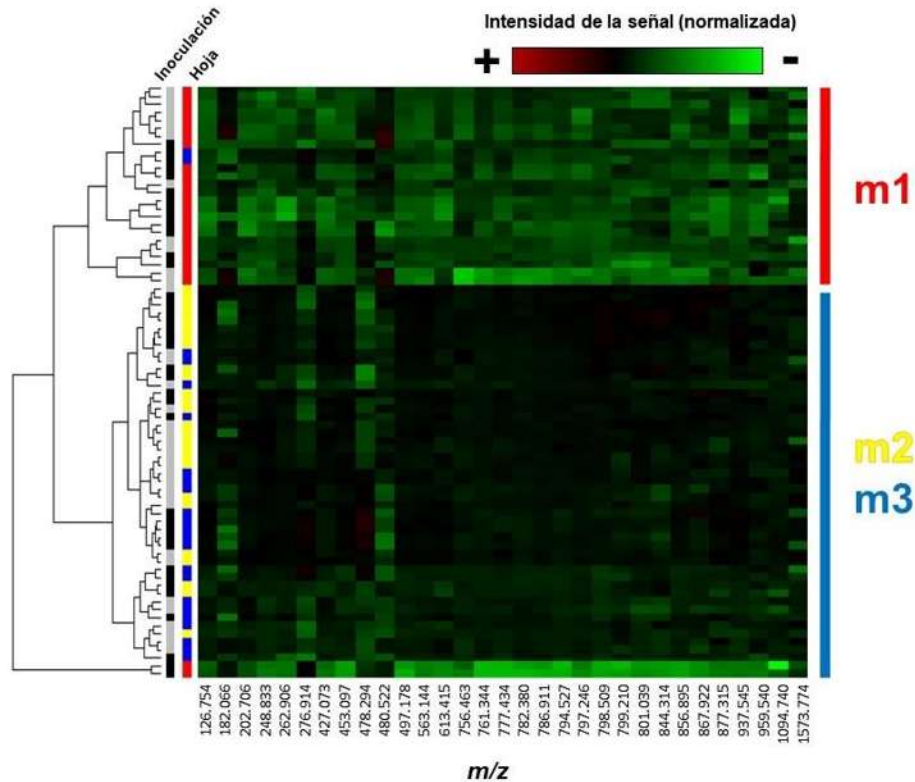


Figura 15. Acomodo por conglomerados jerárquicos utilizando los iones extraídos para el factor hoja.

7.4. Cambios en el perfil de carbohidratos entre hojas de *M. truncatula* y asociados con la inoculación foliar con *A. agilis* UMCV2.

En vista del patrón de colonización observado para la cepa UMCV2; con una clara preferencia por la hoja m1, y el hecho de que no se pudieron apreciar cambios químicos globales asociados con la presencia de la bacteria, se decidió realizar un estudio dirigido para caracterizar el perfil de carbohidratos en hojas por GC-MS ya que es ampliamente reportado en la literatura que los azúcares representan una fuente nutricional para el crecimiento microbiano. Entre los azúcares libres se logró la caracterización de la D-glucosa, D-fructosa, *myo*-inositol, sacarosa y el etil-D-glucopiranosido. Interesantemente, se observaron cambios en la concentración de azúcares en las hojas inoculadas (Fig. 16). La D-glucosa, D-fructosa y el etil-D-glucopiranosido se incrementaron en las hojas m1 inoculadas en comparación con las hojas m1 axénicas (Fig. 16A, B, E), mientras que la D-glucosa y el *myo*-inositol fueron abundantes en la hoja m2 inoculada (Fig. 16A, C). En el caso de m3, no se

observaron diferencias significativas en el contenido de azúcares entre el tratamiento axénico e inoculado (Fig. 16A-E).

La sacarosa también se identificó, sin embargo no hubo diferencias significativas en el contenido de este disacárido entre ninguno de los tratamientos analizados, aunque se observó una tendencia al aumento en la cantidad de sacarosa en hojas m1 inoculadas ($79.470 \pm 28.029 \mu\text{g/g}$) comparadas con hojas axénicas ($31.497 \pm 2.207 \mu\text{g/g}$) y en m2, donde los tratamientos inoculados mostraron promedios más altos que los axénicos ($50.064 \pm 25.106 \mu\text{g/g}$ y $33.101 \pm 3.288 \mu\text{g/g}$, respectivamente) (Fig. 16D).

Finalmente, al comparar la cantidad de azúcares totales entre los tratamientos axénicos e inoculados, se observó un marcado incremento de hasta un tercio en las hojas m1 inoculadas comparados con los controles axénicos ($1,586.525 \pm 68.825 \mu\text{g/g}$ y $1,055.383 \pm 72.436 \mu\text{g/g}$, respectivamente) con una alta significancia ($p < 0.0001$). A su vez, también se observó un incremento significativo ($p = 0.0014$) en este mismo parámetro para m2 inoculada ($1,124.105 \pm 63.586 \mu\text{g/g}$) comparado con las hojas axénicas ($771.331 \pm 26.141 \mu\text{g/g}$). Es de destacar el hecho de que, si bien no se observaron diferencias significativas para carbohidratos totales en hoja m3, sí se observó una disminución de su contenido asociado a la inoculación (Fig. 16F). Los datos anteriores nos permiten decir que existen diferencias en el perfil de carbohidratos en las hojas de *M. truncatula* asociadas con la inoculación foliar de *A. agilis* UMCV2, que consisten principalmente en el aumento de estos en las hojas inoculadas para m1 y m2.

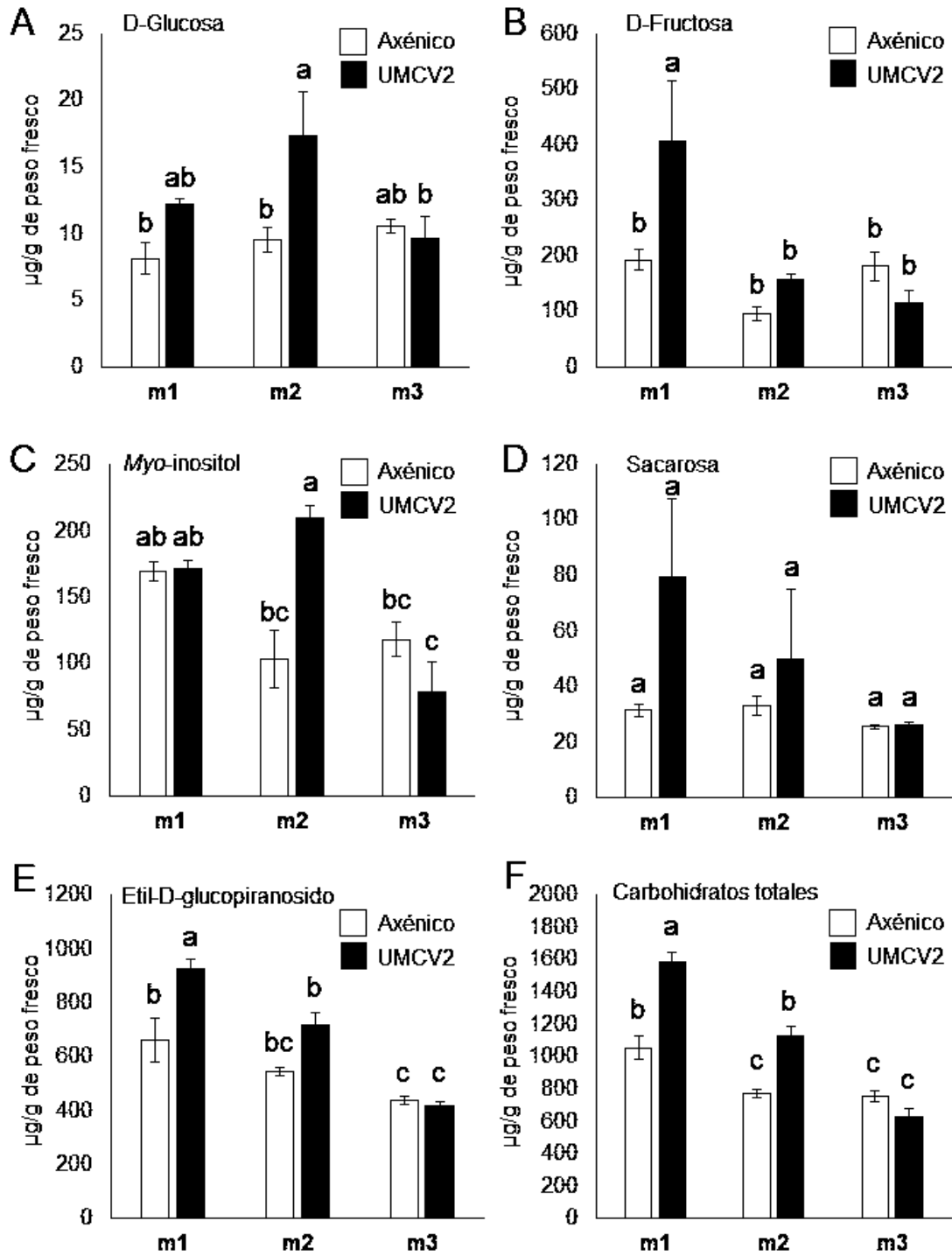


Figura 16. Cuantificación de carbohidratos por CG-MS para hojas de *M. truncatula* inoculadas con *A. agilis* UMCV2 a los 5 d de interacción. n=7. Tukey, $\alpha=0.05$. Letras iguales corresponden a grupos iguales

8. Discusión

La metabolómica como metodología naciente ha abierto la posibilidad de entender una gran variedad de procesos biológicos, y en el caso particular de plantas esto también representa un desafío mayor por la enorme cantidad de metabolitos que son identificados como producto de un metabolismo secundario complejo que además es variable dependiendo del grupo vegetal que se estudie y del estímulo biótico o abiótico presente (Wink et al., 2013). En lo que se refiere a la interacción planta-microorganismo, los estudios que utilizan a la metabolómica como acercamiento metodológico aún son pocos, y en referencia particular a la interacción de PGPB-planta los estudios son escasos y están enfocados en las interacciones a nivel de rizósfera (Ryffel et al., 2016; Gargallo-Garriga et al., 2016; Ye et al., 2013; Gemperline et al., 2015). La inoculación foliar de bioinoculantes de origen rizosférico cobra relevancia en los últimos años y se han reportado ventajas con respecto a la aplicación en suelo, sin embargo, no se conoce cuál es la respuesta química global que pueda asociarse con la aplicación de bacterias endófitas en el follaje, ni de qué manera la química del tejido huésped puede influir en esta colonización. Este estudio pretende cerrar esa brecha de conocimiento por medio de la aplicación de DLI-ESI (García-Flores et al., 2012) en el estudio de la rizobacteria endófitas *A. agilis* UMCV2 en interacción con *M. truncatula* UMCV2 cuando la bacteria es inoculada por aplicación foliar.

8.1. Diferencias metabólicas entre hojas de *M. truncatula*

Como parte de la estrategia experimental, era importante analizar el perfil de metabolitos en las hojas, toda vez que al momento de la cosecha, la planta presentaba 3 hojas con morfología diferente y de distinta edad. Para la designación de hojas se siguió el método establecido por Bucciarelli y col. (2006), en el que la hoja unifoliada proveniente del primer metámero se designa como m1, la primera hoja trifoliada del siguiente metámero como m2 y la tercera hoja del metámero tres como m3. El análisis del perfil de metabolitos en m1, m2 y m3 por DLI-ESI arrojó un total de 1121 iones, de los cuales se conservaron 751 para llevar a cabo los análisis de ordenación (Legendre et al., 2003).

Con estos datos fue posible observar que el perfil químico de la hoja m1 es distinto de las trifoliadas m2 y m3 (Fig. 17). Las diferencias en la composición química de las hojas debidas a la edad de las mismas es un aspecto que ha sido ampliamente reportado en la literatura (Kantha et al., 1987; Gershenzon et al., 1989; Manuela et al., 1998; Watanabe et al., 2013). Bajo nuestras condiciones experimentales, a los 15 días de edad de las plántulas, la hoja m3 tiene alrededor de 6 días de haber emergido, mientras que la hoja m2 tiene alrededor de 8 días, y finalmente m1 tiene casi los 11 días. De acuerdo a la cronología promedio del desarrollo para *M. truncatula* realizada por Bucarelli y col. (2006) la hoja m1 emerge a los 4 días y termina muriendo alrededor de los 14 días; cabe destacar que en nuestro sistema no se observaron signos de senescencia en m1 como clorosis o caída del órgano (Ryun et al., 2013), por lo que la hoja unifoliada se consideró como un órgano plenamente desarrollado si lo comparamos con m3 o con m2.

8.2. Características bioquímicas de las hojas de *M. truncatula*

Los carbohidratos son importantes en el desarrollo vegetal, pues actúan como moléculas de señalización y participan en el control del desarrollo durante todo el ciclo de vida de la planta; de tal forma que conforme progresa el desarrollo y la madurez, se registra una acumulación de carbohidratos; particularmente de fructosa y glucosa (Rolland et al., 2002).

Los tejidos jóvenes de las plantas tienen una elevada demanda de recursos para su desarrollo, lo mismo las estructuras reproductoras y de defensa, a este modelo se le conoce como “fuente-sumidero” de recursos en la planta. Los carbohidratos se mueven en forma de sacarosa por dos rutas principales en las plantas: a través del apoplasto o por medio del simplasto. Se ha propuesto la expresión de invertasas (enzimas catalizadoras de la ruptura de sacarosa en glucosa y fructosa) y transportadores de hexosas SUT1/SUC2 de forma específica en tejidos sumidero que están en expansión y crecimiento para explicar este patrón de acumulación de carbohidratos (Lemoine et al., 2013). En el presente estudio se observó una mayor acumulación de los carbohidratos glucosa, fructosa, etil-glucosa y sacarosa en la

hoja m1, que es la hoja madura, lo que se corresponde con lo reportado en la literatura.

Adicionalmente, en m1, también se incrementaron las señales que corresponden a diversos lípidos con función estructural tal como 1-linoleoil-2-linoleoil- monogalactosildiacilglicerol (MGDG), 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina, y 1-oleoil-2-oleoil-fosfatidilcolina. En particular, los MGDA y digalactosildiacilglicerol (DGDG) son lípidos abundantes de membranas tilacoidales, y para los que se ha reportado su disminución conforme el tejido se vuelve senescente (Wanner et al., 1991; Watanabe et al., 2013). Al igual que los compuestos anteriores, hubo una considerable acumulación del precursor de la clorofila, protoclorofilida a, indicativo de que m1 es una hoja con actividad fotosintética y que conforme vaya envejeciendo irá disminuyendo.

A su vez, en m1 también se incrementaron las señales correspondientes a otros productos del metabolismo secundario. En lo que respecta a los niveles de isocorismato, se indica en la literatura que es un precursor del ácido salicílico; la ruta de biosíntesis es referida como la ruta del isocorismato y está presente tanto en bacterias como en plantas (Chen et al., 2009). La ruta en sí, parte del corismato que se produce a partir del ácido shikímico, que posteriormente es transformado en isocorismato por la isocorismato sintetasa (ICS), para la cual se han reportado la existencia de copias de este gen en *M. truncatula* (Macaulay et al., 2017). En el caso de bacterias, una isocorismato piruvato liasa (IPL) cataliza la transformación en ácido salicílico sin embargo, no se ha identificado ninguna proteína IPL para plantas, aunque se presume que el paso final podría ser catalizado por una corismato mutasa, para el que *A. thaliana*, por ejemplo, posee al menos 3 copias (Amick et al., 2011). El ácido salicílico es una fitohormona que se acumula conforme avanza el crecimiento vegetal y esta acumulación disminuye la susceptibilidad al ataque de patógenos asociados con la edad de la planta, efecto conocido como resistencia relacionada con la edad (*age-resistance related*, ARR). Esto a su vez se ha relacionado con la conversión del SA en ácido 2,3-dihidroxibenzoico por la acción del ácido salicílico 3-hidroxilasa (SA3H), que se acumula también en el tejido

maduro (Carella et al., 2015). El SA también es el responsable de la activación de la SAR, disparada por patógenos (Zhao et al., 2008).

La amirina (427.073 m/z), el oleanolato (478.294 m/z), y la soyasaponina III (797.246 m/z) son los tres triterpenos encontrados en este trabajo. Estos tres compuestos son parte de las conocidas saponinas, tan abundantes dentro del grupo de las leguminosas (Wink et al., 2013). Estos compuestos comparten como precursor al 2,3-oxidoescualeno, proveniente del isopentenil pirofosfato de la vía del mevalonato para la síntesis de terpenos, que posteriormente es metabolizado a β -amirina por la acción de la β -amirina sintetasa (BAS), y por dos pasos enzimáticos más catalizados por dos citocromos P450 (CYP93E2 y CYP72A61v2) donde el producto es soyasapogenol B, cuya forma glicosilada corresponde a la soyasaponina III. Otro citocromo actuando sobre la β -amirina dará como resultado al ácido oleanólico (Gholami et al, 2014). Las soyasaponinas tienen numerosas funciones biológicas, siendo las mejor conocidas como compuestos disuasivos de herbívoros, también son alelopáticos, antimicrobianos y antivirales (Lacaille-Dubois et al., 1996; Jesus et al., 2015). Hasta el momento no se ha estudiado el papel de las soyasaponinas en la comunicación planta-bacteria, sin embargo, existe evidencia indirecta de alguna relación entre triterpenos derivados de la ruta del mevalonato y la nodulación de *M. truncatula* con *Sinorizobium meliloti*; pues la inhibición química de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR) que cataliza la síntesis del mevalonato, presenta una reducida tasa de nodulación (Kevei et al., 2007).

En las hojas más jóvenes m2 y m3, se observó la acumulación de indol-3-acetaldehído (182.066 m/z), de este compuesto se sabe que posee actividad como auxina (Rajagopal, 1968). Las auxinas inducen la transición de la fase G1 a S (G1/S) del ciclo celular, promoviendo la proliferación, además de promover la laxitud de la pared celular y la expansión de la misma, regulando la expansión celular (Perrot-Rechenmann, 2010; Taiz et al., 2002). En realidad, el indol-3-acetaldehído es el precursor directo del ácido indol acético por medio de la ruta denominada del indol-

3-piruvato, dependiente de triptófano (Zhao, 2010). Su presencia en hojas jóvenes nos habla del crecimiento activo de estos tejidos, lo que nuevamente refuerza la idea de su estado metabólico activo. Otra hormona fitorreguladora encontrada fue el 26-hidroxisbrasinólido (497.178 m/z), perteneciente al grupo de los brasinoesteroides, mayormente acumulado en la hoja m1. Los brasinoesteroides son esteroides que regulan varios aspectos de la fisiología vegetal, por ejemplo, se les ha asociado con respuesta a estrés biótico y abiótico, en transporte celular, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y citoesqueleto, así como en el desarrollo de los verticilos florales y del establecimiento del tejido vascular, entre otros (Jia-Ying et al., 2013). Sin embargo, es importante notar que nuestro brasinólido en cuestión se encuentra hidroxilado en la posición 26. Se sabe que la presencia de este grupo hidroxilo en esta posición, así como en la 25, tiene como efecto una modesta disminución de su actividad en arroz, por lo que parece ser un mecanismo de regulación de su bioactividad (Pharis et al., 2001). Su acumulación en m1 de nueva cuenta sugiere un estado de arresto metabólico comparado con m2 y m3.

Otro compuesto clasificador relevante para m1 y m2 es la metilmalonil-CoA. Éste se produce como resultado del catabolismo de aminoácidos ramificados como valina, isoleucina, treonina y metionina, de ácidos grasos de cadena impar y de colesterol, entrando como succinil-CoA en el ciclo de Krebs por medio de la acción de la metilmalonil CoA mutasa (Ghoraba et al., 2015). En lo que respecta a su función biológica en metabolismo secundario, es casi desconocido su papel en plantas, aunque se ha sugerido que pudiera participar como donador de grupos metilo en la biosíntesis de ceras en la epidermis vegetal, si bien esto sigue siendo materia de especulación (Wettstein-Knowles, 2017; Wettstein-Knowles, 2018).

Como resultado de la especialización que sufren los distintos órganos vegetales, existe una repartición de recursos que se ve reflejada, por ejemplo, en el suministro de carbono a tejido en crecimiento activo, como de hojas maduras a hojas jóvenes. Así, la composición química es específica del tejido que se observa. Por ejemplo se sabe que en la familia Lamiaceae; particularmente con la planta de

menta (*Mentha spicata*), la síntesis de monoterpenos se limita a hojas jóvenes a nivel de tricomas, deteniéndose casi completamente después de las dos semanas de desarrollo de las hojas, a su vez se observan patrones semejantes para glicósidos e indol alcaloides para las familias Poacea (gramíneas) y Apocynacea, en tejidos jóvenes anabólicamente activos comparados con los viejos (Gershenzon et al., 1989; Gershenzon, 1994), Otro ejemplo en tejidos de leguminosas, son los reportes de diferencias en la acumulación de carotenoides en hojas jóvenes de *Trifolium* sp. (Kantha et al., 1987), pero en contraste, se conoce que el contenido de clorofila y carotenoides totales de *Lupinus albus* es relativamente constante entre los verticilos, con una tendencia a la disminución en los verticilos más basales, que son también los más viejos, y donde se observa un patrón semejante en la acumulación de hexosas donde las hojas más jóvenes tienden a acumular mayor cantidad de hexosas totales (Manuela et al., 1998). De igual forma para la vainilla (*Vanilla planifolia*); de la familia Orchidaceae, las hojas jóvenes presentan mayores concentraciones de glucosa y glucósidos (Palama et al., 2010). En el caso de *A. thaliana* se ha observado que la acumulación de carbohidratos tiene lugar en las hojas basales más viejas (Watanabe et al., 2013). Así, no es posible afirmar la existencia de patrones universales, y deben de entenderse como variables entre distintos grupos vegetales.

8.3. Patrones de colonización de *A. agilis* UMCV2 en hojas y diferencias químicas asociadas.

De acuerdo a la evidencia mostrada por microscopía confocal, la rizobacteria y endófito *A. agilis* UMCV2 coloniza el tejido interno de m1, m2 y m3 después de la inoculación foliar. La cuantificación del DNA bacteriano en las hojas, indicó una mayor colonización en m1, comparado con m2 y m3. Ya en el trabajo de Aviles-García y col. (2016), observaron que la inoculación a nivel de raíz no solo progresaba hasta la internalización de la bacteria en hojas, si no que existían diferencias en el patrón de colonización de éstas. En particular observaron una tendencia a colonizar m2 antes que m1 y m3. Sin embargo, como los mismos

autores describen, esto puede ser producto de la conducción pasiva de las bacterias por xilema en sentido acropétalo, siguiendo el flujo del fluido xilemático. Con las observaciones que realizamos respecto al movimiento bacteriano entre hojas, esta idea parece ser confirmada, pues existe la tendencia de la bacteria a desplazarse a folíolos superiores; por ejemplo, al inocularle sobre m1 se le recupera en m2 y m3, sin embargo, también fue posible detectar el movimiento inverso; de tal forma que inoculando en m3 fue posible detectarle en m1.

Por el sistema de inoculación foliar, fue posible observar que la bacteria coloniza en mayor número a la hoja m1, con una abundancia aproximada de $696,653 \pm 406,608$ genomas/g de tejido fresco. En la literatura se mencionan reportes muy variados de densidad bacteriana a nivel de filósfera, pero que rondan alrededor de 10^6 - 10^7 células por centímetro cuadrado, por lo que los números obtenidos en nuestros resultados encajan dentro de estos valores (Bulgarelli et al., 2013). Las diferencias de colonización con respecto a las hojas m2 y m3 son de un orden de magnitud, lo que implica que existe un factor que está favoreciendo el establecimiento de *A. agilis* UMCV2 en esta hoja. El análisis de ordenación de los perfiles de metabolitos obtenidos por DLI-ESI, no logró clasificar las hojas axénicas de las inoculadas a los cinco días de la interacción y las hojas m1 que presentaron una mayor colonización a ese tiempo, se agruparon en el mismo clado que las no inoculadas, lo que revela que, al menos al nivel de resolución que permite DLI-ESI, no hubo cambios globales asociados con la presencia de la bacteria. En este punto es conveniente precisar que DLI-ESI registra compuestos mayoritarios y el nivel de resolución analítica es global, por lo que los análisis metabolómicos suelen acompañarse de la extracción de metabolitos que son analizados complementariamente por otras herramientas analíticas como GC-MS. Así, el análisis de carbohidratos por GC-MS reveló que la presencia de la bacteria se hizo acompañar de un incremento de carbohidratos. Hasta donde tenemos conocimiento, solo encontramos dos reportes anteriores de estimulación en la acumulación de carbohidratos posterior a la aplicación foliar de bioinoculantes bacterianos. Por una parte, Radhakrishnan y col. (2017) encontraron que la

inoculación foliar de ajonjolí (*Sesamum indicum*) incrementa la acumulación de sacarosa, glucosa, inulina, galactosa, y xilitol, tanto en brotes como en vainas de la planta, además se observó que incrementaba el contenido de aminoácidos, ácido salicílico, ácido absícico y fenoles totales. Por otra parte, González-Rodríguez y col. (2013), encontraron un efecto semejante en plántulas de piña (*Ananas cosmosus*) en un sistema de micropropagación y al aplicar *Azotobacter chroococcum* INIFAT5; observaron un incremento en el contenido de carbohidratos, aminoácidos, y de clorofila a y b. Mercier y col. (2000), realizaron un estudio de la relación de la microbiota bacteriana epífita con los niveles de carbohidratos en la epidermis de la hoja al momento de ser inoculado con *Pseudomonas fluorescens* en diferentes especies vegetales; como maíz, calabaza, chícharo, tabaco y jitomate. Estos autores observaron que el contenido de azúcares es un factor limitante para la proliferación de esta población bacteriana, existiendo una tendencia a la disminución de los carbohidratos en hojas conforme la población bacteriana crecía, puesto que éste es un recurso utilizado como fuente de carbono por las bacterias. De la misma manera, aquellas especies vegetales con mayores niveles de carbohidratos en hojas son las que presentan valores más altos de colonización; lo que refuerza aún más la idea de la importancia de la presencia de carbohidratos para el mantenimiento de estas comunidades bacterianas. En nuestro trabajo, se observó una acumulación de azúcares en m1 y m2 inoculadas y al menos en estos dos órganos hubo una correlación positiva, es decir a mayor colonización se destina una mayor cantidad de azúcares disponibles para el crecimiento bacteriano. En el caso de m3, no se detectó una diferencia significativa en el contenido de azúcares, lo que sugiere que al ser el tejido más joven por ende demanda un mayor consumo de energía más lo que requiere la bacteria para crecer.

Los azúcares en plantas no solo cumplen funciones estructurales y energéticas, sino que además juegan un papel muy importante en la respuesta a diferentes tipos de estrés. Por ejemplo; se sabe que el estrés salino, por deshidratación y por frío tiene efectos negativos en la integridad de las membranas y en la estructura nativa de las proteínas, además de generar un desbalance iónico

y osmótico que finalmente impacta a nivel global en el equilibrio de funciones esenciales del metabolismo. Así, una de las formas en que la planta responde a esto es con la acumulación de azúcares; entre los que frecuentemente se encuentran la sacarosa, glucosa, fructosa y trehalosa; por un lado, para actuar como agentes protectores de membranas y macromoléculas, además de iniciar cascadas de señalización que finalmente desencadenan la respuesta de genes de respuesta a estrés (Martínez-Noël et al, 2018; Sami et al., 2016). Es interesante notar que también en lo que respecta a estrés biótico los azúcares parecen jugar un papel muy importante. Herbers y col. (2000) reportan que las plantas de tabaco que acumulan hexosas en sus hojas son menos susceptibles al ataque del virus Y de la papa, de donde los autores proponen que la acumulación de carbohidratos es producto, a su vez, de la acumulación de invertasas en el apoplasto, lo que provoca una degradación generalizada de la sacarosa en sus respectivas hexosas, que son tomadas por las células del mesófilo, induciendo una acumulación generalizada de azúcares en la región infectada, además de disminuir la fotosíntesis y desencadenar una respuesta de defensa más intensa (Herbers et al., 2000). En el mismo sentido, se conoce que en plantas de *A. thaliana* la acumulación de sacarosa induce la expresión de genes PR, y en particular aumenta la acumulación de las proteínas PR-2 y PR-5, además de demostrarse que esta respuesta es dependiente de la señalización por ácido salicílico (Thibaud et al., 2004). Las proteínas PR son producidas con respuesta al ataque de patógenos y muchas tienen actividad antimicrobiana al poseer actividad glucanasa y quitinasa. Esto sugiere que los azúcares podrían participar activamente en la activación de genes de defensa a patógenos.

Con todo lo anterior, se establece que al menos la ruta de los carbohidratos está implicada en el proceso de colonización, donde el contenido de azúcares pudiera fungir como biomarcador de la colonización. Con esto en mente surge una pregunta importante: ¿La acumulación observada en los niveles de carbohidratos podría atribuirse a una respuesta de defensa de la planta a la presencia de *A. agilis* UMCV2? Con los reportes anteriores, esta posibilidad queda abierta. Los endófitos

activan mecanismos de señalización mediados por MAMPS', posteriormente esta respuesta es mitigada por los propios endófitos y la relación progresa (Bordiec et al., 2011), por lo que en sus primeros estadios la acumulación de azúcares podría atribuirse a este reconocimiento. Esto a su vez sería capitalizado por la propia bacteria endófito, que al verse provista de una fuente de carbono aumenta su número. Así, sería importante observar si se activan mecanismos de señalización como respuesta a la inoculación de la cepa UMCV2 en hojas, y si esta respuesta en hojas es, a su vez, es dependiente de la acumulación de carbohidratos observada en el tejido. En vista de que la interacción, efectivamente, progresa y culmina con el establecimiento de la bacteria como endófito en hojas (Aviles-Garcia et al., 2016), se tiene que entender de qué forma la bacteria logra evadir estas posibles respuestas de defensa en la planta, y nuevamente, si los carbohidratos disponibles de alguna manera participan en este proceso (Fig. 17).

Este trabajo aporta las bases para un posterior seguimiento del progreso de esta relación, tratando de entender tres aspectos muy importantes que aún falta por indagar: la temporalidad de los cambios observados en carbohidratos en hojas inoculadas, el efecto acumulativo de estos cambios conforme progresa el crecimiento de las plantas inoculadas, y el seguimiento de las modificaciones en el perfil químico de plantas axénicas.

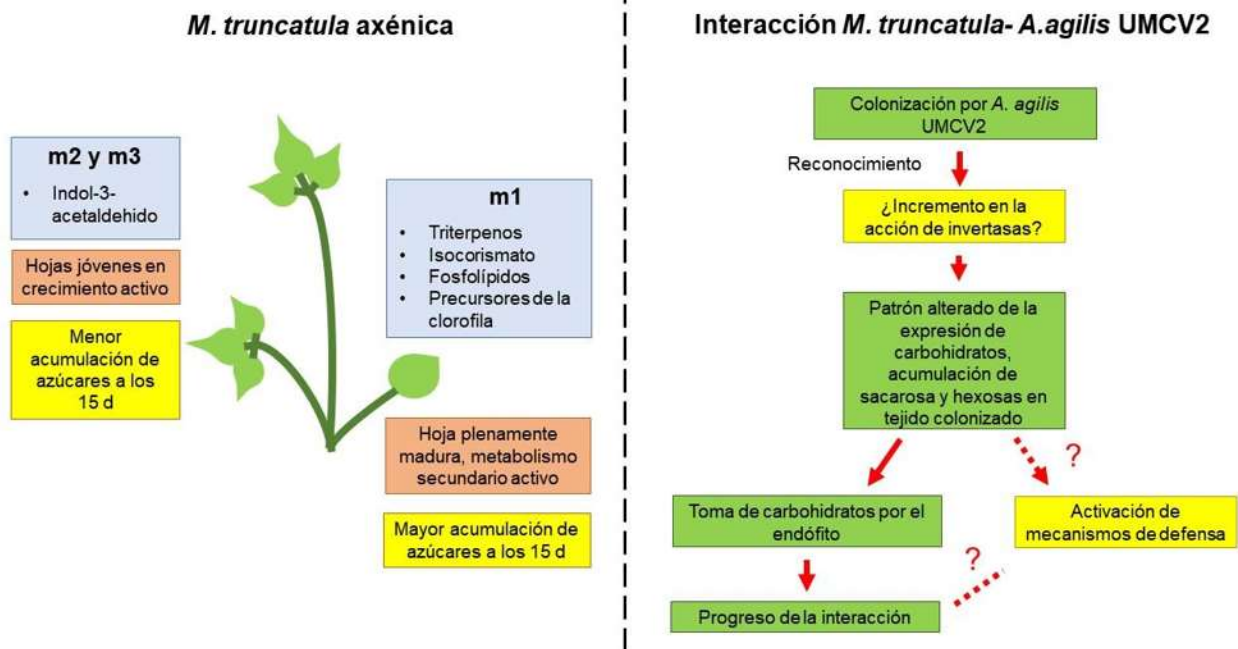


Figura 17. Modelo que esquematiza los principales hallazgos en este trabajo. *M. truncatula* a los 15 d posee tres hojas con diferente perfil químico. La hoja unifoliada (m1) posee como característica principal la acumulación de indol-3-acetaldehído, así como un menor contenido de azúcares. Por su parte las hojas trifoliadas m2 y m3, acumulan triterpenos, fosfolípidos y precursores de la clorofila. Por su parte, la interacción de *M. truncatula* con *A. agilis* UMCV2 está asociada a un incremento de carbohidratos totales, lo que refuerza el papel de los azúcares en el reconocimiento y la colonización endofítica.

9. Perspectivas

Esclarecer el comportamiento temporal de los cambios en el perfil de carbohidratos en plántulas inoculadas con *A. agilis* UMCV2, así como el posible efecto a largo plazo que esta acumulación pueda tener.

Analizar la posible respuesta de defensa de la planta a la inoculación foliar de la cepa UMCV2, y si esta respuesta es dependiente de la acumulación de carbohidratos.

Analizar si el perfil global de metabolitos se modifica en presencia de algún tipo de estrés.

10. Conclusión

El metaboloma de las hojas de *Medicago truncatula* difiere entre los distintos metámeros y hay una acumulación selectiva de *Arthrobacter agilis* UMCV2 en la primera hoja producto de la disponibilidad de carbohidratos para el establecimiento de la bacteria por inoculación foliar.

11. Bibliografía

Abhilash P., D. Rama, T. Vishal, K. Gupta, H. Singh. 2016. Plant growth promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*. 34(11): 847-850.

Ali S., T. Charles, B. Glick. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*. 80: 160-167.

Amick D., A. Vlotb, M. Wildermuth, D. Klessig. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*. 9: e0156

Asis C., T. Shimizu, M. Khan, S. Akao. 2003. Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Science and Plant Nutrition*.49(6): 915-920.

Aviles-Garcia M, I. Flores-Cortez, C. Hernández-Soberano, G. Santoyo, E. Valencia-Cantero. 2016. La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*. *Revista Argentina de Microbiología*. 48(4): 342-346

Backman P., R. Sikora. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*. 46(1): 1-3.

Berendsen R., C. Pieterse, P. Bakker. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 17(8): 478-486

Boddey R., V. Reis, S. Urquiaga, L. da Silva, F. dos Reis, J. Baldani, J. Dobereiner. 1995. N₂ fixation in sugarcane: the role of *Acetobacter diazotrophicus*. En: Tikhonovich I., N. Provorov, V. Romanov, W. Newton. 1995. Nitrogen fixation: fundamentals and Applications. Ed. Kluwer Academic Press. Holanda. 824 pp.

Bohn-Courseau I. 2010. Auxin: a major regulator of organogenesis. *Comptes Rendus Biologies*. 333(4): 290-296.

Bordiec S., S. Paquis, H. Lacroix, S. Dhondt, E. Ait, S. Kauffmann, P. Jeandet, F. Mazeyrat-Gourbeyre, C. Clément, F. Baillieul, S. Dorey. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*. 62(2): 595-603.

Brader G., S. Compant, B. Mitter, F. Trognitz, A. Sessitsch. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 27(100): 30-37.

Bucciarelli B., J. Hanan, D. Palmquist, C. Vance. 2006. A standardized method for analysis of *Medicago truncatula* phenotypic development. *Plant Physiology*. 142(1): 207-219.

Canellas L., S. da Silva, D. Olk, F. Olivares. 2015. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 13(1): 131-138.

Carella P., D. Wilson, R. Cameron. 2015. Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 5:775.

Chen Z., Z. Zheng, J. Huang, Z. Lai, B. Fan. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 4(6): 493-496.

Chi F., S. Shi-Hua, C. Hai-Ping, J. Yu-Xiang, Y. Yanni, F. Dazzo. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 7271-7278

Christina A., V. Cristopher, S. Bhore. 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Pharmacognosy Reviews*. 7(13): 11-16.

Clément G., M. Michaël, S. Fabienne, M. Reisdorf-Cren, C. Masclaux-Daubresse. 2018. Metabolomics of laminae and midvein during leaf senescence and

source–sink metabolite management in *Brassica napus* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*. 69(4): 891–903.

Courant F., J. Antignac, G. Dervilly-Pinel, B. Le Bizec. 2014. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics*. 14(21-22): 2369-2388.

Da Silva A., J. Gomes, R. Lobo, C. C. de Oliveira. 2013. Tolerance to drought in leguminous plants mediated by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. En: S. Akinci (Editor). 2013. Responses of organisms to water stress. Ed. IntechOpen. doi: 10.5772/54094.

Da Silva S., F. Lopes, L. Pasqualoto. 2017. The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 4: 24.

Dixon R., G. Pasinetti. 2010. Flavonoids and Isoflavonoids: From plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*. 154(2): 453-457.

Dong-Bo X., Y. Wan-Wan, H. Ying, D. Zi-Xin, H. Kui. 2014. Natural products from mangrove Actinomycetes. *Marine Drugs*. 12(5): 2590-2613.

Dörr J., T. Hurek, B. Reinhold-Hurek. 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular Microbiology*. 30(1):7-17.

Doyle J., M. Luckow. 2003. The Rest of the Iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*. 131(3): 900-910.

Du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3-14.

FAO. 2015. Soil is a non-renewable resource. En: <http://www.fao.org/soils-2015/news/news-detail/en/c/275770/>. Última consulta: 29 de julio de 2017.

Ferguson C., E. Simon. 1973. Membrane lipids in senescing green tissues. *Journal of Experimental Biology*. 24(79): 307-316.

Fong N., M. Burgess, K. Barrow, D. Glenn. 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56(5-6):750-756.

García-Flores M., S. Juárez-Colunga, A. García-Casarrubias, S. Trachsel, R. Winkler, A. Tiessen. 2015. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(3): 1042-1052.

García-Flores M., S. Juárez-Colunga, J. Montero-Vargas, J. López-Arciniega, A. Chagolla, A. Tiessen, R. Winkler. 2012. Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). *Molecular BioSystems*. 8(6): 1658–1660.

Gargallo-Garriga A., J. Sardans, M. Pérez-Trujillo, A. Guenther, J. Llusà, L. Rico, J. Terradas, G. Farré-Armengol, I. Filella, T. Parella, J. Peñuelas. 2016. Shifts in plant foliar and floral metabolomes in response to the suppression of the associated microbiota. *BMC Plant Biology*. 16:78.

Gemperline E., D. Jayaraman, J. Maeda, J. Ané, L. Li. 2015. Multifaceted investigation of metabolites during nitrogen fixation in *Medicago* via high resolution MALDI-MS imaging and ESI-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 26(1): 149–158.

Gerd-Joachim K., D. Nies. 2015. Ecological biochemistry. Ed. Wiley-VCH. Alemania.

Gersbenzon, J. 1994. The cost of plant chemical defence against herbivory: a biochemical perspective. En: Bernays E. (editor). 1993. Insect- plant interactions. vol. V. Ed. CRC Press. USA.

Gershenzon, J., M. Maffei, R. Croteau. 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology*. 89(4):1351-1357.

Gholami A., N. Geyter, J. Pollier, S. Goormachtig, A. Goossens. 2014. Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Natural Product Reports*. 31(3): 356-380.

Ghoraba D., M. Mohammed, O. Zaki. Mutation analysis of methylmalonyl CoA mutase gene exon 2 in egyptian families: Identification of 25 novel allelic variants. *Meta Gene*. 3:71-88.

Glick B. 2015. Beneficial plant-bacterial Interactions. Ed. Springer. USA.

Graham P., C. Vance. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131(3): 872- 877.

Hans-Jürgen B., M. Wieser, S. Buczolits. 2012. Genus III. *Arthrobacter*. En: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 5. 2da Ed. Springer. USA.

Hardoim P., L. van Overbeek, G. Berg, A. Pirttilä, S. Compant, A. Campisano, M. Döring, A. Sessitsch. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 79(3): 293-320.

Hardoim P., L. van Overbeek, van Elsas. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 16(10): 463-471.

Hartley S, Rene Eschen, Julia M. Horwood, Alan C. Gange, Elizabeth M. Hill. 2014. Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*. *New Phytologist*. 205(2): 816-827

Harwood J., N. Russell. 1984. Lipids in plants and microbes. Ed. George Allen & Unwin. USA. 162 pp.

Herbers K., Y. Takahata, M. Melzer, H. Mock, M. Hajirezaei, U. Sonnewald, 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*. 1(1): 51-59.

Ibáñez F, Tonelli M., Muñoz V., Figueredo M., Fabra A. 2017. Chapter 2: Bacterial endophytes of plants: diversity, invasion mechanisms and effects on the host. En: Maheshwari D (edit.). 2017. *Endophytes: Biology and Biotechnology*. Springer. USA.

Iniguez A., Y. Dong, H. Carter, B. Ahmer, J. Stone, E. Triplett. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18(2): 169-178.

Jain V., H. Nainawatee. 2002. Plant flavonoids: signals to legume nodulation and soil microorganisms. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 11(1): 1-10.

Jia-Ying Z., J. Sae-Seaw, W. Zhi-Yong. 2013. Brassinosteroid signalling. *Development*. 140(8): 1615–1620.

Jesus J., J. Henrique, M. Laurenti, E. Yamamoto, L. Passero. 2015. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. eCAM, 2015: 620472.

Kantha S., J. Erdman. 1987. Legumes carotenoids. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 26(2): 137-155

Kassir L., B. Lartiges, N. Ouaini. 2012. Effects of fertilizer industry emissions on local soil contamination: a case study of a phosphate plant on the east Mediterranean coast. *Environmental Technology*. 33(7-9): 873-885.

Kevei Z., G. Loughnon, P. Mergaert, G. Horváth, A. Kereszt, D. Jayaraman, N. Zaman, F. Marcel, K. Regulski G. Kiss, A. Kondorosi, G. Endre, E. Kondorosi, A. Jean-Michel. 2007. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*. 19(12): 3974-3989.

Kirti K., S. Amita, S. Priti, A. Mukesh, S. Jyoti. 2014. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Advances in Biology*. 2014: 1-13.

Klassen A., A. Tedesco, G. Baptista, P. Rocha da Cruz, H. Caracho, M. Maggi, A. Sussulini. 2017. Metabolomics: definitions and significance in systems biology. En: Sussulini A. (edit.). 2017. Metabolomics: from fundamentals to clinical applications. Ed. Springer. USA.

Kloepper J. y M. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. (2):879-882.

Kloepper J.W. 1994. Chapter 9: Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). En: Okon Y. (edit.). 1994. Azospirillum/Plant Associations. Ed. CRC Press. USA.

Kougan G., T. Tabopda, V. Kuete, R. Verpoorte. 2013. Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa. En: Kuete V. (edit.). 2013. Medicinal Plant Research in Africa. Ed. Elsevier. USA

Lacaille-Dubois M., H. Wagner. 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*. 2(4):363–386.

Legendre P., L. Legendre. 2003. Numerical Ecology. Segunda edición. Ed. Elsevier. Países bajos.

Leeper F. 1985. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B12. *Natural Product Reports*. 2(6): 561-580.

Lemoine R., S. La Camera, R. Atasassova, F. Dédaldéchamp, T. Allario, N. Pourtau, J. Bonnemain, M. Laloi, P. Coutos-Thévenot, L. Maurousset, M. Faucher, C. Girousse, P. Lemonnier, J. Parrilla, M. Durand. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontier in Plant Science*. 4: 272

Lim P., J. Kim, H. Nam. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*. 58:115–136.

Lindow S., J Leveau. 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(3): 238-243.

López-Gresa M., P. Lison, L. Campos, I. Rodrigo, J. Rambla, A. Granell, V. Conejero, J. Bellés. 2017. A non-targeted metabolomics approach unravels the VOC's associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1188

Maag D., R. Diwakar, C. Müller, A. Mendoza-Mendoza, S. Wratten, A. Stewart, M. Rostás. 2014. *Trichoderma atroviride* LU132 promotes plant growth but not induced systemic resistance to *Plutella xylostella* in oilseed rape. *BioControl*. 59(2): 241-252.

Macaulay K., G. Heath, A. Ciulli, A. Murphy, C. Abell, J. Carr, A. Smith. 2017. The biochemical properties of the two *Arabidopsis thaliana* isochorismate synthases. *Biochemical Journal*. 474(10): 1579–1590.

Mahuku, G. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22(1): 71-81.

Manuela M., D. Coelho, I. Barrote, M. Correia. 1998. Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25(3): 299-306.

Martínez-Noël G., J. Tognetti. 2018. Sugar signaling under abiotic stress in plants. En: Ahmad P (edit.). 2018. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. Ed. Academic Press. USA.

Melville S., L. Craig. 2013. Type IV Pili in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77(3): 323-341.

Mercier J., E. Lindow. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1): 369-374.

Mhlongo M., P. Lizelle, M. Ntakadzeni, N. Labuschagne, I. Dubery. 2018. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for

metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in Plant Science*. 9: 112.

Mohammad R., M. Akhavan-Kharazian, W. Campbell, M. Rumbaugh. 1991. Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil*. 134(2): 271–276.

Orozco-Mosqueda M., C. Velázquez-Becerra, L. Macías-Rodríguez, G. Santoyo, I. Flores-Cortez, R. Alfaro-Cuevas. 2013. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil*. 362(1-2): 51-66.

Oteino N., R. Lally, S. Kiwanuka, A. Lloyd, A. Ryan, K. Germaine, D. Dowling, 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 6: 745.

Palama T., I. Fock., Y. Hae, R. Verpoorte, H. Kodja. 2010. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry*. 71(5-6): 567-573.

Paliy O., V. Shankar. 2016. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*. 25(5): 1032-1057.

Partida-Martínez L., M. Heil. 2011. The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*. 2:100.

Pérez-Montaña F., C. Alías-Villegas, R.A. Bellogín, P. del Cerro, M. Espuny, I. Jiménez-Guerrero, F. López-Baena, F. Ollero, T. Cubo. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169(5-6): 325-336.

Perrot-Rechenmann C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2(5): a001446.

Pharis R., L. Janzena, S Nakajimab, J. Zhu, T. Back. 2001. Bioactivity of 25-hydroxy-, 26-hydroxy, 25,26-dihydroxy- and 25,26-epoxybrassinolide. *Phytochemistry*. 58(7): 1043–1047.

Philippot L., J. Raaijmakers, P. Lemanceau. W. van der Putten. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews: Microbiology*. 11(11): 789-799.

Plant Metabolic Network (PMN). 2018. www.plantcyc.org. Visto el 6 de junio de 2018.

Quesada V., R. Sarmiento-Mañús, R. González-Bayón, A. Hricová, M. Rosa, J. Micol. 2013. Porphobilinogen deaminase deficiency alters vegetative and reproductive development and causes lesions in *Arabidopsis*. *PLoS One*. 8(1): e53378.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Viena, Austria. En: <https://www.R-project.org/>

Radhakrishnan R., I. Lee. 2017. Foliar treatment of *Bacillus methylotrophicus* KE2 reprograms endogenous functional chemicals in sesame to improve plant health. *Indian Journal of Microbiology*. 57(4): 409-415.

Rajagopal R. 1968. Occurrence and metabolism of indoleacetaldehyde in certain higher plant tissues under aseptic conditions. *Physiologia Plantarum*. 21: 378-385.

Reynoso M., V. Savy, M. Lancia, K. Hobecker, F. Blanco, M. Zanetti. 2013. *Medicago truncatula*: a model organism to study the biology of agriculturally important legume crops. En: Satou H (edit.). 2013. Legumes; Types, Nutritional Composition and Health Benefits. Ed. Nova Science Publishers. Reino Unido.

Rolland F., B. Moore, J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*. (Suppl) 14: S185–S205.

Ryan C., E. Clayton, W. Griffin, S. Sie, D. Cousens. 1988. SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 34(3): 396-402.

Ryffel F., E. Helfrich, P. Kiefer, L. Peyriga, J. Portais, J. Piel, J. Vorholt. 2016. Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 10(3): 632-643.

Ryun H., H. Jung, H. Gil, P. Ok. 2013. Plant leaf senescence and death-regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*. 126(Pt 21): 4823–4833.

Sadeghi M., S. Dehghan, R. Fischer, U. Wenzel, A. Vilcinskas, H. Reza, M. Rahnamaeian. 2013. Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius*. *Plant Signaling and Behavior*. 8(11): e27335.

Sami F., M. Yusuf, M. Faizan, A. Faraz, S. Hayat. 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 109: 54-61.

Santoyo G., G. Moreno-Hagelsieb, M. Orozco-Mosqueda, B. Glick. 2015. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183: 92-99.

Savci S. 2012. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *APCBEE Procedia*. 1: 287-292.

Shi Y., K. Lou, C. Li. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biology and Fertility of Soils* 45(6): 645-653.

Spaepen S., J Vanderleyden. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(4): a001438.

Stougaard J. 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology*. 124(2): 531-540.

Suzuki S., Y. He, H. Oyaizu. 2003. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology*. 47(2): 138-143.

Taiz L., E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3rd edición. Ed. Sinauer Associates. Inglaterra.

Teotia P., M. Kumar, R. Prasad, S. Sharma, V. Kumar. 2017. Endophytic probiotics and plant health: toward a balanced accost. En: Kumar V., M. Kumar, S. Sharma, R. Prasad (edit.). 2017. Probiotics and Plant Healt. Ed. Springer. India.

Thibaud M., S. Gineste, L. Nussaume, C. Robaglia. 2004. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(1): 81–88.

Valencia-Cantero E., E. Hernández-Calderón, C. Velázquez-Becerra, J. López-Meza, R. Alfaro-Cuevas, J.- López-Bucio. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil*. 291(1-2): 263-273.

Van Overbeek L., J. Bergervoet, F. Jacobs, J. van Elsas. 2004. The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology*. 94(5):463-469.

Velázquez-Becerra C, L. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, J. Altamirano-Hernández, I. Flores-Cortez, E. Valencia-Cantero. 2011. A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro. *Plant Soil*. 339(1-2):329-340.

Verpoorte R. 2000. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Ed. Springer-Science+Business Media. USA.

Vincken J., L. Heng, A. de Groot, H. Gruppen. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68(3): 275-297.

Wanner L., F. Keller, P. Matile. 1991. Metabolism of radiolabelled galactolipids in senescent barley leaves. *Plant Science*. 78(2):199-206.

Watanabe M., S. Balazadeh, T. Tohge, A. Erban, P. Giavalisco, J. Kopka, B. Mueller-Roeber, A. Fernie, R. Hoefgen. 2013. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 162(3):1290-1310.

Weckwerth W. 2010. Metabolomics: an integral technique in systems biology. *Bioanalysis*. 2(4): 829-836.

Wettstein-Knowles P. 2017. The polyketide components of waxes and the Cer-cqu gene cluster encoding a novel polyketide synthase, the β -diketone synthase, DKS. *Plants*. 6(3): 28

Wettstein-Knowles P. 2018. Chapter 4: Waxes, cutin, and suberin. En: Moore T. (Editor). 2018. Lipid metabolism in plants. Ed. CRC Press. USA.

Wink M. 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*. 89: 164-175.

Winkler R. 2015. SpiderMass: semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *Journal of Mass Spectrometry*. 50(3): 538-541.

Woodward A., B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95: 707-735.

Yasuda M., T. Isawa, S. Shinozaki, K. Minamisawa, H. Nakashita. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73(12): 2595-2599.

Ye H., E. Gemperline, M. Venkateshwaran, R. Chen, P. Delaux, M. Howes-Podoll, J. Ané, L. Li. 2013. MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *The Plant Journal*. 75(1): 130–145.

Zamioudis C., C. Pieterse. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(2): 139-150.

Zhao S., X. Qi. 2008. Signaling in Plant Disease Resistance and Symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50(7): 799-807.

Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*. 61:49-64.

12. Apéndice

Durante la ejecución del presente proyecto, se realizaron las siguientes actividades académicas:

- Estancia de investigación en el CINVESTAV, unidad Irapuato, bajo la coasesoría del Dr. Robert Winkler, en el laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental, del 1 de marzo al 31 de diciembre de 2017.
- Asistencia al curso titulado “Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas”, en el CINVESTAV, unidad Irapuato, el 18 y 19 de mayo de 2017.
- Asistencia al curso titulado “Curso de Introducción a R” en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Ciudad de México, del 22 al 26 de enero de 2018.
- Coautoría del artículo titulado “*Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Aromas') plants in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction” en la revista *Journal of Plant Growth Regulation*, en 2018. DOI:10.1007/s00344-018-9888-6.
- Participación en el *XVII National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & X Joint Mexico-USA Symposium*, en noviembre de 2017, por parte de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C., con el trabajo titulado “The metabolic profiles of the *Medicago truncatula* leaves influence the endophytic colonization of *Arthrobacter agilis* UMCV2”.
- Participación en el 12° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación (CECTI) del estado de Michoacán, noviembre de 2018.
- Se encuentra en proceso de elaboración el artículo correspondiente a los resultados del presente proyecto, con el título “The foliar colonization of the rizhosphere and endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 in *Medicago truncatula* is influenced by leaf development stage and its metabolic profiling”, con los autores: Arturo Ramírez-Ordorica, Robert Winkler, Eduardo Valencia-Cantero, Idolina Flores-Cortez, María Teresa Carrillo-Rayas, Ma. Isabel Cristina Elizarraraz-Anaya, Josaphat Motero-Vargas, y Lourdes Macías-Rodríguez; para la revista *Microbial Ecology*.