



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Glomus intraradices y *Azospirillum brasilense*: **efectos locales y sistémicos en plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.)**

TESIS

**como requisito parcial para obtener el título profesional de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

Biol. ERIKA ZETINA TENA

DIRECTOR DE TESIS: D. C. H. Javier A. Villegas Moreno

CODIRECTOR: D. C. Jesús Campos García

Morelia, Mich., MARZO 2013

AGRADECIMIENTOS

Por todo su apoyo y confianza al Dr. Villegas.

Al Dr. Jesús Campos por sus valiosas aportaciones e ideas a este proyecto.

A mi comité tutorial por su enorme contribución a la realización de este proyecto.

A Lore por las todas facilidades brindadas para la realización de esta tesis, por su paciencia y tolerancia. Por su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio Santos, Ana, Ene, Adrián y Carlos por sus valiosas aportaciones y colaboración a este trabajo y por hacer mi estancia en el laboratorio más amena.

Al Dr. Enrique A. por su disponibilidad y atención a mis siempre dudas.

Al Dr. Josue por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis papas por todo su apoyo y comprensión, los quiero.

A CONACyT por la beca brindada para la realización de mi maestría.

A este proyecto de maestría que me hizo crecer personal y profesionalmente.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. SUMMARY.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1 RESPUESTA SISTÉMICA EN PLANTAS	5
3.2 CULTIVO DE CEBADA.....	6
3.2.1 Clasificación taxónomica de la cebada (Gomez-Macpherson 2001)	7
3.3 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	9
3.3.1 Producción de hormonas	10
3.3.2 Fijación de nitrógeno.....	12
3.3.3 Producción de sideróforos	12
3.4 SIMBIOSIS MICORRÍZICA.....	13
3.4.1 Clasificación de <i>G. intraradices</i>	15
3.4.2 Anatomía y colonización de <i>G. intraradices</i>	15
3.4.3 Los hongos micorrízicos y la promoción del crecimiento vegetal	18
3.4.4 Los hongos micorrízicos y producción de compuestos que intervienen en los mecanismos de la resistencia inducida	19
3.5 ÁCIDO SALICÍLICO	19
3.5.2 Metabolismo del ácido salicílico.....	20
3.5.3 El Ácido salicílico es una señal endógena de la resistencia.	21
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
5.1 OBJETIVO GENERAL	25
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Diseño experimental.....	27
VII. RESULTADOS.....	32
VIII. DISCUSIÓN.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	44
X. PERSPECTIVAS.....	45
XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de cebada.....	8
Figura 2. Arbúsculo dentro de una célula cortical.....	16
Figura 3. Proceso de colonización de un HMA.....	18
Figura 4. Rutas de biosíntesis del AS.....	21
Figura 5. Plantas de cebada a las siete semanas de crecimiento en un sistema de split-root	32

Figura 6. Estructuras características de los HMA en las raíces de cebada.....	33
Figura 7. Peso fresco de la parte aérea de plantas de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) inoculadas con <i>G. Intraradices</i> , <i>A. Brasilense</i> , solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root.....	34
Figura 8. Peso seco de la parte aérea de plantas de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) inoculadas con <i>G. Intraradices</i> , <i>A. Brasilense</i> solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root.....	34
Figura 9. Peso fresco de raíz de plantas de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) inoculadas con <i>G. Intraradices</i> , <i>A. Brasilense</i> , solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root.....	35
Figura 10. Peso seco de raíz de plantas de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) inoculadas con <i>G. Intraradices</i> , <i>A. Brasilense</i> , solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solución nutritiva Hoagland.....	26
Tabla 2. Determinación del efecto de la interacción <i>G. intraradices</i> - <i>A. brasilense</i> sobre la producción sistémica de AS total y de compuestos con potencial estimulador del crecimiento.	27
Tabla 3. Colonización de <i>G. intraradices</i> y <i>A. brasilense</i> en la raíz de las plantas de cebada, a los 49 días de crecimiento en un sistema de raíces divididas.....	33
Tabla 4. Compuestos de origen esterooidal determinados en la raíz de las plantas inoculadas con <i>G. intraradices</i> y <i>A. brasilense</i> a las 7 semanas de crecimiento.....	38
Tabla 5. Acido salicílico total determinado en la raíz de las plantas de cebada inoculadas con <i>G. intraradices</i> y <i>A. brasilense</i> a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de raíces divididas.	39

I. RESUMEN

Las plantas se encuentran expuestas a una gran cantidad de estímulos ambientales a los que responden de manera local, pero además son capaces de integrar las señales internas que dan cuenta del estatus que impera en sus órganos de manera sistémica. *Glomus intraradices* un hongo micorrizico arbúscular (HMA) ha mostrado inducir de manera local la acumulación de ácido salicílico (AS) en plantas de cebada, así como tener efectos positivos en el crecimiento. Por su parte la rizobacteria *Azospirillum brasilense* se ha observado que induce en cereales incrementos en el tamaño de hoja, peso seco, concentración de Nitrógeno en grano y follaje. La inoculación en la raíz de HMA así como de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) ha mostrado tener respuestas en la parte aérea de las plantas. La interacción de los microorganismos ha mostrado una sinergia positiva en eventos como la fotosíntesis, desarrollo de la planta, la solubilización y toma de fósforo. Por lo que en el presente trabajo se planteó estudiar los efectos de *G. intraradices* y *A. brasilense* sobre el crecimiento e inducción de compuestos de manera sistémica en plantas de cebada. Las plantas de cebada se establecieron en un sistema de split-root para conocer los efectos locales y sistémicos de *G. intraradices* y *A. brasilense*. Se observaron incrementos en el peso fresco y seco, longitud de raíz por efecto de la inoculación con la rizobacteria. Las plantas inoculadas con *G. intraradices* mostraron un incremento en el peso fresco de la parte aérea, respecto de los demás tratamientos. La interacción de los microorganismos no mostró tener efectos significativos en la biomasa de las plantas de cebada. Por otra parte, la cantidad de AS total detectado por HPLC en la raíz de las plantas de cebada se incrementó de manera local por efecto de la rizobacteria *A. brasilense* respecto de las plantas control y las inoculadas con *G. intraradices*. Así mismo, la interacción mostró tener un efecto significativo en la acumulación de AS. En las plantas de cebada se detectaron por GC-MS cuatro compuestos de origen esteroideal. La inoculación con *A. brasilense* mostró efectos significativos en la acumulación de éstos compuestos de manera local y de manera sistémica. En el presente experimento se puede atribuir un mayor efecto en las variables evaluadas a la

inóculación con *A. brasilense*.

II. SUMMARY

Plants are exposed to a great variety of environmental stimuli. They often respond locally but are also capable of triggering long-distance signals that notice the status inside their organs. The arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus intraradices* has proved to induce the local accumulation of salicylic acid (SA) in barley plants, as well as to promote plant growth. In the other hand *A. brasilense* a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) induces increases in leaf size and grain and foliage nitrogen concentration, in cereals. The interaction between the AMF and PGPR results in systemic responses in the aerial tissues, this has been observed in physiologic events such as photosynthesis and plant development, it also promotes phosphorus (P) solubilization. The present work was planned to study the growth effects and the induction of systemic molecules in barley plants inoculated with *G. intraradices* and *A. brasilense*. A split root system was designed in order to study local and systemic effects of dual inoculation. Increases in root fresh and root dry weight were observed. AMF plants showed an increase in leaf fresh weight compared with the other treatments. The interaction between the microorganisms did not show significant effects in plant biomass. Also, the total amount of SA detected by HPLC in root barley plants increase locally due to the presence of the bacteria. Also, the interaction was shown to have a significant effect on SA accumulation. In barley plants four steroidal compounds were found in root extracts by GC-MS. The root inoculation with *A. brasilense* showed significant effects on the accumulation of these compounds locally and systemically. In the present experiment can be attributed a greater effect on the evaluated variables to inoculation with *A. brasilense*.

III. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de señalización son vitales para todos los organismos vivos. De manera particular las plantas utilizan señales para coordinar y ajustar su crecimiento en respuesta a señales internas como ambientales. Estas señales transmiten mensajes a través de la planta entera para mantener o lograr la homeostasis biológica. Las plantas utilizan ARN, proteínas, péptidos pequeños, lípidos y moléculas tales como el ácido salicílico (AS) en los procesos de señalización de larga distancia contra los patógenos, en respuesta al estrés ocasionado por numerosos factores bióticos y abióticos y en procesos relacionados al crecimiento y al desarrollo (Kassaw y Frugoli, 2012). En respuesta a los estímulos del medio ambiente las plantas responden comúnmente de manera local, pero además son capaces de integrar las señales internas que dan cuenta del estatus que impera en sus órganos de manera sistémica. Ésta respuesta sistémica requiere de rutas de señalización de larga distancia (Ruffel, 2008). A este respecto los sistemas de raíces divididas (split-root) son herramientas útiles en los estudios de respuesta sistémica, y señalización de larga distancia. Se ha reportado el efecto de microorganismos en el crecimiento y respuesta sistémica de especies vegetales, como es el caso de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) y de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). La asociación simbiótica que ocurre entre las plantas y el HMA *Glomus intraradices* resulta en un incremento neto en la fotosíntesis en las plantas y una fuerte demanda de carbono por parte el HMA. De esta manera aunque la presencia de los HMA ocurre solamente en una región de la raíz todas las partes de la planta son afectadas por la colonización del hongo (Raman y Selvaraj, 2006). Así mismo, la interacción de las plantas con la RPCV *Azospirillum brasilense* ha resultado en la mayoría de los estudios realizados con plantas gramíneas en incrementos en el tamaño de la hoja y desarrollo de las raíces y asimismo ejercer un efecto en la parte aérea de las plantas aunque solo se encuentra asociada a la raíz de las plantas. La cebada, un cultivo que resulta de importancia en México debido a que su superficie de cultivo se encuentra

ampliamente extendida (218 mil Ha) es una planta perteneciente a la familia de las Poaceas capaz de establecer de establecer interacciones simbióticas con *G. Intraradices* y con *A. brasilense* (SIAP, 2010). La mayoría de los estudios han reportado una sinérgia positiva entre *G. intraradices* y con *A. brasilense* en procesos cómo la fotosíntesis, desarrollo de la planta y el la toma de fósforo.

JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior, es necesario conocer los efectos de estos microorganismos y sus sinergias en el desarrollo de la planta de cebada, así como en la producción sistémica de AS y compuestos con potencial para la promoción del crecimiento vegetal.

3.1 RESPUESTA SISTÉMICA EN PLANTAS

Las respuestas de las plantas los estímulos del medio ambiente pueden ser localizadas o sistémicas. Existen varios ejemplos de la respuesta sistémica en plantas. Cuando una planta es atacada por un patógeno la resistencia que ocurre de manera local conlleva al desarrollo de una resistencia incrementada en los tejidos distales sanos (Conrath, 2006). En experimentos con injertos se ha demostrado que algunas formas de autorregulación son controladas por el tallo de las plantas (Catford *et al.*, 2003). A este respecto los sistemas de raíces divididas (split-root) son herramientas útiles en los estudios de respuesta sistémica, y señalización de larga distancia. En estudios de split-root se ha observado que durante la simbiosis de plantas de alfalfa con la bacteria fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* los nódulos existentes suprimen de manera sistémica la subsecuente formación de nódulos en otras partes de la raíz. Similarmente las raíces micorrizadas reducen las colonizaciones posteriores en otras partes del sistema radicular (Catford *et al.*, 2003). Así aunque la presencia de los HMA y de RPCV es sólo en una región de la raíz todas las partes de la planta son afectadas por la colonización del hongo y de la bacteria (Raman y Selvaraj, 2006).

3.2 CULTIVO DE CEBADA

El cultivo de cebada es uno de los más antiguos de la humanidad, su origen se remonta hacia 10 mil años. Es el quinto cultivo en orden de importancia en el mundo, después del trigo, maíz, frijol y la avena (Pourkheirandish y Komatsuda, 2007; Akar *et al.*, 2004).

Se encuentra muy extendido, aunque esta mejor adaptado a climas frescos y moderadamente secos. En las zonas templadas y frías alcanza de 70 a 110 cm de altura. Requiere pocas unidades de calor para alcanzar la madurez fisiológica (Tiwari, 2009; Mashayekhi *et al.*, 2005).

En México el cultivo de cebada se inició en los albores de la conquista española, sembrándose principalmente en los valles altos de la Nueva España, con resultados muy favorables (SAGARPA, 2005).

En la actualidad la producción se orienta principalmente a la elaboración de malta para la elaboración de cerveza (70%). La malta se usa también para la fabricación de productos alcohólicos destilados como el whisky, jarabes, en sustitutos de café y algunos alimentos a base de cereales. Algunos de los derivados de la malta son subproductos de la cerveza como alimento para animales, productos químicos y productos solubles agregables a alimentos balanceados para ganado y aves de corral. El 30% de la producción restante, corresponde a variedades que se utilizan fundamentalmente para alimentación de ganado (Akar *et al.*, 2004).

Los principales productores de cebada en México son Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Edo. de México y Michoacán. La superficie cosechada a nivel nacional en el ciclo agrícola del año 2011 fue de 218 mil Ha equivalente a un valor de producción estimado en 1,750 millones de pesos. En Michoacán la superficie cultivada para ese mismo año fue de 2,068 Ha estimada en 39,189 millones de

pesos. En el estado destacan en la producción de cebada los municipios de Vista Hermosa, Tanhuato, Pajacuarán y Yurécuaro (SIAP, 2012).

3.2.1 Clasificación taxónomica de la cebada (Gomez-Macpherson 2001)

Clase	Magnoliopsida
Superorden	Commelinanae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	Hordeum
Especie	vulgare (L.)

En general la planta de cebada se caracteriza por tener hojas lineares de 5- 15 mm de ancho que son producidas de manera alterna en el tallo, de color verde claro (Gomez-Macpherson, 2001).

Presenta un sistema radical fasciculado compuesto de tres a ocho raíces seminales, y un gran número de raíces adventicias. La profundidad de las raíces depende de la condición, textura y estructura de el suelo, así como de la temperatura. Las raíces más profundas son usualmente de origen seminal mientras que las capas superiores del suelo están comprimidas con las raíces adventicias de mas tarde desarrollo (White *et al.*, 2009; OGTR, 2008).

El tallo es erecto, grueso, formado por seis u ocho entrenudos. La altura depende de las variedades y oscila desde 0.50 cm a un metro. Las espiguillas se encuentran unidas directamente al raquis, dispuestas de forma que se recubren unas a otras (Tiwari, 2009) (Fig. 1).

Las flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas. El fruto es un cariósido, característico de esta familia (SIAP, 2012).

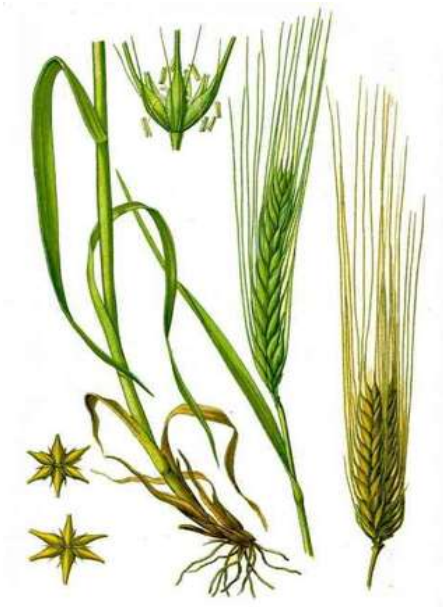


Figura 1. Planta de cebada

En la actualidad la cebada requiere cantidades importantes de insumos químicos para su cultivo, con los consecuentes daños ambientales y elevados costos de producción. De esta manera, el uso de estrategias amigables con el medio ambiente resulta imprescindible para la producción sustentable de este cultivo, además de ser un factor clave para elevar la rentabilidad en la producción agrícola (de-Bashan *et al.*, 2007).

La utilización de los microorganismos del suelo en los ecosistemas agrícolas ha probado ser una alternativa eficiente para promover el crecimiento vegetal y reducir el uso de fertilizantes químicos y pesticidas en los sistemas de producción (de-Bashan *et al.*, 2007).

A este respecto las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) juegan un papel clave en la promoción del crecimiento vegetal al mantener el estatus nutricional de las plantas y sintetizar

moléculas que estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta y funcionar como agentes de control biológico (de-Bashan, 2007; Lucy *et al.*, 2004).

3.3 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) son un grupo de bacterias que poseen la capacidad de inducir incrementos en el crecimiento y la producción vegetal. Los generos más reconocidos son *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Kennedy *et al.*, 2004).

Estas bacterias son capaces de solubilizar fosfatos, producir hormonas y fijar nitrógeno, mecanismos clave en la promoción del crecimiento vegetal. Favorecen la toma de agua y minerales, mejoran el desarrollo radicular que eventualmente conllevan a plantas más grandes, en muchos casos más productivas. Incrementan la actividad enzimática o actúan sinérgicamente con otros microorganismos benéficos. Además son capaces de suprimir fitopatógenos (de-Bashan *et al.*, 2007; Gamo, 1991; Hernández-Rodríguez y Heydrich-Pérez, 2005).

Azospirillum es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal de vida libre, capaz de afectar el crecimiento y rendimiento de numerosas especies, muchas de ellas de importancia ecológica y agronómica (Bashan *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2001; Perrig *et al.*, 2007).

Los estudios realizados con *Azospirillum* se han llevado a cabo principalmente en cereales y pastos (Dobbelaere *et al.*, 2001). En la mayoría se han reportado incrementos en el peso seco total, concentración de nitrógeno en el follaje y grano, número de espigas y granos por espiga, espigas fértiles y mazorcas; floración y aparición más temprana de espigas; altura y tamaño de la hoja y tasas de germinación (Massena *et al.*, 2011; Kapulnik *et al.*, 1981; Saubidet *et al.*, 2002).

Los efectos de la inoculación en la raíces de las plantas se han observado principalmente en parámetros morfológicos como son el incremento en la longitud (principalmente en la zona de elongación), en el número y longitud de raíces laterales, incremento en el volumen radicular, en el peso seco de la raíz, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, en el área de superficie radicular y en la promoción de la división celular (de-Bashan *et al.*, 2007; Tien *et al.*, 1979; Levanony y Bashan, 1989; Bashan y Holguin, 1996).

3.3.1 Producción de hormonas

El mecanismo más significativo para explicar la promoción del crecimiento en plantas por parte de las RPCV es la producción de hormonas (Spaepen *et al.*, 2008; Arshad y Frankenberger, 1991) a este respecto el estudio de la auxina ácido indol acético (AIA) ha sido significativo.

La producción de AIA por *A. Brasilense* en medio de cultivo, ocurre principalmente en la fase estacionaria, acumulándose hasta que la fase de muerte es alcanzada. Los niveles de AIA fluctúan en concordancia con la viabilidad celular (Malhotra y Srivastava, 2009).

La promoción del crecimiento de *A. Brasilense*, a través de los efectos producidos por el AIA, han sido estudiados en diversos modelos. En arroz, la adición del sobrenadante filtrado del medio de cultivo de *Azospirillum* a plantas, colocadas en un sistema hidróponico líquido, tuvo como resultado incrementos en la elongación, superficie y peso seco de la raíz y en el desarrollo de las raíces laterales y pelos radiculares comparados con las raíces control. El análisis de los sobrenadantes del medio de cultivo de *Azospirillum* dio como resultado cantidades altas de AIA (El-Khawas y Adachi, 1999).

En plántulas de maíz inoculadas con *A. Brasilense* se observó un incremento significativo en la superficie radicular, en comparación con las plantas no inoculadas.

La cuantificación por HPLC de AIA en el medio de crecimiento fue de 32 a 40 ng mL⁻¹. Dos semanas después de la inoculación con *A. Brasilense*, las raíces de las plantas de maíz mostraron niveles elevados de AIA libre y conjugado en comparación con las plantas control (Fallik *et al.*, 1989).

En trigo, la inoculación de una cepa silvestre de *A. brasilense* promovió la formación de pelos radiculares, mientras que una cepa mutante con capacidad reducida para producir AIA no fue capaz de inducir este incremento. Lo que probó un papel importante del AIA producido por *A. brasilense* en la alteración de morfología de la raíz en las plantas de trigo. Los análisis de la cosecha revelaron además que la cepa silvestre de *A. brasilense* produjo un incremento significativo en el peso fresco y seco y en el número de espigas, mientras que la cepa mutante fue menos efectiva o no fue diferente significativamente del control (Spaepen, 2008).

Se ha observado que la producción de giberilinas y citocininas en *Azospirillum* esta asociada al incremento significativo en el peso seco de raíces y parte aérea (Cassán *et al.*, 2008; Bottini *et al.*, 2004).

Las giberelinas (GAs) son una familia de compuestos responsables de la elongación del tallo y desarrollo de las plantas, específicamente en la germinación, floración y fructificación. Se sintetizan en los tejidos jóvenes del tallo y en las semillas en desarrollo. Su biosíntesis comienza en los cloroplastos y su transporte ocurre a través del floema y el xilema. Las giberelinas son capaces de estimular la elongación de los tallos a través de sus efectos en la división y la elongación celular. El compuesto que se encuentra más ampliamente disponible es el ácido giberélico (Davies, 1995).

La producción de las giberelinas GAI, GA3 e iso-GA3 fueron reportadas en medio de cultivo puro de *Azospirillum lipoferum* por Bottini y colaboradores (1989) concluyendo los autores que la identificación de éstas hormonas en los cultivos puros de *Azospirillum* proveen de una base mas sólida para explicar los efectos en la

promoción del crecimiento por efecto de la inoculación con *Azospirillum* en las plantas. Además se ha observado que los efectos de la inoculación con *Azospirillum* pueden ser mimetizados por la aplicación de Giberelinas.

Tien y colaboradores (1979) observaron en plantas de mijo (*Pennisetum glaucum*) crecidas en medio de cultivo líquido, efectos en la morfología de la raíz cuando fueron inoculadas con *A. brasilense*. El número de raíces laterales incrementó, así como la presencia de pelos radicales a diferencia de las plantas control que presentaron muy pocos o ningún pelo radical. Asimismo la combinación de AIA, giberelinas y cinetina produjeron cambios en la morfología de la raíz de las plantas de mijo similares a las observadas en las plantas inoculadas con *A. brasilense*.

3.3.2 Fijación de nitrógeno

Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico, ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas, y participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno. Después de la inoculación, hay un incremento en el nitrógeno total de brotes y granos de las plantas inoculadas. La contribución de la fijación de nitrógeno bacteriana al balance de nitrógeno de las plantas está fundamentada en el incremento significativo de la actividad de la nitrogenasa en las raíces. Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz indican que del 5 al 10% del nitrógeno total de la planta deriva de la fijación de nitrógeno (de-Bashan *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2009). Otros estudios han sido conducidos con *Azospirillum* como agente de biocontrol al promover el crecimiento vegetal indirectamente, al limitar la proliferación de fitopatógenos (Tortora y Díaz-Ricci, 2011).

3.3.3 Producción de sideróforos

La promoción bacteriana del crecimiento vegetal puede resultar por efecto de mecanismos directos e indirectos, que incluyen la producción de **sideróforos**. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (<1,500 Da) que poseen una alta afinidad hacia el hierro. Permiten a los microorganismos del suelo secuestrar y solubilizar el hierro ferrico en ambientes pobres. De esta manera las RPCV pueden favorecer el crecimiento vegetal al incrementar la disponibilidad de nutrientes a través de la toma del hierro, limitando el crecimiento de los patógenos del suelo debido a la limitación de este elemento (Tortora y Díaz-Ricci, 2011).

El AS es considerado una molécula capaz de quelar el hierro (Audenaert *et al.*, 2002; Adilakshmi *et al.*, 2000). La producción de ácido salicílico (AS) entre los sideróforos producidos por *A. lipoferum* en condiciones de déficit de hierro ha sido reportada (Saxena *et al.*, 1986; Shah *et al.*, 1992). Más recientemente Tortora y Díaz-Ricci (2011) documentaron la producción de AS en dos cepas de *A. brasilense* bajo condiciones limitantes de hierro. Relacionando la producción de AS a una actividad de protección contra el patógeno *Colletotrichum acutatum*, un patógeno de la fresa.

Las cantidades de AS producidas por *A. lipoferum* varían entre los reportados por Saxena y col. (1986) y Shah y col. (1992). Se ha estimado una producción desde 2-8 y 7-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en células obtenidas directamente del medio de cultivo sometidas a extracción ácida con etil acetato.

3.4 SIMBIOSIS MICORRÍZICA

El término simbiosis ha sido utilizado comúnmente para describir las asociaciones benéficas entre diferentes organismos. La asociación que ocurre entre ciertos hongos a la raíz de las plantas se conoce como simbiosis micorrízica. En esta asociación la localización del simbionte fúngico en la raíz y la conexión de sus hifas con el suelo asegura que el hongo logre influenciar la absorción de nutrientes provenientes del suelo, obteniendo a su vez carbono orgánico proveniente de la fotosíntesis de la planta. Esta transferencia de nutrientes bidireccional, es en muchos

casos la base de la relación mutualista (Allen, 2003). Se estima que más del 90% de las plantas forman asociaciones micorrízicas (Smith y Read, 1997). Entre ellas destaca la simbiosis micorrízica arbuscular que involucra a hongos pertenecientes al phylum Glomeromicota, con 150 especies descritas, y la raíz de plantas, entre las que se incluyen angiospermas, gimnospermas y pteridofitas así como las fases gametofitas de algunos musgos y lycopodos. Se calcula que dos tercios de todas las plantas terrestres son capaces de formar este tipo de asociación micorrízica de gran importancia ecológica (Redecker y Raab, 2006; Redecker *et al.*, 2000; Wang y Qiu, 2006).

Desde el punto de vista evolucionario los HMA son simbioses obligados que poseen hifas multinucleadas, cenocíticas, capaces de transportar organelos y nutrientes a grandes distancias (Kuhn *et al.*, 2001). La fase sexual del ciclo de vida no es conocida, sin embargo los procesos de anastomosis y movimiento nuclear entre las hifas ha sido descrito (Giovannetti *et al.*, 2001).

El HMA *G. intraradices* es una especie que se encuentra presente en diferentes ecosistemas alrededor del mundo incluyendo localidades tropicales y templadas (Smith y Read, 1997). Es capaz de colonizar un gran número de plantas, incluyendo especies de importancia agrícola como el trigo, alfalfa, arroz, cebada, así como en plantas modelo de estudio. Es uno de los HMA más comúnmente estudiados debido a su rápida capacidad de colonización. Es el ingrediente principal en numerosos inoculos comerciales. Además, puede ser cultivado *in vitro* en un cultivo dual con raíces de zanahoria transformadas. Es de las únicas especies cuyas esporas están disponibles comercialmente de forma pura y en grandes cantidades. Esto ha conducido a que esta sea la especie de HMA que posea la secuencia genómica mejor estudiada (Martin *et al.*, 2008).

Glumus intraradices ha sido recientemente reclasificado dentro del género *Rhizophagus*. De acuerdo al International Code of Botanical Nomenclature su

nombre inicial *G. intraradices* es aceptado para hacer referencia a esta especie, en este trabajo se hará referencia a su nombre inicial (IAPT, 2006).

3.4.1 Clasificación de *G. intraradices* (Walker y Schuessler, 2010)

Phylum	Glomeromycota
Clase	Glomeromycetes
Orden	Glomerales
Familia	Glomeraceae
Género	<i>Rhizophagus</i>
Especie	<i>intraradices</i>

3.4.2 Anatomía y colonización de *G. intraradices*

La colonización de *G. intraradices* puede darse a partir de tres fuentes de inóculo: esporas, hifas y fragmentos de raíz infectados llamadas colectivamente propágulos (Smith y Read, 1997).

Esporas. Miden entre 70 y 130 μm de diámetro, poseen paredes celulares gruesas y resistentes. Contienen grandes cantidades de núcleos y de lípidos y carbohidratos de reserva. Son consideradas estructuras de supervivencia a largo plazo, con capacidad para ser dispersadas por agua y viento (INVAM, 2012; Marleau *et al.*, 2011).

Germinación y crecimiento de las hifas. Las esporas germinan en el suelo y junto con los fragmentos de raíces infectados son capaces de producir pequeñas cantidades de micelio de 20 a 30 mm por espora. Una cantidad significativa de micelio solo se forma cuando una colonización exitosa de un sistema radicular ocurre, sí la espora se desprende de la hifa antes de que esta última alcance a formar un austorio, el crecimiento de la hifa cesa (Smith y Read, 1997).

Vesículas. Las vesículas al igual que las esporas almacenan grandes cantidades de lípidos de reserva y poseen un gran número de núcleos, sus paredes celulares gruesas sugieren una función de propágulos o de soporte al crecimiento de las hifas intercelulares.

Arbúsculos. Son el principal sitio de intercambio de nutrientes entre la planta hospedera y el HMA. Durante la colonización el arbúsculo ocupa una porción considerable en la célula cortical de la planta, se encuentra separado del protoplasto por una extensión de la membrana plasmática de la célula, denominada membrana periárbuscular. Aunque se origina de la membrana plasmática de la planta, la membrana periárbuscular exhibe diferentes propiedades. En particular se ha observado que los transportadores de fosfato están localizados específicamente en la membrana periárbuscular. Además de una alta actividad de la ATPasa acompañada de un pH altamente ácido del espacio que separa las membranas plasmáticas del hongo y de la planta (Hause y Fester, 2005) (Fig 2).

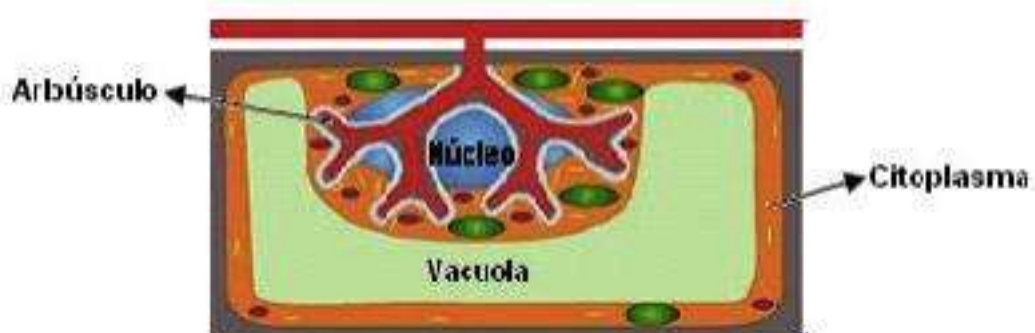


Figura 2. Arbúsculo dentro de una célula cortical (tomado de Hause y Fester 2005).

Colonización. El desarrollo del HMA comienza con la germinación de la hifa a partir de una espora. En ausencia de una planta hospedera, el HMA desarrollará un crecimiento limitado, por el contrario si se encuentra en presencia de exudados radiculares la hifa incrementará significativamente su crecimiento y ramificación. La

reacción presimbiótica esta caracterizada por la activación de genes específicos seguido de cambios fisiológicos y morfológicos. Por su parte las esporas en proceso de germinación producen factores que son percibidos por las plantas, lo que conduce a la expresión de genes específicos aún en ausencia de un contacto físico directo (Hause y Fester, 2005; Denison y Kiers, 2011).

Posterior al primer contacto entre la hifa y la raíz de las plantas, el hongo forma un apresorio y subsecuentemente penetra la superficie de la raíz colonizando los espacios intercelulares de la corteza de la raíz. Una vez que la hifa es capaz de penetrar las capas corticales internas se forman los arbusculos en células individuales, a través de un proceso de ramificación dicotómico de una hifa fúngica. Los arbusculos representan la fase final del crecimiento del HMA, finalmente senescen y colapsan 4 a 10 días posteriores al inicio de simbiosis (Bonfante y Perotto, 1995). Las estructuras fúngicas son degradadas por completo por la célula de la planta, recobrando su morfología original. De esta manera las células corticales pueden permitir una segunda penetración y formación de arbusculos. El ciclo de vida del HMA finaliza con la formación de esporas extraradicales, que pueden dar inicio a otro proceso de colonización (Bonfante *et al.*, 2000) (Fig. 3).

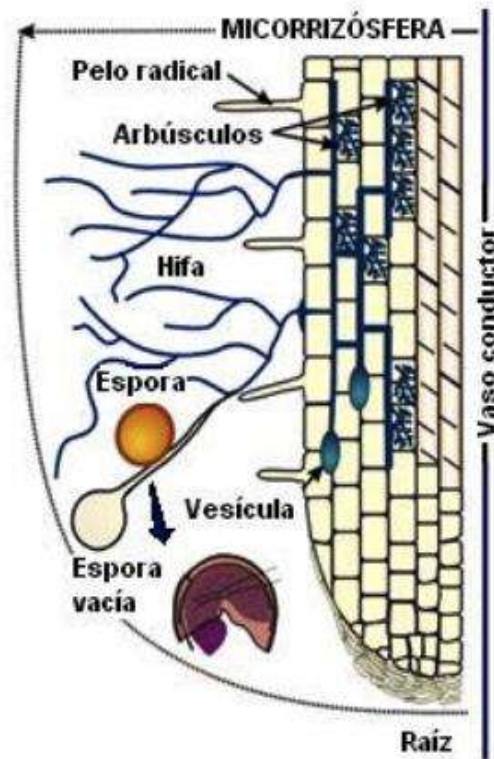


Figura 3. Proceso de colonización de un HMA (tomado de Hause y Fester, 2005).

3.4.3 Los hongos micorrízicos y la promoción del crecimiento vegetal

El término de promoción vegetal es usado para describir el incremento en el crecimiento de las plantas que ocurre a partir de la inoculación con ciertas especies de organismos que colonizan la raíz de las plantas (Raman y Selvaraj, 2006).

La colonización de los HMA resulta en la promoción del crecimiento de las plantas al favorecer la toma de nutrientes que no se encuentran disponibles. Se han documentado sus efectos en el incremento en la toma de P, Zn, Cu, Ni; así como N. La evidencia de que las raíces micorrizadas son más eficientes en la toma de nutrientes que las raíces no colonizadas proviene del hecho de que las plantas micorrizadas son frecuentemente más grandes y contienen altas concentraciones de P en sus tejidos que las plantas control (Smith y Read, 1997).

Los HMA son altamente efectivos en la movilización, toma y transporte de nitrógeno, desde el suelo hacia las plantas. La disponibilidad del nitrógeno frecuentemente limita el crecimiento vegetal y dependiendo de las condiciones del suelo la transferencia de nitrógeno por el HMA puede representar una ruta significativa de toma por las plantas. En este proceso intervienen las enzimas nitrato reductasa y las enzimas de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) (Govindarajulu, 2005).

3.4.4 Los hongos micorrízicos y producción de compuestos que intervienen en los mecanismos de la resistencia inducida

Existen diversos reportes acerca de la acumulación de AS en diferentes plantas por efecto de la inoculación con HMA (Blilou *et al.*, 2000 a; Blilou *et al.*, 2000 b; Herrera *et al.*, 2003). Relacionándose el grado de colonización a un mayor contenido de AS (Khaosaad *et al.*, 2007). Aún entre plantas pertenecientes a la misma especie pero no a la misma variedad, la cantidad de AS inducida por HMA es variada. En plantas de tabaco inoculadas con *Glomus mosseae* se reportan cantidades de AS que van desde 70 ng g⁻¹ de peso fresco (Blilou *et al.*, 2000 a) hasta 0.2 µg g⁻¹ de peso fresco (Herrera-Medina *et al.*, 2003). Estos estudios se han realizado con el objetivo de estudiar el papel del AS en las respuestas de defensa desencadenadas por efecto de la asociación MA (Herrera-Medina *et al.*, 2003).

Entre estas respuestas se ha documentado la relación que existe entre el contenido de AS y el incremento de la actividad de las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa, enzimas clave en el estrés oxidativo (Blilou *et al.*, 2000 a).

3.5 ÁCIDO SALICÍLICO

El ácido salicílico es un compuesto fenólico sintetizado por las plantas (Raskin, 1992). Tiene influencia en procesos fisiológicos como la germinación, el

establecimiento de las plántulas, la respiración, el cierre estomático, las respuestas al estrés abiótico, la nodulación en las leguminosas y en el rendimiento de los frutos. Su efecto en algunos de estos procesos es indirecto debido a que el AS altera la síntesis o señalización de otras hormonas vegetales como el ácido jasmónico, el etileno y algunas auxinas. Además el AS funciona como una molécula de señalización regulando la termogénesis y la resistencia a enfermedades (Raskin *et al.*, 1989; Malamy *et al.*, 1992; Klessig y Malamy, 1994; Metwally *et al.*, 2003).

3.5.2 Metabolismo del ácido salicílico

En la plantas el AS puede ser generado por dos vías enzimáticas distintas, que requieren al metabolito primario corismato (Wildermuth, 2006). El corismato deriva de la 1-fenilalanina y puede ser convertido en AS por vía de los intermediarios del benzoato o del ácido cumárico a través de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas inicialmente por la enzima FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL por sus siglas en inglés). El corismato puede además ser convertido en AS vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que involucra a las enzimas ISOCORISMATO SINTASA (ICS) e ISOCORISMATO PIRUVATO LIASA (IPL) (Strawn *et al.*, 2007): en mutantes de *Arabidopsis* que carecen de la enzima ICS1 la producción de AS, así como la resistencia ante los patógenos, se ve seriamente comprometida (Fig. 4) (Garcion *et al.*, 2008).

La mayor parte del AS producido en la planta es convertido en AS O- β glucósido (ASG) por la enzima AS glucosiltransferasa (ASGT), inducible por patógenos (Lee y Raskin, 1998). Existen dos tipos de enzimas ASGT, una convierte principalmente AS en ASG, mientras que la otra enzima forma un derivado menos abundante, el salicilol glucosil ester (SGE) (Dean y Delaney, 2008). El AS es comúnmente sintetizado en los cloroplastos (Garcion *et al.*, 2008) mientras que la ASGT parece estar localizada en el citosol (Dean *et al.*, 2005). El ASG es transportado activamente desde el citosol a la vacuola donde es almacenado en su forma inactiva, que puede ser nuevamente convertido en AS, si así se requiere

(Hennig *et al.*, 1993). El MeSA y/o su derivado glucosilado MeSAG pueden acumularse también en altas concentraciones.

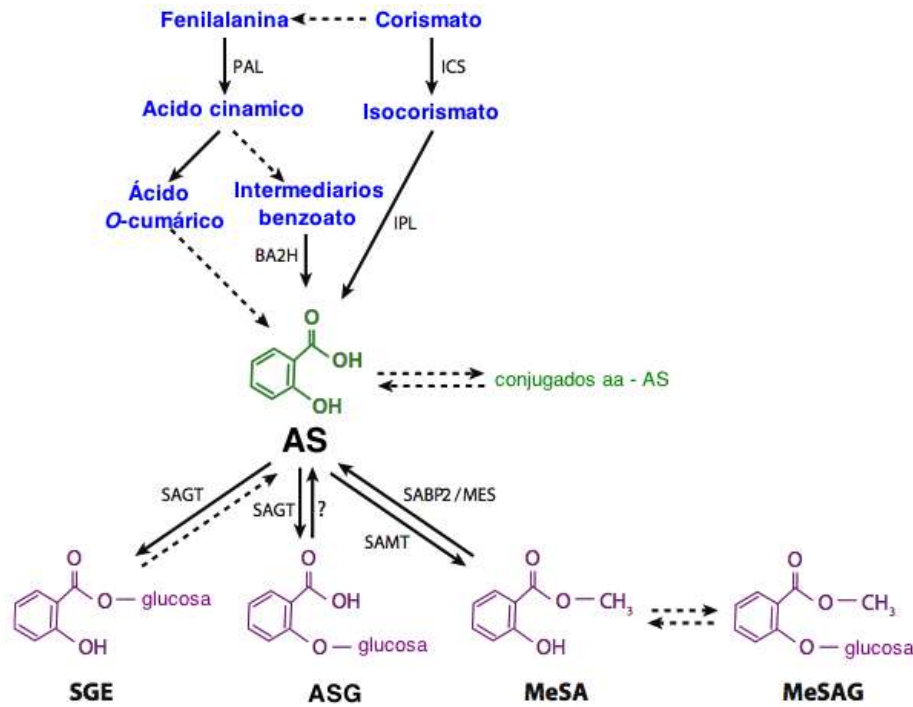


Figura 4. Rutas de biosíntesis del AS. Abreviaciones: PAL, Fenilalanina Amonio Liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, Isocorismato piruvato liasa; BA2H, Ácido benzoico hidrolasa; AS, Ácido salicílico; SAGT, AS glucosil transferasa; aa, aminoácido; SAMT, AS metil transferasa; SABP2, proteína de unión al AS 2; MES, metil estereasa ; SGE, saliciloil-glucosa ester; ASG, AS O-β-glucósido; MeSA, metil salicilato; MeSAG metil-salicilato O-β-glucósido (tomado de Vlot *et al.*, 2009).

3.5.3 El Ácido salicílico es una señal endógena de la resistencia.

White y colaboradores sugirieron por primera vez en 1979, que el AS tiene un papel importante en la señalización de la resistencia a las enfermedades en plantas. Al inyectar AS o aspirina a las hojas de tabaco resistente observaron un incremento en la acumulación de proteínas PR y en la resistencia a la infección por el virus del mosaico del tabaco (VMT), manifestado por la reducción del 90% en el número de lesiones causadas por el patógeno (Klessig y Malamy, 1994). Subsecuentemente se

encontró que el tratamiento con AS, inducía la expresión de los genes de resistencia PR a virus, bacterias y patógenos fúngicos en muchas especies de plantas (Vlot *et al.*, 2008).

Inicialmente se propuso que el AS actuaba mimetizando una señal endógena fenólica para el desarrollo de la resistencia; sin embargo los análisis de los niveles de AS en pepino y tabaco sugerían que el AS era de hecho la señal de defensa (Dempsey *et al.*, 1999). En plantas de tabaco resistentes pero no susceptibles al VMT, los niveles de AS aumentaron más de 20 veces en las hojas inoculadas y más de 5 veces en las hojas sistémicas, en ambos conjuntos de hojas estos incrementos precedieron o sucedieron al mismo tiempo que la expresión de genes PR (Durner *et al.*, 1997). Similarmente, los niveles de AS incrementaron 10 a 100 veces en los exudados del floema de plantas de pepino inoculadas con el VMT ó *Pseudomonas syringae*. Estos incrementos precedieron el desarrollo de la RSA e indujeron la acumulación de una peroxidasa cuya actividad esta asociada a la defensa en plantas (Rasmussen *et al.*, 1991).

La evidencia más fuerte que soporta el rol del AS como una molécula señal de importancia crítica, proviene del análisis de plantas en las que los niveles de AS endógeno fueron alterados (Malamy *et al.*, 1992). El primero de estos estudios se realizó a partir de plantas transgénicas de tabaco ó *Arabidopsis* que fueron diseñadas para expresar el gen bacteriano nahG, este gen codifica la enzima salicilato hidroxilasa cuya función es la de metabolizar el AS. Posterior al ataque por un patógeno estas plantas fueron incapaces de producir grandes cantidades de AS, de desarrollar la RSA o expresar los genes PR en las hojas sistémicas, por el contrario mostraron una alta susceptibilidad hacia patógenos virulentos y avirulentos. El tratamiento con ácido 2,6-dichloro-isonicotínico (AIN) un análogo sintético del AS, restableció en estas plantas la resistencia a enfermedades así como la expresión de los genes PR (Delaney *et al.*, 1994). En contraste, la sobreexpresión en tabaco transgénico, de AS bacteriano en genes biosintéticos confirieron grandes cantidades

de AS, una expresión constitutiva de genes PR y un aumento en la resistencia (Verbene *et al.*, 2000).

IV. HIPÓTESIS

La interacción entre *Glomus intraradices* y *Azospirillum brasilense* induce la producción sistémica de AS y de compuestos con potencial estimulador del crecimiento en plantas de cebada.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar en un sistema de “*split root*” el efecto de la interacción entre *G. intraradices* y *A. brasilense* sobre el crecimiento y la producción sistémica de AS y compuestos con potencial promotor de crecimiento en plantas de cebada.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el crecimiento de plantas de cebada inoculadas con *G. intraradices* y *A. brasilense* solos o en interacción.

2. Detectar por CG-EM los niveles de compuestos con potencial promotor del crecimiento en plantas de cebada inoculadas con *G. intraradices* y *A. brasilense* solos o en interacción.

3. Determinar en HPLC los niveles de AS total en plantas de cebada inoculadas con *G. intraradices* y *A. brasilense* solos o en interacción .

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) var. Esperanza, desinfectadas superficialmente con etanol y germinadas en un sustrato compuesto por una mezcla de turba-agrolita en una relación 1:2, previamente esterilizado en olla de presión a 121 °C. Después de cinco días las plantas fueron transferidas a un sistema de raíces divididas. Este sistema consistió de dos recipientes de 220 mL de volumen unidos por sus lados, cada recipiente contenía la mitad de la raíz de la planta de cebada. Un solo lado (el lado proximal) del sistema de raíces divididas fue inoculado directamente sobre la raíz con *G. intraradices*, *A. brasilense* o ambos, sin inocular el otro lado (lado distal).

El inóculo de *G. intraradices* consistió en 100 esporas por planta. Provenientes de cultivos puros *in vitro* mantenidos en el laboratorio de Interacción Planta Suelo Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. El inóculo de *A. brasilense* se aplicó a una concentración de 5×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹). Proporcionado por el Centro de Investigación y Producción Biosustenta (CINBIOS), proveniente de cultivos puros.

El experimento se llevó a cabo durante siete semanas bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento (temperatura 26 °C, humedad relativa 75% y fotoperiodo de 14h). Las plantas fueron regadas con una solución nutritiva de Hoagland cada tres días (Tabla 1).

Tabla 1. Solución nutritiva Hoagland

NUTRIENTE	g L ⁻¹ solución nutritiva
KH ₂ PO ₄	6.8 x 10 ⁻⁴
K ₂ SO ₄	0.2526
CaSO ₄	0.2582
MgSO ₄	0.3697
EDTA	0.011655
Ca(NO ₃) 4 H ₂ O	0.1180

MICROELEMENTOS	
MnSO ₄	6.4 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄	3 x 10 ⁻⁷
ZnSO ₄	2.17 x 10 ⁻⁵
H ₃ BO ₄	2.23 x 10 ⁻⁵
(Na) ₂ Mo ₇ O ₂₄	2.7 x 10 ⁻⁶

6.1 Diseño experimental

Se establecieron cuatro tratamientos (Tabl 2) con 25 repeticiones cada uno, en un diseño completamente al azar. Cada unidad experimental en el sistema de raíces divididas consistió de una planta.

Tabla 2. Determinación del efecto de la interacción *G. intraradices*-*A. brasilense* sobre la producción sistémica de AS total y de compuestos con potencial estimulador del crecimiento.

TRATAMIENTOS	Lado próximal	Lado distal
1. Control	-	-
2. <i>G. Intraradices</i>	+	-
3. <i>A. brasilense</i>	+	-
4. <i>G. Intraradices</i> y <i>A. brasilense</i>	+	-

Las plantas de cebada fueron cosechadas a las siete semanas de inoculación con *G. intraradices* y *A. brasilense*. Se evaluaron las siguientes variables:

1. Porcentaje de colonización de *G. intraradices* y las UFC mL⁻¹ de *A. brasilense* en la raíz de las plantas de cebada.
2. Peso fresco y seco de la raíz y parte aérea.
3. Determinación de compuestos con actividad sistémica en la raíz de las plantas de cebada por GC-MS y

4. Concentración de AS total por HPLC en raíz

Porcentaje de colonización de *G. intraradices* en las raíces de las plantas de cebada

Las raíces de las plantas de cebada se tiñeron de acuerdo a la técnica propuesta por Vierheilig (1998). Esta técnica consiste en decolorar las raíces hirviéndolas en hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Después de varios lavados las raíces se hirvieron durante 3 minutos en una solución de tinta y vinagre al 5%. Las raíces se lavaron nuevamente para eliminar el exceso de colorante y se observaron al microscopio (Leica DM 750) para realizar la determinación del porcentaje de colonización.

Número de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) en la raíz de plantas de cebada

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) en la raíz de las plantas de cebada se usó el método de conteo por dilución en placa. El método consistió en sacar la planta de la maceta, eliminando la tierra de la raíz. Una porción de raíz se colocó en un microtubo con 500 µL de medio LB y se agitó vigorosamente. De esta solución se realizó una dilución 10⁻³. Se tomaron 10 µL de la dilución 10⁻³ y se colocaron en una caja con medio LB sólido con tetraciclina. Se espatuló la muestra con asa de vidrio. Posteriormente las cajas se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 24 h. Finalmente se realizó el conteo de las UFC en las cajas.

Peso fresco y seco

El peso fresco de la parte aérea y raíz se determinaron en una balanza (Adeventurer OHAUS) posteriormente las muestras se llevaron a secar al horno a

una temperatura de 60 °C durante 24 h y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco.

Extractos de raíz y análisis por GC-MS

Para la extracción se utilizaron 0.140 g de material fresco de raíz. La raíz se homogenizó en mortero con nitrógeno líquido y de 500 µL de una solución de isopropanol/H₂O/HCl concentrado (2:1:0.002 v/v). El homogenizado se centrifugo a 11,500 g durante tres minutos en una centrifuga Thermo SCIENTIFIC (SL 40R). El sobrenadante se recuperó y se sometio a reextracción con 200 µL de diclorometano. La muestra fue derivatizada con cloruro de acetato en metanol (1 mL/250 mL), sonicado por 15 minutos y calentado durante una hora a 75 °C. Posteriormente la muestra fue evaporada y resuspendida en 1 mL de acetato de etilo para el análisis por GC-MS.

Análisis por cromatografía de gases-espectometria de masas (GC-MS).

Se utilizó un cromatografo de gases en el modo impacto por electrón, con una energía de electrón de 70 eV. Los analitos fueron separados utilizando una columna HP5 (Agilent). Las muestras fueron inyectadas en modo splitless. La temperatura del horno fue inicialmente ajustada a 100 °C por 2 minutos, posteriormente se programó a 15 °C min⁻¹ hasta 300 °C mantenidos durante 10 min. Helio (99.99%) fue utilizado como acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹. El análisis cuantitativo se desarrolló en el modo full-scan con rango de masa de 45-500 a.m.u.

Determinación de la concentración de ácido salicílico en la raíz de plantas de cebada.

Para la determinación de la concentración de ácido salicílico total las raíces de las plantas de cebada fueron lavadas con agua y colocadas en nitrógeno líquido. El ácido salicílico total fue extraído y cuantificado por cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de acuerdo a la técnica descrita por Malamy y colaboradores (1992).

Extracción de AS total

La técnica de extracción consistió en homogenizar 0.4 g de raíz en mortero con nitrógeno líquido y 4 mL de metanol al 100%. El homogenizado fue centrifugado a 9000 g x 15 min en una centrifuga Thermo SCIENTIFIC (SL 40 R). El sólido fue reextraído con 2 mL de metanol al 100%. Ambos sobrenadantes se unieron y secaron al vacío a 40 °C en speed vac (Savant ISS110). El precipitado se resuspendió en 4 mL de agua grado HPLC a 80 °C. Para la determinación de AS total se añadieron 2 mL del buffer acetato de sodio a un pH de 4.5 que contenía 2 U mL⁻¹ de la enzima β-glucosidasa. El extracto fue incubado a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente fue acidificado a pH 1 utilizando 50 μL HCl mL⁻¹ de extracto. Posteriormente se realizaron 2 extracciones consecutivas con 2 mL de la mezcla de acetato de etilo:ciclopentano:isopropanol (50:50:1). La fase orgánica de ambas extracciones (fase superior) se juntó y secó al vacío a 40 °C. El precipitado se resuspendió en 1000 μL de metanol y fue analizado por HPLC.

Análisis de AS por HPLC

Se inyectaron 25 μL del extracto de AS total en una columna C18 de fase reversa, a una temperatura de 40 °C. La fase móvil consistió en una solución de Metanol 30% en Ac. Acético 1% (v:v), con un flujo de 1 mL min⁻¹. La longitud de onda del detector UV-VIS (HITACHI) fue establecida en 325 nm.

Para determinar la concentración de AS, se utilizó una curva patrón preparada con AS (0 a 1000 ng mL⁻¹).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de Tukey para las comparaciones múltiples, utilizando el paquete estadístico Graph Path Prism, Version 5.0b para MAC OS X.

VII. RESULTADOS

Efecto de la interacción de *G. intraradices* y *A. brasilense* en el crecimiento de las plantas de cebada

A los 49 días de crecimiento en un sistema de **split root**, las plantas de cebada mostraron diferencias entre los tratamientos. Las plantas inoculadas con *G. intraradices* incrementaron la biomasa aérea significativamente respecto de los demás tratamientos, mientras que en la raíz los incrementos en el peso fresco se asociaron a la inoculación con *A. brasilense* (Fig. 5).

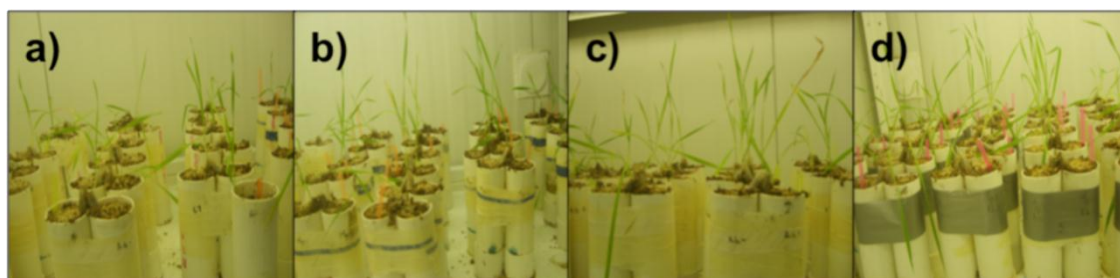


Figura 5. Plantas de cebada a las siete semanas de crecimiento en un sistema de split-root: a) Control, b) *G.intraradices*, c) *A. brasilense* d) Inoculación dual

Efecto de la colonización de *G. intraradices* y *A. brasilense* en el crecimiento de la planta

A los 49 días del trasplante, se encontró en la raíz de las plantas inoculadas con *G. intraradices* un porcentaje medio de colonización del 28% y de 24% en las plantas del tratamiento que contenía la interacción. En el tratamiento control no se detectó la presencia del HMA (tabla 2). Se observaron estructuras específicas de los HMA en la raíz de las plantas inoculadas, como arbuscúlos y vesículas e hifas (Fig. 6). Estas estructuras dieron muestra de una colonización exitosa por parte del hongo. La colonización micorrízica resultó en un efecto significativo en el peso fresco de la parte aérea de las plantas de cebada (Fig 8). Sin embargo se observó una

disminución en el crecimiento de la raíz, por efecto del hongo en el lado proximal. En el peso seco de la parte aérea, no se observaron diferencias estadísticamente significativas por efecto de la inoculación de los microorganismos, observándose tendencias muy similares en todos los tratamientos (Fig. 13).

Tabla 3. Colonización de *G. intraradices* y *A. brasilense* en la raíz de las plantas de cebada, a los 49 días de crecimiento en un sistema de raíces divididas.

Colonización	Control	+ <i>G.i.</i>		+ <i>A. b.</i>		+ <i>G.i</i> + <i>A.b</i>	
		proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
HMA %	nd	28.7 ± 0.4	nd	nd	nd	24.25 ± 0.95	nd
RPCV (UFC x10 ⁵ mL ⁻¹)	nd	nd	nd	3.5 a	0.11 c	0.61 b	0.012 c

Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos P=000.1

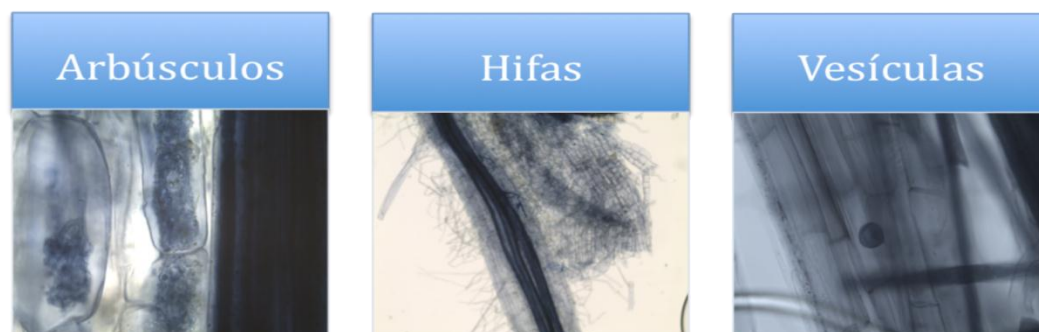


Figura 6. Estructuras características de los HMA en las raíces de cebada. Resolución 100x, 10 x y 40 x de izquierda a derecha.

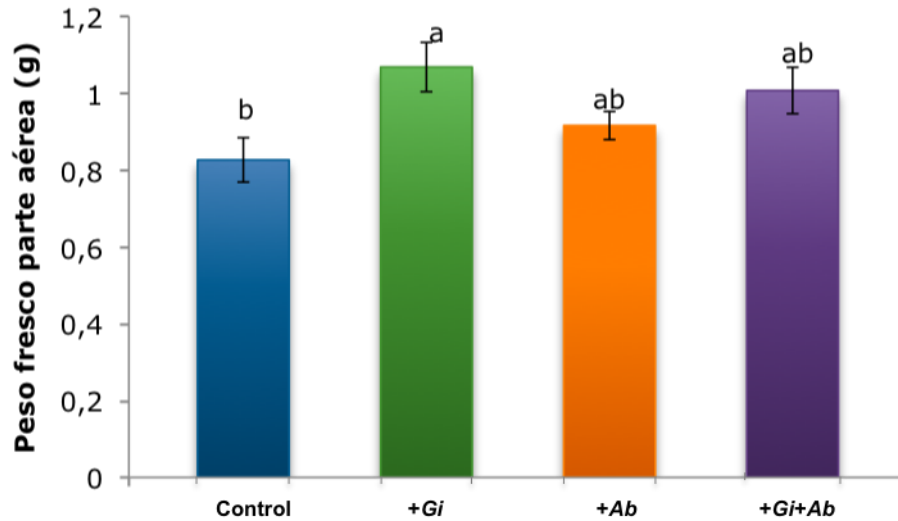


Figura 7. Peso fresco de la parte aérea de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) inoculadas con *G. Intraradices*, *A. Brasilense*, solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0492$).

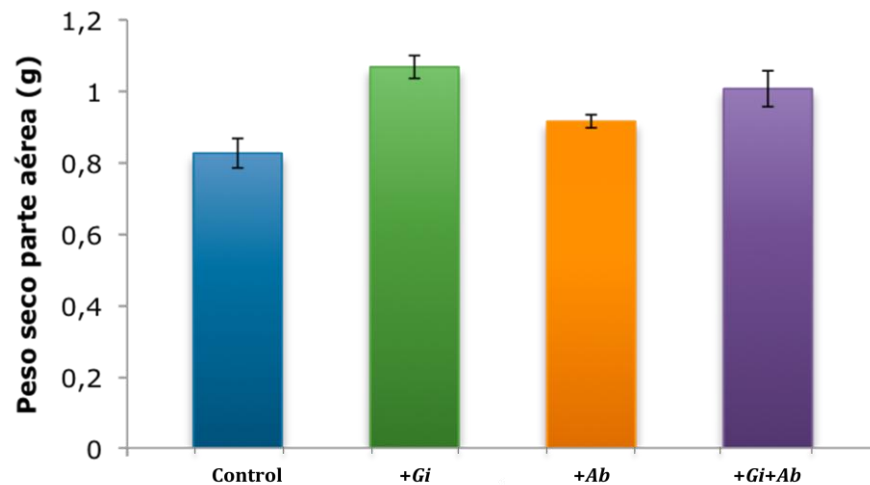


Figura 8. Peso seco de la parte aérea de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) inoculadas con *G. Intraradices*, *A. Brasilense* solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root.

En cuanto a la colonización bacteriana en el lado proximal de las plantas de cebada inoculadas con *A. brasilense* se encontraron 3.5×10^5 UFC mL⁻¹ en tanto que en el lado distal se detectó una concentración de 1.1×10^4 UFC mL⁻¹. Las plantas que fueron inoculadas con ambos microorganismos presentaron una concentración de 6.1×10^4 UFC mL⁻¹ en el lado proximal, mientras que la concentración se redujó hasta 1.2×10^3 UFC mL⁻¹ en el lado distal. En el tratamiento control y con *G. intraradices* no se detectó la presencia de la rizobacteria (Tabla 2).

Una de las principales características de *A. brasilense* es inducir el crecimiento vegetal, en este experimento este mecanismo de promoción se observó en el peso fresco de raíz (Fig. 9). La inoculación con *A. brasilense* resultó en un incremento estadísticamente significativo ($P=0.0041$) del peso fresco de raíz de las plantas de cebada, respecto de las plantas control y las inoculadas con *G. intraradices* en el lado proximal.

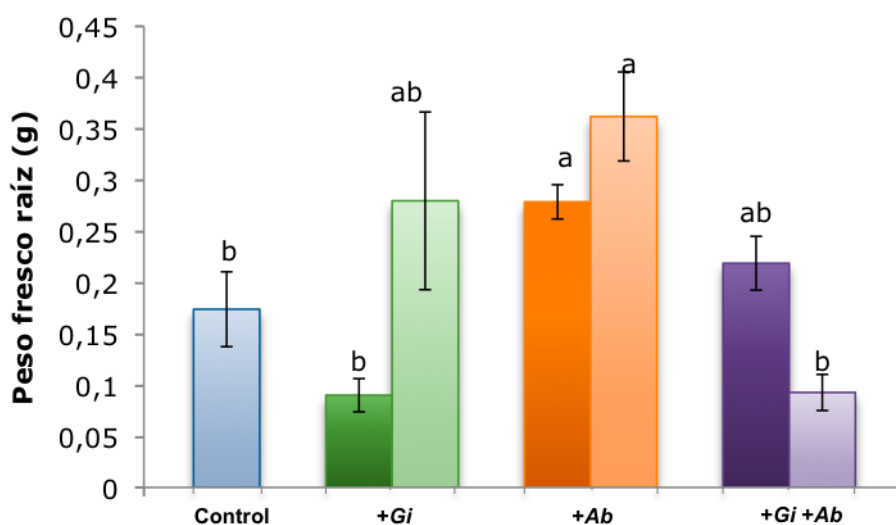


Figura 9. Peso fresco de raíz de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) inoculadas con *G. Intraradices*, *A. Brasilense*, solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de split-root (lado proximal: color intenso; lado distal: color tenue). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

Este efecto se observó de manera sistémica y no fue asociado con un crecimiento sistémico de la bacteria; por otra parte, la interacción de los microorganismos en el lado proximal del sistema *split root* no tuvo efecto significativo en esta variable. En el presente ensayo no se asociaron estos incrementos en peso fresco al aumento de poblaciones de la bacteria, debido a que las poblaciones de esta disminuyeron significativamente en el lado distal, lo que sugiere que los efectos en el lado distal en el peso fresco de la raíz pudieron deberse al efecto sistémico de algún metabolito.

Una tendencia similar se observó en el peso seco de la raíz donde los valores más altos de peso seco se observaron en el sistema *split root* inoculado con *A. brasilense*. Sin embargo, debido a la variabilidad del sistema, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0259$) en el peso seco de la raíz distal de las plantas inoculadas con *A. brasilense* respecto de las plantas inoculadas con *G. intraradices* en el lado próximal de la raíz (Fig. 10).

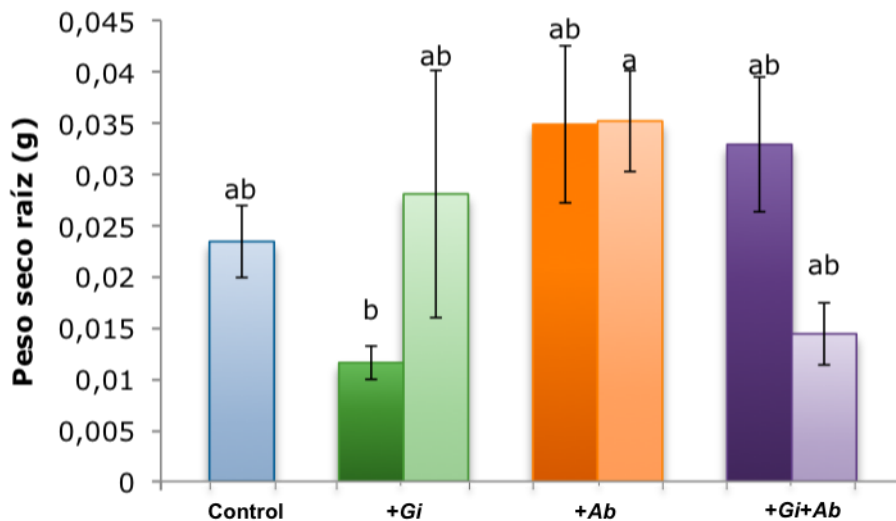


Figura 10. Peso seco de raíz de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) inoculadas con *G. Intraradices*, *A. Brasilense*, solos o en interacción, a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de *split-root* (lado proximal: color intenso;

lado distal: color tenue). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

Efecto de la interacción de *G. Intraradices* y *A. brasilense* en la concentración local y sistémica de moléculas con potencial promotor del crecimiento en la raíz de las plantas de cebada.

En la raíz de las plantas de cebada se detectaron 4 compuestos de estructura estereoidal correspondientes a los tiempos de retención siguientes: 11.174, 9.96, 10.148, y 10.585 min (tabla 4).

La importancia de los esteroides radica en que están presentes en todos los organismos eucariotes y son componentes que regulan la fluidez y permeabilidad de las bicapas fosfolipídicas de las membranas celulares. Además los esteroides son los precursores en la biosíntesis de los brasinoesteroides. Los brasinoesteroides son considerados reguladores internos esenciales; juegan un papel importante en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, el crecimiento celular y la fertilidad de la planta (Schumacher y Chory, 2000; Schaller, 2003).

La abundancia de cada uno de los compuestos esteroidales fue diferente entre los tratamientos establecidos. Específicamente la inoculación con *A. brasilense* indujo la acumulación de manera sistémica de varios de los compuestos de origen estereoidal respecto de las plantas inoculadas con *G. intraradices* y las plantas control (Tabla 4).

El compuesto que mostró mayor similitud a la estructura estereoidal fue el compuesto de tiempo de retención de 11.174 min. La rizobacteria produjo un incremento en la concentración de este compuesto de manera local y sistémica respecto de los demás tratamientos. Sin embargo la interacción no mostró tener efectos significativos en la concentración de esta molécula (Tabla 4).

La molécula correspondiente a un tiempo de retención de 9.96 incrementó su concentración de manera significativa en el lado distal de las plantas inoculadas con *A. brasilense* y de manera local en el tratamiento de la interacción. Estos incrementos fueron diferentes estadísticamente respecto del tratamiento control y del inoculado con *G. intraradices* (Tabla 4).

El compuesto con tiempo de retención de 10.148 min. tuvo un comportamiento similar al compuesto anterior. Las plantas inoculadas con *A. brasilense* presentaron una mayor cantidad de este compuesto. Encontrándose diferencias estadísticamente significativas en las plantas que fueron inoculadas con *A. brasilense* y la interacción de ambos microorganismos, respecto de las plantas control y las inoculadas sólo con *G. intraradices* (Tabla 4).

Las plantas inoculadas con *A. brasilense* presentaron una mayor cantidad del compuesto esteroidal de tiempo de retención de 10.585 min. Este incremento fue significativo solo en lado distal respecto del lado distal del tratamiento inoculado con *G. intraradices* (Tabla 4).

Tabla 4. Compuestos de origen esteroidal determinados en la raíz de las plantas inoculadas con *G. intraradices* y *A. brasilense* a las 7 semanas de crecimiento (media \pm EE).

Tiempo de retención (min)	Control	+ <i>G.i.</i>		+ <i>A. b.</i>		+ <i>G.i</i> + <i>A.b</i>	
		próximo	distal	próximo	distal	próximo	distal
11.174 (34.5%)	22 \pm 8.1 b	17 \pm 2.5 b	nd	161 \pm 39 a	162 \pm 14 a	120 \pm 4.5 ab	166 \pm 61 ab
9.96 (14.9%)	37 \pm 9.8	37 \pm 0.57 b	nd	63.5 \pm 4.4 ab	75.2 \pm 12 a	74.5 \pm 4.8 a	63.1 \pm 28 ab
10.148 (11%)	36.7 \pm 5.5 b	35.1 \pm 3.8 b	26.1 \pm 5.1 b	66.4 \pm 11 ab	96.6 \pm 6.9 a	111 \pm 12 a	90.7 \pm 46 ab
10.585 (9.43%)	59.6 \pm 7.7 bc	62.5 \pm 7.1 c	48.3 \pm 7.4 c	173 \pm 5 abc	198 \pm 22 a	188 \pm 6.6 a	161 \pm 64 bc

Todos los valores de las concentraciones fueron detectados a un exponente $\times 10^5$.

Efecto sistémico de *G. intraradices* y *A. brasilense* en la acumulación local y sistémica de ácido salicílico total

La acumulación AS total en las plantas de cebada fue inducida significativamente por la rizobacteria *A. brasilense* de manera local. Los valores de AS total encontrados en la raíz de las plantas inoculadas con *A. brasilense* fueron se incrementaron respecto del tratamiento control y el tratamiento inculado con *G. intraradices* (Tabla 5).

La interacción de los microorganismos también mostró tener un efecto en la concentración de AS total en al raíz de las plantas de cebada, se observaron incrementos significativos respecto del tratamiento control y el tratamiento inculado con *G. intraradices*. Este efecto se asoció principalmente a la presencia de la rizobacteria en la raíz de las plantas, debido a que en los tratamientos inoculados con el hongo no se observaron estos incrementos. Más bien, el hongo redujó hasta la mitad la concentración de AS total de manera local, aunque esta disminución no fue diferente estadísticamente. No se observó un efecto sistémico en la concentración de AS por efecto de la inoculación con los microorganismos (Tabla 5).

Tabla 5. Acido salicílico total determinado en la raíz de las plantas de cebada inoculadas con *G. intraradices* y *A. brasilense* a las 7 semanas de crecimiento en un sistema de raíces divididas.

Acido Salicílico ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco)	Control	+ <i>G.i.</i>		+ <i>A. b.</i>		+ <i>G.i</i> + <i>A.b</i>	
		proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
Total	0.264 c	0.113 c	0.243 c	1.363 a	0.157 c	0.751 b	0.196 c

En el presente experimento no se observaron efectos en la acumulación del AS por efecto de la interacción de *A. brasilense* y *G. intraradices*, bajo el sistema de raíces divididas a los 49 días de evaluación en la raíz de las plantas de cebada.

VIII. DISCUSIÓN

Los porcentajes de colonización encontrados en las plantas de cebada variaron entre los reportados. Khaosaad y col. (2007) en un mismo sistema de raíces divididas detectaron a los 14 días de inoculación con el HMA *G. mosseae* un porcentaje de colonización de $19 \pm 3\%$ (media \pm ES). Mientras que Vierheilig y col. (2000) encontraron un porcentaje de colonización del 77% a los 12 días de inocular plantas de cebada con *G. intraradices*. En la mayoría de los estudios se ha propuesto que a un mayor tiempo de inoculación el porcentaje de colonización incrementará, esto debido al tiempo que le toma al hongo establecer la simbiosis. Sin embargo al comparar los diferentes porcentajes de colonización entre los estudios aquí mencionados se observa la gran variabilidad en el porcentaje de colonización independientemente de que se trate del mismo HMA y planta hospedera. En este sentido los efectos de la colonización pudieron ser observados en el peso fresco de la raíz de la planta y en el peso fresco de la parte aérea. El hongo suprimió de manera local el crecimiento de la raíz, el lado proximal del tratamiento inoculado con *G. intraradices* tuvo en promedio un peso fresco igual al peso fresco del tratamiento control. Además se observó que el lado proximal de las plantas colonizadas fue significativamente menor en comparación con el peso fresco del lado distal, estas diferencias no fueron significativas. Por otra parte las plantas micorrizadas fueron las que presentaron mayor peso fresco en la parte aérea respecto de los demás tratamientos.

Aumentos en el peso fresco y peso en raíces de plantas inoculadas con *G. intraradices* han sido ampliamente documentados. Sin embargo en otros estudios se ha observado la disminución o ausencia de efectos en el peso fresco de la planta por efecto de la inoculación con HMA. Vierheilig y colaboradores (2000) en un estudio realizado con plantas de cebada en un sistema de split-root e inoculadas con *G. mosseae* o *G. intraradices* no observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso fresco de la raíz respecto de las plantas control. A los doce días de la

evaluación observaron una disminución aunque no significativa en el peso fresco en el lado próximal de la raíz colonizada con los HMA comparada con las plantas control. También observaron que el lado próximal de las plantas colonizadas con *G. Mosseae* o *G. intraradices* fue significativamente menor en comparación con el peso fresco del lado distal.

Pozo y colaboradores (2002) en un estudio de split-root con plantas de tomate e inoculadas con HMA, no observaron diferencias significativas en el peso fresco de las plantas inoculadas con *G. Mosseae* respecto de las plantas control. Sin embargo la colonización con *G. intraradices* resultó en una depresión del crecimiento principalmente al nivel de tallo. La discusión en estos estudios se ha centrado en los efectos de los HMA en la demanda de carbono. En su estudio Pozo sugiere que en general “el crecimiento de las plantas en respuesta a la colonización con HMA depende del balance entre el efecto depresor debido a los requerimientos del hongo, principalmente carbón para la producción y mantenimiento de la biomasa fúngica (costo de la simbiosis), y los beneficios de la interacción concernientes a mejor status nutricional de la planta y otros efectos secundarios”. Mencionando también que en previos estudios utilizando modelos comparticionales, “un incremento en el transporte de carbono hacia el compartimento micorrizado ha sido observado. Cuando el costo de la simbiosis excede los beneficios, la relación planta-HMA puede volverse de mutualista a parasitismo. De hecho, algunos estudios han mostrado la poca estimulación del crecimiento, ó mas bien una depresión durante la interacción de las plantas con *G. intraradices*”. Finalmente concluye que el hongo puede actuar como un gran consumidor de carbono, al ser muy agresivo en su habilidad para colonizar y requerir una gran cantidad de los fotosintatos de las planta debido al gran numero de vesículas y esporas intraradicales que produce”. En este caso, aducimos los efectos en el crecimiento de la raíz al proceso de establecimiento del hongo y su papel significativo en la demanda de carbono a la planta, al haberse encontrado vesículas y esporas en la raíz de las plantas colonizadas al momento de la cosecha.

Se ha documentado que la colonización con hongos MA puede modificar la distribución de bacterias asociadas ya sea promoviendo o inhibiendo su crecimiento, dependiendo de las condiciones ecológicas y la planta huésped (Meyer y Lindermann, 1986; Andrade *et al.*, 1998; Mansfeld-Giese *et al.*, 2002). En sistemas convencionales con maceta, se ha encontrado que la coinoculación HMA-*Azospirillum* tiene un efecto promotor sobre el crecimiento de la bacteria (Subba Rao *et al.*, 1985). Sin embargo hasta el momento no existen reportes que estudien la distribución de poblaciones de *Azospirillum* o su comportamiento sistémico en sistemas de macetas divididas, con los que podamos comparar los resultados obtenidos. Nuestros resultados sugieren que la competencia por recursos y espacio, cuando estos dos organismos fueron inoculados afectaron el crecimiento de la bacteria en el sistema.

Es importante recalcar que la colonización bacteriana en la raíz de las plantas de cebada tuvo efectos significativos en el peso fresco y seco de la raíz. Estos efectos en el crecimiento podrían relacionarse con la presencia de las moléculas con potencial promotor del crecimiento detectadas en la raíz de las plantas inoculadas con *Azospirillum*.

En cuanto a la acumulación de AS Khaosaad *et al.*, 2007 reportaron un incremento en la acumulación de AS en la raíz de las plantas de cebada por efecto de la inoculación con *G. intraradices* en un sistema de raíces divididas. En el presente experimento la respuesta disminuida del AS en presencia del hongo pudo deberse a que los hongos MA deben penetrar la raíz y establecerse en las células corticales de esta, por lo que un mecanismo de resistencia por parte de la planta podría afectar el desarrollo intraradicular del hongo. Por otro lado, *Azospirillum* coloniza mayormente la superficie de la raíz por lo que el incremento en las concentraciones de AS no debe afectar las poblaciones de esta bacteria en la rizosfera.

Si bien la mayoría de los reportes han documentado que la inoculación con hongos MA estimula la síntesis de AS; existen reportes que muestran que la inoculación de estos organismos inhibe otros mecanismos de resistencia inducida.

IX. CONCLUSIONES

La promoción del crecimiento por efecto de RPCV se ha centrado en el estudio de las hormonas AIA, giberelinas y auxinas, en el presente trabajo se observaron 4 compuestos de origen esteroidal, que podrían tener un impacto en el crecimiento de las plantas de cebada.

En cuanto a la biomasa fresca de las plantas de cebada se observaron efectos diferenciados por efecto de la inoculación con los microorganismos. Por un lado la inoculación con *G. intraradices* incremento significativamente el peso fresco de la parte aérea de la planta en tanto que *A. brasilense* incremento el peso fresco de las raíces, en comparación a los valores de las plantas no inoculadas.

La producción de AS por *Azospirillum* ha sido probada en medio de cultivo, en este experimento se cuantificó un incremento en el AS total de la raíz de las plantas de cebada inoculadas con la RPCV, aunque no de forma sistémica. A su vez las plantas inoculadas con *G. intraradices* no presentaron cambios significativos en la síntesis de AS total.

Todo lo anterior sugiere que en nuestro modelo de estudio los beneficios a la planta por parte de *Azospirillum* se pudieron relacionar más a mecanismos de resistencia inducida y a la producción de metabolitos que intervienen directa o indirectamente en la promoción del crecimiento, en tanto que los beneficios a la planta por parte de los hongos MA fueron el resultado de otro tipo de factores, probablemente de tipo nutricional.

Es recomendable la inoculación de plantas de cebada con *A. brasilense*, de esta manera el crecimiento y desarrollo de las plantas se verá favorecido.

X. PERSPECTIVAS

Determinar mediante GS-MS la identidad de los compuestos estereoidales aquí descritos. Detectar en cultivo directo de *A. brasilense* para dilucidar si la presencia de estos compuestos ocurre solamente en la raíz de las plantas o son compuestos producidos por la rizobacteria. La mayoría de los estudios han probado los efectos de *Azospirillum* al comparar los efectos producidos por la inoculación bacteriana con los efectos de la adición de la molécula en estudio al medio de crecimiento de las plantas. Un ensayo para asociar los efectos de las moléculas esteroidales con el crecimiento de la raíz podrían sustentar el efecto promotor de *A. brasilense*.

En el caso del AS, probar si el efecto del AS inducido por la rizobacteria en la raíz de las plantas de cebada esta relacionado a mecanismos de defensa inducidos en las plantas.

XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adilakshmi, T., Ayling, P. D. y Ratledge, C. 2000. Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology* 182: 264–271.
- Akar, T., Avci, M., Dusunceli, F. 2004. Barley: Post-harvest operations. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_BARLEY.pdf. (Accesada en diciembre 2012).
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton Warburton, L. M., y Treseder, K. K. 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology* 41: 271–303.
- Andrade, G., Linderman, R. G. y Bethlenfalvay, J. G. 1998. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant and Soil* 202: 79–87.
- Arshad, M. y Frankenberger Jr, W. T. 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil* 133: 1-8.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis P. y Höfte, M. 2002. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. *The American Phytopathological Society* 15: 1147–1156.
- Bashan, Y., Holguin, G. y de-Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521 – 577.
- Bashan, Y., y Holguin, G. 1996. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43: 103-121.
- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J.A. y García Garrido, J. M. 2000 a. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological research* 104:722-725.
- Blilou, I., Ocampo, J.A. y García-Garrido, J. M. 2000 b. Induction of LTP (Lipid transfer protein) and Pal (Phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice

- roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. J. Exp. Bot. 51:1969-1977.
- Bonfante, P. y Perotto S. 1995 Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol 130:3–21.
- Bonfante, P., Genre, A., Faccio, A., Martini, I., Schauser, L., Stougaard, J., Webb, J. y Parniske, M. 2000. The Lotus japonicus LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1109-1120.
- Bottini, R., Cassán, F. y Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. Appl Microbiol Biotechnol 65:497–503.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D. y Pharis, R. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Cassán, F. Sgroy, V., Diego P., Oscar, M. y Virginia L. 2008 Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En: *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. (Eds. Cassán F.F. y de Salamone I. G.). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. pp. 61.
- Catford, J-G., Staehelin, C., Lerat, Sylvain., Piché, Y. y Vierheilig, H. 2003. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. Journal of Experimental Botany 54: 1481-1487.
- Conrath, U. 2006. Systemic Acquired Resistance. Plant Signaling and Behavior. 1: 179-184.
- Davies, P. 1995. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions en Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. pp 833. Dordrecht, Kluwer Acad. Press.
- de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Capitulo 8. Editorial Trillas, México. pp. 170-224.

- Dean, J. V. y Delaney, S. P. 2008. Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 132:417–25.
- Dean, J. V., Mohammed, L. A. y Fitzpatrick, T. 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221:287–96.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E y Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.
- Dempsey, D. A., Shah, J. y Klessig, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547–75.
- Denison, R. F., and E. T. Kiers. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology* 21:775–785.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero- Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., y Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871–879.
- Durner, J., Shah, J. y Klessig, D. F. 1997. SALicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2,266 –274.
- El-Khawas, H., y Adachi, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol. Fertil. Soils* 28: 377–381.
- Fallik, E., Okon, Y., Epstein, E., Goldman, A., y Fischer, M. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147–153.
- Gamo, T. y Ahn, S. B. 1991. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil Sci Plant Nut* 37:455-461.
- Garcion, C., Lohman, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, Peter y Métraux, J.-P. 2008. Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE 2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 147:1279–87.
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernesi, A. S., Morini, S. y Nuti, M. P. 2001. The

- occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151: 717–724.
- Gomez-Macpherson, H. (2001). *Hordeum vulgare*. ecoport.org/ep?Plant=1232&entityType=PL****&entityDisplayCategory=full (accesada en octubre de 2012).
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., Bucking, H., Lammers, P. J y Shachar-Hill, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819–823.
- Hause B. y Fester E. T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221: 184–196.
- Hennig, J., Malamy, J., Gryniewicz, G., Indulski, J. y Klessig, D. F. 1993. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4:593–600.
- Hernández-Rodríguez, A. y Heydrich-Pérez, M. 2005. Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24: 42-48.
- Herrera-Medina, M.J., Cagnon, H., Piché, Y., Ocampo, J.A., García-Garrido J.M. y Vierheilig, H. 2003. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science* 164:993-998.
- IAPT International association for plant taxonomy. 2006. International code of botanical nomenclature disponible en <http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm> (accesado junio 2012).
- International Culture Collection of (versicular) Arbuscular Micorrhizal Fungi (INVAM) 2012. <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/Glomaceae/Glomus/intraradices/intrarad.htm> (accesada diciembre de 2012).
- Kapulnik, Y., J. Kigel, Y. Okon, I. Nur, y Henis. Y. 1981. Effect of Azospirillum inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum, and Panicum. *Plant Soil* 61:65-70.
- Kassaw, T. K. y J. A. Frugoli. 2012. Simple and efficient methods to generate split roots and grafted plants useful for long-distance signaling studies in *Medicago truncatula* and other small plants. *Plant Methods* 8:38.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A.T.M.A. y Kecske's M. L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant

- growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1229–1244.
- Khaosaad, T., Garcia-Garrido, J. M., Steinkellner, S. y Vierheilig, H. 2007. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 727–734.
- Klessig, D. F. y Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1439–58.
- Kuhn, G., Hijri, M y Sanders R. I. 2001 Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414, 745-748.
- Lee, H.-I. y Raskin, I. 1998. Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* 88:692–97.
- Levanony, H. e Y. Bashan. 1989. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Canad. J. Bot.* 67: 2213-2216.
- Lucy, M., Reed E. y Glick. B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Malamy, J., Hennig, J. y Klessig, D. F. 1992. Temperature-Dependent Induction of Salicylic Acid and Its Conjugates during the Resistance Response to Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Cell* 4: 359 –366.
- Malhotra M., y Srivastava, S. 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European journal of soil biology* 45, 73–80.
- Mansfeld-Giese, K., Larsen, J. y Bødker, L., 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 133–140.
- Marleau, J., Dalpe, Y., St-Arnaud, M., y Hijiri, M. 2011. Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Evol. Biol.* 11: 51.
- Martin, F., Gianinazzi-Pearson, V., Hijri, M., Lammers, P., Requena, N., Sanders, I.R., Shachar-Hill, Y., Shapiro, H., Tuskan, G. A. y Young, J. P. W., 2008. The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747–750.
- Mashayekhi, S., Keshava, T.R. R. y Achoth. L. 2005. Comportamiento relativo de cebada en Irán e India y su papel en la industria agropecuaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39: 107-113.

- Massena, R. V., dos Santos Teixeira, K. R. y Pedraza, R. O. 2011. What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth promoting bacteria? *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses* (Maheshwari DK, ed), pp. 123–138, SpringerVerlag, Berlin.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. y Dietz, K. J. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132:272–81.
- Meyer, J. R. y Linderman, R. G. 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 191–196.
- Office of the Gene Technology Regulator (OGTR) 2008. The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). www.ogtr.gov.au/ (accesada en octubre de 2012).
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D. y Luna, M. V. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1143–1150.
- Pourkheirandish, M. y Komatsuda, Takao. 2007. The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective. *Annals of Botany* 100: 999–1008.
- Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M., y Azcón-Aguilar, C. 2002. Localized vs. systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 53:525-534.
- Raman, N. y Selvaraj, T. 2006. Tripartite Relationship of *Rizobium*, AMF, and Host in Growth Promotion. *Handbook Of Microbial Biofertilizers*. M. K. Rai (ed) The haworth Press, Inc.,51-88.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 43:439–63
- Raskin, I., Turner, I. M. y Melander, W. R. 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an arum lily by endogenous salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2214-2218.
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R. y Zook, M. N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 97:1342–47.

- Redecker, D. y Raab, P. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895.
- Redecker, D., Kodner, R. y Graham, L. E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920–1921.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeil, A. M. y Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.
- Ruffel, S., Freixes, S., Balzergue, S., Tillard, P., Jeudy, C., Martin-Magniette, M. L., van der M, M. J., K, K., Gouzy, J., Fernie, A. R., Udvardi, M., Salon, C., Gojon, A. y Lepetit, M. 2008. Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 146:2020–2035.
- Saubidet, M.I., Fatta, N., y Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* 245: 215-222.
- Saxena, B., Modi, M. y Modi, V. V. 1986. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *J Gen Microbiol* 132: 2219–2224.
- Schaller, H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research. Review* 42: 163–175.
- Schumacher, K. y Chory J. 2000. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:79–84.
- Schüßler, A. y Walker, C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Electronic copy freely available online at <http://www.amf-phylogeny.com>. Printed copy of available under ISBN-13: 978-1466388048, ISBN-10: 1466388048.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2005. Plan rector sistema nacional cebada. Segunda fase: diagnóstico inicial base de referencia estructura estratégica. http://www.inforural.com.mx/IMG/pdf/prn_cebada.pdf. Accesada agosto de 2012.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012 <http://www.campomexicano.gob.mx/> (accesada en agosto de 2012).
- Shah, S., Karkhanis, V. y Desai, A. 1992 Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity from *Azospirillum lipoferum* M. Curr Microbiol 25(6):34–35.
- Smith, S. E., Read y D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed. Academic Press, London. pp 36, 37.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs A. y Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil. 312:15–23.
- Strawn, M. A., Marr, S. K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta C, Mary C. y Wildermuth, M. C. 2007. Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. J. Biol. Chem. 282:5919–33.
- Subba Rao, N. S., Tilak, K. V. B. R. y Singh, C. S. 1985. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. *Soil Biology & Biochemistry* 17: 119-121.
- Tien, T. M., Gaskins M. H., y Hubbell D. H. 1979. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum braselense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.) Applied And Environmental Microbiology, 37: 1016-1024.
- Tiwari, V. 2009. Growth and production of barley en Soil, Growth and Crop Production Agricultural Sciences - Vol 1 Ed Rattan Lalaytexasphltw. <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E1-05A-11-00.pdf> (accesada Diciembre de 2012).
- Tortora, M. L. y Díaz-Ricci, J.C. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Arch Microbiol. 193:275-286.
- Verberne, M. C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J. y Linthorst, H. J. M. 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. Nat. Biotech. 18:779–83.
- Vierheilig, H., Coughlan, A., Wyss, U., Piché, Y., 1998. Ink and vinager, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 64: 5004-5007.

- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, M.J., Wyss, U., y Piché, Y., 2000. Systemic suppression of mycorrhizal colonization in barley roots already colonized by AM-fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 589–595.
- Vlot, A. C., Dempsey, D'M. A. y Klessig D. F. 2009. Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease annual review of phytopathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177–206.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F. y Park, S-W. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Annu. Rev. Phytopathol.* 11:436–42. Current opinión in plant biology.
- Wang, B., Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363.
- White, P. J., Bengough, A. G., Bingham, I. J., George, T. S., Karley, A. J. y Valentine, T. A. 2009. Induced Mutations Affecting Root Architecture and Mineral Acquisition in Barley. Q.Y. Shu (ed.), *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 338-340.
- Wildermuth, M. C. 2006. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:288–96.

