



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Interacción de *Arabidopsis thaliana* con bacterias promotoras del desarrollo y protectoras frente al estrés hídrico

Ignacio Llamedo

Directora de Tesis: Dra. Irene Mabel Baroli

Lugar de trabajo: Grupo de Fisiología Vegetal, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Abril 2024

Ignacio Llamedo

Irene Baroli

Resumen

Las plantas, tanto en ecosistemas naturales como en cultivos, están sujetas a estreses bióticos y abióticos que afectan su crecimiento. El estrés abiótico por déficit hídrico (DH) es considerado uno de los más importantes, tiene mayor impacto aún que el causado por todo el conjunto de estreses bióticos y se estima que en los próximos años se verá exacerbado como consecuencia del cambio climático. Inicialmente, las plantas responden al DH disminuyendo la conductancia estomática y la transpiración, lo que produce una menor fotosíntesis, con lo que se retrasa el crecimiento. Cuando el DH es severo o prolongado, las plantas disminuyen su área transpiratoria acelerando la senescencia foliar y redistribuyendo recursos hacia la raíz para aumentar su desarrollo y maximizar su área de absorción.

Una estrategia prometedora para hacer frente al estrés por DH consiste en la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento (PGPB), ya sea para aportar a las plantas tolerancia a la sequía, o bien para evitar un descenso en la tasa de crecimiento. Recientemente nuestro grupo ha reportado que dos cepas del género *Pseudomonas*, llamadas M25 y N33, aportan protección frente a la sequía en plantines de *Eucalyptus grandis*, aunque el mecanismo de acción no fue aún dilucidado. Para poder avanzar en aspectos mecanísticos, en esta tesis se utilizó la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, de fácil cultivo en laboratorio, y se evaluó en ella el efecto protector frente a la sequía de M25 y N33, inoculadas tanto de forma individual como en consorcio. La cepa M25 produjo un efecto benéfico bajo condiciones de sequía, que se evidenció al mantener una tasa de crecimiento del vástago similar a la del control bien regado, con una tasa de transpiración menor y una incidencia de la senescencia foliar más lenta que las del control. La plantas inoculadas con M25+N33 no mostraron un efecto sinérgico aportado por ambas cepas, sino que se comportaron de forma similar a aquellas sin inocular con bacterias.

El trabajo con *A. thaliana* nos permitió poner especial atención en la arquitectura radical, específicamente sobre el patrón de crecimiento y ramificación de la raíz principal y sobre el desarrollo de pelos radicales en respuesta a la presencia de las PGPB. La cepa M25 produjo un mayor crecimiento de la raíz principal, con más raíces laterales. En contraste, la inoculación con N33 llevó a una raíz principal más corta y menos ramificada. La presencia de cada una de las dos cepas aumentó considerablemente el número y el largo de los pelos radicales. Esto nos llevó a pensar una posible alteración en la vía de las auxinas en la raíz, generada por la presencia en la rizosfera de M25 o N33. Luego de realizar ensayos en la línea DR5rev::GFP reportera de auxinas concluimos, hasta el momento, que la inducción del desarrollo de pelos radicales no estaría causada por una alteración en la vía de señalización de auxinas. Esto sugiere que los cambios observados en la arquitectura radical implicarían otra vía regulatoria.

Título y Resumen en inglés

***Arabidopsis thaliana* interaction with plant growth promoting bacteria that protect against drought stress**

Plants, both in natural ecosystems and in crops, are subject to biotic and abiotic stresses that affect their growth. Abiotic stress caused by water deficit (WD) is considered one of the most important stresses, with a greater impact than all biotic stresses combined. It is estimated that climate change will exacerbate this effect. Initially, plants respond to WD by reducing stomatal conductance and transpiration, leading to decreased photosynthesis and delayed growth. When WD is severe or prolonged, plants reduce their transpiring area, accelerating leaf senescence, and reallocate resources towards the roots to enhance their development and maximize absorption area.

A promising strategy to cope with WD stress involves inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB), either to confer drought tolerance or to prevent a decline in growth rate. Recently, our group reported that two strains of *Pseudomonas*, named M25 and N33, provide protection against drought in *Eucalyptus grandis* seedlings, although the mechanism of action has not been elucidated yet. In this thesis, in order to advance our understanding of mechanistic aspects, we used the model species *Arabidopsis thaliana*, which is easily cultivated in the laboratory, to evaluate the protective effect against drought of M25 and N33, inoculated both individually and in consortium. Strain M25 exhibited a beneficial effect under drought conditions, maintaining a shoot growth rate similar to that of the well-watered control, with lower transpiration rate and slower leaf senescence progression than the control. Plants inoculated with M25+N33 did not show a synergistic effect contributed by both strains but behaved similarly to plants without bacterial inoculation.

Working with *A. thaliana* allowed us to focus on root architecture, specifically on the growth and branching pattern of the main root and on the development of root hairs in response to PGPBs. Strain M25 promoted greater main root growth with more lateral roots, while N33 inoculation resulted in a shorter and less branched main root. The presence of each strain significantly increased the number and length of root hairs. This led us to consider a possible alteration in the auxin pathway in the root, induced by the presence of M25 or N33 in the rhizosphere. After conducting assays with the auxin-signaling reporter line DR5rev::GFP, we concluded, so far, that the induction of root hair development may not be caused by an alteration in the auxin signaling pathway. This suggests that the observed changes in root architecture involve another regulatory pathway.

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a la Universidad de Buenos Aires por haberme dado la posibilidad de estudiar esta hermosa carrera, sin educación pública no hubiese llegado al lugar donde estoy hoy. Agradezco también por haberme otorgado la beca estímulo, que impulsó mis primeros pasos en el campo de la investigación científica.

A mi directora Irene Baroli, por sus infinitos consejos y enseñanzas, por llenarme de entusiasmo hacia el mundo de las plantas, por haber estado siempre presente durante este proceso, y por esas tardes codo a codo en la mesada del laboratorio donde entendí que la ciencia se construye colectivamente.

A José María Chaín, que sentó las bases de esta investigación con su excelente trabajo los años previos. También le agradezco por estar disponible para consultas, y por ser una gran persona y un gran colega.

Al grupo de Fisiología Vegetal y Biofísica de Acuaporinas, que me acompañaron con saberes, experiencias y muchas charlas distendidas. A Marina Recchi, por su buena voluntad y enorme ayuda para realizar los experimentos.

A Victoria Berdion y José Estévez, por su colaboración con la línea DR5rev::GFP. Sin las charlas y consejos aportados la última parte de esta tesis habría sido realmente muy difícil.

A Victoria Repetto, por habernos asistido con las imágenes del microscopio confocal, y por sus conocimientos sobre el análisis de imágenes.

A mis amigos y amigas de la facultad, que me mostraron lo rápido que uno puede formar lazos fundamentales para la vida (y hasta irse de viaje a los pocos meses de conocerles).

A todos los docentes de la FCEN que me tocó tener, por su trabajo sumamente formativo y de excelente calidad.

Al equipo del Centro Cultural de la Ciencia, donde pasé estos últimos dos años, donde me hicieron amar la divulgación científica y me dieron herramientas que seguirán conmigo durante el resto de mi vida.

Ahora quiero agradecer a un gran grupo de personas que están por fuera de la facultad, pero que fueron igual de importantes en mi formación como científico y como persona. A mi familia, que me mostró lo que es el amor incondicional, les debo este trabajo y mucho más. A mis viejos, por ser los mejores tutores en mi vida y por darme la posibilidad de seguir este sueño. A mis abuelos Ito e Ita, que los llevo en el corazón.

A Amparo, que con mucho afecto y cartelitos me ayudó a pasar los momentos difíciles, y a disfrutar mucho más este último tramo.

A Tade y Fel, amigos para toda la vida si los hay.

A mi Sensei Eduardo, gracias por mostrarme que al deseo hay que acompañarlo con la voluntad. Sin esa y otras enseñanzas quizás hoy no estaría donde estoy.

Por último quiero agradecer infinitamente a mi viejo profesor de biología Pablo Carabelli por transmitirme el amor hacia la biología. Estoy seguro que él es la razón principal por la cual decidí seguir esta carrera. Espero pronto estar compartiendo más mates con quien considero un amigo, y próximamente también colega.

Les estoy agradecido más de lo que mis palabras dejan ver.

Tabla de contenidos

RESUMEN.....	1
TÍTULO Y RESUMEN EN INGLÉS.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	6
ESTRÉS ABIÓTICO	6
FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS HÍDRICO	6
ARQUITECTURA DE LA RAÍZ.....	7
INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMOS.....	8
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO.....	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
OBJETIVO GENERAL	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
MATERIALES.....	12
CULTIVO DE BACTERIAS.....	12
<i>Titulación de las cepas bacterianas</i>	13
<i>Preparación de suspensiones bacterianas para inoculación.....</i>	13
CULTIVO DE PLANTAS.....	13
<i>Condiciones de cultivo</i>	13
<i>Esterilización de semillas</i>	13
<i>Cultivo de arabidopsis para ensayo de sequía</i>	13
<i>Cultivo de arabidopsis para ensayo de visualización de raíces.....</i>	14
<i>Cultivo de arabidopsis para ensayo de visualización de pelos radicales</i>	14
<i>Cultivo de arabidopsis para ensayo de visualización de fluorescencia en ápices de raíz.....</i>	14
ENSAYO DE SEQUÍA Y RIEGO NORMAL EN PLANTAS CULTIVADAS EN MACETA.....	14
<i>Desarrollo del ensayo.....</i>	14
<i>Asignación de tratamientos</i>	15
<i>Disposición de las macetas en la cámara de cultivo.....</i>	15
<i>Inoculación de macetas con suspensión de bacterias</i>	15
<i>Suspensión del riego</i>	16
MEDICIÓN DE VARIABLES RELACIONADAS AL CRECIMIENTO VEGETAL.....	16
<i>Área foliar proyectada</i>	16
<i>Biomasa acumulada del vástago</i>	16
MEDICIÓN DE VARIABLES RELACIONADAS AL MANEJO DEL AGUA.....	16
<i>Peso de las macetas</i>	16
<i>Conductancia estomática en hojas</i>	16
<i>Contenido relativo de agua en hojas</i>	17
<i>Porcentaje de hojas senescentes</i>	17
ENSAYOS DE VISUALIZACIÓN DE RAÍCES Y CUANTIFICACIÓN DE PELOS RADICALES	17
<i>Preparación de placas e inoculación.....</i>	17
<i>Desarrollo y cuantificación del largo de la raíz principal y el número de raíces laterales.....</i>	18
<i>Desarrollo y cuantificación del número de pelos radicales</i>	18
ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA EN RAÍCES DE LA LÍNEA DR5REV::GFP	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
<i>Modelos implementados</i>	19

<i>Supuestos de los modelos</i>	19
RESULTADOS.....	21
TITULACIÓN DE BACTERIAS	21
EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS SOBRE LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA	21
EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS SOBRE LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ Y LOS PELOS RADICALES	26
VISUALIZACIÓN DE FLUORESCENCIA EN LÍNEA DR5REV::GFP REPORTERA DE AUXINAS	28
DISCUSIÓN.....	32
EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL MANEJO HÍDRICO BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS DE DISPONIBILIDAD DE AGUA.....	32
EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA.....	32
EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ.....	33
POSIBLE EFECTO DE LA INOCULACIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN DE AUXINAS.....	34
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO.....	39
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MS	39

Introducción

Estrés abiótico

Las plantas, tanto en ecosistemas naturales como en cultivos, están sujetas a estreses bióticos y abióticos que afectan su crecimiento. Se define al estrés abiótico como cualquier condición ambiental que genere una disminución en el crecimiento vegetal (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2010). Dentro de los más importantes estreses abióticos se encuentra el estrés por déficit hídrico (DH) o sequía, el cual es un fenómeno temporal de falta de agua, en contraste con la aridez de una región particular en donde la falta de agua es constante y característica del ambiente. El DH impuesto por la sequía tiene un impacto tanto a nivel ecológico como social. La reducción en la disponibilidad de agua lleva a una aceleración de la degradación de ambientes naturales y pérdida de biodiversidad, así como una reducción en la producción de cultivos, derivando en fuertes consecuencias sociales y económicas (FAO, 2019). Su impacto sobre los cultivos a nivel anual es de mayor magnitud aún que el causado por todos los patógenos combinados (Gupta *et al.*, 2020). Se estima que en los años venideros el estrés por DH se verá exacerbado dado el contexto actual de cambio climático (FAO, 2019), por lo que es imperativo desarrollar sistemas vegetales capaces de tolerarlo.

Fisiología del estrés hídrico

A tiempos cortos (en el rango de minutos a pocas horas) las plantas responden al DH cerrando sus estomas, es decir, disminuyendo la conductancia estomática y en consecuencia la transpiración. Esta estrategia, si bien evita la pérdida excesiva de agua, lleva a un aumento de la temperatura de la planta y una menor incorporación del CO₂ necesario para la fotosíntesis, lo que retrasa el crecimiento. Cuando el DH es severo o prolongado, las plantas disminuyen su área transpiratoria acelerando la senescencia y la abscisión de las hojas. Si bien estas respuestas aumentan la supervivencia, en plantas cultivadas pueden traer como consecuencia una disminución de la productividad. La estrategia complementaria a la conservación del agua a nivel del vástago es la disminución del crecimiento del tallo y de las hojas, lo que resulta en la redistribución de recursos hacia la raíz para acelerar su desarrollo y maximizar su área de absorción, en muchos casos mediante cambios en la arquitectura radical (Tardieu *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2020; Tenorio Berrío *et al.*, 2022).

A nivel celular los cambios en la biomasa y expansión foliar que se disparan por el estrés hídrico se dan a través de un arresto en la división y expansión de las células, siendo este último el mayor determinante del tamaño final de las hojas (Tenorio Berrío *et al.*, 2022). En paralelo, en muchas especies el potencial osmótico del tejido decrece por la acumulación activa de solutos, lo cual evita la pérdida de turgencia de las células, al generar un gradiente de potencial hídrico favorable a la entrada de agua a la célula, en lo que se denomina “ajuste osmótico” (Verslues *et al.*, 2006).

Las fitohormonas juegan un rol muy importante en la respuesta al DH. Una de las más relevantes es el ácido abscísico (ABA), que promueve el cierre estomático al acumularse en el vástago cuando el contenido de agua del suelo disminuye (Hsu *et al.*, 2020). También se vio que el ABA está implicado en la respuesta hidrotrópica de la raíz, a través de

reducciones en el ángulo de surgimiento de las raíces laterales en busca de agua a mayor profundidad (Dietrich, 2018).

Arquitectura de la raíz

Las plantas regulan el patrón de ramificación de sus raíces en respuesta a las características mecánicas y nutricionales del suelo y con eso logran optimizar la adquisición de recursos. La arquitectura radical resultante está definida por el crecimiento indeterminado de la raíz principal, por la formación de raíces laterales y por la formación de pelos radicales (PRs). La mayor información que tenemos al presente sobre las vías regulatorias del desarrollo de las raíces en angiospermas proviene de estudios en *Arabidopsis thaliana* (Banda *et al.*, 2019; Vissenberg *et al.*, 2020). Las raíces laterales se generan a partir de células del periciclo ubicadas en la zona de elongación de la raíz, llamadas células fundadoras, que se dividen anticlinal y periclinalmente para formar un primordio tridimensional. Este primordio crece atravesando el tejido de la corteza hastaemerger a la superficie y en el trascurso desarrolla un nuevo meristema apical. El proceso de iniciación de raíces laterales está en parte controlado por auxinas (Zluhan-Martínez *et al.*, 2021) y en parte por interacciones mecánicas de las células del primordio con el tejido circundante, especialmente la endodermis (Banda *et al.*, 2019).

El desarrollo de los PRs se da tanto en la raíz principal como en las laterales y constituye un proceso dinámico que es esencial para la óptima exploración del suelo por las raíces, ya que, si bien los PRs comprenden solamente un 2% de la biomasa radical, su presencia aumenta en varios órdenes de magnitud la superficie de contacto de la raíz con el suelo (Marin *et al.*, 2021). Esta función de los PRs se torna especialmente importante en condiciones de DH o de baja disponibilidad de nutrientes. En *Arabidopsis thaliana* los PRs se encuentran distribuidos en la raíz con un patrón regular. El desarrollo de una célula epidérmica de la raíz en un PR depende de la recepción de una señal posicional proveniente de las células corticales subyacentes (Schiefelbein *et al.*, 2009; Shibata y Sugimoto, 2019), que responden a hormonas, dentro de las cuales las auxinas, el etileno, las citoquininas y el ácido jasmónico ejercen una regulación positiva, mientras que los brasinoesteroides y el ácido abscísico regulan negativamente el desarrollo de los PRs (Zluhan-Martínez *et al.*, 2021). La cascada de señalización molecular de este proceso se está estudiando en detalle en arabidopsis, donde se han identificado varios factores de transcripción involucrados, como GLABRA2, RHD6 y RSL4, así como los genes ARF5, ARF7, ARF19, EIN2, EIN3-EIL1, de señalización de auxinas y de etileno, que controlan la diferenciación del PR (Velasquez *et al.*, 2016; Vissenberg *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020); ver Figura 11.

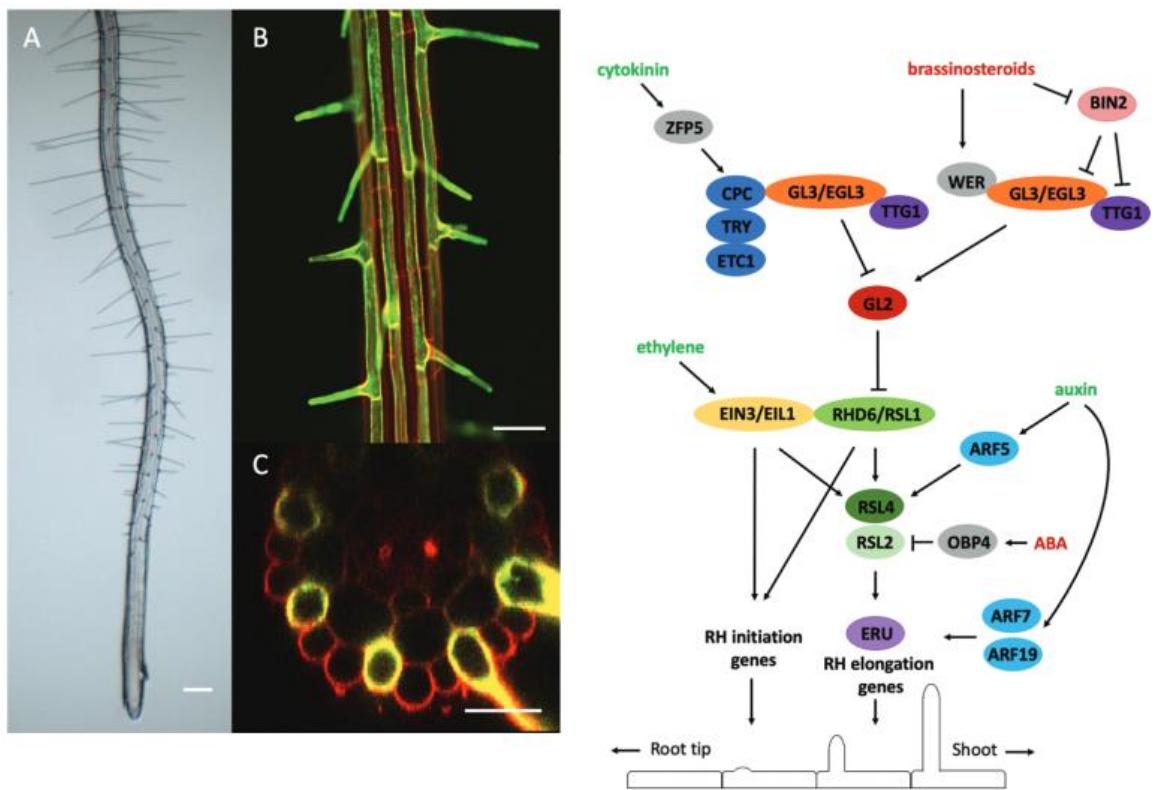


Figura I1. Regulación del desarrollo de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*. Izquierda: (A) imagen, tomada en campo claro, de la zona apical y de elongación de la raíz principal donde pueden observarse PRs en distinto grado de desarrollo; (B) imagen de un segmento longitudinal de la raíz, y (C) corte transversal de la raíz mostrando la ubicación de los PRs, en ambos casos correspondiente a imágenes tomadas en microscopio confocal, mostrando en verde/verde-amarillo la fluorescencia de GFP. Derecha: modelo de la vía molecular y hormonal del desarrollo de PRs. Las hormonas indicadas en verde estimulan el desarrollo de los PRs, y aquellas indicadas en rojo lo reprimen. Figura tomada de Vissenberg *et al.*, 2020.

Interacción planta-microorganismos

Desde los inicios de su evolución las plantas han establecido relaciones esenciales con los microorganismos (bacterias, algas, oomicetes y hongos) presentes en su entorno. Actualmente las plantas interaccionan con un conjunto de microorganismos provenientes del suelo, los cuales pueden encontrarse en la rizosfera, el rizoplano u hospedados en los tejidos vegetales (Berg *et al.*, 2014). Las plantas ejercen control sobre la composición y abundancia de la comunidad microbiana, ya sea a través de la emisión de exudados radicales, que acorde a su composición favorecerán a algunos microorganismos más que a otros (Chaparro *et al.*, 2012), o bien mediante compuestos señalizadores que promueven el reclutamiento y la modulación de especies particulares (Massalha *et al.*, 2017).

Bacterias promotoras del crecimiento

En la última década la interacción con bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (llamadas PGPB por sus siglas en inglés, *plant growth promoting bacteria*) ha

ganado considerable atención, ya sea desde el punto de vista ecológico o como una herramienta de manejo de cultivos frente a estreses (Backer *et al.*, 2018). Las PGPB pueden estimular el desarrollo vegetal de dos maneras: directamente, aumentando la disponibilidad de minerales del suelo o sintetizando y liberando fitohormonas (o sus análogos); e indirectamente, alterando las propiedades del suelo o las condiciones de crecimiento de otros microrganismos, ya sea benéficos como patógenos. Dentro del primer grupo se engloban las PGPB productoras de auxinas, que favorecen el desarrollo de la raíz o alteran su arquitectura (Verbon y Liberman, 2016), como también las productoras de ACC deaminasa, que degrada al precursor del etileno, retrasando la senescencia. En su acción indirecta, las PGPB pueden actuar como agentes de control biológico, favoreciendo la simbiosis con otros microorganismos o degradando sustancias del suelo tóxicas para las plantas (Ngumbi y Kloepper, 2016). Estas características hacen de la inoculación con PGPB una estrategia prometedora y ambientalmente amigable para hacer frente al estrés vegetal (Trivedi *et al.*, 2022). En particular, se ha reportado que la inoculación con PGPBs puede aumentar la tolerancia al DH, y esta tolerancia parece estar relacionada con cambios en la arquitectura radical provocados por la presencia de los microorganismos (Ngumbi y Kloepper, 2016).

Las proteobacterias del género *Pseudomonas* son muy abundantes en el microbioma de la rizosfera (Bulgarelli *et al.*, 2013). Se reportaron cepas de *Pseudomonas* que estimulan el crecimiento en *Arabidopsis thaliana* al inhibir la elongación de la raíz principal y promover la formación de nuevas raíces laterales y de nuevos PRs (Vacheron *et al.*, 2013; Zamioudis *et al.*, 2013). Nuestro grupo ha reportado recientemente la interacción beneficiosa con plantines de eucaliptos de dos cepas de *Pseudomonas* aisladas de agroambientes bonaerenses, llamadas M25 (Castagno *et al.*, 2011) y N33 (Chaín *et al.*, 2020). Demostramos que estas cepas, que no penetran en la planta sino que ejercen su acción desde la rizosfera, aumentan la tolerancia al DH en eucaliptos juveniles, modificando el manejo del agua, mediante cambios en la conductancia estomática y la elasticidad de las paredes celulares (Chaín *et al.*, 2020). Además, observamos que dichas cepas causan un incremento del número y la longitud de los PRs en plántulas recién germinadas, tanto en eucalipto como en arabidopsis (Chaín, 2021). Esta reciente observación, en conjunto con lo que se conoce de la acción de las auxinas en el desarrollo de las raíces (Jung y McCouch, 2013), permite hipotetizar que el efecto benéfico de las cepas M25 y N33, al menos en los pasos iniciales de la interacción, puede deberse a la liberación de auxinas o sus análogos.

Si bien los resultados de nuestro grupo son prometedores en cuanto a la implementación de M25 y N33 como estrategia para la tolerancia de eucaliptos frente a la sequía (Chaín, 2021), todavía resta dilucidar el mecanismo por el cual nuestras cepas aportan tales beneficios bajo estrés hídrico. Para generar mayor conocimiento acerca de los efectos aportados por M25 y N33 bajo condiciones desfavorables de riego, así como indagar sobre la participación de las auxinas, involucradas en el desarrollo de los PRs y la posible función de éstos durante la respuesta al DH, en esta tesis se trabajó con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta especie presenta un corto ciclo de crecimiento, un tamaño pequeño y la posibilidad de realizar cultivos tanto en suelo y como en medio agarizado. A esto se suma la existencia de numerosas herramientas genéticas y moleculares en la especie, como por ejemplo la disponibilidad de líneas transgénicas portadoras de constructos “reporteros” de la acción de diversas hormonas y la posibilidad de trasladar los resultados obtenidos con *A. thaliana* a cultivos y otras especies de interés (Yaschenko *et al.*, 2024).

Un mayor conocimiento acerca de la interacción entre las plantas y las PGPBs permitirá contribuir con estrategias ambientalmente amigables para afrontar las condiciones adversas al crecimiento vegetal a nivel global, como la sequía, exacerbadas por el cambio climático y otras problemáticas mundiales.

Hipótesis y objetivos de la investigación

Esta tesis de licenciatura busca contribuir al conocimiento de los mecanismos por los que las bacterias benéficas aportan a las plantas tolerancia al DH.

Objetivo general

Profundizar la caracterización mecanística de la interacción positiva de las plantas con M25 y N33 que el grupo de Fisiología Vegetal había reportado para *Eucalyptus grandis* (Chaín *et al.* 2020). Por poseer un ciclo de vida corto, factible de completarse en cámaras climatizadas por la duración de la tesis y donde las etapas iniciales pueden ser observadas en cultivo en medio agarizado, además de la disponibilidad de una amplia batería de líneas transgénicas y mutantes, los estudios se realizaron utilizando la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

Hipótesis

- 1) Las cepas N33 y M25 aumentan la tolerancia al DH de arabadopsis mediante cambios en la estrategia de manejo del agua y de la tasa de crecimiento.
- 2) La capacidad de las plantas inoculadas de tolerar el DH estaría en parte relacionada con cambios en la arquitectura radical y con un aumento en la densidad y longitud de PRs inducidos por la presencia de las bacterias.
- 3) Los cambios en la arquitectura radical y el desarrollo de PRs se deberían, en parte, a un cambio en el balance de auxinas producido por las bacterias, directa o indirectamente.

Objetivos específicos:

Para poner a prueba la hipótesis 1: Estudiar el efecto de inocular las cepas N33 y M25, por separado o en consorcio, sobre el crecimiento y el manejo del agua de arabadopsis en condiciones de riego normal y en comparación con condiciones de DH.

Para poner a prueba las hipótesis 2 y 3: Estudiar el efecto de inocular las cepas N33 y M25 sobre la arquitectura de la raíz y la generación de PRs en arabadopsis, prestando especial atención a cambios en la respuesta a auxinas.

Materiales y métodos

Materiales

Los experimentos de sequía, de visualización de raíces y de pelos radicales fueron realizados con la línea salvaje Col-0 de *Arabidopsis thaliana*. Para el experimento de visualización de fluorescencia en ápices de raíz se trabajó con la línea transgénica de *arabidopsis DR5rev::GFP* (Friml *et al.*, 2003), la cual posee el mismo *background* genético que la línea Col-0 y además lleva inserto en su genoma el promotor del gen *DR5*, inducible por auxinas, seguido de la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde medusa (GFP, por su sigla en inglés) .

Las cepas de bacterias utilizadas para los experimentos fueron aisladas de agroambientes bonaerenses. Se utilizaron: 1) la cepa M25, originalmente descripta por Castagno *et al.* (2011), filogenéticamente relacionada con la especie *Pseudomonas fluorescens*, y 2) la cepa N33, que presenta una identidad del 99% con las cepas tipo del género *Pseudomonas* (Chaín 2021). Previamente a este trabajo, ambas cepas fueron transformadas por conjugación con un plásmido que permite la expresión de GFP y de la enzima neomicina fosfotransferasa II, que confiere resistencia a kanamicina (Chaín *et al.*, 2020).

Para la preparación de medio LB se mezclaron 10 g de triptona bacteriológica, 10 g de cloruro de sodio y 5 g de extracto de levadura en 900 mL de agua destilada, bajo agitación constante. Una vez llevado a disolución se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 10M, mediante el uso de un pHmetro. Por último, se ajustó el volumen final a 1L con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

En caso de haber preparado medio LB para el cultivo de bacterias en placas de Petri se adicionaron 8 g de agar, de manera que la concentración resultó 0,8% p/v.

Para la preparación de 1L de medio de cultivo MS agarizado se agregaron 8g de agar (concentración 0,8 % p/v), 25 mL de solución MS1, 2,5 mL de MS2 y 2,5 mL de MS3 (Anexo, Tabla suplementaria). Mediante agitación constante se disolvió el agar y las soluciones MS en agua destilada, se ajustó el pH a 5.8 – 6 con hidróxido de sodio 1N mediante el pHmetro, y se llevó el volumen a 1L, antes de enviar el recipiente a esterilizar en el autoclave.

Cultivo de bacterias

Para su preservación, las cepas se cultivaron en medio LB líquido conteniendo 50 μ g/mL de kanamicina, al que se le agregó un volumen igual de glicerol 30% y las suspensiones resultantes se mantuvieron indefinidamente a -80 °C. Para obtener colonias aisladas, las bacterias fueron estriadas en placa de Petri en medio LB conteniendo 0,8% agar y 50 μ g/mL de kanamicina, e incubadas a 28°C durante 24-48hs. Una vez obtenido el estriado se corroboró que las colonias presentaran fluorescencia bajo luz UV en un transiluminador. Para preparar las suspensiones para inoculación de *arabidopsis* y para la determinación de la concentración de unidades formadoras de colonias, las cepas fueron cultivadas en medio LB líquido con 50 μ g/mL de kanamicina, a 28°C en agitador orbital a 200 rpm, por 12-16 h.

Titulación de las cepas bacterianas

Se determinó la densidad óptica (DO) a 578 nm de cultivos líquidos de las cepas M25 y N33 utilizando un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japón). Las células se colectaron por centrifugación a 10000 rpm, por 5 min a 4°C en centrífuga refrigerada (EBA 12R, Hettich, Tuttlingen, Alemania). El pellet se resuspendió en MgCl₂ 10mM y se realizaron diluciones seriadas, siguiendo estos factores de dilución: 10¹, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷. En placas con medio LB agarizado contenido 50µg/mL de kanamicina se sembraron con rastillo 50 µL de las respectivas diluciones y se cultivaron a 28°C durante 2 días. Cada dilución se plaqueó por duplicado. Se cuantificó el número colonias por placa para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL del cultivo original de cada cepa.

Preparación de suspensiones bacterianas para inoculación

A partir de los cultivos líquidos de M25 y N33 se determinó la DO ($\lambda=578\text{nm}$) con el espectrofotómetro y los cultivos se diluyeron con LB en tubos eppendorf por separado, según los datos de titulación previamente obtenidos, para llevar ambos cultivos a la misma concentración de 10⁹ UFC ml⁻¹. Los tubos se centrifugaron a 4°C, 9000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 mL de MgCl₂ 10mM, para obtener la solución final de inoculación. Para la inoculación con ambas cepas en consorcio se preparó una suspensión contenido 0,5x10⁹ UFC ml⁻¹ de cada cepa y se inoculó de la misma forma que con las cepas individuales.

Cultivo de plantas

Condiciones de cultivo

Las plantas se cultivaron a partir de semillas en una cámara climatizada con temperatura constante a 22°C, fotoperiodo de día corto (10 horas de luz y 14 de oscuridad), irradiancia 190-210 µmol fotones.m⁻².seg⁻¹, provista desde arriba por listones LED de 11W blanco neutro, 4000K (SICA, Lanús Oeste, Argentina). La intensidad de luz en el espectro fotosintéticamente activo fue medida con un radiómetro LI-250A (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EE.UU.). La humedad relativa se mantuvo en el rango de 50-70% mediante el uso de un acondicionador de aire comercial.

Esterilización de semillas

Las semillas fueron mantenidas a temperatura ambiente y esterilizadas superficialmente por sumersión con agitación en una solución de 4 partes de etanol 96% con una parte de hipoclorito de sodio (12,5 g Cl activo L⁻¹) durante 10 minutos, seguido de dos lavados con etanol 96%, dejando secar las semillas en flujo laminar.

Cultivo de arábidopsis para ensayo de sequía

Se sembraron semillas previamente esterilizadas en placas de Petri con medio MS 0,5X solidificado con agar 0,8% (p/v). Para obtener una germinación homogénea las placas se mantuvieron durante 3 días en oscuridad a 4°C (estratificación). Luego las placas se

trasladaron a la cámara de cultivo para la germinación y crecimiento de las plántulas durante 10-13 días. Una vez transcurrido ese tiempo las plántulas se transfirieron a vasos plásticos de 70 mL perforados en la base, conteniendo una mezcla de sustrato comercial marca Grow-mix (Terrafer) y perlita (4:1 v/v), previamente humedecido con agua desclorada. Para evitar un cambio brusco de humedad, las plántulas recién transferidas se mantuvieron cubiertas con una tapa plástica hasta que alcanzaron el estadio de 4 hojas.

Cultivo de arábidopsis para ensayo de visualización de raíces

Se sembraron semillas esterilizadas en placas de Petri con medio MS 0,5X y agar 0,8% p/v, y se estratificaron durante 3 días en oscuridad a 4°C. Las plántulas se cultivaron durante 10 días en cámara de cultivo y se transfirieron, bajo flujo laminar, a placas cuadradas de 10 cm² conteniendo medio MS 0,5X agarizado. Estas placas fueron colocadas en la cámara de cultivo en posición vertical hasta su utilización en el análisis de la estructura radical.

Cultivo de arábidopsis para ensayo de visualización de pelos radicales

Se sembraron semillas esterilizadas directamente en placas cuadradas de 10 cm² con medio MS 0,5X, agar 0,8% p/v, se estratificaron 3 días en oscuridad a 4°C y se cultivaron durante 4-5 días en posición vertical.

Cultivo de arábidopsis para ensayo de visualización de fluorescencia en ápices de raíz

Se sembraron semillas de la línea DR5rev::GFP previamente esterilizadas en placas cuadradas de 10 cm² con medio MS 0,5X, agar 0,8% p/v, se estratificaron 3 días en oscuridad a 4°C y se cultivaron durante 4-5 días en posición vertical.

Ensayo de sequía y riego normal en plantas cultivadas en maceta

Desarrollo del ensayo

Las plántulas fueron cultivadas en vasos plásticos perforados de 70 mL, utilizados como macetas, durante 9 días bajo riego, apoyadas sobre bandejas plásticas para ser regadas desde abajo. El riego se realizó periódicamente cubriendo los primeros 0,5 cm – 1 cm de la bandeja con agua desclorada. Transcurridos los 9 días se inocularon las macetas con suspensión de bacterias o solución control (preparadas según se indica más abajo) y se mantuvieron una semana bajo riego normal. Posteriormente se suspendió el riego en la mitad de las macetas, destinadas al tratamiento de sequía, hasta cumplirse la totalidad del ensayo (Figura M1), mientras que la otra mitad se mantuvo bajo riego periódico (iego normal).



Figura M1. Esquema de trabajo con los tiempos correspondientes a cada paso

Asignación de tratamientos

La unidad experimental fue cada una de las macetas, las cuales recibieron un tratamiento según la combinación de dos variables, por un lado la variable “inoculación”, según se inoculó con la cepa N33, M25, ambas cepas puestas en consorcio (N33+M25), o una solución control de $MgCl_2$ 10mM; por otro lado la variable “riego”, que se refiere a la aplicación de déficit hídrico por suspensión total del riego (sequía) o al mantenimiento del riego normal (RN).

Las macetas se colocaron sobre bandejas de plástico, conteniendo 8 macetas cada una, durante todo el experimento. Cada bandeja recibió al azar una combinación de las dos variables (Figura M2), de manera tal que se formaron 8 combinaciones. La implementación de las bandejas para plantas de una misma combinación de tratamientos permitió que al regarlas no sucediera una contaminación cruzada desde una maceta inoculada con una cepa hacia otra maceta con inoculación diferente.

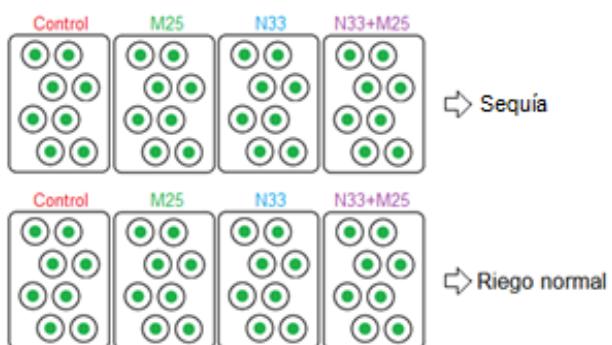


Figura M2. Representación de la asignación de tratamientos y distribución de las macetas

Disposición de las macetas en la cámara de cultivo

La disposición dentro del estante de la cámara de cultivo fue de 8 bandejas de plástico, cada una conteniendo 8 macetas. Las bandejas se rotaron dentro del estante cada 2-3 días para evitar el efecto borde durante el ensayo.

Inoculación de macetas con suspensión de bacterias

Transcurridos 9 días desde la siembra se inocularon las macetas por aplicación de 1 mL de suspensión de bacterias (o solución control de $MgCl_2$ 10mM), por única vez en todo el

experimento. La aplicación se realizó con micropipeta de 1000 μL , directamente sobre el sustrato próximo a cada planta, cuidando que no cayera sobre el vástago.

Suspensión del riego

Posteriormente a la inoculación las plantas se mantuvieron bajo condiciones de riego normal durante 1 semana para permitir la interacción de las bacterias con las plantas bajo condiciones normales, antes de iniciar el estrés. Luego se procedió a suspender totalmente el riego de las 4 bandejas correspondientes al tratamiento de sequía. El día de suspensión del riego fue considerado el día 0 en la toma de datos posteriores. Se midieron variables relacionadas al crecimiento y al manejo del agua de las plantas, en algunos casos para aquellas sometidas a sequía, a riego normal, o en ambos tratamientos. Se midieron algunas variables de forma periódica y otras variables en una única instancia al final del experimento.

Medición de variables relacionadas al crecimiento vegetal

Área foliar proyectada

Se determinó el área foliar de la roseta entera a partir de la toma de fotografías y posterior cálculo del área foliar proyectada usando el programa Photoshop®, tanto para plantas sometidas a sequía como a riego normal. Las fotos fueron tomadas con cámara digital desde una posición vertical por encima de la maceta, para luego calcular la cantidad de píxeles verdes y compararla con la correspondiente a un cuadrado de área conocida incluido en la fotografía.

Biomasa acumulada del vástago

Al final del experimento (día 21) se cortaron las rosetas de las macetas sometidas a sequía y a riego normal, se guardaron en sobres de papel y se secaron en estufa a 60 °C durante por lo menos 48hs. Una vez secas las rosetas se pesaron en una balanza analítica ($d=0,1$ mg).

Medición de variables relacionadas al manejo del agua

Peso de las macetas

La evapotranspiración se estimó como la pérdida de agua de las macetas sometidas a sequía. Para ello se determinó el peso de cada maceta en una balanza granataria cada 2-3 días, a lo largo de 21 días desde la suspensión del riego.

Conductancia estomática en hojas

La conductancia estomática (g_s) de las plantas mantenidas en riego normal se midió utilizando un porómetro de estado estacionario (modelo SC-1, Decagon Devices, Pullman, Washington, EE.UU.). Las mediciones se realizaron en la cara abaxial de una de las hojas más jóvenes totalmente expandidas de cada planta.

Contenido relativo de agua en hojas

El contenido relativo de agua de las hojas (CRA) se determinó para plantas mantenidas en riego normal. Se cortó una hoja joven totalmente expandida de cada planta y se pesó para registrar el peso fresco (P_f). Luego se colocó cada hoja en un tubo Falcon cerrado conteniendo 1 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron a 4°C durante 24hs para obtener el máximo de turgencia de las hojas escindidas, que se pesaron para registrar el peso turgente (P_t). Luego las hojas se transfirieron a sobres individuales y se secaron en estufa a 60 °C por al menos 48 h. Una vez secas se registró el peso seco (P_s). El CRA se obtuvo según la siguiente ecuación:

$$CRA = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} \times 100$$

Porcentaje de hojas senescentes

Considerando como senescentes aquellas hojas de coloración amarillenta homogénea (Figura M3), se cuantificó el número de hojas en estado senescente y se determinó su porcentaje dentro del total de hojas de la planta.



Figura M3. Fotografía del día 21 de una planta representativa sometida a sequía. Se muestran marcadas con asterisco aquellas hojas consideradas senescentes.

Ensayos de visualización de raíces y cuantificación de pelos radicales

Preparación de placas e inoculación

Para el ensayo de visualización de raíces se transfirieron cinco plántulas por cada placa cuadrada, que se inocularon mediante la aplicación con micropipeta de una única gota de 20 µL de suspensión de bacterias (o solución control de MgCl₂ 10mM) ubicada a 1cm del ápice de la raíz, es decir que al momento de la inoculación las bacterias no estuvieron en contacto directo con las raíces.

En el ensayo de cuantificación de pelos radicales las semillas fueron sembradas tal que hubiera dos filas de 10-11 semillas en cada placa. Una vez germinadas se inoculó

procurando que la gota estuviera a 0,5 cm del ápice de cada raíz. En la Figura M4 se esquematizan los pasos para ambos ensayos.

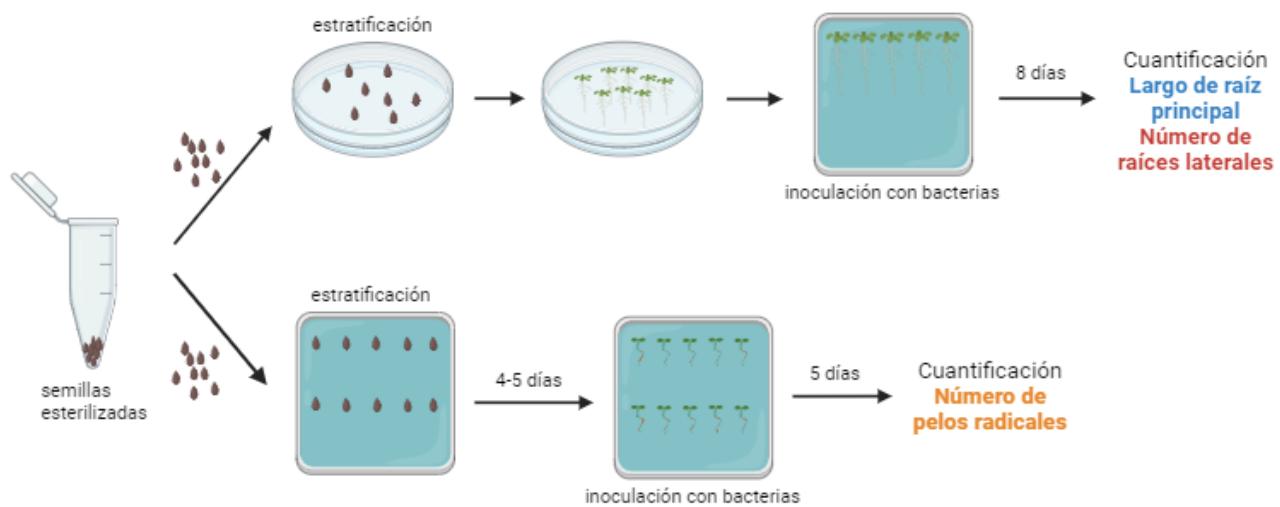


Figura M4. Esquemas de trabajo en placas cuadradas. Se muestra en la parte superior los pasos correspondientes al ensayo de visualización de raíces, y en la parte inferior para la cuantificación de pelos radicales

Desarrollo y cuantificación del largo de la raíz principal y el número de raíces laterales

La arquitectura de la raíz se evaluó a partir de *scans* de las placas cuadradas, obtenidas con un *scanner* Epson Perfection V370 Photo (resolución 2400 ppp). Mediante el Software ImageJ se midió el largo de la raíz principal, desde el ápice hasta la región de transición vástago-raíz, y se cuantificó el número de raíces laterales que emergieron de ésta.

Desarrollo y cuantificación del número de pelos radicales

Se cuantificó el número de pelos radicales en los primeros 13 mm de la raíz desde el ápice, únicamente en aquellas raíces que atravesaron la gota de inoculación. Las imágenes fueron tomadas con cámara fotográfica adosada a una lupa, utilizando un aumento 10X.

Ensayo de cuantificación de fluorescencia en raíces de la línea DR5rev::GFP

La preparación de las placas e inoculación se realizó siguiendo la misma metodología descripta para Col-0. Transcurridos 4 días desde la inoculación se seleccionó una placa proveniente de cada tratamiento de inoculación, de las cuales se tomaron tres plántulas cuya raíz se colocó cuidadosamente entre un porta y un cubre objetos, y se visualizó la fluorescencia de GFP mediante la adquisición de imágenes en el microscopio confocal (modelo LSM980, Zeiss, Jena, Alemania), con una lente 20X de apertura numérica 0.8 (Figura M5). La GFP se excitó con un láser de 488 nm y se registró la emisión a 509 nm. Las imágenes se analizaron a través del programa ImageJ, usando el plug-in Bioformats y

la función Z-stack (seteado en intensidad máxima), la cual genera una nueva imagen denominada *stack*, que integra todos los planos focales obtenidos por el microscopio confocal. Esto permitió obtener la información correspondiente a todos los núcleos fluorescentes dentro del volumen del ápice. A partir de los *stacks* se cuantificó el número de núcleos fluorescentes verdes, como parámetro indicador del nivel de auxinas presentes en las células del ápice de la raíz.

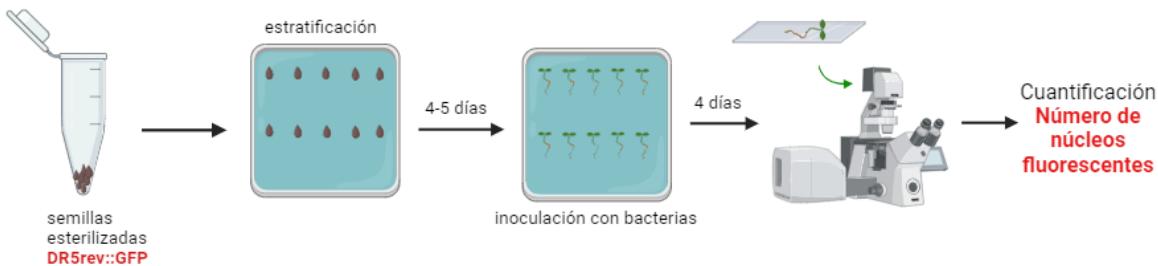


Figura M5. Esquema de trabajo en placas cuadradas para visualización de fluorescencia de GFP

Análisis estadístico

Todos los datos tomados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Rstudio. Para los gráficos se utilizó el paquete "ggplot2". Se realizaron comparaciones de medias entre plantas inoculadas con bacterias y con solución control mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, utilizando el paquete "car". En los casos pertinentes se efectuaron contrastes *a posteriori* entre los tratamientos mediante intervalos de confianza (IC 95%), siguiendo el método de Tukey del paquete "emmeans".

Modelos implementados

Se plantearon modelos lineales para analizar las variables, asumiendo la distribución de probabilidades pertinente a cada una de ellas. Para área foliar proyectada, biomasa de la roseta, evapotranspiración y conductancia estomática se utilizó la función "lm", y se asumió una distribución normal. Para porcentaje de hojas senescentes y CRA se implementaron las funciones "glm" (paquete "lme4") y "betareg" (paquete "betareg") respectivamente, en ambos casos asumiendo una distribución de probabilidades Beta. Para arquitectura radical se implementó un modelo anidado, considerando la placa como un factor aleatorio. Para el largo de la raíz principal y el número de raíces laterales se asumió una distribución de probabilidades normal y Poisson, respectivamente, mediante las funciones "glmer" y "lmer" (paquetes "lme4" y "lmerTest"). Para la variable pelos radicales se asumió una distribución binomial negativa con la función "glmmTMB", del mismo paquete. El análisis de los núcleos fluorescentes se llevó a cabo con la función "glm", asumiendo una distribución de probabilidades binomial negativa.

Supuestos de los modelos

Los muestreos se realizaron de manera aleatoria, con observaciones independientes, o en caso de posible falta de independencia implementando un modelo anidado. Para variables

continuas se realizaron pruebas de homogeneidad de varianza y normalidad de residuos. La homocedasticidad se corroboró mediante un gráfico de residuos estandarizados vs. predichos y una prueba de Levene. Para corroborar la normalidad de los residuos se realizó un qqplot y una prueba de Shapiro-Wilks. En los casos donde se consideró un modelo anidado también se evaluó la normalidad de los residuos aleatorios. Para las variables cuya distribución asumida no fue normal se realizaron pruebas de devianza, de dispersión y de residuos estandarizados vs. predichos con el paquete “DHARMA”. Para la distribución Poisson se calculó el coeficiente de dispersión a mano y también mediante DHARMA.

Resultados

Titulación de bacterias

Con el fin de determinar la concentración de bacterias viables de las suspensiones de inoculación se llevó a cabo una titulación de las cepas M25 y N33. Se sembraron diluciones seriadas de ambas cepas (figura R1), realizando cada siembra por duplicado. Las colonias se visualizaron con luz UV luego de 48 horas de incubación a 28 °C.

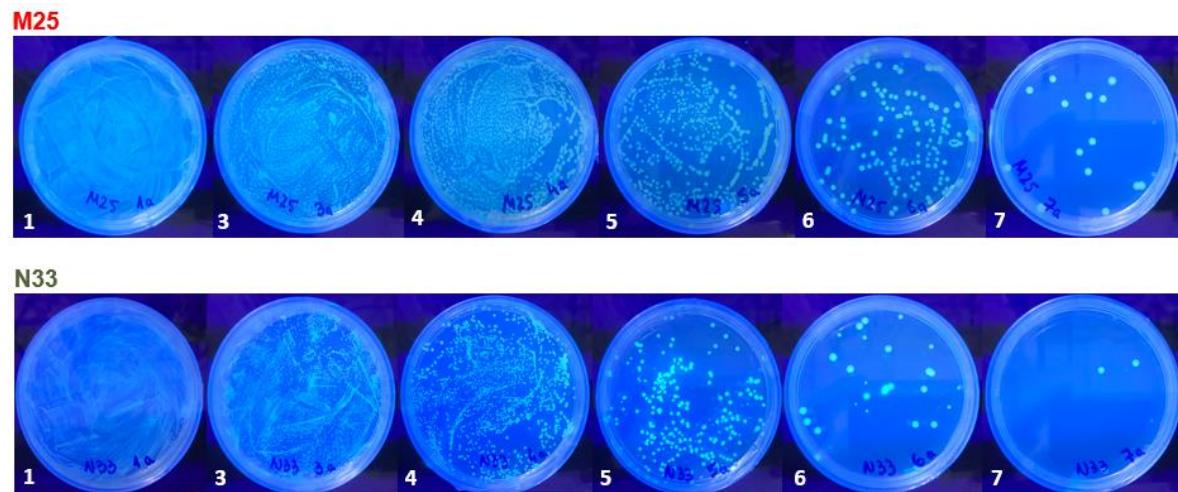


Figura R1. Titulación de suspensiones de M25 y N33. Se muestran las placas con colonias fluorescentes observadas bajo luz UV. Los números refieren al logaritmo en base 10 del factor de dilución empleado partiendo desde la suspensión original. Se realizaron dos réplicas por factor de dilución para cada cepa, se muestra un resultado representativo para cada dilución.

Para realizar el conteo se eligieron las placas cuya siembra correspondió a la dilución 1 en 10^6 (figura R1), dado que contaba con un número suficientemente grande y a la vez cuantificable de colonias (entre 20 y 300 colonias en la placa). A partir de la cuantificación de UFC se determinó que la concentración de M25 y N33 para una densidad óptica de 1 es $5,75 \times 10^8$ UFC/mL y $2,85 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente. Este ensayo permitió asegurarnos de usar el mismo número de UFC de cada cepa en los ensayos subsiguientes.

Efecto de la inoculación con bacterias sobre la tolerancia a la sequía

Para comprobar si las cepas M25 y N33 son capaces de proteger frente a la sequía, se realizaron experimentos donde se evaluó el crecimiento y el manejo del agua de arabidopsis comparando condiciones de riego normal con una suspensión total del riego. Se evaluó el crecimiento de las plantas a través del aumento en el tiempo del área foliar proyectada y de la biomasa del vástago al final del ensayo. En paralelo, para estimar el efecto de la inoculación sobre el manejo del agua en plantas sometidas a sequía, se cuantificó periódicamente la evapotranspiración del conjunto planta + sustrato. Además, se determinó el contenido relativo de agua (CRA) y la conductancia estomática de plantas mantenidas bajo condiciones normales de riego.

Se realizaron tres experimentos de suspensión de riego, uno en noviembre de 2021 y dos durante 2023. Como en los dos últimos se presentaron dificultades en el cultivo y en el control de la severidad de la sequía, en esta tesis se muestran los resultados obtenidos en el experimento de 2021 (figuras R2 y subsiguientes). Es importante destacar que este experimento fue llevado a cabo inoculando con iguales volúmenes de cultivo (DO = 1) para ambas cepas, y no con el mismo número de UFC.

El crecimiento de las plantas bajo los dos regímenes hídricos fue significativamente diferente (figura R2). Bajo riego normal hubo una tendencia del control sin inocular a una mayor tasa de crecimiento (medida como área foliar proyectada de la parte aérea), que se evidenció hacia días finales del ensayo. Las tasas de crecimiento de las plantas inoculadas con M25 o con N33 mostraron un comportamiento similar, estando por debajo del control y de las inoculadas con el consorcio M25+N33. Si bien la co-inoculación con ambas cepas demostró comportarse igual al control al inicio, hacia el final del ensayo los tres tratamientos con bacterias resultaron en un crecimiento del vástago menor al control y similar entre sí. Los resultados obtenidos al evaluar la biomasa del vástago al final del ensayo se condicen con los de crecimiento usando área foliar proyectada (figura R2e y R2f).

La suspensión total del riego produjo una fuerte disminución en la tasa de crecimiento del vástago de las plantas sometidas a sequía a partir de los días 7 a 9 (figura R2c y R2d), observándose un claro aplanamiento en las curvas de crecimiento para el control y las plantas inoculadas con N33. La inoculación con M25, y en menor medida con M25+N33, mantuvo mejor el crecimiento del vástago respecto a las plantas control. Este efecto de mantenimiento del crecimiento en sequía no se observó inoculando con N33, donde el área foliar proyectada alcanzó un plateau, y la biomasa final fue similar a la del control. Si bien a tiempo final no hubo diferencias entre el control y N33, podemos notar un mantenimiento del crecimiento en los días 7 y 9 en plantas inoculadas con N33, lo que podría deberse a una estrategia en días tempranos de falta de agua, y no hacia días posteriores como sí se observó en M25 y el consorcio.

Las diferencias observadas entre tratamientos de inoculación y régimen hídrico sugieren que la presencia de M25 y en menor medida de N33+M25 aporta un beneficio respecto a la continuidad del crecimiento de la parte aérea bajo sequía, pero que supone un costo para el crecimiento de las plantas en condiciones óptimas de riego.

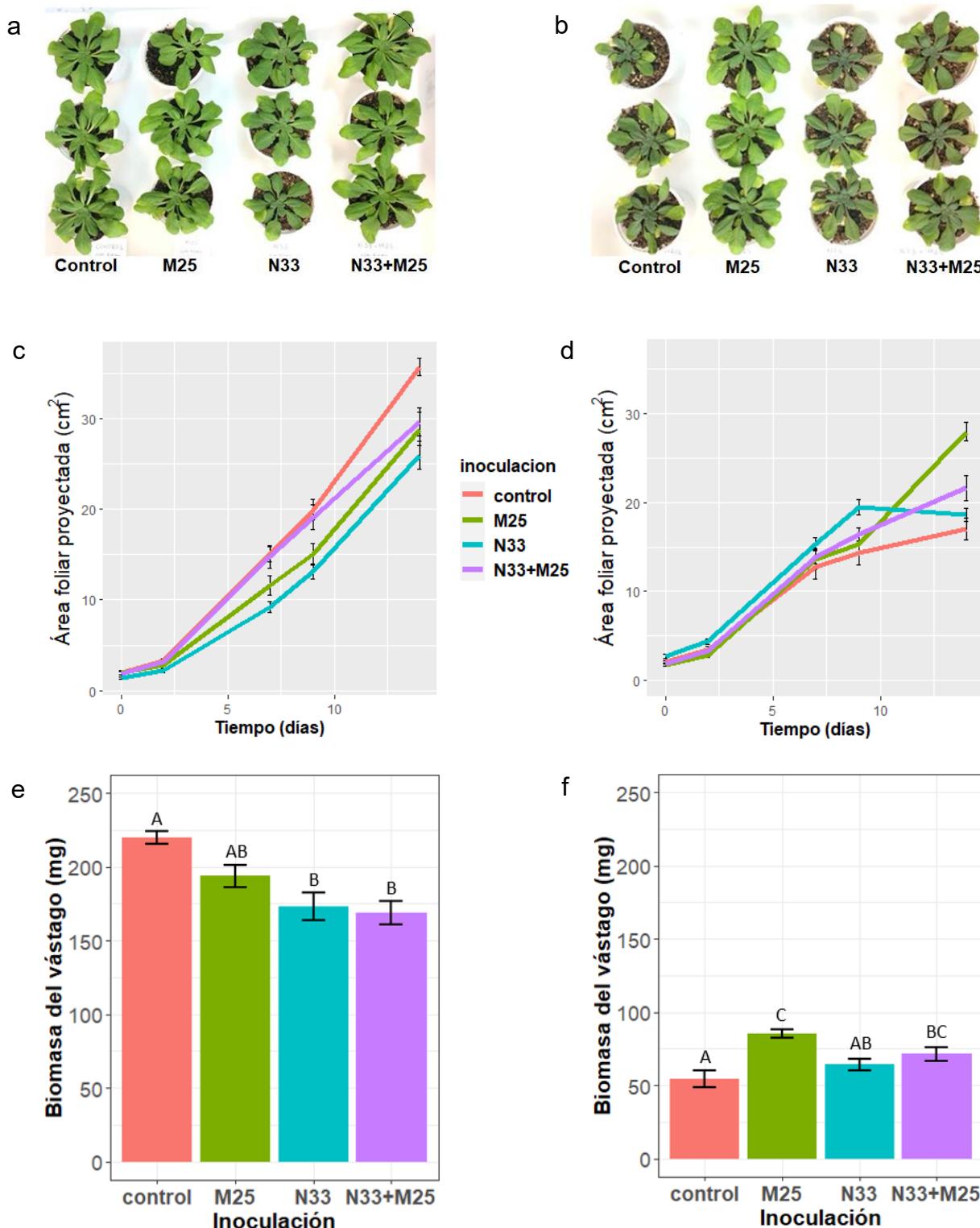


Figura R2. Aspecto general y parámetros de crecimiento evaluados en el tiempo y al final del experimento para plantas bajo condiciones de sequía y de riego normal. Fotografías de tres plantas representativas de cada tratamiento, sometidas a riego normal (a) o sequía (b), tomadas 14 días luego de suspendido el riego. Área foliar proyectada, graficada en función del tiempo, desde la suspensión del riego hasta el día 14, en condiciones de riego normal (c) o sequía (d). Biomasa del

vástago al día 21 en plantas bajo riego normal (**e**) o sequía (**f**). Se muestran las medias y el error estándar de cada tratamiento, $n = 7 - 8$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P-valor $< 0,05$).

Para caracterizar el efecto de la inoculación sobre el manejo del agua en plantas sometidas a sequía, se cuantificó la evapotranspiración siguiendo en el tiempo la variación de peso de cada unidad experimental (planta+sustrato+maceta). En la figura R3 se muestra la caída en peso conforme disminuye el agua en el sustrato y dentro de las plantas, y que se da de manera bifásica: primero como una caída lineal y abrupta del peso absoluto desde el inicio hasta el día 14, y luego con menor velocidad hasta el día 21 (figura R3a). Otra observación respecto al peso absoluto es que las medias de cada tratamiento en el primer punto medido luego de suspender el riego difieren entre sí (figura R3a). Posiblemente esto se deba a una diferencia en la absorción de agua el último día de riego, ya que las plantas fueron regadas por absorción desde la base de la maceta con un nivel de agua de 0,5 cm - 1 cm para toda la bandeja, lo que pudo haber provocado que absorbieran una cantidad de agua similar dentro de una misma bandeja, pero suficientemente diferente entre tratamientos según la cantidad de agua suministrada.

Para comparar mejor las velocidades de evapotranspiración en las diferentes inoculaciones se relativizó el peso de cada maceta respecto al suyo al inicio de la toma de mediciones de pesos (día 2 desde la suspensión del riego), y se determinó la pendiente para cada planta hasta el día 14, lo cual corresponde a la región lineal de la curva de evapotranspiración (figura R3.a). En la figura resultante, R3.b, se observa que las plantas inoculadas con M25 presentan una menor pendiente de evapotranspiración que el resto de los tratamientos, lo cual sugiere un efecto protector frente al déficit hídrico en días tempranos del ensayo, en contraposición con las plantas inoculadas con N33 y con el consorcio, que presentan un comportamiento idéntico a las control. A su vez M25 no presenta un plateau tan marcado hacia el final del ensayo, como sí presentan los demás tratamientos, lo que podría deberse a que las plantas todavía están vivas, y por lo tanto continúan transpirando a un ritmo significativo aún después de haber atravesado dos semanas sin riego.

Este efecto de aminorar la tasa de pérdida de agua aportado por M25 se ve respaldado por una menor senescencia foliar al final del ensayo. Las plantas inoculadas con M25 presentaron en promedio aproximadamente un 10% menos de hojas senescentes respecto a las plantas control, lo cual indica un mejor estado hídrico posterior al ensayo de sequía, o bien un mecanismo inducido por M25 para evitar la senescencia en las hojas. Por otro lado, la inoculación con ambas cepas en consorcio resultó en una senescencia intermedia entre la inoculación individual con M35 y con N33, siendo esta última la de mayor porcentaje de hojas senescentes.

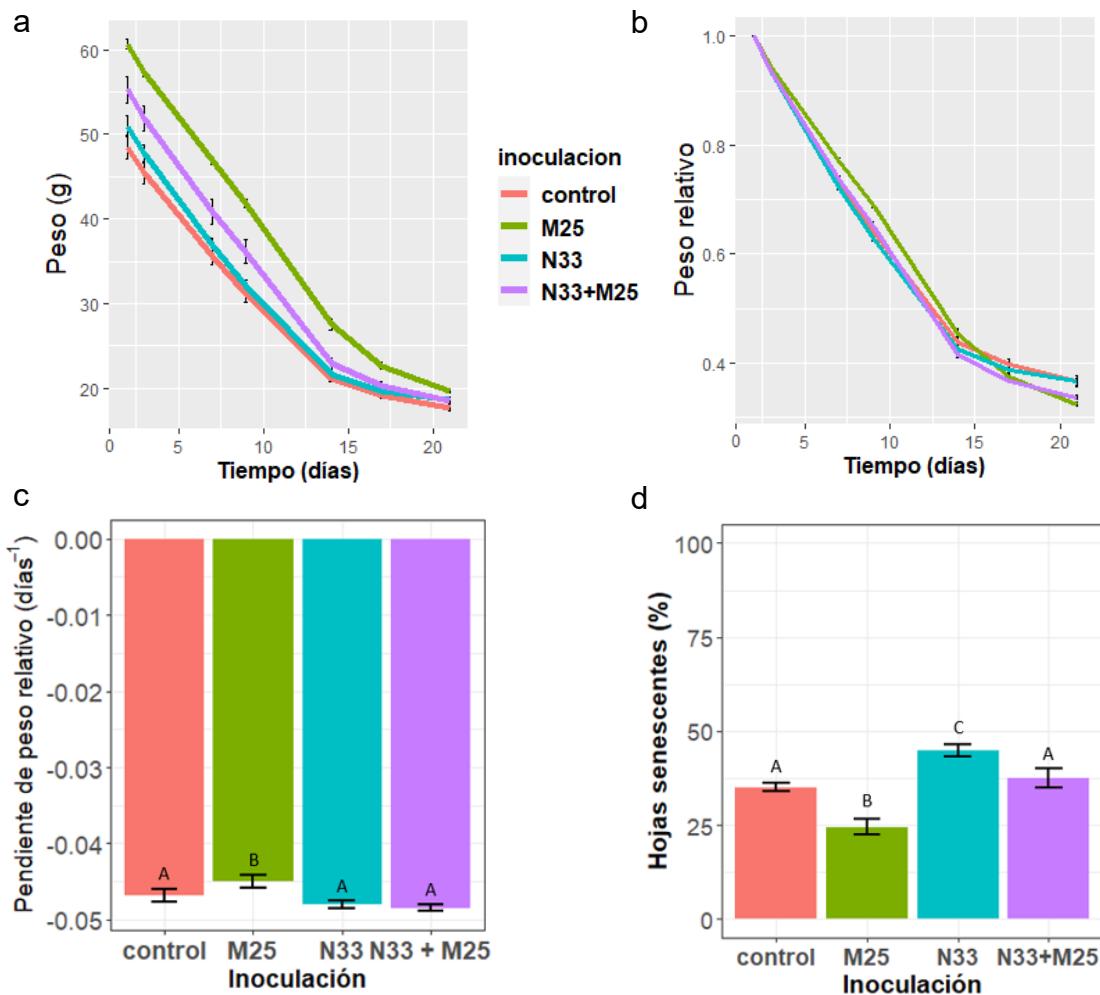


Figura R3. Parámetros estimativos de la pérdida de agua y la senescencia de las plantas bajo condiciones de sequía. (a) Pérdida de agua por evapotranspiración (valores absolutos). **(b)** Pérdida de agua por evapotranspiración (valores relativos al primer día de medición). **(c)** Pendiente de pérdida de peso relativo para la región lineal de cada maceta (día 2 a día 14). **(d)** Porcentaje de hojas senescentes del total para cada planta al día 21. Se muestran las medias y el error estándar de cada tratamiento, $n = 7 - 8$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P -valor $< 0,05$).

Con la intención de seguir caracterizando el efecto de la inoculación con M25 y N33 sobre el manejo hídrico de *arabidopsis* se determinó el contenido relativo de agua (CRA) y la conductancia estomática (g_s) de las hojas. En este ensayo se realizaron mediciones únicamente en plantas bajo riego normal. Dado que la medición de g_s supone un estrés manipulativo para las hojas, y que la determinación del CRA implica la extirpación de una hoja entera de cada planta, se decidió realizar estas dos mediciones una vez finalizada la adquisición de datos de área foliar (día 14 para la medición de g_s y día 21 para el CRA). El CRA resultó alrededor de un 5% más elevado en plantas control y en las inoculadas con M25+N33, respecto a aquellas plantas inoculadas con cualquiera de las cepas de forma individual (Figura R4). Esto nos indica que bajo una situación ideal de disponibilidad de

agua la inoculación con M25 o N33 resulta en una menor acumulación de agua en las hojas transcurridos 21 días, lo que significa un manejo hídrico diferente al de aquellas plantas donde no se agregaron bacterias al sustrato. En la misma línea, al observar la conductancia estomática en las hojas vemos que en M25 y N33 hay una mayor transpiración promedio respecto al control, que podría explicar los valores de CRA más bajos mencionados anteriormente.

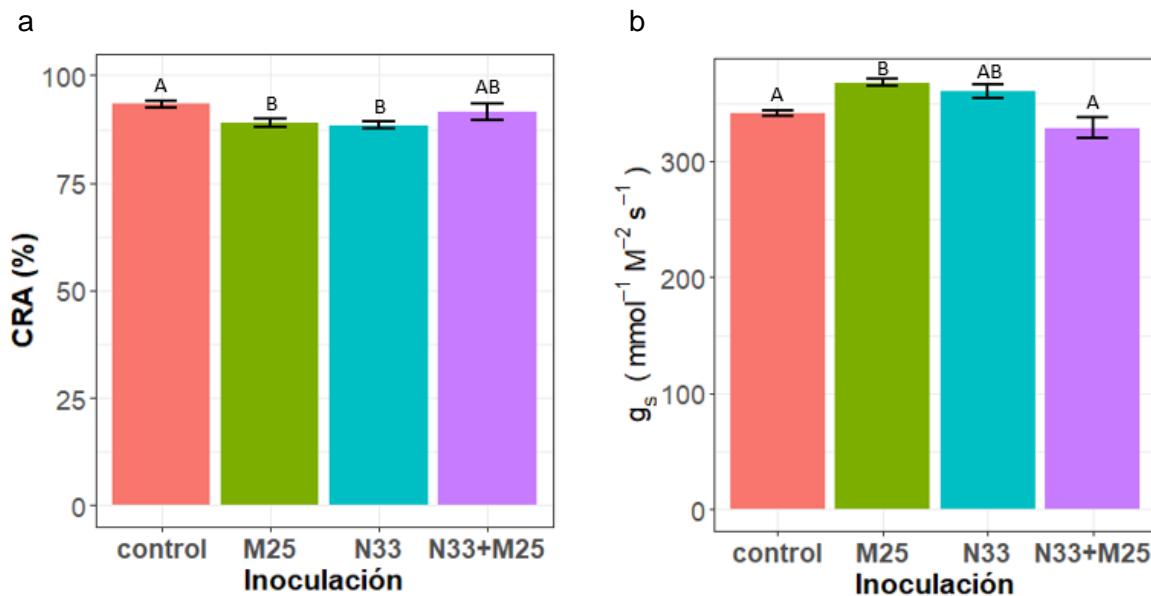


Figura R4. Parámetros referentes al estado hídrico bajo riego normal. (a) Contenido relativo de agua de las hojas el día 21. **(b)** Conductancia estomática de las hojas el día 14. Se muestran las medias y el error estándar de cada tratamiento, $n = 5$. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P -valor $< 0,05$).

Efecto de la inoculación con bacterias sobre la arquitectura de la raíz y los pelos radicales

Con el fin de profundizar acerca de las diferencias observadas respecto al crecimiento y el estado hídrico de las plantas para los tratamientos de inoculación, se realizaron ensayos de crecimiento de *arabidopsis* en medio agarizado, los cuales permitieron la visualización directa de la arquitectura radical. Para caracterizar este sistema se determinó el largo de la raíz principal y el número de raíces laterales en plántulas analizadas a los 19 días desde el inicio de la germinación, y luego de transcurridos 8 días desde la inoculación (Figura R5a). Se obtuvieron diferencias en cuanto al patrón de crecimiento y ramificación del sistema radical al inocular de manera individual con cada cepa. Por un lado M25 mostró una tendencia a un mayor largo de la raíz principal y mayor número de raíces laterales con respecto al control. Aunque estas diferencias no fueron significativas, observamos una fuerte reducción de la varianza de ambas variables en presencia de M25. En cambio, en plantas inoculadas con N33 se observó, en promedio, una raíz principal más corta y un

menor número de ramificaciones que en el control, en ambos casos siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Es importante notar este efecto diferencial de cada bacteria sobre el agrupamiento de los datos: mientras que el control posee una amplia variabilidad, M25 y N33 por separado provocan respuestas diferentes, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente provocado por la presencia de las bacterias en la proximidad de las raíces. En respaldo, se observa un comportamiento aditivo en el tratamiento consorcio, que resultó en una arquitectura radical muy similar a la del control.

Esto se condice con lo explicado anteriormente, en donde la dispersión de N33+M25 se podría deber a que algunas plantas se comportan de forma similar a las tratadas con M25, otras como las tratadas con N33, y algunas de manera intermedia.

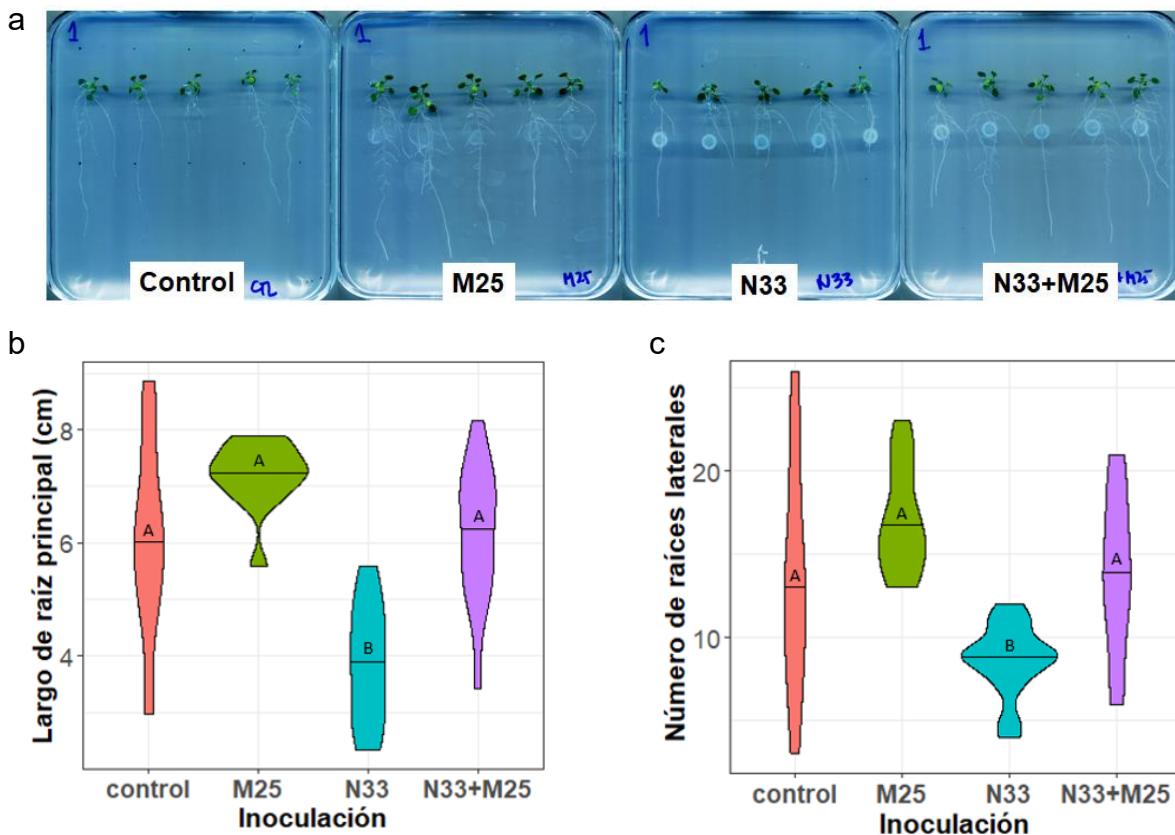


Figura R5. Efecto de la inoculación con M25 y N33 sobre la arquitectura de la raíz en plantas Col-0. (a) Plantas Col-0 cultivadas en placas cuadradas con medio agarizado 8 días posterior a la inoculación con bacterias. **(b) y (c)** Parámetros de arquitectura radical. Se muestran las medianas de cada tratamiento, $n = 5$ por placa, para un número de placas por tratamiento = 3. Las distintas letras indican diferencias significativas entre medias en un ANOVA de un factor (P -valor < 0,05). El factor aleatorio de cada placa no fue estadísticamente significativo (P -valor > 0,05).

Otro factor determinante en la eficiencia de la adquisición de agua y minerales por las raíces son los pelos radicales. Dado que se contaba con información proveniente de experimentos anteriores (Cháin, 2021) se decidió profundizar el estudio del efecto de M25 y N33 sobre el desarrollo de PRs en arábigo. Para ello se determinó el número de pelos radicales próximos al ápice de la raíz principal en plantas Col-0, 5 días luego de la inoculación con bacterias, en aquellas raíces que habían atravesado la gota de inoculación. Las plántulas inoculadas con bacterias presentaron PRs de mayor longitud (figura R6.a), y un mayor número de éstos en su ápice, respecto a aquellas no inoculadas (figura R6.b). Tanto M25 como N33 indujeron individualmente el desarrollo de PRs de manera notable, aumentando su número aproximadamente 10 veces en comparación con a las plántulas control, pero sin evidenciar un efecto sinérgico al ser inoculadas en consorcio.

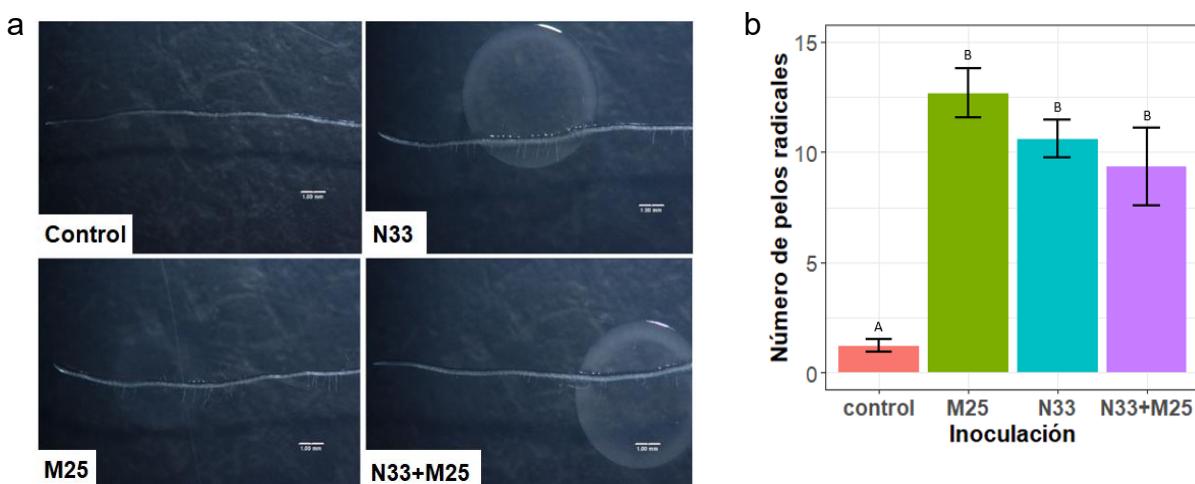


Figura R6. Efecto de la inoculación con M25 y N33 sobre el desarrollo de pelos radicales en plantas Col-0. (a) Fotografía representativa de los pelos radicales en ápice de la raíz bajo lupa (10X). **(b)** Número de pelos radicales por tratamiento 4 días posterior a la inoculación. Se muestran las medias y el error estándar de cada tratamiento, $n = 1-11$ por placa, para un número de placas por tratamiento = 3. Las distintas letras indican diferencias significativas en un ANOVA de un factor (P -valor $< 0,05$). El factor aleatorio de cada placa no fue estadísticamente significativo (P -valor $> 0,05$).

Visualización de fluorescencia en línea DR5rev::GFP reportera de auxinas

En línea con el objetivo de profundizar acerca del mecanismo por el cual las cepas M25 y N33 producen cambios en la raíz, se decidió estudiar la posible implicancia de ambas sobre la vía de las auxinas, dado que esta hormona juega un importante rol en los procesos de crecimiento radical, ramificación y formación de PRs. Para poder entender si nuestras bacterias promueven cambios en dicha vía se realizó un ensayo con plántulas de arábigo de la línea transgénica DR5rev::GFP, que posee en su genoma el promotor del gen DR5, inducible por auxinas, ubicado río arriba del gen de GFP, lo cual permite observar por microscopía de fluorescencia posibles alteraciones en la regulación de dicha vía.

En este ensayo con la línea reportera, además de ver el efecto sobre la señalización de auxinas, se analizó también el efecto de las bacterias sobre la arquitectura radical, con el fin de corroborar los fenotipos antes descriptos en Col-0. Contrariamente a lo esperado, la arquitectura general de la raíz en la línea DR5rev::GFP no respondió de igual manera que Col-0 frente a la inoculación, ya que el largo de la raíz principal y el número de raíces laterales no varió entre los tratamientos de inoculación (figura R7.b). En cambio, el efecto sobre el desarrollo de PRs fue el mismo en las dos líneas: el número de pelos radicales de la raíz principal se vio fuertemente incrementado en todos los tratamientos con bacterias (figura R7.c), observándose en promedio entre 35 y 60 veces más pelos radicales que en el control, lo cual evidencia un efecto promotor del desarrollo de PRs por parte de M25 y N33 sobre DR5rev::GFP, siendo este efecto aún más notable que en Col-0 (entre 20 y 40 veces más PRs en promedio, figuras R6 y R7c).

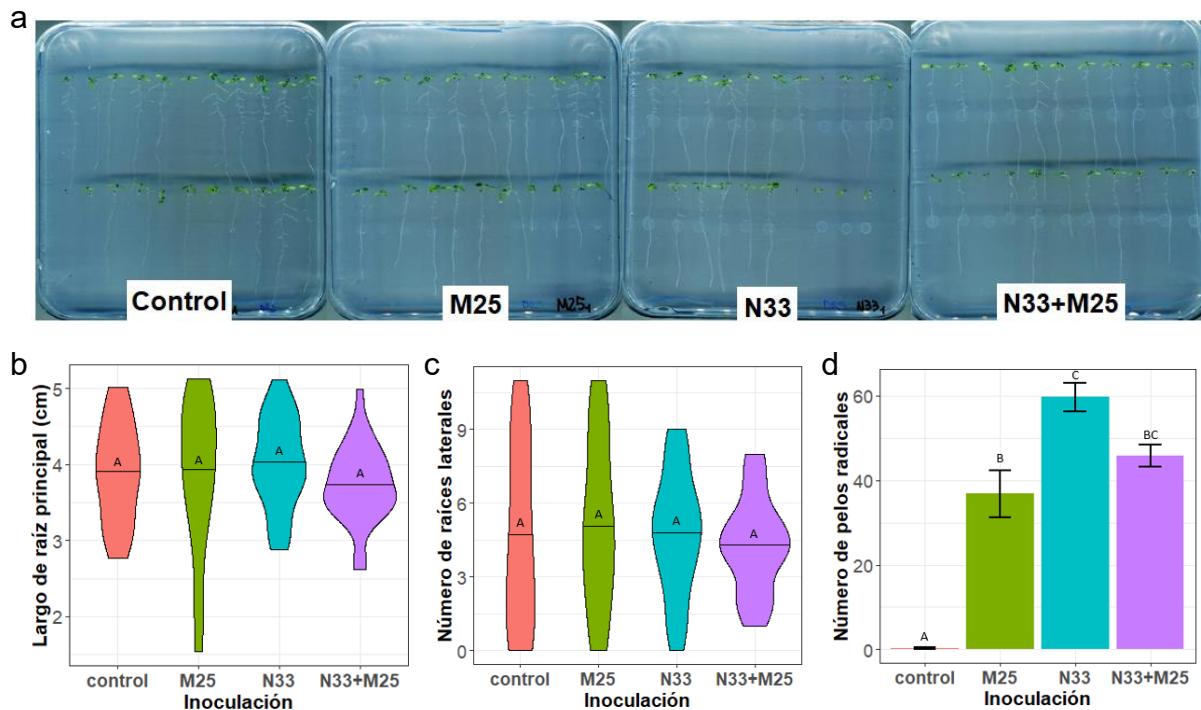


Figura R7. Efecto de la inoculación con M25 y N33 sobre la arquitectura radical y el desarrollo de pelos radicales en plantas DR5rev::GFP. (a) Fotografía representativa de plantas cultivadas en placas cuadradas con medio agarizado, 5 días posterior a la inoculación con bacterias. **(b)** y **(c)** Parámetros de arquitectura radical. **(d)** Número de pelos radicales. Para los gráficos (b) y (c) se muestran las medianas de cada tratamiento, $n = 9-19$ por placa, para un número de placas por tratamiento = 2. Para el gráfico (d) se muestran las medias de cada tratamiento y su error estándar, $n = 8-17$. Las distintas letras indican diferencias significativas entre medias a partir de un ANOVA de un factor (P -valor $< 0,05$). El factor aleatorio correspondiente a la variable placa no fue estadísticamente significativo (P -valor $> 0,05$).

Si bien no se replicaron exactamente los mismos resultados obtenidos en Col-0, podemos identificar ciertas diferencias a nivel experimental entre ambos ensayos. En primer lugar las plántulas medidas en el primer ensayo de arquitectura radical contaron con 10 días más de crecimiento dentro de la cámara de cultivo, siendo en promedio 2 cm más largas y con aproximadamente 10 veces mas raíces laterales (figura R5). Que las plántulas DR5rev::GFP se encontraran en un estadio más temprano de desarrollo podría haber impedido la observación de efectos inducidos por M25 y N33 sobre el crecimiento de la raíz y la formación de raíces secundarias. En segundo lugar la manipulación de las plántulas, ya que en el ensayo con Col-0 estas fueron traspasadas desde la placa inicial hasta la placa final en donde fueron inoculadas, lo cual involucró estrés mecánico principalmente sobre la raíz, a diferencia del ensayo con DR5rev::GFP que se llevó a cabo con plántulas crecidas desde semilla en las placas finales. Si bien las plántulas DR5rev::GFP contaron con menos días de crecimiento se pudo observar una fuerte inducción de PRs, permitiendo asegurar que hay un efecto inducido por las bacterias sobre esta línea.

Dado que el fenotipo de PRs fue el mismo en las dos líneas de arábidopsis, se realizó un ensayo de visualización de fluorescencia de GFP en el microscopio confocal, primeramente a partir de una exploración total de la raíz, para identificar aquellas regiones que presentaban células con fluorescencia de GFP, indicando una alta concentración de auxinas. Después de un escaneo general de la raíz principal se encontró presencia de GFP en núcleos de células del meristema subapical y la caliptra, y en algunas células del periciclo próximas a la formación de raíces laterales. Como con esta primera inspección semicuantitativa no se apreciaron diferencias a lo largo de la raíz entre tratamientos, nos enfocamos en la cuantificación de la fluorescencia en el ápice de la raíz principal de cada planta, región donde se detectó mayor fluorescencia de GFP. En la figura R8 se observan las imágenes obtenidas y el número promedio de núcleos fluorescentes por tratamiento, que resultó no significativo.

Este resultado sugiere que las bacterias, suministradas individualmente o en consorcio, no provocan una alteración en la vía de las auxinas en la raíz. Aún así, es importante tomar en consideración el tamaño muestral y el método de cuantificación. Dados los tiempos de trabajo disponibles en el microscopio confocal, el número de mediciones para cada tratamiento fue acotado, resultando en medias con varianzas considerablemente grandes, lo que pudo haber resultado en una limitación para detectar posibles diferencias significativas entre tratamientos. Por otro lado, podría suceder que una alteración dentro de la vía de señalización de auxinas se traduzca como una diferencia en la intensidad de GFP dentro de las células, y no como un cambio en el número de células en que esta proteína se expresa.

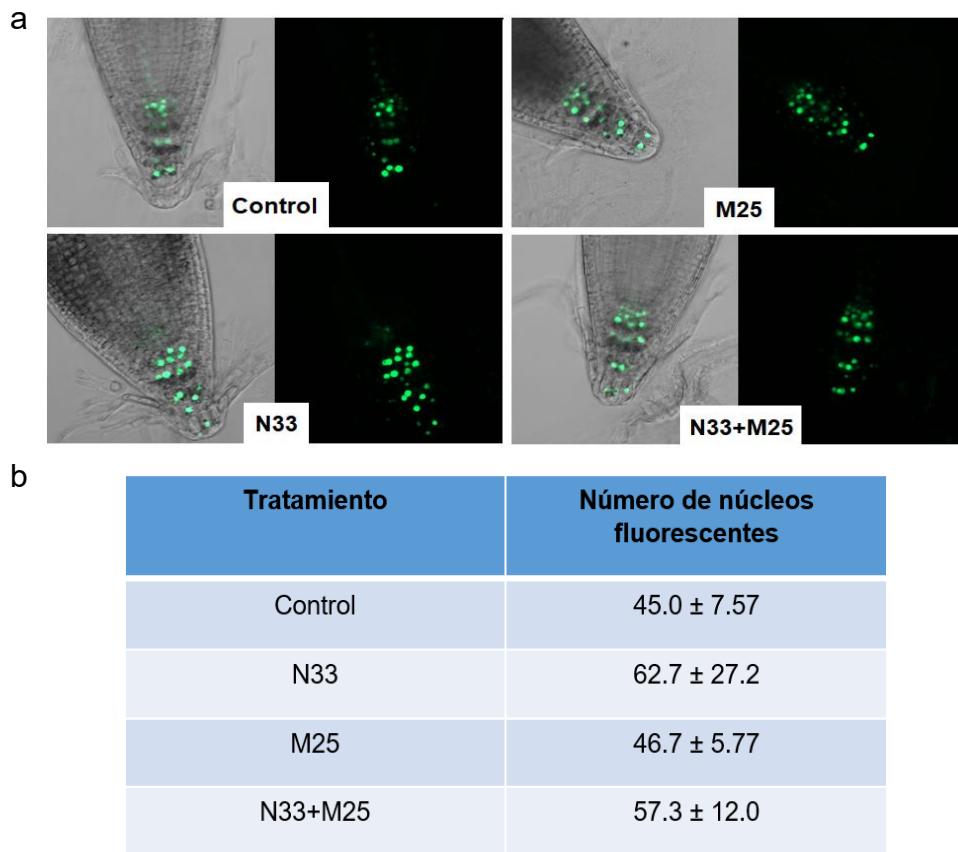


Figura R8. Fluorescencia de GFP en núcleos del ápice de la raíz en plántulas DR5rev::GFP. (a) Imágenes stack del eje Z (intensidad máxima) tomadas bajo el microscopio confocal de fluorescencia. **(b)** Número de núcleos fluorescentes 6 días posterior a la inoculación con bacterias. Los números indican la media ± el error estándar, n = 3. No se observaron diferencias significativas mediante ANOVA de 1 factor (P-valor > 0.05)

Discusión

Es importante destacar que a continuación se discuten los resultados obtenidos a partir de un solo experimento realizado en *arabidopsis* para condiciones de riego normal y de sequía. Si bien este experimento contó con 8 unidades experimentales por tratamiento, no se pudo replicar debido a inconvenientes para mantener idénticas condiciones de cultivo en el período de tiempo dedicado a esta tesis.

Efecto de la inoculación sobre el crecimiento y el manejo hídrico bajo condiciones óptimas de disponibilidad de agua

En ausencia de estrés hídrico, la inoculación con las cepas bacterianas demostró implicar un costo para las plantas; este costo se manifestó tanto con una menor tasa de crecimiento (medida como aumento de área foliar) como con una disminución en la biomasa del vástago acumulada al final del experimento. Aunque se observó dispersión en los datos comparativos (figura R2.c y e), ninguno de los diferentes tratamientos de inoculación produjo un aumento de los parámetros de crecimiento medidos, sino una disminución del 10-15%, con lo que podemos afirmar que estas bacterias no favorecen el crecimiento de la roseta de *arabidopsis* bajo riego normal. Sin embargo, en un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que tanto N33 como M25 promovían el crecimiento del vástago de plantines de *E. grandis*, tanto en riego normal como en sequía (Chaín *et al.* 2020), y en un ensayo preliminar realizado en *arabidopsis* (Chaín, 2021). Esta discrepancia puede deberse a diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, en los ensayos en *E. grandis* las bacterias fueron aplicadas embebidas en un gel) o, alternativamente, a una respuesta diferencial de una especie herbácea comparada con una especie arbórea.

En cuanto al manejo hídrico, se sabe que algunas PGPBs provocan una disminución de la conductancia estomática y esto puede resultar beneficioso para la planta como estrategia de conservación de agua (Ngumbi y Kloepper, 2016). Si las plantas responden a su estado hídrico ajustando la concentración de osmolitos en sus tejidos, el cierre estomático a su vez podría traducirse en un CRA foliar más elevado (Lawlor y Cornic 2002). En nuestro caso, para plantas bien regadas la inoculación con M25 resultó en una conductancia levemente y significativamente mayor que la del control y un CRA más bajo. Estos dos resultados tomados en conjunto sugieren que, si bien la presencia de M25 altera el manejo del agua en *arabidopsis*, no lo hace induciendo un ajuste osmótico.

Comparando los resultados de nuestras inoculaciones con las cepas de forma individual y con el consorcio, no observamos un comportamiento sinérgico ni antagonista entre M25 y N33; de hecho, en la mayoría de los ensayos, los resultados fueron aditivos. Esto indica que, si se generara un bioinoculante utilizando estas cepas, M25 y N33 podrían aplicarse de manera conjunta sin penalidad.

Efecto de la inoculación sobre la tolerancia a la sequía

A partir de las condiciones de sequía exitosamente logradas se pudo evaluar el efecto de las cepas M25 y N33 respecto a su capacidad de promover el crecimiento y la tolerancia

frente al déficit hídrico, tanto de forma individual como en consorcio. Como se esperaba, la suspensión total del riego produjo, en general, un marcado detrimento en el estado hídrico y el verdor de las plantas y en su crecimiento a lo largo del ensayo. El parámetro de crecimiento que más contraste generó entre plantas de riego normal vs. plantas bajo sequía fue la biomasa del vástago al final del experimento. El déficit hídrico produjo un arresto en el crecimiento del vástago desde los días 7-9 desde la suspensión del riego, para todos los tratamientos a excepción de M25, en donde no se observó un cambio en la velocidad del crecimiento del vástago bajo esta condición adversa.

Nuestra hipótesis nos llevaba a esperar que tanto M25 como N33 presentaran, durante o hacia el final del ensayo, un mejor desempeño con respecto a las plantas inoculadas con solución control; a su vez, dicho efecto podría presentar un componente sinérgico al aplicar N33+M25 en consorcio. Los resultados indican que únicamente M25 aporta un beneficio frente a la sequía, el cual resulta en un mantenimiento del crecimiento del vástago (figura R2.d), una disminución en la velocidad de evapotranspiración durante la primera fase de deshidratación (figura R3.b y c), y una menor senescencia foliar (figura R3.d). Contrario a lo esperado, dichos efectos no fueron observados en los otros dos tratamientos con bacterias, siendo que su desempeño fue en la mayoría de los casos idéntico al control. Si bien el tratamiento con N33+M25 no presentó un comportamiento significativamente diferente al observado en el tratamiento sin inocular, notamos una tendencia a presentar un desempeño intermedio entre M25 y el control. Esta tendencia la observamos especialmente para área foliar proyectada y para velocidad de evapotranspiración, y nos lleva a pensar que M25 es la responsable de dicho comportamiento (la concentración de M25 en el consorcio es la mitad respecto al tratamiento individual con M25). Esta tendencia mencionada parece repetirse también en los patrones de arquitectura radical.

Si bien es de especial interés conocer el manejo del agua en respuesta al déficit hídrico en plantas inoculadas, no fue posible la determinación de g_s y CRA hacia el final del ensayo de sequía debido al estado senescente de las plantas. Como alternativa se podría haber realizado un ensayo con más unidades experimentales, para poder realizar las mediciones destructivas de CRA sobre algunas plantas en tiempos anteriores a la senescencia, o bien realizar un ensayo más corto, con mediciones de CRA y g_s alrededor de las dos semanas posteriores a la interrupción del riego.

Efecto de la inoculación sobre la arquitectura de la raíz

A partir de los ensayos de crecimiento de plántulas en medio agarizado se pudo observar y caracterizar la arquitectura radical, en base a los parámetros de crecimiento, ramificación y desarrollo de PRs de la raíz principal. Los resultados arrojaron un desarrollo del sistema radical con diferencias fenotípicas marcadas según se inoculó con M25 o N33; estos patrones desaparecieron al inocular con ambas cepas en consorcio, donde el resultado fue un fenotipo intermedio, semejante al tratamiento control sin bacterias. Que M25 y N33 induzcan fenotipos diferentes podría significar que las dos cepas tienen un efecto diferente sobre las vías hormonales en la raíz. La compleja interacción entre las distintas fitohormonas da como resultado la inducción o represión de los procesos celulares, tales como la división, elongación y diferenciación de las células, que determinan el crecimiento final de la raíz principal (Zluhan-Martínez *et al.*, 2021). Por otro lado, se conocen PGPBs dentro del género *Pseudomonas* capaces de alterar el largo de la raíz principal, la formación

de raíces laterales y la inducción de PRs (Zamioudis *et al.*, 2013), y que podrían tener un efecto sobre el crecimiento del vástago, lo cual nos lleva a prestar especial atención a los patrones detectados en los tratamientos con M25 o N33.

Sumado a los efectos sobre el patrón de elongación y ramificación de la raíz, ambas cepas produjeron una fuerte inducción en el desarrollo de los pelos radicales en el ápice de la raíz principal. No se evidenciaron diferencias entre los tres tratamientos de inoculación con bacterias, lo cual descarta la idea de un efecto sinérgico al combinar M25 y N33 en consorcio.

Al haberse observado PRs de mayor longitud y en mayor número nos surgen preguntas respecto al mecanismo que promueve dicha inducción. Dado que la identidad de las células previas a convertirse en PRs (tricoblastos) responde a un patrón espacial dentro de la raíz (Schiefelbein *et al.*, 2019; Shibata y Sugimoto 2019), se podría hipotetizar que tanto M25 como N33 alteran el proceso de diferenciación de dichas células, promoviendo un mayor número de tricoblastos en la epidermis de la raíz y aumentando así el número final de PRs. Alternativamente, se podría especular con otro mecanismo, que involucre una aceleración del proceso de diferenciación de los tricoblastos ya existentes, lo que resultaría en un mayor número de PRs ya diferenciados próximos al ápice de la raíz (es decir con su *tip* más elongado). Previamente mencionamos trabajos en donde distintas PGPBs (incluidas cepas del género *Pseudomonas*) promueven la formación de PRs (Zamioudis *et al.*, 2013; Verbon y Liberman, 2016), lo cual apoya nuestros resultados obtenidos inoculando con M25 o N33, indistintamente del mecanismo que esté actuando.

Si bien estos resultados de arquitectura radical fueron obtenidos bajo condiciones normales de disponibilidad de agua, podríamos esperar que, de reproducirse en plantas sometidas a sequía, el aumento de PRs producido por las bacterias resultaría en una mejor utilización del agua y una mayor tolerancia al estrés hídrico (Marin *et al.*, 2021). Aunque los tres tratamientos de inoculación resultaron en un aumento significativo de PRs en los ensayos en medio agarizado, en los experimentos en sustrato sólido sólo observamos una mayor tolerancia a la sequía en presencia de la cepa M25 y no de la N33 o del consorcio, lo que sugiere que la relación entre la superficie de absorción de la raíz y la respuesta al DH es más compleja de lo que suponíamos.

Possible efecto de la inoculación en la señalización de auxinas

Para visualizar el efecto de la inoculación sobre la señalización de auxinas utilizamos la línea reportera de arabidopsis DR5rev::GFP. Como la intención de este experimento era observar rápidamente cambios en esta vía en la zona apical de la raíz principal, en los ensayos de arquitectura radical utilizamos plántulas 8 días más jóvenes que las utilizadas con la línea salvaje Col-0. En el experimento con DR5rev::GFP las bacterias no causaron cambios en el largo y la ramificación de la raíz principal. Estas diferencias con lo previamente observado en Col-0 podrían deberse al estadio más temprano de desarrollo de las plántulas DR5rev::GFP (Col-0 presentó en promedio raíces principales 2 cm más largas, con 8 raíces laterales más; figuras R5 y R7). No podemos descartar que, de haberse realizado las mediciones en el mismo estadio para las dos líneas de arabidopsis, hubiésemos replicado los mismos resultados.

En cambio, la cuantificación de la inducción de PRs se realizó en la misma ventana temporal para ambas líneas de *arabidopsis* y se observó en DR5rev::GFP el mismo resultado sobre el largo y número de PRs que habíamos obtenido con Col-0 (figuras R6 y R7.d). Esto convalida el uso de DR5rev::GFP como reportera de la señalización de auxinas en el desarrollo de PRs en nuestro sistema.

Pese a lo esperado, no observamos diferencias en la señalización de auxinas en el ápice de raíces inoculadas con respecto al control. A partir de esto podemos plantear posibles explicaciones: 1) Ninguna de las dos cepas, individualmente o en consorcio, produce alteraciones en la vía de las auxinas, aunque esto no descarta que lo hagan sobre la vía regulatoria de otra hormona. 2) De haber un efecto en la vía de las auxinas, éste no se evidenciaría en la región apical de la raíz, sino en otra región, como por ejemplo la zona de elongación o la zona de diferenciación, que no incluimos en este análisis. 3) No es posible evidenciar el efecto de las bacterias al cuantificar el número de células en donde se induce la vía de auxinas, si lo que está implicado es una diferencia en la concentración intracelular de auxina, y no en el número de células que responden a ella. 4) Alternativamente podría considerarse que el bajo número de réplicas ($n=3$) no permite observar diferencias estadísticas.

Este resultado nos invita a realizar nuevos ensayos en DR5rev::GFP, los cuales involucren un mayor tamaño muestral. Además, se podrían complementar esos experimentos con un ensayo que permita cuantificar directamente la producción de auxinas en las suspensiones de bacterias, tanto aisladas como en interacción con las plantas.

Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue avanzar en la comprensión del fenómeno, previamente observado, de mejora del crecimiento y de la tolerancia a la sequía que las cepas de *Pseudomonas* M25 y N33 confieren a ejemplares jóvenes de *Eucalyptus grandis*. Este estudio se realizó en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* con la intención de verificar los efectos de las bacterias, investigar su mecanismo de acción y lograr información trasladable a otras especies vegetales. Se logró estudiar en esta especie el efecto de la inoculación con ambas cepas en consorcio sobre la arquitectura de la raíz, llevando el estudio un paso más allá respecto a lo previamente reportado en *E. grandis*. A partir de los resultados presentados podemos afirmar que *arabidopsis* es un buen modelo para estudiar la inducción de PRs por ambas cepas bacterianas y que dicha inducción no está mediada por una alteración marcada de la señalización por auxinas. Los resultados del ensayo de sequía sugieren que *arabidopsis* puede ser un buen modelo para el estudio del efecto protector de M25 en eucaliptos, pero esto no queda claro para N33. Para explorar estas discrepancias, entre otras cosas sería necesario ampliar los experimentos de sequía, aumentando el número de unidades experimentales y determinando parámetros hidráulicos con más precisión durante el período de aplicación del DH.

Bibliografía

- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., et al. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9, 1473. doi:10.3389/fpls.2018.01473.
- Banda, J., Bellande, K., von Wangenheim, D., Goh, T., Guyomarc'h, S., Laplaze, L., et al. (2019). Lateral root formation in arabidopsis: a well-ordered irexit. *Trends Plant Sci.* 24, 826–839. doi:10.1016/j.tplants.2019.06.015.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., and Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Front. Microbiol.* 5, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., and Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., and Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J. Appl. Microbiol.* 110, 1151–1165. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x.
- Chaín, J. M., Tubert, E., Graciano, C., Castagno, L. N., Recchi, M., Pieckenstain, F. L., et al. (2020). Growth promotion and protection from drought in *Eucalyptus grandis* seedlings inoculated with beneficial bacteria embedded in a superabsorbent polymer. *Sci. Rep.* 10, 1–17. doi:10.1038/s41598-020-75212-4.
- Chaín, JM (2021) "Manejo del agua en plantines de *Eucalyptus grandis* y efecto frente a la sequía de la inoculación con bacterias beneficiosas embebidas en un polímero superabsorbente". Tesis doctoral. Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol. Fertil. Soils* 48, 489–499. doi:10.1007/s00374-012-0691-4.
- Dietrich, D. (2018). Hydrotropism: How roots search for water. *J. Exp. Bot.* 69, 2759–2771. doi:10.1093/jxb/ery034.
- FAO (2019). Proactive approaches to drought preparedness - Where are we now and where do we go from here? Disponible en: <http://www.fao.org/3/ca5794en/ca5794en.pdf>.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., et al. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426, 147–153. doi:10.1038/nature02085.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., and Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science* 368, 266–269. doi:10.1126/science.aaz7614.
- Hsu, P.-K., Dubeaux, G., Takahashi, Y., and Schroeder, J. I. (2020). Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *Plant J.* 0–2. doi:10.1111/tpj.15067.
- Jung, J. K. H., and McCouch, S. (2013). Getting to the roots of it: Genetic and hormonal

- control of root architecture. *Front. Plant Sci.* 4, 1–32. doi:10.3389/fpls.2013.00186.
- Lawlor, D. W., Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25, 275–294
- Massalha, H., Korenblum, E., Tholl, D., and Aharoni, A. (2017). Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *Plant J.* 90, 788–807. doi:10.1111/tpj.13543.
- Marin, M., Feeney, D. S., Brown, L. K., Naveed, M., Ruiz, S., Koebernick, N., et al. (2021) Significance of root hairs for plant performance under contrasting field conditions and water deficit. *Ann Bot* 128: 1–16
- Ngumbi, E., and Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Appl. Soil Ecol.* 105, 109–125. doi:10.1016/j.apsoil.2016.04.009.
- Robert-Seilantianz, A., Bari, R., and Jones, J. D. G. (2010). “A biotic or abiotic stress? En *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert and Govindjee (eds.) pp 103–122. doi:10.1007/978-90-481-3112-9.
- Schiefelbein, J., Kwak, S. H., Wieckowski, Y., Barron, C., and Bruex, A. (2009). The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 60, 1515–1521. doi:10.1093/jxb/ern339.
- Shibata, M., and Sugimoto, K. (2019). A gene regulatory network for root hair development. *J. Plant Res.* 132, 301–309. doi:10.1007/s10265-019-01100-2.
- Tardieu, F., Simonneau, T., and Muller, B. (2018). The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040218.
- Tenorio Berrío, R., Nelissen, H., Inzé, D., and Dubois, M. (2022). Increasing yield on dry fields: molecular pathways with growing potential. *Plant J.* 109, 323–341. doi:10.1111/tpj.15550.
- Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., and Singh, B. K. (2022). Plant-microbiome interactions under a changing world: responses, consequences, and perspective. *New Phytol.* In press. doi:10.1111/NPH.18016.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Locoz, Y., Muller, D., et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 1–19. doi:10.3389/fpls.2013.00356.
- Velasquez, S. M., Barbez, E., Kleine-Vehn, J., and Estevez, J. M. (2016). Auxin and cellular elongation. *Plant Physiol.* 170, 1206–1215. doi:10.1104/pp.15.01863.
- Verbon, E. H., and Liberman, L. M. (2016). Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* 21, 218–229. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.013.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45, 523–539. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x.

- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., and Schoenaers, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 71, 2412–2427. doi:10.1093/jxb/eraa048.
- Yaschenko A. E., Alonso J. M., Stepanova A. N. (2024) *Arabidopsis* as a model for translational research. *Plant Cell* koae065, <https://doi.org/10.1093/plcell/koae065>
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., and Pieterse, C. M. J. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Plant Physiol.* 162, 304–318. doi:10.1104/pp.112.212597.
- Zhu, S., Martínez Pacheco, J., Estévez, J. M., and Yu, F. (2020). Autocrine regulation of root hair size by the RALF-FERONIA-RSL4 signaling pathway. *New Phytol.* 227, 45–49. doi:10.1111/nph.16497.
- Zluhan-Martínez, E., López-Ruiz, B. A., García-Gómez, M. L., García-Ponce, B., de la Paz Sánchez, M., Álvarez-Buylla, E. R., et al. (2021). Integrative roles of phytohormones on cell proliferation, elongation and differentiation in the *arabidopsis thaliana* primary root. *Front. Plant Sci.* 12, 1–20. doi:10.3389/fpls.2021.659155.

Anexo

Preparación de soluciones MS

Tabla suplementaria. Componentes presentes en las soluciones MS para el cultivo de plantas

Solución	Compuesto	Cantidad a agregar (para 1000 mL de solución)
MS1	NH_4NO_3	33 g
	KNO_3	38 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4 g
	KH_2PO_4	3.4 g
MS2	KI	0.17 g
	H_3BO_3	1.24 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.46 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.72 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
	$\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005 g
MS3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.56 g
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.46 g