

Tesis Doctoral

Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico

Ribaudo, Claudia Mónica

2013-06-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ribaudo, Claudia Mónica. (2013-06-28). Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ribaudo, Claudia Mónica. "Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-06-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la
interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas
de interés agronómico**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas**

Lic. Claudia Mónica Ribaudó

Director de tesis: Dra. María Leonor Cantore

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem

**Lugar de trabajo: Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad
de Buenos Aires.**

Buenos Aires, 2013

Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico

Resumen

En esta Tesis se abordó el estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la interacción entre algunas bacterias promotoras del crecimiento y dos plantas de interés agronómico, arroz (*Oryza sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

La bacteria *Azospirillum brasilense* promovió el crecimiento de plantas de arroz, especialmente de su sistema radicular; la inoculación indujo un aumento en la producción de etileno en la planta y en la actividad y expresión de la ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS). Se observó también un aumento en la actividad de quinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} cuyas características bioquímicas indican que se trata de una CDPK que estaría relacionada con el crecimiento de las raíces laterales.

La inoculación con *A. brasilense* promovió el crecimiento de plantas de tomate, aumentó los niveles de ácido indol acético (AIA) y etileno y la actividad y expresión de ACS. El suplemento exógeno de etileno y el uso de un inhibidor de su percepción permiten asignar a modo de hipótesis un rol intermediario del etileno en la promoción del crecimiento del sistema radicular en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*.

El análisis global del perfil de expresión génica asociado a la inoculación de plantas de tomate con *A. brasilense* indicó que la inoculación estimuló la expresión de una variedad de genes, muchos de los cuales se inducen por etileno y que se han encontrado sobre expresados en otras especies en respuesta a la infección con patógenos o afectadas por agentes generadores de estrés. Los niveles de expresión de los genes implicados en el establecimiento de la respuesta hipersensible aparecen sub expresados lo cual podría favorecer el establecimiento de la interacción endofítica entre *A. brasilense* y tomate. Utilizando la técnica de 2D-DIGE se comenzó el análisis de los perfiles de proteínas expresadas en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*. Con esta técnica se logró evidenciar diferencias en los patrones de expresión que dependen del tratamiento al que se sometió a las plantas.

Palabras claves: PGPRs, *Azospirillum*, CDPK, arroz, tomate, análisis genómico, análisis proteómico

Biochemical and molecular mechanisms triggered in the interaction between plant growth promoting bacteria and plants of agricultural interest

Abstract

This thesis is focused on the study of biochemical mechanisms involved in the interaction among some growth-promoting bacteria and two plants of interest for agronomy: rice (*Oryza sativa*) and tomato (*Solanum lycopersicum*).

The bacterium *Azospirillum brasilense* promoted growth in rice plants, especially in their root system; inoculation induced an increase in ethylene production in the plant and in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) activity and expression. A rise was also noticed in a Ca²⁺-dependent protein kinase activity with the biochemical features of a CDPK that could be related to lateral roots' growth.

A. brasilense inoculation also promoted tomato plants growth, raised indole acetic acid (IAA) and ethylene levels and the activity and expression of ACS. Exogenous supplement of ethylene and the use of an inhibitor of their perception have allowed for the hypothesis for an intermediary role of ethylene in *A. brasilense*-inoculated tomato plants' root system growth.

The overall analysis of the genetic expression profile of tomato plants associated to the inoculation with *A. brasilense* has indicated that inoculation stimulated expression of a variety of genes which are also induced by ethylene and have been found overexpressed in other species as a result of pathogenic infection or affected by stress-generating agents. The genes involved in the hypersensitive response appeared as underexpressed; this fact could favour the establishment of the endophytic interaction between *A. brasilense* and tomato.

2D-DIGE technique was used to start the analysis of protein profiles expressed in *A. brasilense*-inoculated tomato plants.

Key words: PGPRs, *Azospirillum*, CDPK, rice, tomato, genomic analysis, proteomic analysis

“Si quieres construir un barco, no empieces por buscar madera, cortar tablas o distribuir el trabajo, sino que primero has de evocar en los hombres el anhelo de mar libre y ancho” (Antoine De Saint Exupery).

A la memoria de mis abuelos, Cristo y María

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mi esposo Sergio y a mis hijos Lucio y Abril, por haberme acompañado y apoyado durante estos largos años, por tolerar las ausencias, por su amor y paciencia infinita.

A mi directora de Tesis, Dra María Leonor Cantore por brindarme sus conocimientos, experiencia y esfuerzo para guiarme en este camino del doctorado, por haberlo hecho con tanta dedicación y amor.

Al Dr Alfredo Curá, con quien nos iniciamos en este camino del estudio de la comunicación entre los microbios y las plantas, por discutir el diseño de muchos experimentos, por las largas horas compartidas y sobre todo su amistad sincera.

A mis compañeros de laboratorio, a los presentes Daniela y Juan, y a los que siguieron su camino incorporándose a la vida profesional, con los que pasamos muchos gratos e inolvidables momentos que me permitieron crecer junto a ellos.

Al Lic. Gustavo Trincherro y a Verónica Feuring por su ayuda en la puesta a punto y la realización de las mediciones llevadas a cabo con el cromatógrafo gaseoso.

Al Dr Antonio Granell Richart por su generosidad al haberme recibido en su laboratorio para desarrollar parte de los experimentos de esta tesis.

A Leandro y Clara, por su apoyo incondicional, por el esfuerzo compartido para que todo saliera bien y por haber hecho tan agradable mi estadía en España.

A la Universidad de Buenos Aires

Por sobre todo a Dios.

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico
ACC: Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACS: Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
AIA: Ácido indolacético
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
AVG: Aminoetoxivinilglicina
BrEt: Bromuro de etidio
BSA: Albúmina Sérica Bovina
CDPK: Quinasa de proteína dependiente de calcio
cpm: Cuentas por minutos
DDI: Días después de la inoculación
DEAE: Dietilaminoetil Celulosa
DIGE: Electroforesis bidimensional diferencial en gel
DO: Densidad óptica
EDTA: Ácido etilen diamino tetracético
EGTA: Etilenglicol-bis (β -amino-etileter)-N,N,N',N'-tetracético
GA: Ácido giberélico
H1: Histona H1
HIII : Histona H3
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
h: horas
IEE: Isoelectroenfoco
ISR: Resistencia sistémica inducida
JA: Ácido jasmónico
kDa: KiloDaltons
L: Litro
M: Molar
MAPK: Quinasa de proteína activada por mitógenos
MCP: Metilciclopropeno
MEBA: Microscopio electrónico de barrido ambiental
MeJA: Metil Jasmonato
mg: Miligramos
min: Minutos
mL: Mililitro
mM: Milimolar
NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
NFb: Caldo libre de nitrógeno
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PM: Peso molecular
pmol: picomol
PRs: Proteína relacionada con la patogénesis

PVP: Polivinilpirrolidona
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Transcriptasa reversa
SA: Ácido Salicílico
SAR: Resistencia sistémica adquirida
SDS: Dodecil sulfato de sodio
seg: segundos
TAE: solución reguladora tris acetato EDTA
UFC: Unidades formadoras de colonia
µg: Microgramo
var: variedad
W7: N-(6-aminohexil)-5-cloro-1 naftalen sulfonamida clorhidrato

Indice general

Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	V
Abreviaturas	VI
INTRODUCCIÓN	1
1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	1
1.1. Descripción de algunas PGPRs	3
1.1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.1.2. Familia <i>Pseudomonadaceae</i>	4
El género <i>Pseudomonas</i>	4
1.1.3. PGPRs diazotróficas	4
El género <i>Azospirillum</i>	5
El género <i>Herbaspirillum</i>	5
1.1.4. Familia <i>Rhizobiaceae</i>	6
1.2. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal en <i>Azospirillum</i>	6
1.2.1. Fijación Biológica del Nitrógeno	6
1.2.2. Efectos hormonales de la inoculación con <i>Azospirillum</i>	7
1.2.2.1. Síntesis de AIA	7
1.2.2.2. Síntesis de giberelinas	7
1.2.2.3. Síntesis de etileno	7
1.2.2.4. Otras sustancias reguladoras del crecimiento	8
1.2.3. Incremento en el desarrollo del sistema radicular	8
1.2.4. <i>A. brasilense</i> como agente de biocontrol	8
1.3. Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre el rendimiento de los cultivos	9
1.4. Otros usos de <i>Azospirillum</i>	9
1.5. Promoción del crecimiento ejercido por <i>Herbaspirillum</i>	9
2. Las hormonas vegetales	9
2.1. Auxinas	10
2.1.1. Efectos de las auxinas bacterianas en las plantas	11
2.2. Etileno	12
2.2.1. Biosíntesis y degradación del etileno en plantas	12
ACS	13
ACO	14
ACC desaminasa	15
2.2.2. Percepción del etileno y señalización	17
3. Mecanismos moleculares de defensa en la planta	20

3.1. Respuesta primaria.....	22
3.1.1. Supresión de la respuesta primaria	23
3.2. Respuesta secundaria.....	23
3.3. Respuestas sistémicas a la infección por microorganismos.....	26
3.3.1. Resistencia sistémica adquirida (SAR).....	26
3.3.2. Resistencia sistémica inducida (ISR).....	26
3.4. Adaptación de los patógenos a la respuesta secundaria de defensa	28
4. Transducción de señales	29
4.1. Generalidades de los senderos de transducción	29
4.2. Transducción de señales en las plantas	30
4.2.1. El rol del calcio	30
4.2.1.1. Proteínas sensoras de calcio	32
Calmodulina.....	32
Otras proteínas que unen calcio.....	32
Quinasas de proteína dependientes de calcio	32
Subfamilia CDPK.....	33
4.2.2. Otros componentes de los senderos de transducción	35
Proteínas que unen GTP.....	35
Formas reactivas de oxígeno.....	36
Inositol 1,4,5-trifosfato y nucleótidos cíclicos	37
Acido salicílico	37
Óxido nítrico	37
Oxilipinas y jasmónico	38
Etileno	38
Acido abscísico.....	39
Mensajeros lipídicos.....	39
Azúcares	39
4.2.3. Proteínas relacionadas con la patogénesis.....	40
4.3. Transducción de señales en la respuesta de las plantas a estrés biótico y abiótico	41
4.3.1. Integración de diferentes senderos de señalización por factores de transcripción.....	42
4.3.2. Interrelación de los componentes de los senderos de señalización mediante modificaciones post traduccionales	43
4.4. Transducción de señales en tomate	45
5. Importancia del estudio de la interacción planta/microorganismos.....	47
6. Análisis de la expresión génica utilizando micromatrices de ADN	47
7. Análisis de la expresión génica a través de proteómica	48
8. El Cultivo de Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	49
9. El cultivo de tomate(<i>Solanum lycopersicum</i>).....	50

MATERIALES Y MÉTODOS	52
1. Cepas bacterianas	52
2. Evaluación del efecto del 1-MCP sobre el crecimiento bacteriano.....	52
3. Material vegetal	53
3.1. Plantas de arroz	53
3.1.1. Crecimiento e inoculación con bacterias PGPR	53
3.1.2. Tratamiento con inductores y con un inhibidor de la actividad ACS.....	53
3.1.3. Tratamiento con etileno, 1-MCP y ACC	53
3.1.4. Tratamiento con W7	54
3.1.5. Crecimiento de plantas e inoculación para el ensayo de quinasa	54
3.2. Plantas de tomate	54
3.2.1. Crecimiento e inoculación con bacterias PGPR	54
3.2.2. Tratamiento de las plantas con un precursor de etileno y con 1-MCP	55
3.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento	55
3.2.2.2.-. Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	55
3.2.3. Cultivo y tratamiento de las plantas para el estudio de expresión diferencial de genes.....	56
4. Técnicas generales.....	56
4.1. Microscopía	56
4.2. Evaluación del endofitismo bacteriano	56
5. Técnicas bioquímicas.....	57
5.1. Electroforesis en gel monodimensional.....	57
5.2. 2D-DIGE	57
5.2.1.-Isoelectroenfoque	57
5.2.2- Tratamiento de las tiras de IEE.....	58
5.2.3- Eletroforesis en la segunda dimensión	58
5.3. Ensayos de Western blot	58
5.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	59
6. Determinaciones bioquímicas	59
6.1. Medición de la actividad ACS	59
6.2. Extracción y medición de actividad CDPK.....	60
6.3. Ensayo de quinasa en gel.....	60
6.4. Cuantificación de proteínas.....	61
6.5. Medición de AIA	61

6.6. Medición de etileno.....	62
6.7. Extracción y análisis de hidratos de carbono.....	63
6.8. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	63
6.9. PCR	63
7. Análisis transcriptómico de la respuesta de plantas de tomate a la inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i>.....	64
7.1. Preparación del material vegetal.....	64
7.1.1. Marcación de muestras de ADNc con fluoróforos	65
7.2. Hibridación de las micromatrices	66
7.3. Análisis de los resultados de las micromatrices.....	67
7.3.1. Obtención de imágenes.....	67
8. Análisis proteómico de la respuesta de plantas de tomate a la inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i>.....	68
8.1. Extracción de proteínas y marcación con fluoróforos.....	68
8.2. Análisis de las imágenes 2D-DIGE.....	69
Obtención de imágenes.....	69
RESULTADOS	71
CAPÍTULO I.....	71
Mecanismos bioquímicos involucrados en la promoción del crecimiento en plantas de arroz.....	71
1. Producción de etileno por las plantas inoculadas con <i>A. irakense</i> , <i>A. brasilense</i> y <i>H. seropedicae</i>	73
2. Medición de los niveles de expresión de ACS en plantas inoculadas.....	75
3. Efecto de un precursor de la síntesis de etileno y de un inhibidor de su percepción	76
4. Endofitismo bacteriano	78
5. Actividad de la proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ en respuesta a la inoculación con <i>A. brasilense</i>	78
DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO II.....	88
Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas de tomate	88
1. Parámetros de crecimiento	88
2. Determinación del contenido de AIA.....	89
3. Producción endógena de etileno	90
4. Determinación de la actividad y expresión de ACS en plantas inoculadas	90
5. Efecto del tratamiento con ethephon	91

6. Determinación de la longitud de los pelos radiculares	93
7. Endofitismo bacteriano	93
8. Efecto del 1-MCP	94
9. Efecto del 1-MCP sobre el desarrollo de pelos radiculares promovido por la inoculación con <i>A. brasilense</i>	95
DISCUSIÓN.....	97
CAPÍTULO III.....	100
Variación de la expresión génica en la respuesta sistémica de <i>S. lycopersicum</i> a la inoculación con <i>A. brasilense</i>	100
1. Análisis transcriptómico	100
1.2. Genes diferencialmente expresados en la planta a los 7 días posteriores a la inoculación	102
1.2.1. Genes sobre expresados.....	102
Validación de los resultados de expresión génica	104
A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR	104
Expresión de genes correspondientes a proteínas de defensa	104
Expresión del factor de transcripción <i>Pti4</i>	106
Expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas	106
B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína	107
Determinación de la expresión de la proteína PR P23	107
1.2.2. Genes reprimidos.....	108
Validación de los resultados de expresión génica	108
Amplificación por RT-PCR	108
1.3. Genes diferencialmente expresados en la planta a los 14 días posteriores a la inoculación	109
1.3.1. Genes sobre expresados.....	109
Genes relacionados con proteínas de la patogénesis	109
Genes relacionados con la defensa	110
Genes relacionados con la pared celular	111
Genes relacionados con el metabolismo.....	111
Genes relacionados con el transporte	111
Genes relacionados con la biosíntesis de hormonas	112
Genes correspondientes a factores de transcripción	112
Genes relacionados con fotosíntesis.....	112
Validación de los resultados de expresión génica	113
A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR	113
Expresión de genes correspondientes a proteínas de defensa	113
Expresión de genes relacionados con la defensa	114
Expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas.....	115
Expresión de factores de transcripción.....	116
B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína	117
Expresión de la proteína PR P23	117
Expresión de las proteínas ACS4, ACS2 y α -DOX1	118
1.3.2. Genes reprimidos.....	119
Genes relacionados con fotosíntesis.....	119
Genes relacionados con metabolismo.....	119
Genes relacionados con transporte	119
Genes relacionados con la defensa	120
Genes correspondientes a factores de transcripción	121

Validación de los resultados de expresión génica	121
A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR	121
B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína	122
Expresión de la proteína malato deshidrogenasa	122
2. Contenido de azúcares en plantas inoculadas	123
3. Análisis proteómico	124
DISCUSIÓN	128
CONCLUSIONES	135
Perspectivas futuras.....	136
BIBLIOGRAFÍA	137
Anexo 1: Programa de amplificación de los genes de 7 DDI y 14 DDI	160
Anexo 2: Genes sobre expresados a los 7 DDI.....	162
Anexo 3: Genes reprimidos a los 7 DDI.....	163
Anexo 4: Genes sobre expresados a los 14 DDI.....	164
Anexo 5: Genes reprimidos a los 14 DDI.....	166
Anexo 6: Confirmación de los datos de las micromatrices por RT-PCR	167
Nómina de publicaciones generadas por esta Tesis	168

INTRODUCCIÓN

1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, del inglés Plant Growth Promoting Bacteria) son un grupo de bacterias que interactúan con las plantas favoreciendo su crecimiento y/o controlando los fitopatógenos que puedan infectarlas aumentando así la productividad de los cultivos. El grupo de PGPB más estudiado son las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPRs, del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Estas colonizan la rizosfera acercándose y adhiriéndose a la superficie radicular (Kloepper y col., 1999). Muchas de ellas son capaces de rebasar la barrera de la endodermis, cruzando de la corteza de la raíz al sistema vascular, y subsecuentemente desarrollarse como endofíticas en el tallo y otros órganos sin perjudicar a la planta (Compant y col., 2005).

Entre los microorganismos con actividad PGPR más conocidos se encuentran especies de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum* (Glick, 1995). Los mecanismos que utilizan estas bacterias para promover el crecimiento de las plantas son numerosos y variados, y no solo difieren de un microorganismo a otro sino que también pueden diferir de una cepa a otra. A diferencia de *Rhizobium*, donde la principal contribución de la bacteria al crecimiento de la planta parece ser la fijación de nitrógeno por la bacteria, las PGPRs de vida libre probablemente no cuentan con un solo mecanismo para promover el crecimiento de la planta. Se postula que en la mayoría de los casos opera más de un mecanismo, y que los efectos en las plantas tratadas son aditivos (Bashan y Dubrovsky, 1996).

Los mecanismos de la promoción del crecimiento pueden ser directos o indirectos. **Mecanismos directos** son los que entran en juego cuando los metabolitos producidos por algunas cepas son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta. Son ejemplos de estos mecanismos la fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum* en asociación con plantas de maíz y de trigo (Ribaudó y col., 2001); asimilación de nitratos (García de Salamone y Döbereiner, 1996; Ribaudó y col., 1998); producción de hormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, etc., (Bottini y col., 2004; Cassán y col., 2001), y solubilización de fosfatos (Nico y col., 2012). **Mecanismos indirectos** son los utilizados por las PGPRs con capacidad de control biológico que evitan el daño que los fitopatógenos ocasionan en las plantas; los mecanismos de control biológico incluyen competencia con el patógeno, reemplazo físico del fitopatógeno, secreción de sideróforos, (Glick y col., 1999) y síntesis de antibióticos como, 2,4-diacetilfluoroglucinol, y lipopépticos cíclicos producidos por *Pseudomonas*, oligomicina A, kanosamina, y xantobacina

producidos por *Bacillus* y *Streptomyces* (Raaijmakers y col., 2002). La producción de enzimas líticas es otro mecanismo que frena la proliferación de patógenos. Por ejemplo la habilidad de producir quitinasas extracelulares es considerado crucial para *Serratia marcescens*, *Paenibacillus sp.* y *Streptomyces sp.*, al actuar como antagonistas contra *Sclerotium rolfii* y *Fusarium oxisporum f. sp. cucumerinum* (Ordentlich y col., 1988). La detoxificación y degradación de factores de virulencia del patógeno es otro mecanismo de biocontrol puesto en juego por las PGPRs. Algunos agentes de biocontrol son capaces de detoxificar albicidina, toxina producida por *Xantomonas albilineans*. El mecanismo de detoxificación incluye la producción de una proteína que reversiblemente liga la toxina, por ejemplo en *Klebsiella oxytoca* y *Alcaligenes denitrificans* (Walker y col., 1988), o bien como una detoxificación irreversible de albicidina mediado por una esterasa como ocurre con *Pantoea dispersa* (Zhang y Birch, 1996). Por otro lado algunas toxinas de los patógenos exhiben actividades que pueden suprimir el crecimiento de competidores microbianos, o detoxificar antibióticos producidos por algunos microorganismos de biocontrol contrarrestando el efecto de estos últimos.

A pesar de que el hierro es uno de los minerales más abundantes en la tierra, generalmente no está disponible en el suelo para la asimilación directa por parte de las bacterias debido a que las sales férricas, forma predominante del hierro en la naturaleza, son poco solubles (Neilands y col., 1986). Las bacterias del suelo sintetizan y secretan moléculas de bajo peso molecular (aproximadamente 400 a 1000 Daltons), conocidas como sideróforos que ligan el hierro con alta afinidad. El complejo hierro-sideróforo vuelve a la célula bacteriana transportado por medio de un receptor celular y queda a disposición para el crecimiento bacteriano (Briat, 1992). Estas bacterias evitan que los patógenos fúngicos proliferen en la rizosfera de la planta hospedante debido a que secuestran el hierro y por lo tanto queda menor cantidad disponible para el crecimiento de los mismos. Las plantas generalmente no se ven afectadas por la disminución localizada de hierro en el suelo provocada por la producción de sideróforos dado que la mayoría de ellas son capaces de crecer con concentraciones de hierro menores (aproximadamente 1000 veces) que la mayoría de los organismos (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Además de los antibióticos y sideróforos, las PGPRs de control biológico producen una amplia variedad de metabolitos de bajo peso molecular con actividad antifúngica. Por ejemplo, algunas *Pseudomonas* pueden sintetizar ácido cianhídrico, al cual ellas mismas son resistentes, metabolito que se ha relacionado con la capacidad de esas cepas para inhibir algunos hongos patógenos como *Thielabiopsis basicola*, agente causante de la pudrición negra de las raíces de tabaco (Voisard y col., 1989).

Recientemente se descubrió que ciertas bacterias PGPRs suprimen a los patógenos por su capacidad de Quórum-sensing, degradando señales autoinducidas, y bloqueando así la expresión de numerosos genes de virulencia (Dong y col., 2004).

Finalmente ciertas PGPRs despiertan en la planta una **respuesta sistémica inducida** (ISR, del inglés Induced Systemic Response), en la cual no se evidencian daños sobre la planta pero que resulta en una inmunización contra el ataque de patógenos. El mecanismo bioquímico que media a ISR se describe en detalle en el ítem *Mecanismos Moleculares de Defensa*. La forma en que se manifiesta ISR y su efectividad dependen de la bacteria y la combinación bacteria-planta. La mayoría de tales asociaciones involucran a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* (Sharma y Nowak, 1998).

Es bien sabido que los microorganismos patógenos afectan la salud de la planta y son una amenaza crónica para la producción de alimentos y la estabilidad del ecosistema en todo el mundo. Como la producción agrícola se intensificó en pocas décadas, incrementar la producción depende cada vez en mayor medida del uso de agroquímicos como un método relativamente confiable de protección. Sin embargo, el incremento del uso de químicos agregados causa varios efectos negativos, como el desarrollo de resistencia de los patógenos a los agentes aplicados y el impacto negativo en el ambiente (Gerhardson, 2002). El control biológico es considerado actualmente una alternativa o vía complementaria para lograr la reducción del uso de productos químicos en la agricultura (Welbaum y col., 2004).

Por estas razones se trata de incrementar el desarrollo de inoculantes biológicos que incluyen en su formulación microorganismos benéficos para las plantas, tanto los que protegen a la planta contra el ataque de patógenos, plagas y malezas, como de los que le facilitan la obtención de nutrientes.

1.1. Descripción de algunas PGPRs

1.1.1. Familia *Enterobacteriaceae*

Esta familia comprende un gran número de géneros. Los que se encuentran comúnmente en la rizósfera corresponden a: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia* y *Citrobacter* (Döbereiner y Pedrosa, 1987).

Se observaron efectos de promoción de crecimiento vegetal, especialmente sobre el sistema radicular, en plantas de arroz inoculadas con *S. marcescens* (Prasad y col., 2001). Se ha observado además solubilización de fosfato tricálcico en los géneros *Serratia* (Chen y col., 2006) y *Enterobacter* (Shoebitz y col., 2009).

1.1.2. Familia *Pseudomonadaceae*

Esta familia incluye a varios géneros entre ellos *Azomonas*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Flavimonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, entre otros.

El género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* pueden ser encontradas en diferentes ambientes tales como suelo, agua, y tejido animal y vegetal.

Diferentes especies de este género son bacterias patógenas de seres humanos, animales y plantas, por ejemplo, *Pseudomonas syringae pathovar tomato* y *Pseudomonas aeruginosa* son conocidos patógenos de tomate (Cohn y Martin, 2005). Sin embargo algunas especies de este género, como *P. fluorescens* son saprófitos no patogénicos y son considerados PGPRs ya que poseen la capacidad de disminuir la acción de fitopatógenos a través de la producción de sideróforos y antibióticos (Lemanceau, 1992). Varios autores señalan a algunas especies del género *Pseudomonas* entre las más efectivas en reducir enfermedades en los suelos denominados supresivos (Weller, 1988).

En cuanto a los efectos directos de la promoción del crecimiento que posee este género de bacterias, se destaca la solubilización de fosfatos (Babu-Khan y col., 1995).

1.1.3. PGPRs diazotróficas

Debido la diversidad de Familias que contienen géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas, se comentan sólo algunas de ellas.

Azospirillum (Familia *Rhodospirillaceae*) es un género bacteriano conocido desde hace varios años, se aisló de la rizosfera de muchas hierbas y cereales en todo el mundo, en las zonas tropicales y en los climas templados.

Herbaspirillum sp., (Familia *Oxalobacteraceae*) es un endófito, que coloniza arroz, maíz, sorgo, cereales y caña de azúcar. Estos dos género de bacterias se describirán posteriormente en mayor detalle.

Otras PGPRs con capacidad de fijar N_2 incluyen *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, (Familia *Burkholderiaceae*) *Azotobacter sp.* (*Azotobacteriaceae*) y *Paenibacillus polymyxa*, (Familia *Paenibacillaceae*). *Azoarcus sp.* es una β -proteobacteria, y la mayoría de las especies se han aislado de raíces o tallos de hierba Kallar, no son capaces de utilizar los hidratos de carbono para el crecimiento sino que utilizan ácidos o etanol y sus temperaturas óptimas de crecimiento son altas (37-42°C).

Gluconacetobacter diazotrophicus, (Familia *Acetobacteraceae*), es una bacteria gram-negativa, aerobia estricta, aislada originalmente de las raíces y tallos de caña de azúcar.

El género *Burkholderia* (Familia *Burkholderiaceae*) contiene más de 30 especies, y la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico se ha establecido en varios aislamientos de plantas.

El género *Azospirillum*

Azospirillum pertenece a la subclase α de las proteobacterias siendo *Azospirillum lipoferum* la especie tipo. Son bacterias flageladas Gram negativas, de forma vibroide, con movilidad espiralada. Son organismos aeróbicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia (0,04 a 0,2 kPa).

Las células contienen cantidades elevadas de poli- β -hidroxibutirato (PHB) que llega hasta el 50% del peso seco celular; en las células jóvenes se pueden observar al microscopio abundantes gránulos refringentes de PHB (Hartmann y col., 2000).

La primera especie de *Azospirillum* se aisló en Holanda a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y originalmente se la llamó *Spirillum lipoferum*. Döbereiner y colaboradores fueron los primeros en informar su amplia distribución en la rizosfera de diversos pastos tropicales (Döbereiner y col., 1976). Posteriormente se aislaron cepas de *Azospirillum* de la filosfera de raíces de numerosos pastos y cereales y de plantas de diversas familias, en suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos (Singh, 1992; Saleena y col., 2002).

Actualmente son reconocidas varias especies del género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas, *A. lipoferum* y *A. brasilense*, han sido las más estudiadas. Posteriormente se caracterizaron las especies *A. amazonense* aislada de pastos en el área del Amazonas (Falk y col., 1985), *A. halopraeferans* la especie halo-tolerante de las raíces del pasto Kallar (Reinhold y col., 1986), *A. irakense*, una especie que degrada pectina, aislada a partir de raíces de arroz, (Khammas y Kaiser, 1991) y *A. largimobile* y *A. doebereineriae* (Eckert y col., 2001). Entre las últimas especies descubiertas se encuentran *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng y col., 2006) y *A. canadensis* (Mehnaz y col., 2007). En la actualidad se han descrito quince especies pertenecientes al género *Azospirillum* (Lavrinenko y col., 2010).

El género *Herbaspirillum*

Herbaspirillum seropedicae fue aislada por primera vez en la ciudad de Seropédica, Rio de Janeiro, por Baldani y col. (1986). Fue inicialmente descrito como *Azospirillum seropedicae* debido a varias similitudes con el género *Azospirillum* y más tarde fue ubicado en un género nuevo, *Herbaspirillum*. Son bacterias Gram negativas que presentan flagelos, su forma es espiralada y se encuentran en asociación con plantas herbáceas. Al igual que *Azospirillum* presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia. Se ha aislado de raíces, tallos y hojas de maíz, trigo, sorgo, arroz y caña de

azúcar (Elbeltagy y col. 2001). Otra de las especies de este género es *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, antiguamente conocida como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Baldani y col., 1996). Este es agente causante de una enfermedad conocida como estría moteada en algunas variedades de caña de azúcar. El género se amplió para incluir a otras especies reclasificadas y se incluyeron seis nuevas siendo actualmente un total de aproximadamente diez (Chubatsu y col, 2012).

1.1.4. Familia *Rhizobiaceae*

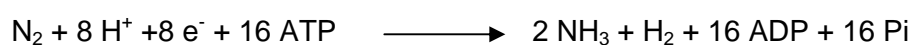
La Familia *Rhizobiaceae* incluye muchas especies de rizobios e incluso al parásito de plantas *Agrobacterium*. Son proteobacterias, Gram-negativas, aerobias. Muchas especies de la familia *Rhizobiaceae* son diazótrofos simbióticos.

1.2. Mecanismos promotores del crecimiento vegetal en *Azospirillum*

Se han propuesto varios mecanismos de acción: i) fijación biológica del nitrógeno, ii) cambios en la síntesis de hormonas que regulan el crecimiento vegetal, iii) incremento en el desarrollo del sistema radicular relacionado en general con los cambios hormonales que promueve una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; iv) alteración del funcionamiento de la membrana a través de la síntesis de moléculas de comunicación celular relacionadas con la absorción de iones y v) la hipótesis aditiva, la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados (Bashan y col., 2004).

1.2.1. Fijación Biológica del Nitrógeno

Todas las cepas salvajes de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico, ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas. El mecanismo de fijación biológica involucra la participación de la enzima bacteriana nitrogenasa, que cataliza la siguiente reacción:



Con la fijación del nitrógeno atmosférico, se incrementa el nitrógeno incorporado por la planta y esto lleva a incrementos en el rendimiento de la misma expresado en términos de concentración de nitrógeno total (Baldani y Baldani, 2005). Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz han indicado que de 5 a 10% y en algunos casos hasta 18% del nitrógeno total de la planta, proviene de la fijación biológica del nitrógeno (Rennie y Thomas, 1987). Sin embargo, al menos en suelos ricos en nitrógeno, la fijación biológica por *Azospirillum* no es un mecanismo relevante en la promoción del crecimiento, por lo tanto otro, u otros de los mecanismos mencionados anteriormente serían los responsables del mayor crecimiento de la planta.

1.2.2. Efectos hormonales de la inoculación con *Azospirillum*

La síntesis de hormonas llevada a cabo por la bacteria es responsable del mejor crecimiento de la raíz y de la parte aérea de las plantas ya que los efectos de la inoculación son similares a los que se observan cuando las plantas son tratadas con fitohormonas (Bashan y Bashan, 2010).

1.2.2.1. Síntesis de AIA

El mecanismo de la producción de auxinas ha sido muy estudiado, especialmente el del ácido indol acético (AIA) (Jain y Patriquin, 1985).

El AIA producido por las bacterias puede modificar el contenido endógeno de AIA de la planta y este a su vez incrementar el contenido de etileno (Glick y col., 1999).

En cultivos de *Azospirillum*, además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído (Perrig y col., 2007). Actualmente se sabe que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías. En tanto que las vías del ácido indol pirúvico y la del indol acetamida son dependientes del triptofano, la tercera es una vía independiente de este aminoácido, desconociéndose el precursor del AIA.

1.2.2.2. Síntesis de giberelinas

Se ha demostrado que *A. lipoferum* Op33 es capaz de metabolizar formas inactivas de giberelinas (GAs) a sus formas con actividad biológica, por ejemplo GA20 a GA1 y GA9 a GA3 confirmando la capacidad del microorganismo para aumentar en la planta el pool endógeno de formas activas de GAs por la eliminación de glucosa a partir de los conjugados sin actividad biológica (Piccoli y col., 1998). Bottini y col., (2004) demostraron que *A. lipoferum* tiene además la capacidad de producir giberelinas (GA1, GA3 e iso-GA3) en medio de cultivo químicamente definido.

Estos resultados permiten suponer que la promoción del crecimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum* se debe, al menos en parte, a la capacidad bacteriana de metabolizar precursores inactivos de GAs a sus formas activas.

1.2.2.3. Síntesis de etileno

Perrig y col., 2007 demostraron en medios de cultivo definidos, que *A. brasilense* AZ39 y *A. brasilense* Cd son capaces de sintetizar etileno y que esta síntesis es dependiente de la concentración de metionina en el medio. Es posible entonces que los efectos del etileno en las plantas colonizadas por PGPRs se deban a la hormona sintetizada por la bacteria más la producida por la planta.

1.2.2.4. Otras sustancias reguladoras del crecimiento

Otras hormonas sintetizadas por *Azospirillum* son zeatina, ácido abscísico (ABA), poliaminas (Thuler y col., 2003).

Es conocido que *Azospirillum* produce NO a bajas concentraciones de O₂ por un proceso llamado desnitrificación (Hartmann y Zimmer, 1994). Por otro lado se ha demostrado que NO tiene un rol importante en la arquitectura radicular relacionada con la formación de raíces laterales (Correa-Aragunde y col. 2004) y la formación de raíces adventicias (Pagnussat y col., 2003). Creus y col., 2005 demostraron que el NO es un componente del sendero de señalización que lleva a la formación de raíces laterales en plantas de tomate inoculadas con *Azospirillum*.

1.2.3. Incremento en el desarrollo del sistema radicular

Diversos factores químicos, fisiológicos, ambientales y nutricionales regulan la adhesión de *A. brasilense* a las raíces (Bashan y col., 1986). Pinheiro y col., 2002 demostraron que existe un número saturable y específico de sitios disponibles en las raíces para ser colonizados por la bacteria. A través de la utilización de una mutante de *A. brasilense* sin flagelos, se demostró que el flagelo polar está involucrado en la adhesión de las bacterias a las raíces, encontrándose que flagelos polares purificados se adhieren a raíces de trigo *in vitro* (Croes y col., 1993). Se ha sugerido que el mecanismo de adhesión bacteria-planta está mediado por lectinas expuestas en la superficie celular de la bacteria o contenidas en el material fibrilar.

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan ningún efecto. El nivel de inoculación óptimo para muchos cereales es de alrededor de 10⁵-10⁶ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Una concentración de inóculo de 10⁸-10¹⁰ UFC/mL generalmente inhibe el desarrollo radicular. Los efectos observados debido a la inoculación son: el incremento en la longitud de la raíz principal, en el número y longitud de las raíces laterales, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, en el peso seco de la raíz, y aumentos en la exudación radicular (Bashan y col., 2004).

1.2.4. *A. brasilense* como agente de biocontrol

A. brasilense puede limitar el crecimiento de bacterias no patogénicas (Romero y col., 2003). La capacidad de biocontrol estaría relacionada con la producción de bacteriocinas, de sideróforos y la síntesis de ácido fenilacético con actividad antimicrobiana (Somers y col., 2005).

1.3. Efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de los cultivos

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede dar como resultado un cambio significativo en varios parámetros de crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento de la cosecha.

La mayoría de los estudios relacionados con el efecto de la inoculación con *Azospirillum* se han llevado a cabo en cereales y pastos (Bashan y Dubrovsky, 1996; Ribaud y col., 1998; Barassi y col., 2007) y en menor grado, en otras familias de plantas (Bashan, 1998). En general los estudios han demostrado los siguientes resultados: i) incremento en peso seco total y en la concentración de nitrógeno en hojas y grano. ii) floración y aparición de espigas más tempranas. iii) aumento en el número de espigas y mazorcas. iv) incremento en el número de granos por espiga. v) plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja (Bashan y col., 2004).

1.4. Otros usos de *Azospirillum*

Además de su aplicación en la agricultura, *Azospirillum* se ha convertido en un excelente modelo para los estudios genéticos de bacterias asociadas a plantas en general. Adicionalmente, aplicaciones diferentes a la agrícola, como la producción de poli-beta-hidroxibutirato para usos médicos, degradación de contaminantes, producción de vitaminas y tratamiento de aguas residuales, están cobrando importancia últimamente (Johri y col., 2003; Bashan y col., 2004; Lin y col., 2011; Galazka y col., 2012).

1.5. Promoción del crecimiento ejercido por *Herbaspirillum*

H. seropedicae es una bacteria diazotrófica endofítica capaz de colonizar las raíces, tallos y hojas sin causar síntomas de enfermedad. *H. seropedicae* expresa genes *nif* en raíces, tallos y hojas de arroz, sorgo, maíz y trigo (Roncato-Maccari y col., 2003), y su contribución al contenido de nitrógeno de la planta se demostró en arroz, (Elbeltagy y col., 2001; James y col., 2002) y maíz (Ribaud y col., 2006). Baldani y col., 2000 demostraron que plantas axénicas de arroz "Guaraní" inoculadas con *H. seropedicae* Z94 podrían obtener más de 50% de sus necesidades de nitrógeno a partir de la fijación biológica.

2. Las hormonas vegetales

Las hormonas vegetales son compuestos naturales, de bajo peso molecular, activas en bajas concentraciones que actúan como mensajeros químicos responsables de la integración de los procesos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estas hormonas pueden actuar sobre tejidos diferentes al que las produjo, mediando así la

comunicación intercelular. La síntesis y la degradación de las hormonas están reguladas tanto por los procesos endógenos de la planta que tienen que ver con su crecimiento y desarrollo, como por factores externos (luz, fotoperíodo, daño, etc.). En última instancia las hormonas modifican los programas de expresión génica que modulan infinidad de respuestas de la planta.

Auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno, jasmónico, metil jasmónico y últimamente sistemina, son consideradas las más importantes hormonas vegetales. Existen otros compuestos como varios oligosacáridos y compuestos fenólicos que intervienen en algunos procesos de señalización pero no son considerados hormonas.

En contraste con las hormonas animales que pueden producir efectos fisiológicos muy específicos, las funciones reguladoras de las fitohormonas se solapan ampliamente. Ninguna hormona vegetal tiene el control exclusivo de un determinado efecto fisiológico. De hecho prácticamente todas las hormonas vegetales tienen efectos sobre la mayoría de las fases del desarrollo de las plantas. Por lo tanto la regulación hormonal en las plantas debe analizarse en términos de una interacción positiva o negativa entre las diferentes hormonas.

2.1. Auxinas

Las auxinas son importantes reguladores del crecimiento y del desarrollo vegetal. Entre los mecanismos regulados por auxinas se encuentran la orientación de raíces y tallos en respuesta a la luz y a la gravedad, la dominancia apical, la iniciación de raíces laterales y adventicias y la estimulación de la división celular. Estos procesos son regulados positiva o negativamente según la concentración de auxinas. Aparte de los factores endógenos de la planta que regulan los niveles de auxinas como ser la síntesis *de novo*, la degradación, la formación de conjugados y la hidrólisis, las auxinas secretadas por los microorganismos del suelo también contribuyen al pool endógeno de la hormona.

Se conocen varias auxinas naturales; el ácido 3-indol-acético (AIA) es el representante más importante de la familia, de hecho se habla generalmente de AIA como sinónimo de auxina. En la Fig. 1 se muestra la estructura del ácido 3-indol-acético.

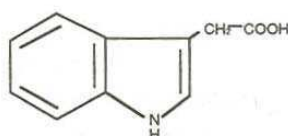


Figura 1. Estructura de la auxina natural ácido 3-indol-acético (AIA)

Las auxinas se sintetizan en los brotes apicales y en las hojas jóvenes y su transporte desde el lugar de síntesis hasta regiones distales de la planta se lleva a cabo por un mecanismo polar, pasando de célula a célula, desde el ápice hasta la base vía proteínas transportadoras, o no polar moviéndose pasivamente hacia arriba o hacia abajo vía el sistema vascular.

Existen varios senderos diferentes para la síntesis de auxinas en plantas; el triptofano es el precursor predominante en algunos de ellos pero a partir del estudio de mutantes deficientes en la síntesis de triptofano se ha demostrado en algunas plantas la existencia de senderos que no involucran a este amino ácido (Ljung y col., 2001).

La mayor parte del AIA sintetizado por la planta es almacenado en forma de conjugados inactivos con inositoles, azúcares o péptidos. Estos conjugados son hidrolizados por enzimas específicas para proveer la concentración óptima de AIA libre en cada proceso de crecimiento o desarrollo como por ejemplo durante la germinación de la semilla (Perrot-Rechenmann y Napier, 2005).

El establecimiento rápido del sistema radicular, ya sea por crecimiento de la raíz primaria o por proliferación de las raíces laterales y adventicias es sumamente ventajoso para las semillas en germinación ya que les permite anclarse mejor al suelo y facilita la obtención de agua y de nutrientes. Dado que, como se dijo más arriba, el agregado externo de AIA promueve el desarrollo del sistema radicular, esta hormona y algunos de sus derivados sintéticos se han utilizado para mejorar el desarrollo de las raíces en cultivos de interés económico. Es importante destacar que los efectos de las auxinas dependen de las concentraciones aplicadas: así mientras el crecimiento de las raíces laterales y adventicias es inducido por altas concentraciones de AIA, bajas concentraciones de la hormona estimulan la elongación de la raíz primaria (Meuwly y Pilet, 1991).

2.1.1. Efectos de las auxinas bacterianas en las plantas

Alrededor del 80% de las bacterias del suelo tiene la capacidad de producir AIA, lo que muestra la enorme potencialidad de las mismas para contribuir al pool endógeno de AIA de las plantas (Patten y Glick, 1996). En el caso de algunos de estos microorganismos como *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, la producción de AIA está relacionada con el desarrollo de tumores que eventualmente podrían tener un efecto negativo en la salud de la planta. En otros casos como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, y *Bradyrhizobium*, la producción de AIA promueve el desarrollo del sistema radicular, comportamiento típico de las PGPRs (Xie y col., 1996). *A. brasilense* produce altos niveles de AIA y afecta positivamente el desarrollo del sistema radicular de trigo en forma similar a la aplicación externa de AIA y este efecto es

independiente de la capacidad de la bacteria de fijar nitrógeno del aire (Barbieri y Galli, 1993).

De la misma forma que el efecto inductor o inhibitorio de las auxinas depende de la concentración de las mismas, se ha demostrado que el efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento puede ser inductor o inhibidor del crecimiento según sea la cantidad de AIA que producen las distintas cepas y del inóculo utilizado; esto sugiere que a mayor nivel de AIA sintetizado por las bacterias, mayor es la cantidad disponible para la planta. Es obvio entonces que si el nivel de auxinas en una planta resulta de lo aportado por las bacterias más lo sintetizado endógenamente, una determinada bacteria será promotora o inhibidora del crecimiento dependiendo de la producción de auxinas por la propia planta (Dubeikovsky y col., 1993).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar por qué algunas bacterias producen AIA; quizá la más obvia respuesta sea que la producción de fitohormonas le provee a la bacteria un mecanismo para estimular el crecimiento de la planta que a su vez aumenta la producción de metabolitos que la bacteria utiliza en su beneficio.

2.2. Etileno

El etileno es una hormona vegetal difusible que tiene un rol sumamente importante en la integración entre los eventos metabólicos y del desarrollo y los estímulos externos. El etileno está involucrado en procesos muy diversos en el desarrollo de las plantas tales como germinación de las semillas, desarrollo de pelos radiculares, nodulación de la raíz, maduración de los frutos, abscisión y senescencia. También es un importante mediador en la respuesta a distintos tipos de estrés tanto bióticos (por ejemplo ataque por patógenos) como abióticos (como daño, hipoxia, frío, sequía); estos estímulos usualmente aumentan la síntesis de etileno que a su vez disminuye el desarrollo de la planta hasta que el estímulo desaparece.

A nivel génico, en respuesta a los estímulos mencionados, el etileno induce la transcripción de un gran número de genes.

2.2.1. Biosíntesis y degradación del etileno en plantas

En las plantas superiores el etileno es sintetizado a partir de metionina vía los intermediarios S-adenosil-L-metionina (SAM), y ACC. Las enzimas involucradas secuencialmente en el proceso son SAM sintetasa, ACS y ACC oxidasa (ACO). La Fig. 2 resume los pasos de la síntesis de etileno.

ACS

La ACS es una enzima citosólica, exclusiva de plantas superiores, que está presente en concentraciones extremadamente bajas en los tejidos vegetales y que regula el paso limitante de la síntesis del etileno. La actividad de la ACS requiere fosfato de piridoxal como cofactor y presenta estricta especificidad por el diastereoisómero natural de SAM. Actualmente están clonadas ACSs de una gran variedad de especies vegetales como tomate, manzana y Arabidopsis lo que ha permitido establecer que los genes que codifican para esta enzima pertenecen a familias multigénicas (Johnson y Ecker, 1998). La mayor homología entre las isoformas se encuentra en la región central del polipéptido que contiene el sitio activo (Kende, 1993). La región carboxilo terminal es variable y contiene dominios que modifican aspectos estructurales y catalíticos de la enzima y afectan la dimerización (Li y Mattoo, 1994).

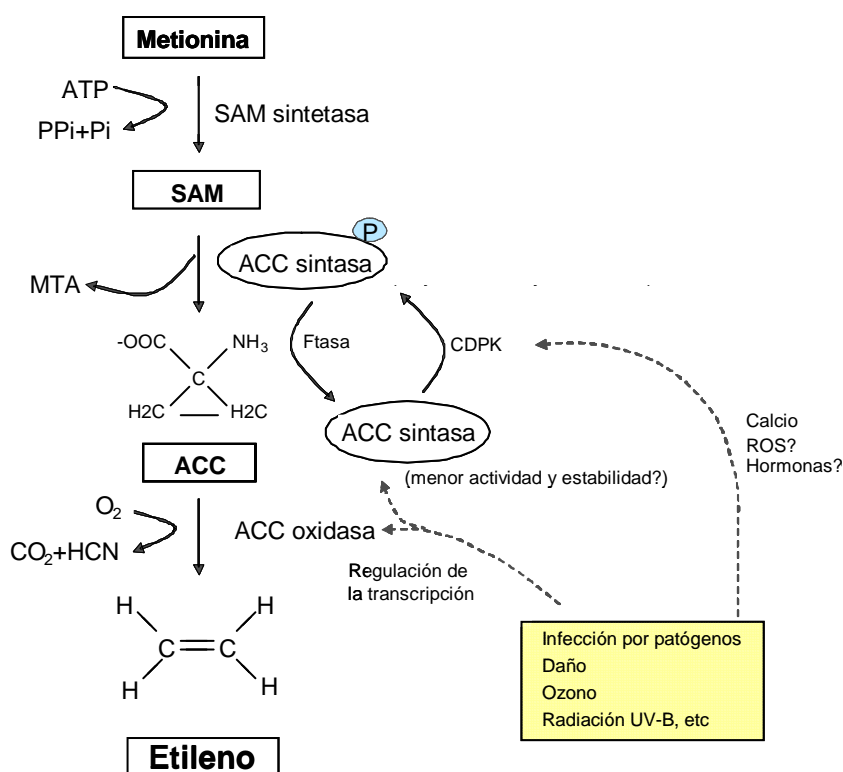


Figura 2. Esquema de la síntesis del etileno y su probable regulación. Modificado de Wang y col. Plant Cell Supp. 2002, 131-151.

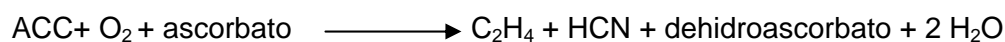
Los miembros de las familias multigénicas de la ACS se expresan diferencialmente en respuesta al desarrollo, a factores ambientales y a hormonas. Se ha demostrado aumento de la síntesis de la enzima durante la maduración del fruto, marchitamiento de las flores y en respuesta a señales externas como daño, estrés mecánico, auxinas, citoquinina y etileno (Kende, 1993). En el caso de tomate se ha visto que la expresión de una

determinada isoforma aumenta en la maduración del fruto, otra en respuesta al daño y una tercera en respuesta a auxinas (Kende y Zeevart, 1997).

La ACS está regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccional. En tomate la fosforilación/defosforilación de la ACS2 regula su recambio aguas arriba del sendero de degradación vía ubiquitina. Se ha demostrado que esta isoforma se estabiliza por fosforilación y se degrada después de la defosforilación. Se vio que la cantidad de LeACS2 afectada por inhibidores de quinasas y fosfatasa afecta significativamente la actividad celular de la ACS, el contenido de ACC y la producción de etileno en frutos de tomate sugiriendo que la regulación postraduccional por fosforilación juega un rol importante en el control de la producción de etileno. Una CDPK, LeCDPK2, y una quinasa activada por mitógeno fosforilan en diferentes sitios a la LeACS2 inmediatamente después de su síntesis en respuesta a señales por daño y prácticamente todas las moléculas de LeACS2 resultan fosforiladas en la célula. Ambas fosforilaciones son necesarias para la estabilidad de la enzima (Kamiyoshihara y col., 2010).

ACO

La ACO que cataliza la última etapa de la biosíntesis de etileno, requiere O₂, Fe²⁺ y ascorbato como cofactores. La reacción que cataliza es:



El CO₂ es un activador esencial de la actividad ACO, aumenta la afinidad por ACC, por el O₂ y por el ascorbato (Finlayson y Reid, 1994). El análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes clonados de ACO ha demostrado que la enzima está codificada por una familia multigénica y que las proteínas resultantes son altamente homólogas especialmente en su región interna. ACO se expresa constitutivamente a bajos niveles en la mayoría de los tejidos vegetales y su actividad aumenta durante la maduración del fruto, la senescencia floral, el daño mecánico y la presencia de efectores fúngicos (Fluhr y Mattoo, 1996). También se ha encontrado aumento de la actividad de ACO en respuesta a ACC y a hormonas como auxinas (y el mismo etileno), conocidos activadores de la biosíntesis de etileno (Kende, 1993). Así, el tratamiento de los tejidos con etileno estimula la actividad ACO a través de un feedback positivo: la inducción de ACS por etileno lleva a la producción de ACC que a su vez estimula la ACO constitutiva del tejido y produce más etileno. El aumento de la actividad está asociado a regulación de la transcripción de la enzima (Fluhr y Mattoo, 1996). La aparente transcripción coordinada de los transcritos de ACS y ACO producen una importante autocatálisis de la síntesis de etileno.

En tomate la familia ACO comprende cuatro miembros (*LeACO1-4*). Se expresan durante el desarrollo floral. *LeACO1* se expresa preferencialmente en pétalos, estigma y estilo; *LeACO2* en antera, y *LeACO3* en todos los órganos florales, incluidos los sépalos (Barry y col., 1996). En cuanto a la presencia de estos mensajeros en fruto, *LEACO1* y *LEACO4* son pre-existentes en el fruto preclimatérico y se incrementan cuando comienza la maduración (Nakatsuka y col., 1998) en tanto que la expresión de *LeACO3* es baja y transiente.

ACC desaminasa

La ACC desaminasa degrada el ACC a amonio y α -cetobutirato. Es una enzima citoplasmática, trimérica, exclusiva de microorganismos y ha sido detectada en un gran número de cepas bacterianas, principalmente *Pseudomonas* spp, aisladas de suelo, muchas de las cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Glick y col., 1995). Esta actividad enzimática les permite a estas bacterias utilizar el ACC como fuente de nitrógeno en medio mínimo. Actualmente están clonados los genes de ACC desaminasa de un gran número de especies de *Pseudomonas* y *Enterobacter*.

Del estudio de la relación existente entre la presencia de actividad ACC desaminasa en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y del efecto inhibitorio del etileno sobre este, se ha propuesto un posible rol de la enzima en el mecanismo de interacción PGPR/planta. La capacidad de promover el crecimiento vegetal de las cepas con actividad de ACC desaminasa se manifiesta, por ejemplo, en el aumento de la elongación de las raíces en plantas sensibles al etileno inoculadas con estas bacterias (Shah y col., 1997); este efecto es comparable al logrado utilizando el inhibidor de la ACC sintasa aminoetoxivinilglicina (AVG) (Hall y col., 1996). Por otro lado, las cepas mutantes defectivas en ACC desaminasa pierden su capacidad promotora de la elongación de las raíces (Glick y col., 1994). Asimismo, el contenido de ACC en las raíces provenientes de plantas tratadas con la PGPR *Pseudomonas putida* es menor que en las semillas no tratadas y no varía cuando se utiliza una mutante defectiva en ACC desaminasa (Glick y col. 1995). Estas observaciones permitieron a Glick y colaboradores proponer un modelo que explicaría de qué manera las PGPRs podrían disminuir los niveles de etileno en las plantas promoviendo así su crecimiento (Glick y col., 1999). Según este modelo la bacteria se une a la superficie de la semilla o de la raíz de la planta y en respuesta a triptofano y otros exudados de la planta, sintetiza y excreta AIA que es tomado en parte por la planta. Este AIA, junto con el endógeno generado en la misma planta puede estimular la proliferación y la elongación celular e inducir la actividad de ACS para convertir SAM en ACC y finalmente en etileno. Se postula que parte del ACC es exudado junto con otras moléculas y podría ser incorporado por la bacteria cuya actividad ACC desaminasa lo degrada a amonio y α -cetobutirato

promoviendo el aumento de la liberación de ACC por la planta y en consecuencia disminuyendo su concentración interna y la inducción de la síntesis de etileno. En la Fig. 3 se muestra un esquema actualizado de la regulación de los niveles de etileno por las PGPRs (Hardoim y col., 2008).

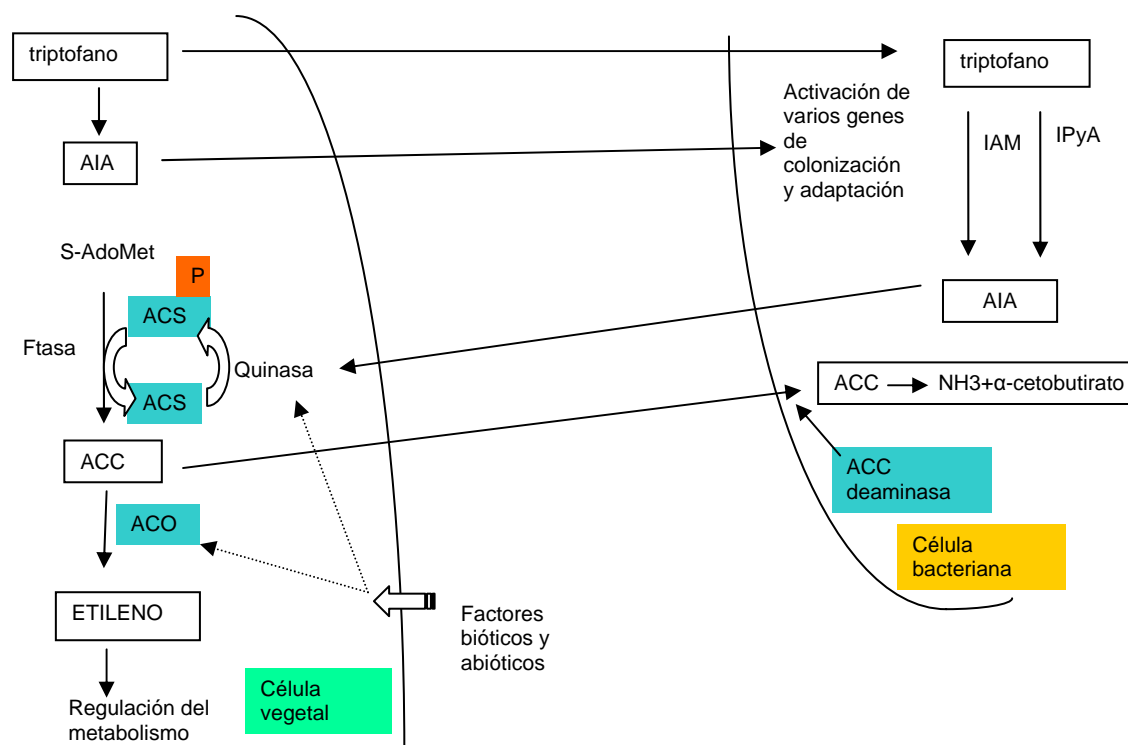


Figura 3. Representación esquemática de la modulación del etileno de la planta por los endofitos. El triptofano exudado por la planta es tomado por la bacteria y convertido a AIA fundamentalmente por las vías del indol-3-piruvato (IPyA) y del indol-3-acetamida (IAM). El AIA de la planta también es exudado y utilizado como molécula señal por la bacteria. La familia multigénica de las ACS y la ACO se regulan independientemente por factores bióticos (incluidas auxinas) y abióticos. La forma fosforilada de la ACS es más estable y activa y convierte S-AdoMet en ACC. No se conoce la fosfatasa que regula la defosforilación de la ACS fosforilada. En presencia de bacterias que poseen ACC deaminasa, el ACC de la planta es secuestrado por la célula bacteriana y transformado en NH₃ y α-cetobutirato. En ausencia de tales bacterias el ACC es oxidado por ACO para dar etileno, CN⁻ y CO₂. Modificado de Hardoim y col., 2008, Trends in Microbiology 16:463-471.

Dado que la regulación de los niveles de etileno es de suma importancia en muchos cultivos para regular la maduración de los frutos y prevenir los efectos deletéreos en vegetales y flores, la manipulación de los niveles de ACC desaminasa es una herramienta potencialmente importante para este fin. De hecho, la enzima ha sido utilizada para obtener plantas de tomate transgénicas que muestran una fase de maduración más prolongada y un menor nivel de etileno desencadenado por la infección por patógenos (Van Loon y col., 2006, a).

2.2.2. Percepción del etileno y señalización

Después de su síntesis el etileno es percibido por receptores específicos y se gatilla un sendero de transducción que finalmente desencadena respuestas fisiológicas específicas. Si bien la mayoría de los componentes de este sendero han sido identificados y su función estudiada en *Arabidopsis*, la estructura básica del sendero de señalización parece ser semejante en otras plantas aunque puede variar el número de componentes del sendero de una especie a otra.

El etileno es sentido por una familia de receptores unidos a la membrana del retículo endoplásmico que presentan similitud de secuencia con los sistemas bacterianos de dos componentes con actividad de histidina quinasa involucrados en la detección de cambios ambientales. De los resultados de estudios bioquímicos y genéticos realizados en *Arabidopsis* se concluyó que el mecanismo de transducción mediado por etileno sigue el modelo del agonista inverso, es decir en ausencia de etileno el receptor es constitutivamente activo en la transducción y cuando el etileno se une al receptor este es inactivado. El etileno se une a una región hidrofóbica del dominio N terminal de los receptores dimerizados y requiere la presencia de Cu^{2+} . En *Arabidopsis* existen cinco de estos receptores, denominados ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4, que se clasifican en dos subfamilias, I y II, dependiendo de la presencia o ausencia del dominio canónico de histidina quinasa. Resultados recientes sugieren que los distintos receptores no tienen funciones redundantes como se pensó originalmente (Lin y Grierson, 2010). En el caso de ETR1 se ha encontrado recientemente que su función es regulada por una proteína, RTE1 (Reversion-To-Ethylene Sensitivity) que estabiliza el estado encendido del receptor. Los receptores actúan como reguladores negativos a través de CTR1 (Constitutive Triple Response 1) que codifica una Raf-like MAPKKK. Recientemente se ha encontrado que existen cuatro genes que codifican para proteínas similares a CTR1 en *Arabidopsis* (CTR1, EDR1, At1g18160 y At1g63660). Estudios genéticos y de co-localización sugieren que CTR1 es parte del complejo de receptores y que media la señalización convergente de varios receptores que activan su actividad quinasa de proteínas en ausencia de etileno. Se postula que aguas abajo de CTR1 estaría implicada una cascada de MAPKs si bien la interacción directa entre CTR1 y una MAPKK no ha sido demostrada. En respuesta a etileno es probable que CTR1 sea inactivado por un cambio conformacional. Aguas abajo de CTR1 se encuentra la proteína EIN2 (Ethylene Insensitive 2), cuya interacción con CTR1 y el mecanismo por el cual transmite la señal al núcleo regulando la disponibilidad de los factores de transcripción de la familia EIN3 son desconocidos. EIN3 se une a los promotores de los Ethylene Responsive Factors (ERFs, por ejemplo ERF1) que finalmente interactúan con las GCC box en los promotores de los genes blanco activando aguas abajo

las respuestas a etileno. En la Fig. 4 se muestra un esquema simplificado del mecanismo descrito.

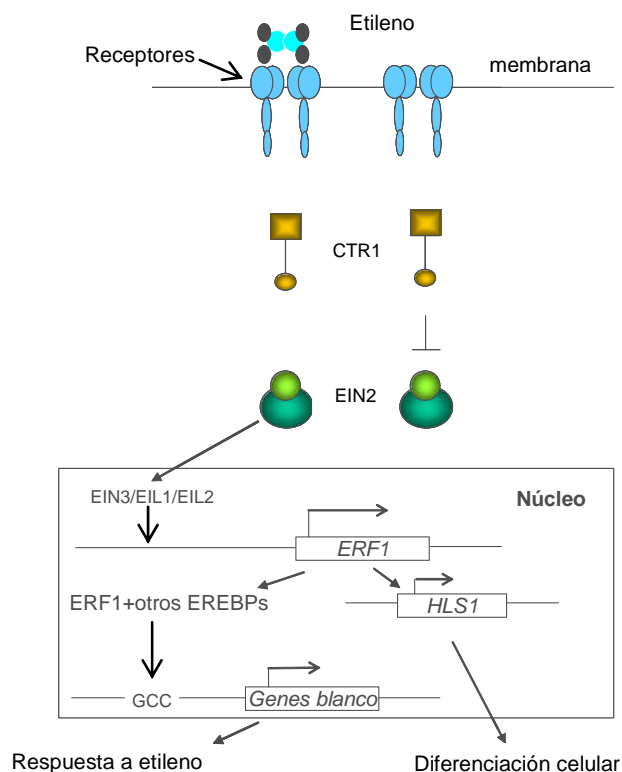


Figura 4: Esquema del sendero de transducción del etileno basado en el modelo de *A. thaliana*. Modificado de Wang y col. Plant Cell (2002), Supp. 131-151.

En tomate existen seis receptores para etileno (LeETR1-6; para revisión, véase Klee, 2002). Las estructuras predichas de la familia de receptores de tomate son muy similares a los de Arabidopsis. Los receptores de tomate son bastante divergentes, exhiben menos del 50% de identidad en su secuencia primaria. Por razones históricas, al LeETR3 se lo continúa llamando NR (Never Ripe). En tres de ellos (LeETR4-6) faltan uno o más dominios conservados de histidina quinasa, con lo que se asemejan a los receptores de la subfamilia II de Arabidopsis. LeETR1, LeETR2, y NR pertenecen a la subfamilia I. LeETR1 y LeETR2 se expresan constitutivamente en todos los tejidos a lo largo del desarrollo siendo LeETR1 unas cinco veces más abundante que LeETR2. En cambio, los patrones de expresión de los otros cuatro genes están altamente regulados. NR, LeETR4, LeETR5 y LeETR6 se expresan más durante la etapa reproductiva en flores y frutos, LeETR4 y LeETR5 en frutos maduros. NR y LeETR4 también son inducidos por la infección por patógenos. La inducibilidad por patógeno de LeETR4 se asocia con aumento de la síntesis de etileno después de la infección (Ciardi y col., 2000). En tomate existe el ortólogo de la proteína RTE1, llamada GR (Green-Ripe). La Fig. 5 muestra un esquema del sendero de

transducción que media la señal de etileno en tomate. En tomate hay una pequeña familia de genes que codifican para proteínas con homología significativa a CTR1 de *Arabidopsis* (LeCTR1, LeCTR2, LeCTR3 y LeCTR4). De la misma forma que los receptores de etileno todos los tejidos expresan los genes de LeCTR1 y sus mensajeros se acumulan diferencialmente dependiendo del tejido. La inducción de LeCTR1 está asociado a los estadios del desarrollo con alto etileno que incluyen la maduración del fruto. Aguas abajo de LeCTRs actúa el gen LeEIN2 que codifica para una proteína con similitud a la familia de transportadores de metales. Se cree que LeEIN2 juega un rol importante en la transducción de señales de otras hormonas como auxinas y jasmónico y por lo tanto puede representar un punto de entrecruzamiento entre varios senderos de señalización. La expresión de LeEIN2 no se regula por etileno. Aguas abajo de LeEIN2 se encuentra en el núcleo una familia de proteínas llamadas EIL que son reguladores transcripcionales. LeEIL1, LeEIL2, LeEIL3 y LeEIL4 reconocen motivos específicos conocidos como Ethylene Responsive Elements (ERE) presentes en los promotores de genes relacionados con la senescencia y la maduración del fruto y en la región promotora de los factores de transcripción Ethylene Response Factors (ERFs). Los ERFs pueden interactuar con los genes que responden a etileno uniéndose a los elementos GCC de los promotores de genes que están involucrados en la resistencia, defensa y crecimiento de la planta. Los factores de transcripción del tipo ERF son específicos de plantas; en tomate se han descrito 5 (LeERF1-4 y LeERF3b) (Cara y Giovannonni, 2008).

Muchos de los componentes clave en el sendero de transducción del etileno, son controlados a nivel transcripcional por el propio etileno, generando así la presencia de circuitos de retroinhibición y activación que permiten la regulación fina del sendero. Por ejemplo es notable que la expresión de ERS1, ERS2 y ETR2 aumentan en respuesta al etileno. Los receptores recién sintetizados que no han interactuado aún con la hormona podrían suprimir la señal del etileno y disminuir o anular la respuesta hormonal como una forma de mecanismo de retroinhibición.

En el caso de *Arabidopsis* se ha propuesto que además de la inactivación de CTR1 por unión del etileno al receptor se activaría una segunda cascada de MAPKs, MKK9-MPK3,6. Dado que MKK9 se transloca al núcleo en forma dependiente de etileno y que sus sustratos MPK3 y 6 están presentes en el núcleo se postuló una fosforilación dependiente de MAPK en la regulación de EIN3. En efecto se encontró *in vivo* e *in vitro* que la fosforilación de EIN3 en Treo¹⁷⁴ estabiliza a la proteína. Los estudios genéticos y moleculares que soportan el rol de esta última cascada en la señalización por etileno también sugieren que solamente cuando la activación de la cascada MPK9-MPK3 y 6 es simultánea con la inactivación de CTR1 el sendero del etileno puede ejecutarse correctamente (Yoo y col., 2009).

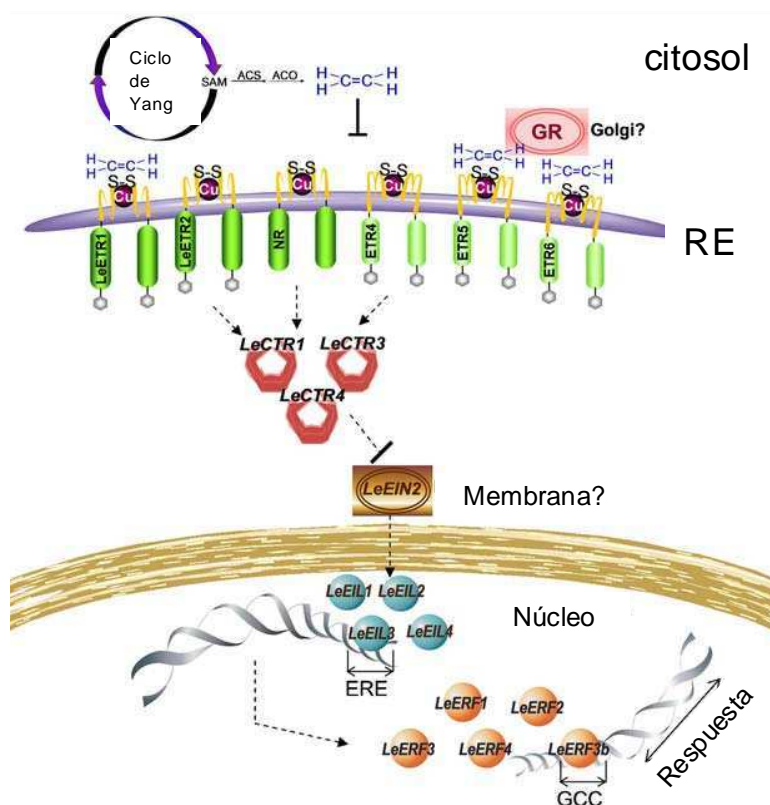


Figura 5. Percepción de etileno y sendero de transducción de la señal en tomate. Una vez que el etileno es percibido por los receptores (LeETR1,2,4-6, Nr) la vía de señalización se bloquea con la participación de GR. Aguas abajo, CTR1 actúa como un regulador negativo mientras LeEIN2 controla positivamente la señalización y la respuesta de ET. En el núcleo, LeEIL1-4 reconoce los dominios EREs en el promotor de los genes de LeERFs que a su vez se unen secuencias GCC en los promotores de los genes que responden a etileno. Tomado de Cara y Giovannoni, *Plant Science* 175 (2008), 106–113.

3. Mecanismos moleculares de defensa en la planta

Todos los organismos vivos evolucionan continuamente adquiriendo diversas características adaptativas que le permiten sobrevivir en un ambiente particular. Como las plantas son inmóviles y carecen del sistema inmune de los vertebrados, han desarrollado complejos mecanismos de defensa que reconocen a los agentes bióticos y abióticos generadores de diferentes tipos de estrés minimizando así los daños que pudieran ocasionarle (para una revisión del tema ver Ausubel, 2005). Las plantas son continuamente desafiadas por virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos que pueden causarles serios daños si no encuentran barreras defensivas en las mismas. Las plantas poseen una variedad de sistemas de defensa que incluyen defensas preformadas como ceras, algunos componentes de la pared y metabolitos secundarios. Una vez detectada la presencia del patógeno la planta activa otros mecanismos que involucran un aumento en la expresión de

genes relacionados con la defensa, por ejemplo producción de compuestos antimicrobianos, formación de lignina y producción de especies reactivas de oxígeno. Una proporción relativamente pequeña de microorganismos han evolucionado como patógenos eficientes que logran suprimir y/o evitar los mecanismos de defensa, son los que causan enfermedad y pueden provocar pérdidas severas en los cultivos (De Wit, 2007). La magnitud de los daños causados por estos patógenos ha estimulado un rápido progreso en la investigación de los mecanismos de defensa de las plantas.

Los patógenos pueden liberar localmente compuestos efectores que son percibidos por el huésped o penetrar la pared y/o la membrana de la célula vegetal. Para responder rápidamente a la infección de un patógeno la planta posee un sofisticado sistema de vigilancia que debe distinguir entre las señales generadas por ella misma de las emitidas por los patógenos. Más aún, cuando una señal es reconocida como no propia, la planta debe discriminar entre los patógenos y los organismos benéficos como es el caso de *Rhizobium* para las leguminosas y las micorrizas y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Los mecanismos que permiten esta discriminación han comenzado a estudiarse recientemente y son parte de los temas de interés en nuestro trabajo.

Las plantas han desarrollado un sistema defensivo innato contra los patógenos que tiene dos niveles: la **resistencia basal** o primaria y la **resistencia secundaria**. La **resistencia basal** es la primera línea de defensa y se induce cuando ciertos compuestos derivados del patógeno (conocidos también como **efectores generales** o del inglés Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs) son reconocidos por receptores de la membrana plasmática. La **resistencia secundaria** se induce cuando los productos de los genes de avirulencia del patógeno (genes *Avr*) son reconocidos por el producto del gen de resistencia correspondiente de la planta, específico de un determinado cultivar. Este último mecanismo, también conocido como **inmunidad inducida por efector**, desencadena una fuerte respuesta hipersensible (HR) que resulta en la muerte celular localizada en la zona del ataque y restringe el crecimiento del patógeno (Jones y Dangl, 2006). Las respuestas primaria y secundaria que llevan a generar resistencia se basan en la activación rápida de cascadas de transducción de señales que promueven cambios intracelulares siendo los más importantes los generados por las respuestas secundarias.

Los **efectores generales** son compuestos vitales para el funcionamiento de los microorganismos, por lo tanto están constitutivamente presentes en los mismos y están conservados en una misma clase de microorganismos. Varios de ellos han sido identificados en patógenos de plantas incluyendo flagelina, lipopolisacáridos (LPS) y factor de elongación Tu (EF-Tu) para bacterias Gram negativas, lo mismo que quitina y α -glucanos para hongos y oomicetes (Zipfel y Felix, 2005).

El reconocimiento de los patógenos por las plantas está mediado por un grupo de proteínas receptoras que pueden agruparse en unas pocas clases importantes. En la Fig. 6 se muestra un esquema de las estructuras modulares, ubicación y función de algunos de estos receptores. Las proteínas símil receptor (RLPs) y los receptores con actividad de quinasa (RLKs) están localizados en la membrana plasmática y contienen dominios con repeticiones ricas en leucina (LRRs). Los RLPs carecen de dominios intracelulares de transducción de señales y los RLKs contienen un dominio citosólico con actividad de quinasa que media la transducción. Otras dos clases de receptores están formadas por proteínas con localización citoplasmática que además del dominio LRR contienen un dominio de unión de nucleótidos (NB). Una clase se conoce como TIR-NB-LRRs ya que contiene un extremo N terminal similar al receptor Toll de *Drosophila* y al receptor de interleuquina 1 (TIR). La otra clase se refiere como CC-NB-LRRs ya que el dominio N terminal contiene un motivo “coiled coil” o leucine zipper además de los otros dominios nombrados. Es llamativo que la respuesta primaria de defensa (non-host) inducida por MAMPs y la respuesta secundaria inducida por factores específicos (race-specific inductors) están mediadas por receptores muy parecidos. Actualmente se los conoce como receptores PRRs y proteínas R (RP) respectivamente (Bent y Mackey, 2007).

3.1. Respuesta primaria

Los modelos más estudiados de recepción por RLKs son los del receptor de la flagelina bacteriana y de otro altamente homólogo que reconoce un fragmento de 18 aminoácidos del factor de elongación EF-Tu bacteriano. Se postula que la señalización por RLKs se inicia con la autofosforilación del receptor y la formación de un complejo con el ligando que se internaliza y es posteriormente degradado por un mecanismo dependiente de proteasoma. Este tipo de receptores RLKs conforman una gran familia de 216 miembros en *Arabidopsis* lo que demuestra la importancia que tiene para las plantas este sistema de percepción de señales del ambiente (Shiu y Bleeket, 2001). Si bien dos MAMPs distintos como flagelina y EF-Tu son reconocidos por RLKs diferentes, las respuestas primarias de defensa son muy similares sugiriendo que el reconocimiento de diferentes MAMPs por diferentes PRRs convergen en un número limitado de senderos de señalización que activan las señales de defensa primarias (Zipfel y col., 2006). Las RLPs tienen un dominio extracelular y uno transmembrana pero carecen de actividad quinasa y por lo tanto requieren de la interacción con una proteína intermediaria para la transducción de la señal. Pese a que se han identificado algunas de estas proteínas el mecanismo por el cual se transfiere la señal es desconocido.

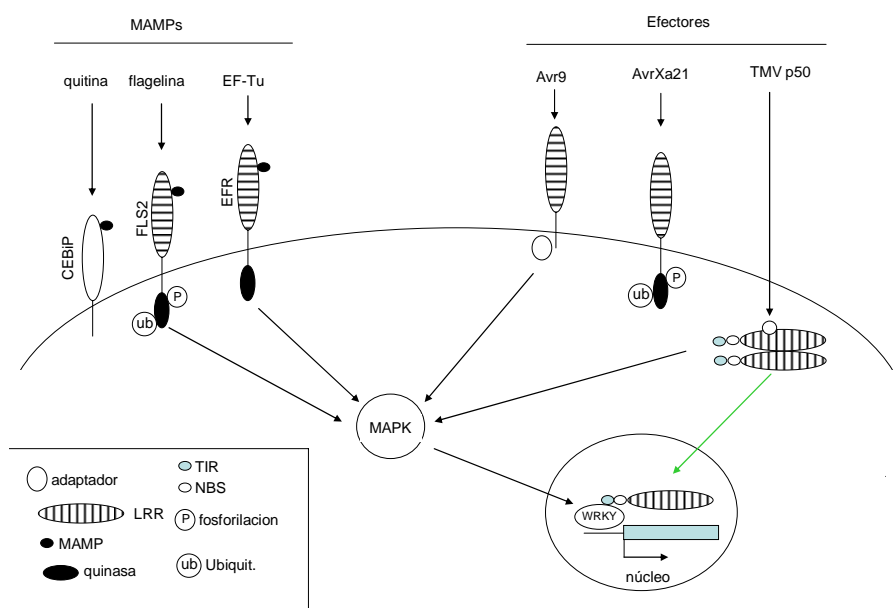


Figura 6. Ubicación celular de los receptores que median la inmunidad en plantas. Modificado de Bent y Mackey (2007). Annu. Rev. Phytopathol. 45:399-436.

3.1.1. Supresión de la respuesta primaria

Los verdaderos patógenos tanto de plantas como de animales son capaces de suprimir o sobrepasar la defensa basal activada por el sistema innato de inmunidad primaria. Las bacterias patógenas de animales y de plantas contienen cuatro sistemas secretorios de los cuales el sistema secretorio tipo III (TTSS III) parece ser el más importante para la virulencia. A través de este sistema las bacterias patógenas de plantas inyectan múltiples efectores en la planta huésped. Si el TTSS es no funcional solo se puede inducir la respuesta primaria de defensa y la bacteria no es patogénica (Grant y col., 2006). Se han descrito un gran número de efectores de bacterias patogénicas y para algunos de ellos se han dilucidado sus mecanismos de acción; por ejemplo, los efectores de *P. syringae* AvrPto, AvrRpt2 y AvrRpm1 comprometen las respuestas inducidas por MAMPs, y AvrPtoB también induce el sendero de ABA favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (De Wit, 2007).

3.2. Respuesta secundaria

Para defenderse de los patógenos que suprimen o rebasan la respuesta defensiva primaria las plantas han desarrollado una respuesta defensiva secundaria que se induce cuando los efectores o sus efectos son detectados por el huésped (Jones y Dangl, 2006). Las proteínas de resistencia (RPs) registran a estos efectores o a algunas proteínas blanco

de la planta que han sido alteradas por estos efectores y disparan la respuesta de defensa secundaria (también llamada respuesta mediada por RPs) que usualmente culminan en una respuesta HR (una respuesta localizada de muerte celular) que asociada a otras respuestas localizadas de defensa bloquea el crecimiento posterior del patógeno. La detección de los efectores o de sus efectos por las proteínas RPs del huésped es específica mientras que la HR inducida no lo es y en general es efectiva contra muchos patógenos de plantas. Los efectores son específicos de una determinada cepa de patógeno y algunas veces modifican distintos dominios de un mismo componente del huésped que a su vez es controlado por diferentes RPs. Por lo tanto la especificidad y diversidad del reconocimiento de los patógenos podría lograrse por la interacción combinatoria de distintos dominios y/o proteínas del huésped.

Como se dijo más arriba, los RPs tienen localización tanto citoplasmática como transmembrana de manera que algunas pueden sentir ligandos secretados o componentes de la superficie del patógeno y otras reconocen ligandos que aparecen en el interior de la célula (Fig 6).

En algunos casos los mecanismos de inducción de defensa mediados por RPs han sido dilucidados. El caso de las proteínas RIN4 de *A. thaliana* y PTO de tomate son un ejemplo de mecanismo indirecto de inducción de la respuesta. En la Fig. 7 se muestra un esquema simplificado de los mecanismos en que están implicadas RIN4 y PTO. RIN4 es blanco de tres efectores bacterianos (AvrRpm1, AvrB, y AvrRpt2) y es controlada por dos RPs intracelulares diferentes (RPM1 y RPS2) y PTO es reconocida por dos efectores bacterianos Avrpto y AvrptoB y controlada por una RP también intracelular (PRF). Este mecanismo indirecto de reconocimiento de las modificaciones inducidas por un efector se conoce también como **modelo de guarda** (Van der Hoorn y col., 2005). Los efectores AvrRpm1 y AvrB fosforilan a RIN4 y Avrpto y AvrptoB fosforilan a PTO que a su vez activan las proteínas receptoras citoplasmáticas RPM1 (del tipo CC-NB-LRR) en el caso de RIN4 o PRF (del tipo NB-LRR) en el caso de PTO. Finalmente estas proteínas activadas median la respuesta secundaria de defensa (Mackey y col., 2002; Axtell y Staskawicz, 2003). En la Fig. 7 se esquematiza uno solo de los mecanismos descritos para cada proteína intermediaria.

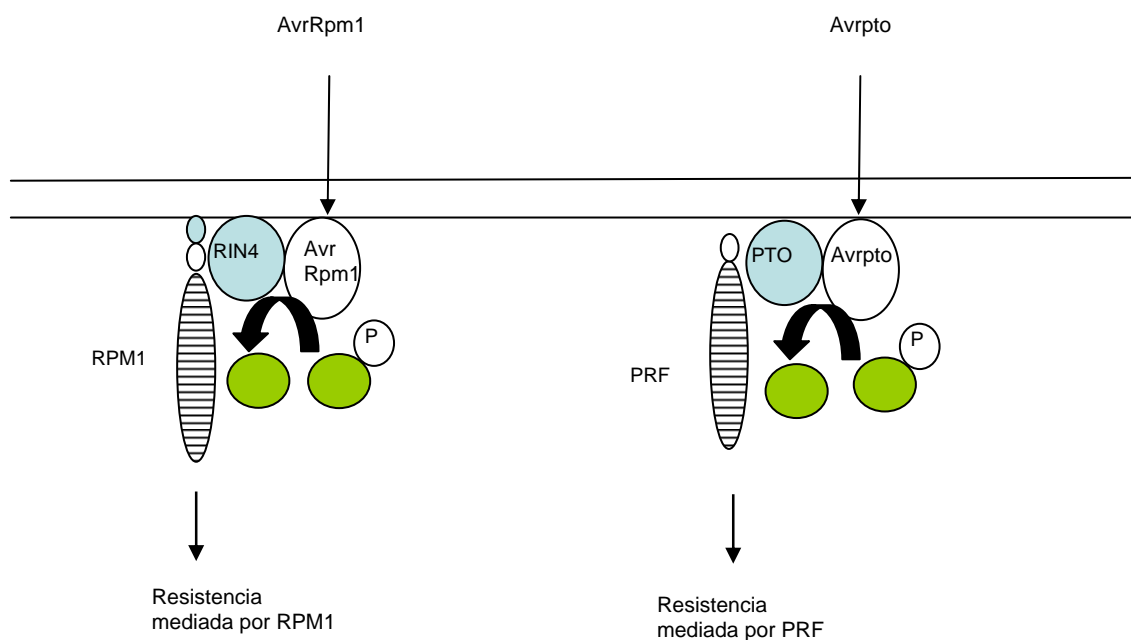


Figura 7. Mecanismo de defensa mediado por RIN4 y PTO. Modificada de Gómez-Gómez *Molecular Immunology* 41 (2004) 1055–1062.

En otros casos el reconocimiento efector/receptor es directo como en el caso de los efectores de la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum* (Deslandes y col., 2003).

Ambos tipos de respuesta comparten ciertas características bioquímicas y moleculares aguas abajo como ser activación del sendero de señalización de MAPK, modificación post traduccional de proteínas preexistentes (Stulemeijer y Joosten, 2008), activación transcripcional de los genes relacionados con la patogénesis (PRs), producción de proteínas antimicrobianas, inducción de la aparición de las formas reactivas de oxígeno (ROS) para el reforzamiento de las paredes celulares y de compuestos tóxicos contra los invasores. Más aún, tres importantes hormonas vegetales, ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno, son componentes cruciales en los pasos posteriores de los senderos de señalización activados por ambos mecanismos de defensa. SA contribuye a la resistencia sistémica de las plantas, y participa en la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) especialmente frente a los microorganismos biotróficos como *P. syringae* que colonizan tejidos vegetales vivos (Glazebrook, 2005). SA también está involucrado en la expresión de los genes PR que codifican para proteínas con actividad antimicrobiana, degradativa u otras durante la resistencia basal como así también en la producción de ROS y en la inducción de la respuesta HR en la resistencia específica. JA y etileno, por otro lado, están involucrados en la resistencia contra patógenos fundamentalmente necrotróficos, como *Botrytis cinerea* y *Erwinia carotovora*, a través de la inducción de genes de defensa y la activación de complejos senderos de señalización (Devoto y Turner, 2003). Estas hormonas no participan

en forma aislada en los procesos que regulan sino que interactúan entre sí y con otras moléculas señalizadoras. Se ha descrito un importante número de interacciones entre los JAs y otras rutas de señalización como las de etileno, auxinas, SA o ABA.

3.3. Respuestas sistémicas a la infección por microorganismos

Estas respuestas inducidas sistémicamente por infección por microorganismos protegen a la planta contra invasiones futuras. Se han caracterizado en detalle la resistencia sistémica adquirida (SAR) que se dispara por patógenos necrotróficos y la resistencia sistémica inducida (ISR) que es activada después de la colonización de las raíces por rizobacterias no patogénicas por ejemplo algunas cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* (Sharma y Nowak, 1998). Los MAMPs como flagelina y los lipopolisacáridos presentes en los microorganismos patógenos se encuentran también en estos microorganismos benéficos y resultan ser potentes inductores de ISR. Fenotípicamente ISR es semejante a SAR, las partes no infectadas de las plantas se vuelven resistentes a una infección posterior.

3.3.1. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La vía SAR se caracteriza por acumulación de SA y de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) como PR1, PR2 y PR5. La expresión de estas PRs está relacionada con el regulador transcripcional NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1). Este regulador se activa en el citosol como consecuencia de la acumulación de SA y se transloca luego al núcleo donde promueve la transcripción de los genes PRs al interactuar con el factor de transcripción TGA2. Estos genes PRs sirven de marcadores de SAR en varias especies de plantas (Pieterse y Van Loon, 2004).

3.3.2. Resistencia sistémica inducida (ISR)

Los determinantes microbianos que contribuyen al establecimiento de la ISR inducida por los microorganismos benéficos han sido ampliamente estudiados en diferentes especies de *P. fluorescens*. Análogamente a lo que ocurre con las MAMPs como flagelina y lipopolisacáridos de especies patógenas de *Pseudomonas*, estos componentes de la superficie de las especies benéficas son potentes inductores de la respuesta inmune del huésped. Estas respuestas pueden ser distintas en distintas plantas (*Arabidopsis*, tomate, poroto) sugiriendo que existe algún tipo de especificidad de huésped en el reconocimiento de estas MAMPs. Por otra parte, algunos antibióticos producidos por especies benéficas de microorganismos como el 2,4 diacilfluoroglucinol, surfactantes como surfactina y compuestos como N-acil-L-homoserina lactona entre otros, inducen resistencia en

Arabidopsis lo que demuestra la diversidad de MAMPs producidas por rizobacterias benéficas que son reconocidas por las plantas.

Se postula que las MAMPs de los organismos benéficos y las de los patógenos se reconocen de manera muy similar resultando finalmente en una capacidad defensiva aumentada en la planta. Sin embargo la diferencia más importante es que la inmunidad inducida por las bacterias benéficas no interfiere con la interacción planta/bacteria lo que implica una comunicación molecular muy especial entre ambas. Se propone que el establecimiento de una respuesta ISR requiere fundamentalmente componentes de los senderos de transducción que involucran al etileno y al jasmónico y no a SA (Pieterse y col., 1998) y es controlado por el regulador transcripcional NPR1 que también controla SAR (Ahn y col., 2007); esto implica que NPR1 es una proteína integradora que puede regular diferencialmente la expresión génica dependiendo de la vía activada aguas arriba (SAR o ISR). Sin embargo, las evidencias más recientes indican que las rizobacterias benéficas pueden inducir un nivel bajo de expresión de genes regulados por etileno y jasmónico y también por SA por lo que serían detectados como “patógenos menores” (Conn y col., 2008). En el sistema modelo *Arabidopsis/P. fluorescens* WCS417 el factor de transcripción MYB72 es requerido en las etapas iniciales del establecimiento de la respuesta ISR aunque su sola sobre expresión no es suficiente para la inducción de la respuesta. MYB72 interactúa *in vitro* con el factor de transcripción EIL3, que podría ser *in vivo* el elemento que complementa a MYB72 y a la vez lo relaciona con el sendero de respuesta a etileno que ha demostrado ser determinante en la respuesta ISR en raíces (Knoester y col., 1999). La resistencia inducida en *Arabidopsis* por el hongo benéfico *Trichoderma asperellum* también parece depender de MYB72 (Van der Ent, 2008), lo que sugiere que MYB72 podría actuar como un nodo de convergencia en las respuestas inducidas por distintos organismos benéficos del suelo.

La resistencia sistémica inducida por microorganismos benéficos no está en general asociada a una reprogramación sustancial del transcriptoma como sí lo está la resistencia inducida por patógenos; en efecto, los cambios son moderados o aún no detectables (Verhagen y col., 2004, Wang y col., 2005). Sin embargo, una característica compartida en muchos casos por las ISR inducidas por las rizobacterias benéficas es la capacidad de generar un estado cebado para una resistencia posterior aumentada. En las plantas cebadas las respuestas no son activadas directamente pero son aceleradas en el caso de una infección posterior por patógenos o insectos resultando en una respuesta más intensa frente al ataque (Conrath y col., 2006). En *Arabidopsis* la ISR inducida por rizobacterias está asociada a menudo con el cebado para la expresión de respuestas mediadas por genes que responden a JA/etileno y una deposición aumentada de calosa en el sitio de entrada del patógeno. La Fig. 8 muestra el esquema propuesto para el sendero de

señalización ISR que incluye los componentes estudiados en el sistema Arabidopsis/microorganismos de la rizosfera como *P. fluorescens* o *T. asperellum*.

En conclusión, los estudios recientes relativos a la interacción planta/microorganismos benéficos muestran que el establecimiento de la asociación involucra un reconocimiento mutuo y un alto grado de coordinación entre la planta y el organismo benéfico. Vale recalcar algunas características de esta interacción:

- ✓ Se conocen varias MAMPs de microorganismos benéficos, que en analogía con las MAMPs de patógenos, juegan roles cruciales en el inicio de la respuesta inmune.

- ✓ Existe considerable redundancia en la capacidad de las MAMPs de los microorganismos benéficos para inducir resistencia (lo mismo que con las de patógenos) lo que sugiere algún punto temprano de convergencia en los senderos de señalización. Se especula que la redundancia en el reconocimiento de las MAMPs aseguraría mayor eficiencia en la inducción de la respuesta inmune.

- ✓ La resistencia sistémica inducida por los microorganismos benéficos está regulada en forma preponderante por el sendero JA/etileno y se basa fundamentalmente en un mecanismo de cebado más que en la activación directa de la defensa. Este mecanismo de cebado parecería tener una razón lógica en que la activación permanente de la defensa tiene un mayor costo que afectaría el crecimiento de la planta, inconsistente con la naturaleza beneficiosa de esta interacción planta/microorganismo. En el caso de un desafío posterior con un patógeno la planta puede sin embargo responder instalando más rápidamente mecanismos de defensa.

3.4. Adaptación de los patógenos a la respuesta secundaria de defensa

La interacción entre las plantas y sus patógenos ha llevado a distintos modos de adaptación a las respuestas defensivas primarias y secundarias. La co evolución de las plantas y sus patógenos ha llevado a la generación de nuevos efectores que ya no interaccionan con las RPs o que perturban a las proteínas blanco de las plantas de una forma tal que ya no son sensadas por las RPs en los casos de mecanismos indirectos de inducción de la respuesta defensiva. Distintos tipos de mutaciones son responsables de estos cambios; dependiendo de su importancia y modo de acción los genes de algunos efectores pueden ser completamente removidos por delección y otros sufren leves cambios en su secuencia aminoacídica que disminuye o impide su reconocimiento por las RPs pero que mantienen algunas funciones de virulencia (Arnold, 2007).

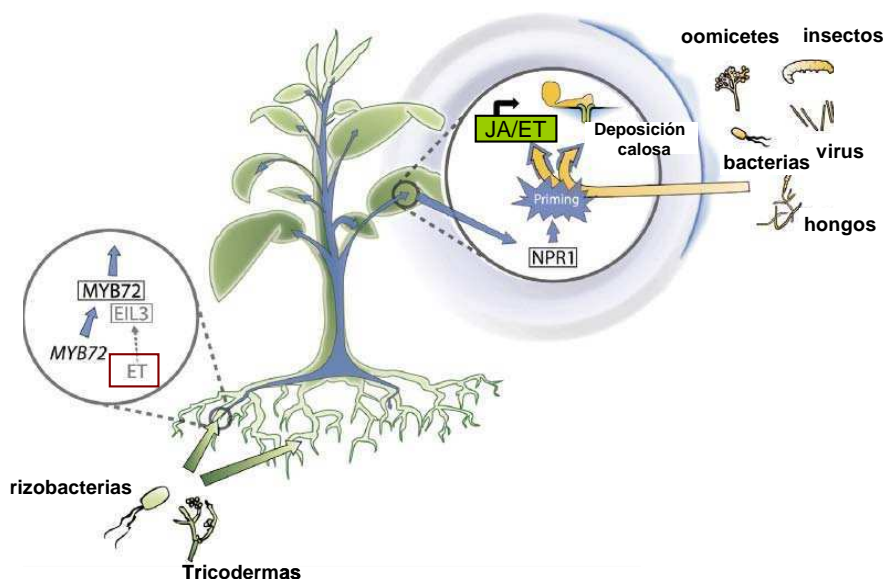


Figura 8. Modelo del camino ISR. El reconocimiento de MAMPs de los microorganismos benéficos rizosféricos como *P. fluorescens* WCS417 o *T. asperellum* T34 conduce a la activación local de los factores de transcripción MYB72 en la raíz. MYB72 posiblemente interacciona con el factor de transcripción EIL3. Río abajo o paralelamente con MYB72/EIL3 un componente no identificado aún del camino de transducción del etileno, es necesario en la raíz para activar un grupo de genes del camino ISR en la parte aérea. La cascada de transducción del camino ISR probablemente requiere NPR1 en los tejidos alejados. El ataque por patógenos o insectos en hojas activa la respuesta de defensa de la planta (flechas amarillas) la cual se acelera en plantas cebadas en ISR (flechas amarillas combinadas con azul). Modificado de Van Wees y col. 2008, *Current Opinion in Plant Biology*, 11:443–448.

4. Transducción de señales

4.1. Generalidades de los senderos de transducción

Las señales (sean internas o externas al organismo) recibidas por las células son sensadas por moléculas receptoras generalmente ubicadas en la membrana plasmática y transmitidas al interior de la célula mediante una serie de reacciones bioquímicas consecutivas en las que intervienen mensajeros no proteicos, enzimas y factores de transcripción que generan en forma secuencial la modificación post-traduccional de proteínas y finalmente modifican los patrones de expresión génica responsables del metabolismo, el desarrollo y la diferenciación. Esta secuencia constituye un sendero de transducción, de distinta complejidad según el caso, que genera finalmente una respuesta celular a la señal original. Las respuestas pueden ser rápidas cuando los cambios bioquímicos involucran modificaciones de las proteínas preexistentes o no requieren expresión génica, o más lentos cuando dependen de cambios en la expresión de determinados genes. Una de las características regulatorias más importantes de los

senderos de transducción es su capacidad para amplificar la señal que desencadena el evento inicial debido a que entre los componentes del sendero se encuentran proteínas con actividad enzimática que se activan en cascada, generalmente quinasas de proteínas.

Las quinasas de proteínas conforman una superfamilia de proteínas que catalizan la transferencia de fosfato desde el ATP a residuos serina, treonina y tirosina de sus proteínas blanco modificando su estructura y/o función.

La aplicación de las nuevas tecnologías (genómica, proteómica) ha permitido establecer que muchos de los senderos de transducción de señales, especialmente los de las plantas, conforman una intrincada red en la que interaccionan unos con otros permitiendo generar y coordinar un enorme número de respuestas diferentes a las señales recibidas.

4.2. Transducción de señales en las plantas

Debido a que las plantas son sedentarias, y carecen de un sistema circulatorio semejante al de los animales, la mayoría de las células vegetales son capaces de sensor casi todas las señales a las que la planta puede responder. Los estímulos pueden ser abióticos y bióticos. Entre los abióticos se encuentran la luz, los metabolitos orgánicos, el contenido de agua, la calidad del suelo, el viento, altas y bajas temperaturas, los reguladores de crecimiento y hormonas, el pH, la interacción con las paredes celulares de células anexas, señales eléctricas, los gases (CO_2 , O_2 , C_2H_4), y el daño (Gilroy y Trewavas, 2001). Entre los estímulos bióticos están los patógenos, las rizobacterias y los microorganismos de la nodulación.

Una vez que la señal externa es detectada por los receptores estos a su vez activan a sus efectores en la célula vegetal (canales iónicos, proteínas que unen GTP, quinasas de proteínas) las que a su vez transfieren la señal a otros componentes del sendero que la amplifican aguas abajo.

Los componentes proteicos de los senderos de transducción (quinasas de proteínas, fosfatasa de proteínas, factores de transcripción) son muy numerosos en las plantas; el genoma de *Arabidopsis*, por ejemplo, codifica potencialmente para alrededor de 1000 quinasas de proteínas, 300 fosfatasa y 1500 factores de transcripción. Los mensajeros no proteicos en cambio son pocos e incluyen nucleótidos cíclicos, iones H^+ , K^+ y Cl^- , especies reactivas de oxígeno, lípidos y fundamentalmente calcio (Sanders y col., 2002).

4.2.1. El rol del calcio

Se han propuesto varias hipótesis para explicar de que manera un mensajero no proteico como el calcio puede estar involucrado en tan diversos senderos de transducción y generar señales específicas en respuesta a un determinado estímulo. Por un lado el calcio

podría ser necesario pero no suficiente para iniciar el sendero, con lo cual sería indispensable la existencia de otra señal en paralelo para disparar la respuesta. La compartimentalización celular y la característica dinámica de los cambios de concentración del calcio podrían tener también un rol en la especificidad de alguna de las respuestas. Finalmente la presencia de los elementos de respuesta en el sitio donde se producen los cambios de calcio tiene un papel decisivo en la transducción de la señal.

Las señales de calcio se inician por la apertura de canales que permiten el pasaje del ión desde un compartimento con un determinado potencial electroquímico (puede ser el exterior de la célula o un sitio de almacenamiento intracelular) hacia otro donde su potencial electroquímico es menor. En general el aumento de Ca^{2+} es bifásico, se observa un rápido aumento transiente de la concentración y luego un segundo pico cuya intensidad con respecto a la del primero depende de la señal inductora. Se ha demostrado que el primer pico es causado por la entrada de Ca^{2+} extracelular y el segundo por la liberación de Ca^{2+} desde los sitios de almacenamiento como vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico mediada por la activación de la fosfolipasa C y aumento de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) (Viehveger y col., 2002).

En el mantenimiento de los bajos niveles de calcio en los diferentes compartimentos juegan un papel importante, además de los canales, las bombas de calcio ATP dependientes y las permeasas. De la acción coordinada de estos transportadores (entrada por canales y salida por bombas y permeasas) resultan los “picos” de calcio que reconocen los decodificadores de la señal. En Arabidopsis algunos de estos transportadores de calcio han sido localizados en membrana plasmática, vacuolas, Golgi, retículo endoplásmico y cloroplastos.

La percepción inicial de las señales de calcio tiene lugar a través de la unión del calcio a diferentes sensores proteicos. El calcio se une a sus proteínas blanco en sitios altamente conservados llamados motivos de unión de calcio (EF-hands) que están usualmente repetidos. El motivo presenta una estructura tipo hélice-rufo-hélice y contiene alrededor de 30 residuos aminoácidos, 12 de los cuales son los más conservados para establecer las uniones de coordinación con el calcio. La unión del calcio a las EF-hands induce un cambio conformacional que modifica las propiedades de la proteína. Los sensores de calcio son de dos tipos: aquellos que trasladan la señal percibida a otros componentes del sendero y los que responden directamente a la unión del ión con un cambio en su estructura y función. La proteína calmodulina (CaM) pertenece al primer tipo, sufre un cambio en su estructura inducido por la unión del calcio que le permite luego interactuar con otra proteína que a su vez responde con un cambio en su actividad (por ejemplo quinasas de proteína dependientes de calmodulina, bomba de calcio estimulada por calmodulina en plantas) o en su estructura. Los sensores que responden directamente a la unión de calcio

sufren un cambio conformacional intramolecular que altera su actividad o estructura, como por ejemplo en la activación de la quinasa de proteínas dependiente de calcio (CDPK). Estos dos mecanismos de decodificación de las señales de calcio están presentes en gran número de senderos de señalización que involucran cascadas de fosforilación reguladas por quinasas y fosfatasas, varios de los cuales terminan en la regulación de la expresión génica.

4.2.1.1. Proteínas sensoras de calcio

Calmodulina

Es una proteína pequeña (15 a 17 KDa) y altamente conservada, posee 150 aminoácidos de los cuales sólo 13 difieren entre las calmodulinas animales y vegetales. Tiene cuatro motivos de unión a Ca^{2+} , ricos en aspartato y glutamato, constituidos por 12 aminoácidos cada uno y al unir Ca^{2+} cambia su estructura terciaria exponiendo una región hidrofóbica la cual es reconocida por regiones específicas de sus proteínas blanco. Se encuentra fundamentalmente en el citoplasma y el núcleo pero se la ha localizado también unida a la membrana plasmática.

No tiene actividad enzimática en sí misma pero modula la actividad de numerosas enzimas y de proteínas no enzimáticas en una forma dependiente de Ca^{2+} . Las proteínas que unen calmodulina son muy diversas y están involucradas en etapas centrales de las rutas de señalización como son el transporte de iones, la regulación génica, la regulación de la división celular (Reddy, 2001).

Otras proteínas que unen calcio

Existen otras proteínas que unen calcio a través de motivos EF-hands y que tienen poca homología con calmodulina. En Arabidopsis se ha identificado una familia de proteínas que presentan homología con Calcineurina B (familia CBL). Algunos miembros de esta familia son inducidos por estrés (Kudla y col., 1999). Las proteínas CBL, como lo hace calmodulina, se unen a otras proteínas modificando su actividad.

Finalmente existen otras proteínas que unen calcio pero que carecen del motivo EF-hand como las anexinas, la calreticulina y la proteína PCP del pistilo (Reddy, 2001).

Quinasas de proteína dependientes de calcio

Como se comentó más arriba la fosforilación de proteínas tiene un papel preponderante en las etapas de señalización. La superfamilia de las quinasas de proteínas está presente en todos los reinos y su dominio catalítico altamente conservado. Las variaciones en sus dominios regulatorios generan subdivisiones de la superfamilia de quinasas agrupadas por su respuesta a nucleótidos cíclicos, Ca^{2+} , fosfolípidos, CaM, mitógenos. Algunas de estas subfamilias se encuentran tanto en animales como en plantas,

otras sólo en animales y otras son exclusivas de plantas como las RLKs (discutidas en *Mecanismos moleculares de defensa*), CDPKs y otras.

Subfamilia CDPK

Las CDPKs tienen la característica única entre las quinasas reguladas por Ca^{2+} de tener en su extremo C-terminal un dominio semejante a calmodulina que une Ca^{2+} acoplado así intracelularmente el sensor de Ca^{2+} con la actividad quinasa. Este tipo de quinasas fue encontrado originalmente en plantas (Harmon y col., 1987) y si bien se han encontrado análogos estructurales en protistas no se las ha encontrado en hongos, insectos o mamíferos (Zhang y Choi, 2001).

Las CDPKs tienen un peso molecular que oscila entre 50 y 90 KDa según la isoforma y poseen cinco dominios conservados: el extremo amino terminal variable, el dominio quinasa, el dominio autoinhibitorio, el dominio regulatorio (semejante a calmodulina) y un dominio carboxilo terminal variable (Harmon y col., 2000). En la Fig. 9 se presenta un esquema de dominios de CDPK.

Hay evidencias de CDPKs de localización citosólica y nuclear y de su asociación a citoesqueleto y membranas lo que permite suponer que la actividad CDPK podría estar involucrada en la regulación de muchos aspectos de la fisiología celular.

Se han caracterizado y clonado gran número de CDPKs de diferentes especies vegetales como soja (Harper y col., 1991), *Arabidopsis* (Urao y col., 1994), arroz (Breviaro y col., 1995), papa (Raíces y col., 2001), tomate (Chico y col., 2002). Algunas especies contienen un gran número de isoformas de CDPK como arroz y *A. thaliana* con 31 (Ray y col., 2007) y 34 isoformas respectivamente (Franz y col., 2011).

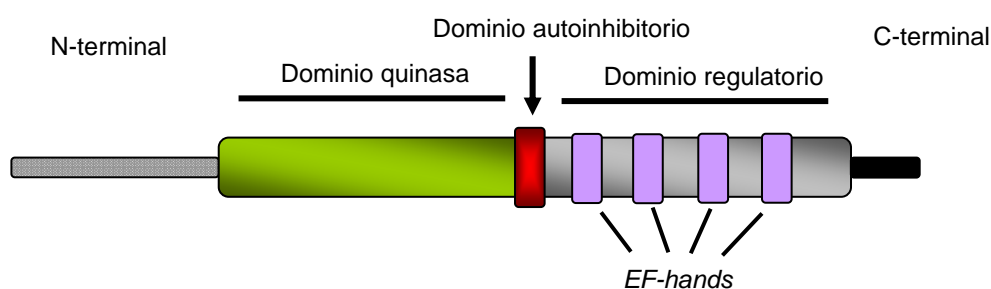


Figura 9. Esquema de dominios en las CDPK. Las CDPK tienen cinco dominios. Un dominio amino terminal (N) de largo y secuencia variable que presenta sitios consenso para miristoilación y palmitoilación, el dominio catalítico (quinasa), el dominio autoinhibitorio o bisagra que contiene una secuencia que funciona como pseudosustrato. La característica principal de estas quinasas es el dominio adyacente al dominio autoinhibitorio. Las CDPKs poseen un dominio regulatorio similar a calmodulina (CaM-LD) que en la mayoría de las isoformas tienen cuatro sitios de unión a Ca^{2+} (EF-hands). El dominio carboxilo terminal (C) de cada quinasa es corto y su función es desconocida (Modificado de Klimecka y Muszynska, 2007, Acta Biochimica Polonica 54: 219-233).

En la Fig.10 se muestra esquemáticamente el mecanismo propuesto por el cual el calcio al unirse a sus sitios regulatorios (EF-hands) en el extremo carboxilo terminal de la CDPK cambia la conformación de la proteína liberando al dominio catalítico de la inhibición impuesta por el dominio autoinhibitorio en la estructura libre de calcio.

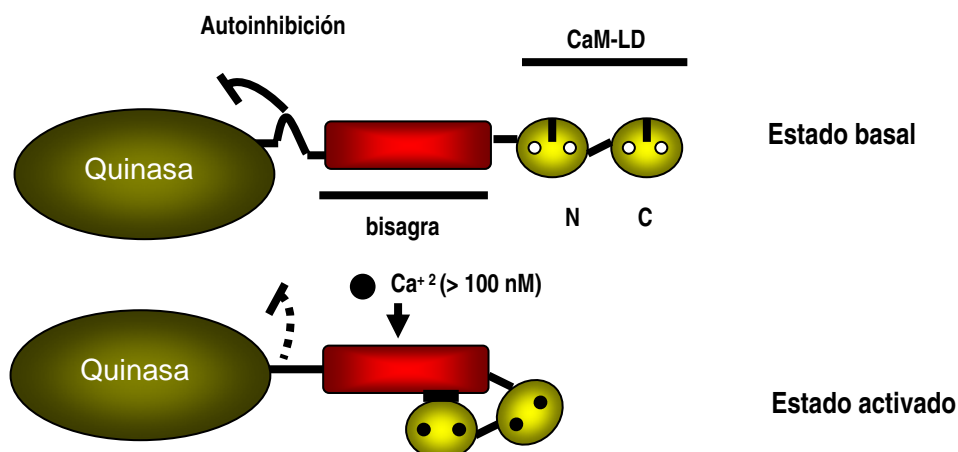


Figura 10. El dominio bisagra contiene un sitio de autoinhibición y un sitio de unión al CaMLD. Los lóbulos N- y C-terminal del CaM-LD contienen un par de sitios de unión a Ca^{2+} EFhands (círculos blancos). La línea perpendicular negra en estos lóbulos representa una conformación cerrada. Cuando se unen los iones Ca^{2+} (círculo negro) se genera la conformación abierta (Modificado de Klimecka y Muszynska, 2007, Acta Biochimica Polonica 54: 219-233).

La existencia de múltiples isoformas de CDPK en casi todos los sistemas hace pensar que podrían estar sensando y respondiendo diferencialmente a distintos “picos” de calcio. La divergencia funcional observada en algunos dominios EF-hands podría explicar en parte esta versatilidad. En efecto, se ha demostrado que tres isoformas de CDPK de soja requieren diferentes concentraciones de calcio para alcanzar la mitad de la activación máxima y las diferencias entre estas concentraciones pueden llegar a un factor de diez (Lee y col., 1998). También es importante tener en cuenta que en algunas CDPKs la activación por calcio es potenciada, *in vitro*, por fosfolípidos (Szczegielniak y col., 2005), por interacción con proteínas 14-3-3 (Camoni y col., 1998) y por fosforilación por otras quinasas (Romeis y col., 2001). Todas estas consideraciones llevan a concluir que diferentes CDPKs pueden ser utilizadas para sensar diferentes señales de calcio y que la especificidad de una determinada CDPK depende de múltiples factores, incluyendo su modificación por otros senderos de señalización y su interacción con diferentes blancos aguas abajo en cada sendero.

La autofosforilación de algunas CDPKs es una modificación que se ha demostrado en proteínas nativas y recombinantes pero no se conoce con certeza cuál podría ser el rol fisiológico de esta modificación (Hegeman y col., 2006).

La actividad CDPK está involucrada en una enorme cantidad de senderos metabólicos centrales en los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación celular de las plantas y también en los relacionados con las respuestas defensivas a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos. Como en todos los sistemas vivos, la coordinación entre los eventos metabólicos en las plantas involucra la acción de hormonas. Muchas de las hormonas vegetales producen cambios en la concentración y movilización de calcio y por lo tanto en la actividad de las CDPKs. Se ha demostrado que en plantas de arroz el aumento de giberelinas y brasinosteroides incrementan la actividad CDPK (Abo-el-Saad y Wu, 1995; Yang y Komatsu, 2000) y que en hojas de papa se inhibe la actividad de CDPK en respuesta a ácido jasmónico (Ulloa y col., 2002). Asimismo el AIA estimula la transcripción de los genes de CDPK en poroto y alfalfa (Botella y col., 1996; Davletova y col., 2001).

Se ha identificado un gran número de sustratos de CDPK que permite relacionar la actividad de las diferentes isoformas con la regulación de enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, en las respuestas a estrés y en el transporte (Romeis, 2012).

La sobre expresión de la isoforma OsCDPK7 en plantas de arroz aumenta la tolerancia a la sequía, la salinidad y el frío (Saijo y col., 2000) y el silenciamiento de NtCDPK2 y NtCDPK3 reduce y retarda la respuesta hipersensible de defensa al efector Cf9/Avr9 (Romeis y col., 2001).

4.2.2. Otros componentes de los senderos de transducción

Proteínas que unen GTP

La existencia en plantas de proteínas que unen GTP (proteínas G) está documentada desde hace varios años. Las plantas poseen proteínas G heterotriméricas compuestas por subunidades α , β , y γ , y también las llamadas pequeñas proteínas G monoméricas; ambos tipos de proteínas G son semejantes a las descritas en mamíferos y en eucariotas inferiores y su rol en la transducción de señales está documentado en gran cantidad de trabajos. A modo de ejemplo se puede mencionar que se ha demostrado recientemente la interacción directa entre la subunidad α de la proteína G y la fosfolipasa D en *Arabidopsis*, lo cual sugiere la participación de la proteína G en la señalización transmembrana (Zhao y Wang, 2004). Asimismo, se ha visto que varias proteínas G pequeñas y subunidades α de proteínas G triméricas están involucradas en la generación de ROS, muerte celular y resistencia a patógenos (Yang, 2002). Una revisión de los

senderos de señalización en que intervienen proteínas G se puede ver en Temple y Jones, 2007.

Formas reactivas de oxígeno

Las diferentes ROS son producidas continuamente en todos los seres vivos como resultado del metabolismo aeróbico o en respuesta a factores bióticos y abióticos. Las ROS no son sólo subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico, también son moléculas de señalización implicadas en varios procesos del desarrollo. Las formas predominantes de ROS son el ión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que resultan de pasos sucesivos en la reducción del oxígeno molecular. Varias enzimas de la planta son responsables de la generación de estas formas de ROS, entre ellas NADPH oxidasa, y peroxidasas y oxigenasas de mitocondria, cloroplastos y peroxisomas. Así mismo, con el fin de hacer frente a la efectos deletéreos de la acumulación de ROS, las plantas están equipadas con una dotación de mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos.

La aparición de ROS es un evento temprano muy común en la respuesta de las plantas al ataque por patógenos. En varios sistemas se ha descrito una generación bifásica de ROS: una fase temprana que se observa a los 10-30 minutos y otra entre 1 y 3 horas después del tratamiento con un inductor fúngico.

Las formas de ROS producen variados efectos en la planta que cooperan en la instalación de la defensa frente a la agresión: reforzamiento de la pared celular por el entrecruzamiento de proteínas estructurales y lignina, muerte celular, activación de genes de defensa e inducción de la acumulación de metabolitos secundarios como isoflavonoides, fitoalexinas o terpenos. No está claro de qué forma las ROS generan estas reacciones de defensa pero sí se sabe que inducen varios genes de la biosíntesis de metabolitos secundarios y regulan la estabilidad de los transcritos de algunos genes de defensa en células vegetales. En especial H_2O_2 puede mediar la peroxidación de lípidos iniciando un sendero de síntesis de jasmónico y compuestos relacionados y de oxilipinas, relacionados a su vez con la síntesis de ciertos metabolitos secundarios (Thoma y col., 2003).

La producción de ROS también es notable en las interacciones planta-microorganismos benéficos como rizobium-leguminosas y durante el establecimiento de las endo y ectomicorrizas. En el caso de estas simbiosis parece haber una supresión de la segunda fase de generación de ROS. Por ejemplo, en la interacción rizobium-leguminosa, se ha observado una disminución transitoria de la acumulación intracelular de ROS en los pelos radiculares en respuesta a la secreción de los factores Nod; esta disminución parece jugar un papel clave en la interacción compatible rizobium-leguminosas, promoviendo

activamente la infección de las raíces. Sin embargo, si no se reconocen los factores Nod o se utiliza Nod non host, la planta parece considerar a la bacteria como un agente patógeno y moviliza sus mecanismos de defensa (Nanda y col., 2010).

Inositol 1,4,5-trifosfato y nucleótidos cíclicos

El fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) y la fosfolipasa C conforman otro sendero de transducción de señales muy importante en la defensa en plantas. La enzima puede ser activada por los aumentos temporales de Ca²⁺ citosólico para hidrolizar el PIP₂ generando así los segundos mensajeros IP₃ y DAG. IP₃ puede movilizar Ca²⁺ desde las reservas en retículo endoplásmico, Golgi o vacuolas. Se ha demostrado que el sendero IP₃/Ca²⁺ está involucrado en la inducción de algunos metabolitos secundarios en respuesta a tratamientos con efectores (Zhao y col., 2004b).

Otro grupo de segundos mensajeros, los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc, se acumulan en forma notoria después del tratamiento con efectores. El AMPc media la inducción de la síntesis de fitoalexinas en varias especies y su análogo, el dibutiril AMPc, estimula la acumulación de fitoalexinas en ausencia de efector (Zhao y col., 2004a). Por otro lado se sabe que AMPc y GMPc tienen un rol importante en la regulación de canales iónicos en la membrana plasmática de las células vegetales en respuesta a efectores y a diferentes tipos de estrés y que estos canales dependientes de nucleótidos cíclicos juegan a su vez un importante papel en las respuestas de defensa (Clough y col., 2000).

Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA), es un conocido inductor de SAR en la interacción planta/patógeno. El SA se acumula rápidamente en el sitio de la infección durante la reacción hipersensible. Luego se inducen respuestas de defensa en el resto de la planta, entre ellas la activación de genes relacionados con la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Mikkelsen y col., 2003).

Óxido nítrico

El rol del óxido nítrico (NO) es bien conocido desde hace tiempo en algunos mecanismos de transducción de señales en mamíferos y recientemente se lo ha reconocido como un intermediario en las cascadas relacionadas con auxinas y que están involucradas en el desarrollo de la raíz. El NO puede ser generado en plantas por un mecanismo no enzimático vía conversión del NO₂ por la luz en presencia de carotenoides y también enzimáticamente a partir de NO₂ por la NADPH nitrato reductasa. Evidencias recientes muestran que el NO tiene un rol importante en el desarrollo de las raíces adventicias y laterales promovido por *A. brasilense* (Molina–Favero y col., 2008).

Oxilipinas y jasmónico

Estos compuestos son mediadores para la síntesis de metabolitos secundarios de distinta naturaleza química como terpenoides, flavonoides y alcaloides, y se los relaciona con la respuesta a patógenos (Farmer y col., 2003). La interacción entre los inductores o factores de avirulencia y sus receptores activan senderos de señalización que incluyen proteínas G y canales iónicos y finalmente en algunos casos se activan fosfolipasas como la fosfolipasa A. Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos liberando ácidos grasos que son los precursores en la biosíntesis de oxilipinas. Las oxilipinas integran una numerosa familia de compuestos biológicamente activos generados por el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos poli insaturados mediado por lipasas, lipoxigenasa, alleno óxido sintasa, e hidroperóxido liasa. La biosíntesis de oxilipinas en las plantas resulta del daño mecánico, del ataque por patógenos y herbívoros y de otros tipos de estrés ambientales y tienen un rol positivo en la inducción de genes relacionados con los mecanismos de defensa. Los más estudiados de estos compuestos son el ácido jasmónico y sus derivados como el metil jasmónico. También se genera una familia de oxilipinas por oxidación no enzimática de los ácidos linoleico y linolénico mediada por ROS (Thoma y col., 2003). Recientemente se encontró que en plantas existe otra familia de lipooxigenasas, estructuralmente no relacionadas con las nombradas anteriormente, llamadas α -dioxigenasas (α -DOX). Estas enzimas tienen homología con las endoperóxido sintasas que median la síntesis de prostaglandinas en mamíferos, generan productos diferentes por oxidación de los ácidos grasos y son inducidas por la infección por patógenos en tabaco (Hamberg y col., 2003). En tomate existen tres genes para α -DOX que se expresan diferencialmente en respuesta al daño mecánico y al estrés salino y esta expresión está relacionada con altos niveles de ABA y posiblemente de etileno (Tirajoh y col., 2005).

Etileno

Como se mencionó anteriormente en el ítem 2, *Hormonas vegetales*, el etileno regula varios procesos muy importantes en las plantas desde crecimiento y desarrollo hasta defensa. La producción de etileno puede ser inducida por diferentes situaciones de estrés como ser daño, ozono, microorganismos patógenos y ataque por insectos y también por moléculas inductoras. Contrariamente a lo que ocurre con jasmónico y sus derivados, el etileno en contados casos está asociado a la acumulación de metabolitos secundarios de defensa y sus efectos pueden ser positivos o negativos dependiendo de la concentración (Zhao y col., 2004c).

Acido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que tiene importantes roles regulatorios a lo largo de todas las etapas de la vida y el desarrollo de las plantas afectando la germinación de la semilla, el crecimiento de la planta, la senescencia y la respuesta a estrés. Especialmente bajo cierto tipo de condiciones como estrés hiper o hipo osmóticos, sal, frío y sequía, ABA es una importante molécula señal que regula un grupo de genes entre ellos los que resultan en un aumento de algunos metabolitos secundarios (Ogura y col., 2001). Sin embargo, ABA también inhibe la acumulación de flavonoides probablemente a través de inhibición génica (Nguyen y col., 2013).

Mensajeros lipídicos

Las fosfolipasas A2, C y D (PLA2, PLC y PLD) tienen roles importantes en las respuestas a estrés: no solo intervienen en la síntesis de oxilipinas sino que generan otros compuestos lipídicos que pueden actuar como segundos mensajeros que regulan otros procesos celulares. Por ejemplo, los lisofosfolípidos generados por la PLA2 a partir de fosfolípidos activan el canal H⁺/ATPasa del tonoplasto lo que resulta en acidificación del citosol que a su vez activa respuestas de defensa y producción de fitoalexinas (Viehveger y col., 2002). La PLC, que puede ser activada por varias señales de estrés y genera, como se mencionó anteriormente, IP3 y DAG que pueden activar quinasas de proteína tipo C (PKC) y otras cascadas de quinasas que median respuestas de defensa (Vasconsuelo y col., 2003). Asimismo, los ácidos fosfatídicos generados por la PLD están involucrados en la generación de ROS y activación de cascadas de quinasas de proteínas (Munnik, 2001).

Azúcares

Los azúcares como tales pueden tener funciones señalizadoras que alteran la expresión génica en forma similar a las hormonas (Smeekens, 2000). Mientras las hormonas son moléculas especializadas que son funcionales en el rango nano a micromolar, los azúcares intervienen en el metabolismo intermedio y están presentes en el rango milimolar. Los azúcares son sensados mediante la interacción entre la molécula de azúcar y una proteína sensora de tal manera que se genera una señal que inicia un sendero de transducción que resulta en respuestas celulares tales como alteraciones en la expresión génica y en algunas actividades enzimáticas.

Generalmente cuando la planta se encuentra en situación de estrés incrementa la respiración, fortalece la pared celular y sintetiza compuestos de defensa. Una elevada concentración de azúcares puede inducir resistencia al ataque de patógenos a través de la inducción de genes relacionados con el estrés, tales como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs, ítem 4.2.3, Roitsch, 1999). La expresión de la invertasa de levadura en el

apoplasto o el suministro directo de azúcares a las hojas lleva a un aumento en los niveles de monosacáridos y PRs (Herbers y col., 1996). También se ha encontrado que los niveles elevados de azúcares durante la maduración del fruto en uvas, induce la acumulación de proteínas antifúngicas (Salzman y col., 1998). Se ha informado que las proteínas transportadoras de dichos azúcares aparecen aumentadas en las infecciones con patógenos. Por ejemplo en hojas de *Arabidopsis* infectadas con el patógeno *Erysiphe cichoracearum*, la incorporación de glucosa se incrementa y coincide con un aumento en la expresión de transportadores de azúcares (Fotopoulos y col., 2003).

Esta actividad metabólica incrementada por la infección es mantenida por un alto flujo de azúcares hacia el sitio de infección. Por otro lado esta situación puede ser generada por los patógenos biotróficos que alteran el metabolismo de la planta para aumentar su propia patogenicidad. Cuando un patógeno biotrófico infecta una planta huésped, se forman las llamadas “islas verdes” en las cuales se mantiene el tejido sano. Las islas verdes funcionan como una fuente de nutrientes para el crecimiento y propagación del patógeno. Se ha propuesto que los niveles de citoquininas pueden contribuir a la formación de estas zonas en el sitio de infección. Paralelamente en estas situaciones aumenta la expresión de genes que codifican para una invertasa extracelular y de un transportador de glucosa que lleva los nutrientes a esta área. La citoquinina también funciona en el retraso de la senescencia y el mantenimiento de la clorofila, ambos necesarios para la formación de las islas verdes (Chung y col., 2008).

4.2.3. Proteínas relacionadas con la patogénesis

Los transcritos de numerosas PRs se acumulan rápidamente en muchas especies de plantas después de minutos u horas de la infección con hongos, bacterias o virus o de ataques por insectos. Las PR son de naturaleza muy variada y se han agrupado en 17 familias (PR1 a PR17). También su localización celular es variada: se las ha encontrado en los fluidos xilemáticos, lo que sugiere que habría una secreción hacia el sistema de transporte, pero otras tienen una localización citoplasmática. Algunas pueden aparecer solo en el órgano en que se dio la infección. Los senderos de transducción de señales mediados por SA, JA y etileno regulan la activación transcripcional de numerosos genes PR. Algunas de estas proteínas son quitinasas (PRs 3, 4, 8 y 11) y glucanasas (PR2) que degradan polisacáridos estructurales de las paredes de los hongos perturbando así su proliferación. Algunos miembros de la familia PR8 tienen actividad de lisozima que limita el crecimiento de las bacterias. En la Tabla 1 se dan algunos ejemplos de proteínas PR pertenecientes a las distintas familias.

Tabla 1. Familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (Edreva A., 2005)

Familia	Miembro tipo	Actividad	Nombre del gen
PR-1	PR-1a de tabaco	Desconocida	<i>Ypr1</i>
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasa	<i>Ypr2</i>
PR-3	P, Q de tabaco	Quitinasa de tipo I,II,IV,V,VI,VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	R de tabaco	Quitinasa de tipo I,II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	S de tabaco	Taumatina-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteínasa	<i>Ypr6, Pis(Pin)</i>
PR-7	P69 de tomate	Endoproteínasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinasa de zapallo	Quitinasa de tipo III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina de tabaco	Peroxidasa	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	PR1 de Perejil	Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Clase V quitinasa de Tabaco	Quitinasa tipo I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Rs-AFP3 de rábano	Defensina, péptido de defensa	<i>Ypr12</i>
PR-13	THI2.1 de Arabidopsis	Tionina, péptido de defensa	<i>Ypr13, Thi</i>
PR-14	LPT4 de cebada	Proteína transferidora de lípidos	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	OXO de cebada	Oxalato oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP de cebada	Oxalato oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 de tabaco	Desconocida	<i>Ypr17</i>

4.3. Transducción de señales en la respuesta de las plantas a estrés biótico y abiótico

Los eventos que ocurren en las respuestas defensivas pueden ordenarse secuencialmente de la siguiente manera: percepción de la señal por los receptores (ver Fig. 6), fosforilación reversible de proteínas de membrana y de proteínas citosólicas, fluctuaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico, despolarización de la membrana, entrada de Cl^- y K^+ y salida de H^+ , activación de la cascada de MAPK, activación de NADPH oxidasa y producción de ROS, expresión de los genes tempranos de defensa, producción de etileno y de JA, expresión de los genes tardíos de defensa y acumulación de metabolitos secundarios.

Para que se consiga establecer una respuesta eficiente de defensa se pone en juego una complicada red de senderos de transducción, paralelos y/o entrecruzados, integrados por un gran número de componentes que generan una variedad de respuestas diferentes. La interacción entre varios senderos le permite a las plantas activar, tanto temporal como espacialmente, diferentes grupos de genes frente a una amplia variedad de situaciones de estrés. Por ejemplo, la interacción entre los senderos del JA y del etileno tiene un rol

importante en muchos aspectos del desarrollo de las plantas y de las respuestas de defensa en la interacción planta/microorganismos y planta/insectos, daño físico o exposición a ozono (Zhao y col., 2004c). Sin embargo en otros casos, etileno y JA inducen diferentes grupos de genes y sus efectos pueden ser antagónicos o no estar relacionados (Shoji y col., 2000).

4.3.1. Integración de diferentes senderos de señalización por factores de transcripción

La regulación de la expresión de los genes de defensa es crucial en los senderos de transducción que llevan a la inducción de la resistencia frente a diferentes formas de estrés. Existen más de 1500 factores de transcripción que podrían estar involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas (Riechman y col., 2000). Estos factores de transcripción son inducidos por la infección por patógenos o por hormonas asociadas a las señales de defensa o son activados post transcripcionalmente por fosforilación o por unión a otras proteínas regulatorias, incluyendo otros factores de transcripción.

Los factores de transcripción relacionados con la defensa pertenecen fundamentalmente a las familias WRKY, ERF, bZIP y MYB (Singh y col., 2002) y tanto ellos como los elementos presentes en los promotores de los genes que regulan están altamente conservados en especies de plantas no relacionadas entre sí.

La familia ERF (por Ethylene Responsive Factor) es una de las más importantes en la inducción de los mecanismos de defensa, se encuentran solamente en plantas superiores, se inducen por infección por patógenos y etileno y se unen específicamente a un elemento GCCGCC (GCC box) altamente conservado presente en la región promotora de los genes de muchas de las proteínas de defensa (PRs). Los factores de transcripción ERF1 (Ethylene Responsive Factor 1) y MYC2 son también importantes integradores de las señales de JA y etileno (Lorenzo y col., 2004).

Las proteínas WRKY son una familia de factores de transcripción importantes en las reacciones de defensa. Son específicos de plantas y están definidos por un dominio de unión al ADN que contiene la secuencia de amino ácidos WRKYGQK altamente conservada que se une específicamente a elementos presentes en numerosos genes que responden a efectores. Los factores de transcripción de esta familia están implicados en defensa, senescencia y respuesta a varias señales ambientales generadoras de estrés (Dong y col., 2003). El promotor del gen de la proteína PR1, marcadora de la inducción de SAR en *Arabidopsis*, contiene el sitio W box de unión de los factores WRKY (Maleck y col., 2000). En algunos casos los factores de transcripción de esta familia son importantes nodos de convergencia que integran las respuestas de defensa mediadas por SA y JA. WRKY70, por

ejemplo, es un activador de los genes inducidos por SA y un represor de los genes que responden a JA (Li y col., 2004).

La familia bZYP incluye factores de transcripción que responden a SA y JA en los senderos de señalización de defensa (Singh y col., 2002). Finalmente la familia MYB constituye una familia especialmente numerosa de factores de transcripción, sus miembros se une a varias secuencias diferentes en los genes que regula (Ballester y col., 2010).

4.3.2. Interrelación de los componentes de los senderos de señalización mediante modificaciones post traduccionales

Si bien gran número de los componentes que integran los senderos de señalización relacionados con la respuesta a efectores y/o patógenos han sido identificados, la forma en que los diferentes eventos se relacionan y los mecanismos por los cuales la señal efectora es transducida y amplificada no han sido completamente dilucidados aún. La modificación postraduccional de proteínas juega un rol central en estos mecanismos y diferentes tipos de modificaciones han sido relacionadas con las respuestas defensivas. Entre las modificaciones postraduccionales implicadas en las reacciones de defensa se encuentran la ubiquitinación, sumoilación, glicosilación, miristoilación, palmitoilación y fosforilación (Stulemeijer y Joosten, 2008). Los mecanismos relacionados con la fosforilación y defosforilación de proteínas han sido los más estudiados y se ha demostrado que tienen un rol esencial en la respuesta frente a efectores y a la presencia de JA, etileno, ABA y otros inductores de estrés. Estudios recientes utilizando análisis genómico y proteómico y espectrometría de masa demostraron la importancia de la dinámica de fosforilación y defosforilación de proteínas en la regulación de las actividades de proteínas y enzimas involucradas en las respuestas celulares a la presencia de situaciones de estrés biótico y abiótico. La regulación de las actividades proteicas por fosforilación/defosforilación comienza, como se mencionó en el ítem relacionado con los receptores, en algunas proteínas de membrana en la etapa de recepción de la señal y se continúa en el citoplasma en los diversos senderos de transducción. En la Fig.11 se presenta un esquema de algunas de las cascadas de señalización relacionadas con la defensa y se señalan sus posibles modificaciones post traduccionales.

La cascada de MAPK es la más conservada entre las señales involucradas en las respuestas a estrés biótico y abiótico. El genoma de Arabidopsis codifica alrededor de 90 miembros de la cascada (AtMPKs) y varias fosfatasa que defosforilan algunas MPKs controlando así la activación de la cascada. En tomate se ha descrito la activación de varios genes de MPKs (LeMPKs) que se activan por el efector Avr4. Estas MPKs tienen

diferentes especificidades y diferente rol en la señalización en defensa, lo cual sugiere que la señal podría eventualmente ser transferida a diferentes sustratos y por lo tanto a diferentes cascadas de señalización (Stulemeijer y col., 2007). Hasta ahora han sido identificados pocos sustratos de MAPK. La proteína AtMPK6 fosforila las isoformas 2 y 6 de la ACS (ACS2/6), enzimas clave en la síntesis de etileno, y al factor de transcripción WRKY después del tratamiento con el efector flg22 (péptido derivado de la flagelina). AtMPK4 fosforila el sustrato 1 de MAPK (MKS1) que regula negativamente la resistencia a SA. AtMPK3 fosforila el factor de transcripción VIP1 involucrado en la expresión del gen de la proteína PR1 importante marcador, como se comentó más arriba, de las reacciones de defensa. Las posiciones de algunas de estas proteínas (AtMPK6, ACS, MKS1, WRKY) en relación a la transducción de las señales de defensa están señaladas en la Fig.11.

Las fosforilaciones mediadas por la quinasa de proteína dependiente de Ca^{2+} (CDPK) también tienen un rol central en la transducción de señales generadas por estrés. La dependencia de Ca^{2+} relaciona fuertemente las fosforilaciones mediadas por CDPK con las variaciones de las concentraciones de calcio citosólico que se comentaron más arriba. La isoforma 2 de la CDPK de tabaco (NtCDPK2) está relacionada con las reacciones de defensa inducidas por el efector Avr9, es requerida para el desarrollo de la HR y es activada por fosforilación. Esta CDPK también estimula la producción de etileno la que a su vez regula negativamente la cascada de MAPK. En tomate una CDPK fosforila a ACS2, el ortólogo del fosforilado por AtMPK6 (párrafo anterior). Este y otros resultados obtenidos analizando las respuestas de plantas transformadas con formas truncadas de CDPK en *N. benthamiana*, sugieren una interrelación entre senderos paralelos que incluyen cascadas de MPKs y CDPK en el control de las respuestas de defensa.

En respuesta a una señal externa de estrés las cascadas de MAPKs y CDPK serían activadas en paralelo lo que permitiría una mayor versatilidad en las respuestas a un mismo estímulo y una regulación más fina de las respuestas al modular diferentes reacciones parcialmente convergentes. Así, por ejemplo en el caso de la síntesis de etileno, diferentes miembros de la familia ACS podrían ser activados dependiendo del sendero inducido. Se puede suponer que una vez que las respuestas a estrés o a infección por patógenos han sido activadas y se ha generado una gran cantidad de etileno se pone en juego un mecanismo de regulación reverso para llevar al sistema a condiciones basales inactivando diferentes reacciones una vez que el estímulo ha desaparecido. La ubicación propuesta para la CDPK en el sendero de transducción según este modelo se puede ver en la Fig. 11.

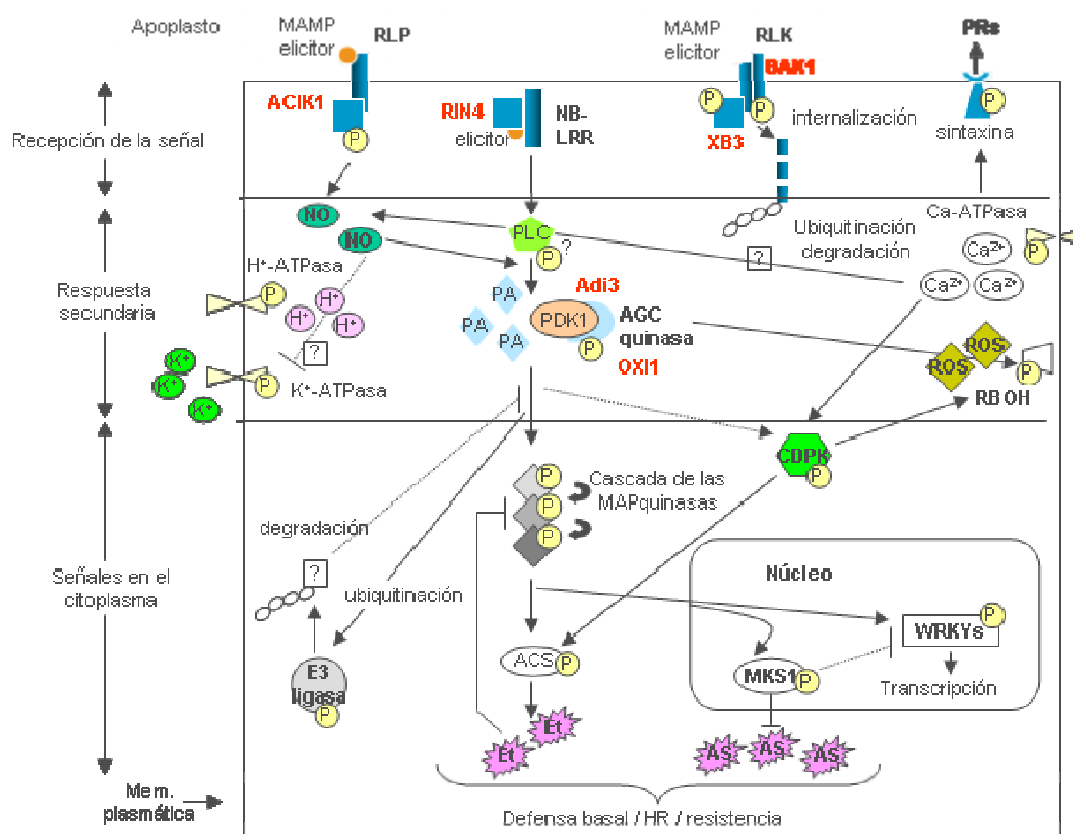


Figura 11. Cascadas de transducción de señales relacionadas con la defensa y que dependen de modificaciones post traduccionales. En primer lugar los receptores reconocen las moléculas liberadas por los microorganismos (MAMPs) y los elicitores específicos. Las proteínas con sitios de unión de nucleótidos y con dominios repetidos ricos en leucina reconocen a sus elicitores intracelularmente mientras que las tipo receptor (RLP) y las que tienen dominios quinasa (RLK) son activadas en la parte externa de la célula. Las RLPs requieren proteínas citoplasmáticas adicionales para transducir la señal y las RLKs necesitan ser autofosforiladas por su dominio quinasa para luego formar complejos con otras proteínas. Los RLKs son ubiquitinados, internalizados y finalmente proteolizados vía proteasoma. Aguas abajo de los receptores se generan segundos mensajeros tales como ácido fosfatídico (PA) y óxido nítrico (NO). Las concentraciones de H^+ , K^+ y Ca^{2+} se controlan por fosforilación/defosforilación de sus respectivas ATPasas y la producción de ROS es estimulada por la fosforilación de NADPH oxidasas (RBOH). Los segundos mensajeros median la fosforilación de otras proteínas como la CDPK y sintaxinas que pueden promover la liberación de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) al apoplasto. La cascada de las quinazas activadas por mitógenos (MAPK) eventualmente lleva a la fosforilación de factores de transcripción (como el WRKY), a la ACS y al sustrato 1 de la MAPK (MSK1) que intervienen en la síntesis de etileno y ácido salicílico respectivamente. También se activa la ligasa E3, que podría resultar en la ubiquitinación y subsiguiente degradación de reguladores negativos de la cascada proveyendo así de un mecanismo de “feedback” positivo. Asimismo, la producción de etileno mediada por MAPKs regula negativamente la activación de estas evitando una respuesta hipersensible descontrolada. Las fosforilaciones señaladas en la figura indican el estado activo de las proteínas. Las proteínas cuyos nombres están en rojo, son ejemplos concretos de elementos específicos de una interacción planta/microorganismo particular: **ACIK1**, quinasa inducida por Avr9; **RIN4**, proteína que interactúa con RPM1; **BAK1**, relacionada con la percepción de brasinoesteroides; **XB3**, proteína 3 de unión de Xa21; **Adi3**, proteína 3 de interacción con AvrPto; **PDK1**, quinasa dependiente de fosfoinosítidos; **AGC-quinasa**, familia de quinazas A, G y C; **OXI1**, proteína 1 inducible por señales de oxidación. Modificado de Stulemeijer y Joosten, (2008), *Molecular Plant Pathology* 9: 545-560.

4.4. Transducción de señales en tomate

La planta de tomate es uno de los modelos de estudio más utilizados para conocer los mecanismos moleculares de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos bacterianos como por ejemplo *P. syringae* pv. tomato (Pendley y Martin, 2003) y *Xanthomonas campestris* (Bonshtien y col., 2005) y el hongo *Cladosporium fulvum* (Wubben y col., 1996). Los datos más concretos de los senderos de señalización que median estos procesos en tomate se han obtenido de los estudios de la interacción tomate/*P. syringae* pv. tomato. Como se comentó en el ítem 3.2 el patógeno libera los efectores de avirulencia Avrpto y AvrptoB que en plantas resistentes interaccionan con la proteína Pto que tiene un rol de intermediario entre los dos efectores y su proteína RP, Prf en este caso, que es del tipo citoplasmático. La Fig.12 muestra un esquema simplificado de las interacciones conocidas entre las proteínas involucradas en la respuesta de defensa.

La proteína Pto es una serin/treonin quinasa de la cual se han identificado varios sustratos, entre ellos otra serin/treonin quinasa, la proteína Pti1 y tres factores de transcripción pertenecientes a la familia ERF, Pti4/5/6, cuya expresión se induce por la infección (Pendley y Martin, 2003). Se ha propuesto que la fosforilación de estos tres últimos facilita su localización nuclear y probablemente su función activadora de los promotores de los genes de resistencia que contienen el box GCC y que Pti4 juega un rol en la comunicación de los senderos de señalización mediados por SA y por etileno/JA (Gu y col., 2000).

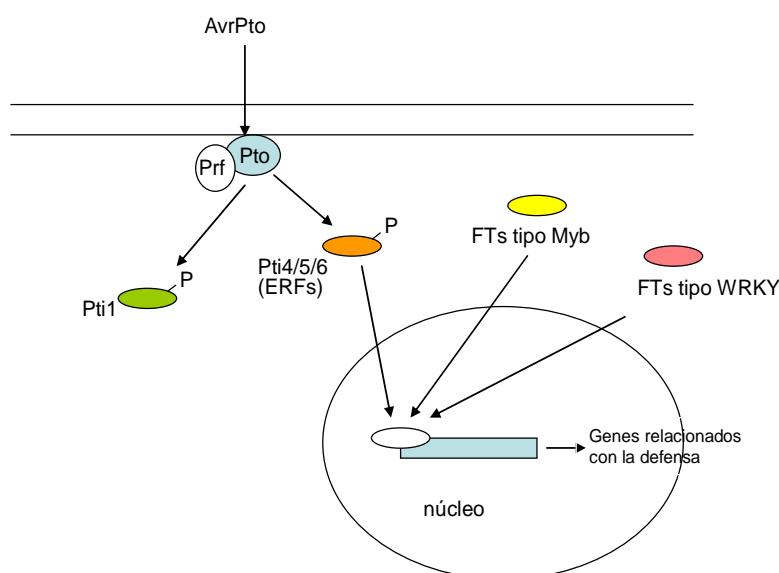


Figura 12. Esquema de las respuestas de la planta de tomate a la infección por *P. syringae* pv. tomato. Modificado de Mysore y col. 2002. The Plant Journal 32: 299-315.

Utilizando la técnica de silenciamiento de genes se vió que hay un sendero de MAPKs implicado en la resistencia mediada por Pto (Ekengren y col., 2003). Algunos miembros de la familia de factores de transcripción WRKY son inducidos por *P. syringae* pv. tomato y fosforilados por las MAPK mencionadas.

5. Importancia del estudio de la interacción planta/microorganismos

Por un lado, el conocimiento de los mecanismos de interacción planta-microorganismo patógeno permite planear soluciones para el tratamiento de las diferentes enfermedades que afectan los cultivos y minimizar el uso de agroquímicos tanto por el costo de los mismos como para evitar problemas de polución ambiental. Asimismo los datos obtenidos de estos estudios se pueden utilizar como base para profundizar el conocimiento de la interacción planta/PGPR.

Concretamente en el caso de la PGPR *A. brasilense* es muy poco lo que se conoce acerca de los genes que median el reconocimiento y la asociación efectiva de la bacteria con plantas de interés agronómico.

6. Análisis de la expresión génica utilizando micromatrices de ADN

El análisis genómico a nivel de ARNm es una forma de medir la expresión génica en una célula. Los niveles de expresión de cada gen están determinados fisiológicamente por una combinación de factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos que determinan la expresión génica incluyen las secuencia regulatorias de los propios genes como promotores, enhancers y sitios de splicing. Por lo tanto el polimorfismo en el ADN contribuye a establecer algunas de las diferencias en la expresión génica entre individuos de la misma especie. La expresión génica se ve afectada también por un gran número de factores ambientales que incluyen temperatura, distintos tipos de estrés (sequía, salinidad, inundación, ataque por patógenos, interacción con microorganismos benéficos, etc.), que llevan a cambios en los niveles de hormonas y de otros compuestos que actúan como señales químicas. Por esta razón el análisis del ARN provee importante información no solo acerca del potencial génico de un organismo sino también acerca de los cambios dinámicos en su estado funcional. En los últimos años, los biochips o microarreglos de ADN se han convertido en las herramientas que más se utilizan para el análisis comparado de la expresión génica. Actualmente coexisten diferentes plataformas para llevar a cabo este análisis utilizando microarreglos (los ARNms en estudio pueden marcarse de diferentes maneras, el ADN inmovilizado en el chip puede ser ADNc u oligonucleótidos de distinta longitud, la hibridación de las muestras en el chip puede ser simultánea o en chips independientes, etc.), pero todas ellas comparten la misma simplicidad conceptual. Esta

tecnología permite monitorear la expresión de un genoma entero en un único experimento. Como se comentó más arriba existen dos tipos de microarreglos, los de ADNc y los de oligonucleótidos cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas. Una de las ventajas que presentan los microarreglos de ADNc es que pueden ser utilizados en experimentos de co-hibridación usando dos marcaciones con diferentes colorantes y esto permite la comparación directa de la abundancia de dos poblaciones de ARNm de interés. Esta estrategia genera relaciones de expresión (ratios de expresión) en lugar de niveles de expresión absoluta, es efectiva para comparar perfiles de expresión y reduce la variación experimental que surge en los datos de otros microarreglos. La técnica de dye-swap (inversión de los colorantes en la marcación de las sondas) permite repetir las hibridaciones con las sondas marcadas una vez con un colorante y otra vez con el otro, de esta manera reduce los errores que pudiera haber en la incorporación del colorante a las sondas.

7. Análisis de la expresión génica a través de proteómica

La proteómica es una palabra acuñada por Wilkins y col., (1996) y se define como el estudio de la composición de proteínas totales de un organismo, célula u organela.

La proteómica es considerada el siguiente paso en el estudio de un sistema biológico, luego de la genómica. El proteoma es el componente proteico de un genoma y la proteómica es la genómica funcional a nivel de proteínas. Mientras que el genoma de un organismo es más o menos constante, el proteoma difiere de una célula a otra y de un momento a otro. Un factor adicional de complejidad son las modificaciones que puede sufrir la estructura o secuencia básica de la proteína (fosforilación, metilación, acetilación, etc). Se sabe que el ARNm no siempre se traduce a proteína, y que la cantidad de proteína producida por una cantidad dada de ARNm depende del estado fisiológico de la célula. El uso de técnicas de proteómica es fundamental para los estudios de la planta y puede ayudar a dilucidar varios aspectos de la regulación metabólica de los principales procesos esenciales. Las plantas están naturalmente sometidas a condiciones estresantes y sus respuestas pueden variar drásticamente dependiendo del tipo de estrés, especie de planta, tejido u órgano, y una serie de otros factores.

La proteómica, se basa en el empleo de la separación de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Ultimamente se han desarrollado técnicas que permiten analizar en un mismo gel muestras proteicas provenientes de distintos tratamientos marcadas con fluoróforos diferentes utilizando un estándar interno constituido por la mezcla equimolecular de todas las muestras a analizar (Fig. 13). Las muestras se marcan con tres tipos diferentes de fluoróforos y son detectadas en función de sus espectros de excitación y

emisión (488/520 nm) Cy2, (532/580 nm) Cy3, y (633/670) Cy5. Además, existe la ventaja de la alta sensibilidad de estos colorantes que permite detectar hasta 1 fmol de proteína. Se logran excelentes resultados cuando la resolución de las proteínas marcadas se lleva a cabo en geles en dos dimensiones (2D-DIGE); la identificación final de las proteínas se lleva a cabo con técnicas de espectrometría de masa.

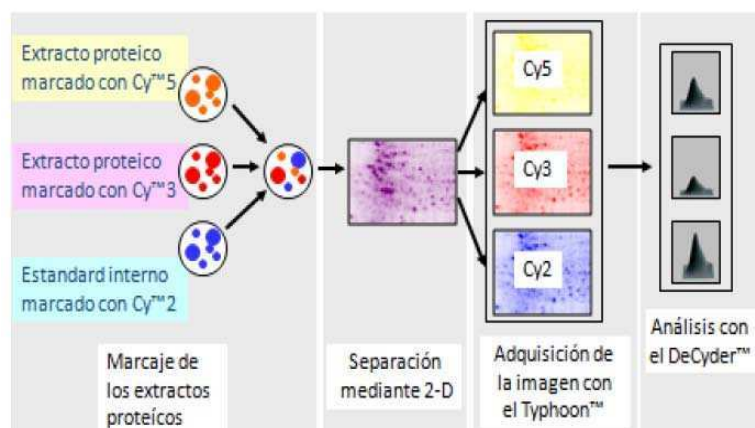


Figura 13. Pasos en la detección de proteínas diferencialmente expresadas a través de la técnica del 2D-DIGE. Las proteínas se marcan con los distintos fluoróforos y se resuelven por electroforesis en dos dimensiones (en un mismo gel), se escanean los geles para la obtención de las imágenes y éstas se analizan utilizando paquetes informáticos especialmente diseñados. El estándar interno es una mezcla que contiene la misma cantidad de proteínas provenientes de las muestras en estudio.

8. El Cultivo de Arroz (*Oryza sativa*)

Los cereales son una fuente importante de nutrientes para la población mundial. El arroz, el trigo, y el maíz son los cereales más cultivados en el mundo. Según una estimación de los Estados Unidos la población se incrementará en 8 billones para el año 2025. Basadas en estas estimaciones la producción de cereales deberá incrementarse en un 40% para el año 2030 para satisfacer las demandas de la población. Esta producción a su vez deberá afrontar el problema de disponer de menos superficie cultivable, menos agua y menos fertilizantes. Por lo tanto lograr un mayor y más rápido desarrollo radicular favorecerá el crecimiento de los cultivos en las condiciones previstas para el futuro.

En algunos países los cereales representan la más importante fuente de alimentos, como es el caso del arroz en la población oriental. El promedio de consumo de arroz por persona por año en esos países es mayor a 150 kg, mientras que el consumo en nuestro país es aproximadamente 6 kg persona⁻¹ año⁻¹. Aunque, éste no es el principal cereal

cultivado en Argentina, su demanda se ha incrementado en los últimos años, llegando actualmente a una superficie sembrada de unas 235.452 hectáreas, en la campaña 2011-2012, siendo el área más importante la zona mesopotámica.

El arroz es un cereal de grano perteneciente a la familia de las *Poáceas*. Además de ser un buen suministro de energía en forma de almidón, es fuente de magnesio, zinc y niacina aunque aporta poco calcio, hierro, fósforo, cobre, tiamina y riboflavina y muy poco β -caroteno. Es uno de los cereales más pobres en su contenido de proteínas (FAO, 2002).

En América Latina, durante el último siglo, el arroz se ha transformado en un cultivo básico para la alimentación de la mayor parte de la población de bajos ingresos. En Argentina y Uruguay se producen grandes excedentes que se exportan a Brasil, el país de mayor demanda en Sudamérica.

En nuestro país, el arroz no representa un cultivo de mucha importancia; aunque desde la década del '90 se aumentó la incorporación de nuevas tecnologías con el consecuente aumento de los rendimientos. La zona por excelencia del cultivo de arroz es el Litoral, siendo las provincias de Entre Ríos y Corrientes quienes aportan el 90% de la producción nacional. El cultivo se puede realizar en secano estricto, bajo riego o inundado. Las variedades utilizadas en la Argentina son predominantemente semi-acuáticas y necesitan condiciones de suelo inundado durante gran parte de su desarrollo. El manejo tradicional en la provincia de Entre Ríos consiste en regar a los 25-30 días por inundación por un período de 90 a 100 días. Después de dicho período, se drena el lote previamente a la cosecha.

9. El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate es originario de Sudamérica, más exactamente de la región comprendida por Perú, Ecuador y Bolivia. Desde allí se extendió a América Central y Meridional, siendo México el país con mayor diferenciación varietal y centro de origen del tomate cultivado. Esta especie perteneciente a la familia de las *Solanáceas* es aprovechada por sus frutos, ricos en vitaminas y minerales, siendo actualmente una hortaliza de gran popularidad en muchos países del mundo.

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual, manifestando un desarrollo de tipo rastrero, semierecto o erecto. Existe una gran diversidad intra específica con relación a distintos caracteres de interés productivo como, por ejemplo, la precocidad o la forma del fruto. Por su parte, la selección varietal y la ingeniería genética contribuyen a la continua expansión de una amplia gama de cultivares, cumpliendo con un objetivo productivo y/o comercial predeterminado.

El cultivo requiere de climas templados a cálidos, con temperaturas óptimas para el crecimiento que oscilan entre los 21 y 24°C y un período libre de heladas de 4 meses como mínimo. Sin grandes exigencias en cuanto a suelos, se siembra directamente a campo o se hacen almácigos para la producción de plantines que luego son trasplantados al aire libre o en invernaderos. La producción mundial de tomates, con casi 4 millones de hectáreas cultivadas, ha superado en los últimos años los 100 millones de toneladas anuales. En nuestro país se cultivan alrededor de 17.000 hectáreas de tomate distribuidas en los cinturones verdes de importantes ciudades y otras zonas especializadas para su producción. Dadas las condiciones ecológicas del país, el tomate para mercado en fresco se produce prácticamente todo el año. Las tecnologías utilizadas varían sensiblemente según la zona y destino de la producción, con un factor común que consiste en la aplicación de una gran cantidad de agroquímicos.

El tomate se ha convertido en un sistema modelo para el estudio del desarrollo y la maduración del fruto debido a (i) el desarrollo y caracterización de amplias poblaciones de mutantes (Giovannoni, 2007), (ii) la disponibilidad de herramientas genómicas, incluidas colecciones de ESTs (<http://solgenomics.net/>) y mapas genéticos (Yamamoto y col., 2005), (iii) eficiente transformación genética (Ellul y col., 2003) y otros métodos transitorios de evaluar función génica (Orzaez y col., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Las bacterias *Azospirillum brasilense* FT326 (BR11015) y *Azospirillum irakense*, KBC1 (ATCC 51182) se cultivaron en caldo base libre de nitrógeno NFb conteniendo 5,0 g/L de ácido málico; 0,5 g/L de PO_4HK_2 ; 0,2 g/L de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L de ClNa , 0,02 g/L de Cl_2Ca ; 2 mL de solución de micronutrientes conteniendo 0,1 % p/v $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,12% p/v $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot\text{H}_2\text{O}$; 0,14 % p/v BO_3H_3 ; 0,004 % p/v $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,012 % p/v $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 2 mL de Azul de bromotimol 0,5% en OHK 0,2 N, 4 mL Fe-EDTA 1,64% p/v; 4,5 g OHK; 1 mL de solución de vitaminas, (biotina 0,01 % p/v y piridoxal 0,02 % p/v). El pH se ajustó a 6,5 y se suplementó con CINH_4 (1g/L). *Herbaspirillum seropedicae* Z152 se cultivó en caldo base libre de nitrógeno JNFb (medio especial formulado para *Herbaspirillum*) conteniendo (g/L): 5,0 ácido málico; 0,6 PO_4HK_2 ; 1,8 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$; 0,2 $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 ClNa ; 0,02 Cl_2Ca ; 4,5 OHK; 2mL solución de micronutrientes; 2 mL Azul de bromotimol (sol. 0,5% en OHK 0,2 N); 4 mL Fe-EDTA 1,64% p/v; 1 mL solución de vitaminas (biotina 0,01 % p/v y piridoxal 0,02 % p/v); se ajustó el pH a 5,8 y se suplementó con CINH_4 2,5 g/L. Los cultivos crecieron con agitación continua (150 rpm) a 33°C hasta alcanzar la fase exponencial ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,8). Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min y se lavaron 2 veces con el mismo volumen de ClNa 0,9% p/v. Finalmente las células se resuspendieron en agua y se ajustó la concentración a 8×10^8 UFC.mL⁻¹.

Las cepas bacterianas fueron cedidas gentilmente por la Dra. Johana Döbereiner, (EMBRAPA, Seropédica, Brasil).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* fue cultivada en Caldo Nutritivo: pluripectona 5 g/L; extracto de carne, 3g/L; ClNa 8 g/L; agar, 15 g/L, pH $7,3 \pm 0,2$, e incubada a 28°C. La bacteria fue cedida gentilmente por el Dr. Luis Quesada-Allué, Fundación Instituto Leloir.

2. Evaluación del efecto del 1-MCP sobre el crecimiento bacteriano

Para evaluar el efecto del antagonista de etileno 1-MCP sobre el crecimiento bacteriano, se sembró en placas de Petri con medio RC una suspensión de bacterias conteniendo 100 UFC. Las placas se incubaron en una cámara cerrada a la que se le inyectó una cantidad de 1-MCP calculado para obtener una concentración en la fase gaseosa de 125 nL/L. Los controles fueron incubados en cámara sin el agregado de 1-MCP. El efecto del 1-MCP sobre el crecimiento bacteriano se evaluó a las 48 h.

3. Material vegetal

3.1. Plantas de arroz

3.1.1. Crecimiento e inoculación con bacterias PGPR

Se utilizaron plantas de arroz (*Oryza sativa*) del cultivar Yeruá. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente según el método de Döbereiner y col., 1995. Se partió de 10 g de semillas sin cáscara que fueron sumergidas en solución de sulfato de estreptomycin 0,1% p/v con dos gotas de detergente comercial; la suspensión se agitó a 100 rpm por 20 min. Las semillas se lavaron dos veces con agua destilada estéril, una vez con solución de Cl_2Mg 0,1% p/v y finalmente ocho veces con agua destilada estéril y se pusieron a pregerminar sobre medio Hoagland sólido (1,5% p/v de agar) durante 48 h en cajas de Petri y se incubaron en estufa a 30°C. A las 48 h se seleccionaron las semillas que presentaron igual desarrollo radicular y se transfirieron a tubos de vidrio de 10 y de 150 mL con medio semisólido (0,5% agar) conteniendo solución Hoagland libre de nitrógeno diluída al medio, y se inocularon con 25 μL de la suspensión bacteriana (10^8 UFC/mL). Los controles recibieron igual volumen de medio de cultivo. Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo Sanyo MRL-350 con $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintética activa, fotoperíodo de 12 h de luz y un gradiente de temperatura entre el día y noche de 25-20°C.

3.1.2. Tratamiento con inductores y con un inhibidor de la actividad ACS

Las semillas de arroz se desinfectaron como se describió anteriormente y se incubaron en ágar Hoagland 0,8% p/v. Después de 36 h de incubación a 30°C, las plantas que presentaron igual crecimiento se transfirieron a medio agarizado conteniendo inductores de las isoformas 1 y 3 de la ACS de arroz: 25 μM de AIA, 25 μM de benciladenina (BA) y 50 mM de CILi, o fueron inoculadas con 25 μL de la suspensión bacteriana (10^8 UFC/mL). Los controles recibieron igual volumen de medio de cultivo. El tratamiento con el inhibidor de la actividad ACS, aminoetoxivinilglicina (AVG) 25 μM se llevó a cabo como se describió más arriba para los inductores. Las plantas se incubaron en las mismas condiciones durante 72 h.

3.1.3. Tratamiento con etileno, 1-MCP y ACC

Los tratamientos se llevaron a cabo en frascos que contenían semillas que habían sido inoculadas 24 h antes. El etileno fue inyectado en el espacio aéreo del frasco de modo de obtener una concentración de 1 nL/L. El 1-MCP se inyectó de la misma forma que el etileno, para obtener una concentración en la fase gaseosa de 125 nL/L. El ACC, precursor de la

síntesis de etileno, fue agregado en el medio agarizado de modo que la concentración final fue de 10 μM . Los frascos se incubaron durante siete días a 30°C.

3.1.4. Tratamiento con W7

Las semillas de arroz se esterilizaron como se describió anteriormente y se sembraron en placas agar Hoagland 0,8 % p/v que contenían W7 en concentraciones 50, 100 y 200 μM . A las 36 h de la siembra se realizó la inoculación con *A. brasilense*. Las observaciones se realizaron a las 72 h de la inoculación.

3.1.5. Crecimiento de plantas e inoculación para el ensayo de quinasa

Se utilizaron semillas de arroz cv. Yeruá que fueron esterilizadas superficialmente como se describió anteriormente y se transfirieron a placas de Petri conteniendo ágar al 0,8% p/v. Luego de 36 h de incubación en cámara de cultivo a 25°C y con fotoperíodo de 12 h de luz se inocularon con 25 μL de una suspensión de *A. brasilense* en agua conteniendo $1,6 \times 10^8$ UFC/mL. Las plantas control recibieron 25 μL de agua destilada estéril. En cada experimento se indicará el tiempo de incubación en presencia de la bacteria.

3.2. Plantas de tomate

3.2.1. Crecimiento e inoculación con bacterias PGPR

Se utilizaron plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Liso Marglobe. Antes de ser sembradas las semillas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas durante 15 min en una solución que contenía hipoclorito de sodio 30% v/v y Tritón X-100 0,1% v/v. Las semillas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y se transfirieron asépticamente a frascos de 170 mL que contenían medio Hoagland agarizado (tres semillas por frasco). Se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un gradiente de temperatura de $25/20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en la cámara de cultivo con un fotoperíodo de 12 h de luz y una intensidad lumínica de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después de la emergencia de las raíces, las semillas se inocularon con 50 μL de la suspensión bacteriana conteniendo 2×10^5 UFC y la incubación se continuó por 15 días. Las plantas se mantuvieron en condiciones estériles con apropiada difusión de gases.

3.2.2. Tratamiento de las plantas con un precursor de etileno y con 1-MCP

Para estudiar el efecto del etileno suministrado exógenamente a las plantas, se usó el precursor de etileno, ácido 2-cloroetilfosfónico (ethephon). El ethephon se incorporó al medio de cultivo a una concentración de 50 μ M. Las plantas se incubaron en cámara de cultivo durante 24 h a 30°C y los efectos se evaluaron a los 15 DDI.

El antagonista del etileno 1-MCP se utilizó como se describió previamente para arroz, inyectándolo en el espacio aéreo del frasco de cultivo. Los frascos se incubaron a 30°C; a los siete días se inyectó una segunda dosis del antagonista y se continuó la incubación por ocho días más.

3.2.2.1. Evaluación de los parámetros de crecimiento

Para evaluar la promoción del crecimiento de las plantas se cuantificó a los tiempos indicados en cada experimento el peso fresco en tallos y raíces, altura de los tallos, longitud de la raíz principal y superficie radicular. Esta última medición se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Ansari y col., (1995). Para ello, se lavaron cuidadosamente las raíces y se sumergieron en una solución acuosa de NO_2Na 50 mM durante 10 segundos. Luego se dejaron escurrir durante 5 min para permitir el drenaje del exceso de solución atrapado entre las raíces más delgadas. Al cabo de ese tiempo, se transfirió cada una de las raíces a un frasco de 170 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de agua destilada y se agitó durante 15 min en agitador orbital a 150 rpm. Una alícuota de 0,4 mL de la solución resultante del lavado de las raíces conteniendo el nitrito desorbido, se transfirió a tubos de ensayo, adicionando luego 0,3 mL de sulfanilamida 1% p/v preparada en CIH 3 M y 0,3 mL de naftiletilendiamina 0,02% p/v. Se dejó reposar 10 min hasta el desarrollo de color rosado, se diluyó la muestra con agua destilada hasta 2 mL y se leyó la DO a 540 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-110-02. Los datos de absorbancia obtenidos fueron transformados en valores de superficie mediante ecuaciones de regresión propuestas por Ansari y col., (1995).

3.2.2.2.-. Diseño experimental y tratamiento estadístico

El diseño experimental que se utilizó para la evaluación de la promoción del crecimiento en plantas de tomate (Capítulo II) fue un diseño de bloques completamente azaroso. Cada bloque consistió en una serie de tratamientos independientes con 10 individuos cada uno. Cuando las plantas fueron cultivadas en presencia de 1-MCP se utilizó el diseño experimental de factorial con dos factores y dos niveles cada uno. Los resultados fueron analizados utilizando el software para estadística InfoStat.

3.2.3. Cultivo y tratamiento de las plantas para el estudio de expresión diferencial de genes

Se utilizaron semillas de *S. lycopersicum* del cultivar F36 que se cultivaron en frascos de vidrio de 170 mL de capacidad conteniendo 40 mL de medio Hoagland agarizado al 0,8% p/v. Después de la emergencia de la radícula (72 h después de la siembra) se inoculó cada planta con 50 μ L de la suspensión bacteriana de *A. brasilense* (2×10^5 UFC). Las plantas control recibieron 50 μ L de agua destilada. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo como se describió anteriormente hasta el momento de la cosecha para la extracción de ARN como se describirá en *Análisis transcriptómico de la respuesta de plantas de tomate a la inoculación con A. brasilense*. Las plantas utilizadas para los experimentos de validación de los resultados de las micromatrices fueron tratadas con SA, ACC o MeJA o inoculadas con *X. campestris*. Las plantas recibieron 50 μ L de solución 0,5 mM de SA o 100 μ M de ACC en el medio de cultivo. El tratamiento con MeJA se llevo a cabo manteniendo durante 24 h los frascos de cultivo en un recipiente cerrado que contenía una torunda de algodón impregnado en MeJA. La infección con *X. campestris* se llevó a cabo rociando las plantas con una suspensión bacteriana en agua que contenía 10^6 UFC/mL y 0,025% v/v del detergente Silwet L-77 (Lund y col., 1998).

4. Técnicas generales

4.1. Microscopía

Para la observación al microscopio óptico, las raíces se fijaron en formaldehído/etanol/ácido acético de acuerdo a la técnica de Cutler (1978) y se tiñeron con azul de metileno. Las observaciones en microscopio electrónico se llevaron a cabo en material fresco con un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA). El uso de esta técnica de observación permitió localizar los microorganismos en diferentes tejidos y determinar la longitud promedio de los pelos radiculares utilizando el software Image Tool 3.0.

4.2. Evaluación del endofitismo bacteriano

Para evaluar el número de bacterias dentro las raíces se utilizó el método descrito por Döbereiner y col., (1995). Las plantas se cosecharon a los tiempos indicados en cada experimento y se tomaron muestras de 1 g de raíz que fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en una solución de cloramina T 1% durante 15 min. Las muestras se lavaron dos veces con agua estéril durante 10 min y una vez con solución salina estéril. Los tejidos se

maceraron en solución salina estéril y las UFC se determinaron por dilución seriada del sobrenadante en medio Rojo Congo conteniendo 5,0 g/L de ácido málico; 0,5 g/L PO_4HK_2 ; 0,2 g/L $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L ClNa ; 0,5 g/L extracto levadura; 0,015 g/L $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\cdot \text{H}_2\text{O}$; 4,8 g/L OHK; 20,0 g/L de ágar y 15 mL solución Rojo Congo (1:400) pH 6,5 (Rodríguez-Cáceres, 1982). Las plantas no inoculadas se utilizaron como control.

5. Técnicas bioquímicas

5.1. Electroforesis en gel monodimensional

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) de acuerdo al método de Laemmli, (1970). Las muestras se prepararon adicionando los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5 X y calentándolas a 100°C por 3-5 min. Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS 1 X. Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue, desteñidos y secados. En el caso de los geles con proteínas marcadas con ^{32}P , después de ser teñidos y secados fueron expuestos a una película AGFA Curix Ortho a -70°C con pantalla amplificadora.

5.2. 2D-DIGE

5.2.1. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque de las proteínas fue realizado en un equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). El isoelectroenfoque (IEE) se realizó en tiras IPG (IPG, Immobiline DryStrips, GE Healthcare). Estas tiras, de 24 cm, contenían un gradiente no lineal de pH entre 3 y 11 inmovilizado en el gel de poliacrilamida fijado al plástico de las tiras. Las tiras fueron hidratadas en 450 μL del buffer de hidratación (Urea 8 M, CHAPS 0,5 % p/v, Tris-HCl 40 mM) con DTT 15 mM, 0,2% v/v de buffer IPG pH 3-11 (Pharmalytes GE Healthcare). Las muestras se cargaron mediante el procedimiento de *cup-loading*. En cada gel se analizaron 150 μg de proteína (50 μg de proteína provenientes del tratamiento 1, 50 μg de proteína provenientes del tratamiento 2 y 50 μg de proteína del estándar interno) en un volumen final de 100 μL de solución de hidratación suplementado con 2 mg/ml DTT y 0,7 % v/v de buffer IPG pH 3-11.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en tres etapas: 500V/hr durante 1 h, 1000V/hr durante 1 h, y 8000V durante 3h en gradiente, 8000V durante 4 h y step-n-hold, totalizando 17500V. Finalmente las tiras se almacenaron en a -70°C hasta su utilización posterior.

5.2.2. Tratamiento de las tiras de IEE

Con la finalidad de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro, después del IEE las tiras fueron equilibradas en dos etapas con 5 mL de buffer de equilibrio, conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30% p/v, SDS 2% p/v y 50 μ L de solución de azul de bromofenol 0,25% p/v. En la primera etapa se adicionó al buffer de equilibrio DTT hasta una concentración de 10 mg/mL, a los 15 min se reemplazó la solución por el mismo buffer de equilibrio conteniendo 25 mg/mL de iodoacetamida para prevenir la reoxidación de los grupos tiol durante la electroforesis.

Finalmente las tiras fueron lavadas con agua destilada, sumergidas unos minutos en buffer de corrida (Laemmli, 1970) e inmediatamente sometidas a electroforesis en la segunda dimensión.

5.2.3. Electroforesis en la segunda dimensión

La electroforesis de las proteínas presentes en las tiras IPG se llevó a cabo en geles planos de poliacrilamida 12,5% en presencia de SDS, sin gel concentrador utilizando un equipo Ettan DALT six. Se utilizó la metodología descrita por Laemmli (1970). Las tiras IPG fueron sumergidas por algunos minutos en solución buffer de corrida y colocadas horizontalmente en la parte superior del gel manteniendo contacto con este. Las tiras fueron cubiertas con 2 mL de solución de agarosa tibia (agarosa, 0,5% p/v, SDS 1% y trazas de azul de bromofenol) y se dejó solidificar por aproximadamente 5 min. La corrida fue realizada a 30 mA/gel hasta que el azul de bromofenol llegara al límite inferior del gel. La temperatura fue mantenida a 20°C por medio de refrigeración con un circulador termostático Multitemp II.

5.3. Ensayos de Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Inmobilon-P SQ, Millipore) por transferencia semiseca durante 45 min a 2 mA/cm² con una solución conteniendo Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% p/v y metanol 20%. Las proteínas transferidas fueron visualizadas por tinción con solución de Ponceau S en ácido acético 5% v/v. Posteriormente la membrana se bloqueó con PBST-leche (buffer fosfato 10 mM pH 6,8; ClNa 0,9% p/v, Tween-20 0,05% v/v y 5% p/v de leche en polvo descremada) durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se incubó con las diluciones apropiadas de los anticuerpos: 1/1000 del anticuerpo policlonal anti-CDPK de soja (Bachmann y col., 1996); 1/500 del anticuerpo policlonal anti PR P23 de *S. lycopersicum* (Rodrigo y col., 1993); 1/1000 del anticuerpo policlonal anti ACS2 de tomate, 1/500 del anticuerpo policlonal anti ACS4 de tomate y 1/1000 del anticuerpo policlonal anti NADP malato deshidrogenasa de

arveja. Los anticuerpos anti ACS2 y anti ACS4 fueron cedidos por el Dr A. Theologhis, Plant Gene Expression Center, California y el anticuerpo policlonal anti NADP malato deshidrogenasa fue cedido por el Dr. E. Pagano, Catedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, UBA. Las incubaciones se llevaron a cabo durante toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación las membranas se lavaron con PBST y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti IgG de conejo o anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina) y los inmunocomplejos fueron revelados con BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato) y NBT (Nitro Blue Tetrazolium) en buffer de revelado TNM (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, ClNa 100 mM, Cl₂Mg 100 mM).

5.4. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en buffer TAE (Tris 40 mM, AcONa 20 mM, EDTA 1mM, pH 7,8) según Ausubel y col., (1994). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados para la obtención de las imágenes que se cuantificaron a través del software ImageJ.

6. Determinaciones bioquímicas

6.1. Medición de la actividad ACS

Para la medición de la actividad de ACS el material vegetal (alrededor de 2 g) de planta entera para el caso de arroz o de parte aérea y parte radical para el caso de tomate, se molieron en mortero con N₂ líquido y el polvo obtenido se resuspendió en 4 mL de buffer fosfato de potasio, 100 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 0,5% v/v, fosfato de piridoxal 10 μM, PLP e inhibidores de proteasas (fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, pepstatina 1 μg/mL, leupeptina 1 μg/mL y benzamidina 20 mM). Se filtró por tela y el filtrado se centrifugó a 28.000 x g durante 20 min. La actividad se ensayó incubando el extracto (100 μL) a 30°C, durante 15 min en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 8,5, con 10 μM de PLP y 200 μM de S-adenosil-L-metionina, en un volumen total de 500 μL. Los tubos con la mezcla se sellaron con tapón de goma y se incubaron a 30°C durante 15 min siguiendo la técnica de Yip y col., (1991). El ACC formado se midió siguiendo la técnica de Lizada y Yang, 1979. Brevemente, se inyectó a cada tubo 300 μL de hipoclorito de sodio 5% v/v en solución saturada de OHNa en una relación 2:1 v/v, después de 5 segundos se inyectó 100 μL de Cl₂Hg 0,1 M y a los 2,5 min se extrajo 1 mL del aire de cada tubo que fue inyectado en el

cromatógrafo gaseoso para determinar la cantidad de etileno formado. Las extracciones y determinaciones enzimáticas se realizaron por duplicado.

6.2. Extracción y medición de actividad CDPK

Los extractos para la medición de actividad se prepararon a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación de las plantas de arroz con *A. brasilense*. En algunos casos se utilizó la plántula entera y en otros se extrajeron por separado raíz y parte aérea. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Abo-El-Saa y Wu, (1995). Brevemente, el material proveniente de 50 plantas de cada tiempo se molió en presencia de nitrógeno líquido y el polvo obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer de extracción conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM sacarosa, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol, e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, pepstatina 1 μ g/mL, leupeptina 1 μ g/mL y benzamidina 20 mM) y de fosfatasas (fluoruro de sodio 50 mM, glicerofosfato de sodio 150 mM, vanadato de sodio 100 μ M). El extracto crudo se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1 h. La actividad quinasa fue medida en el sobrenadante de 100.000 x g (S100) y en el pellet (P100) previamente resuspendido en 200 μ L de buffer de extracción. El ensayo de actividad de CDPK se llevó a cabo en 50 μ L de mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, β -mercaptoetanol 10 mM, Cl_2Mg 10 mM, 1 mg/mL de histona III-S como sustrato, 50 μ M [γ ³²P] ATP (800-1000 cpm/pmol) y la cantidad apropiada de la preparación enzimática. Alternativamente se utilizó syntide-2 25 μ M como sustrato. Los ensayos se realizaron en presencia de 1mM Cl_2Ca ó 2 mM EGTA. La reacción se inició por agregado del ATP radioactivo y la mezcla se incubó a 30°C por 15 min. Una vez terminada la incubación se procesaron 45 μ L de cada ensayo de acuerdo al método de Roskoski (1983).

Alternativamente, la fosforilación de histona, se evaluó en geles de poliacrilamida. En estos casos la reacción se detuvo por agregado de buffer de siembra 4X, los tubos se calentaron a 100°C por 5 min, se enfriaron y se analizaron por SDS-PAGE 12%. Los geles se secaron y se expusieron a placas radiográficas.

6.3. Ensayo de quinasa en gel

Para el ensayo de CDPK en gel, 5 μ g de proteínas de la fracción P100 resuspendida en el mismo buffer de extracción, se sometieron a SDS-PAGE 12% que contenía 1 mg/mL de histona III-S como sustrato en el gel separador. Después de la electroforesis el SDS fue removido del gel por lavado con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8, 20% 2-propanol por 1 h seguido de un segundo lavado de 1 h con Tris-HCl 50 mM, pH 8, β -mercaptoetanol 5 mM. Las proteínas fueron desnaturalizadas completamente sumergiendo el gel en el mismo buffer

conteniendo clorhidrato de guanidina 6 M durante 1 h y luego renaturalizadas sumergiendo el gel en Tris-ClH 10 mM, pH 7,4, ClNa 140 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, BSA 1%, Nonidet P-40 0,1% por 12-18 h con agitación suave. Finalmente los geles se equilibraron en Tris-ClH 40 mM, pH 8, Cl₂Mg 10 mM, DTT 2 mM y Cl₂Ca 0,2 mM por 30 min a temperatura ambiente. La reacción de quinasa se inició por el agregado de [γ -³²P] ATP 50 μ M (880 cpm/pmol) y se incubó a 30°C por 30 min. La reacción se detuvo por lavado exhaustivo del gel con ácido tricloroacético 5% (p/v) que contenía pirofosfato de potasio 1% (p/v) hasta desaparición de radioactividad en los lavados. Los geles se secaron y se expusieron a placas radiográficas.

6.4. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas en las distintas muestras se determinó por el método de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina como estándar. Para la determinación de proteínas asociadas a membrana, se realizó una hidrólisis alcalina previa en OHNa 1 N a 100°C durante 30 min.

6.5. Medición de AIA

La cantidad de AIA en tallos y raíces se evaluó como se describe a continuación. El material proveniente de 5 plantas se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido y el polvo resultante se suspendió en 200 mL de una mezcla de metanol:agua (4:1 v/v) que contenía 0,5% polivinilpirrolidona. La suspensión se estacionó a 4°C durante 12 h. Después de filtrar, el residuo sólido se extrajo nuevamente con 100 mL de la misma solución y se filtró. Se combinaron los extractos y el metanol se evaporó a presión reducida. La fase acuosa se ajustó a pH 2,5 con ácido acético y se extrajo por partición con cuatro veces su volumen de ácido acético 1% saturado en acetato de etilo. El extracto ácido en acetato de etilo se evaporó y el residuo se suspendió en ácido acético:metanol:agua (1:10:89), se filtró a través de membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro y se inyectó en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un equipo KNK-500, Konic Inc., Barcelona, con una columna de fase reversa C18 (μ Bondapack, 300 3 3.9 mm, Waters Associates, Milford, MA). La elución se llevó a cabo a una velocidad de 2 mL/min utilizando un gradiente de 10 a 73% (v/v) metanol en ácido acético 1% (v/v). Las fracciones que presentaron el mismo tiempo de retención del estándar interno de [²H₆] AIA, se recolectaron, evaporaron y se midieron por capilaridad GC-SIM-MS como fue descrito por Chen y col., (1988). La purificación por HPLC y la cuantificación por GC-SIM-MS se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

La determinación de AIA producido por las bacterias se evaluó de acuerdo al procedimiento descrito por Crozier y col., (1988). Brevemente, 30 mL de un cultivo fresco de *A. brasilense* (10^7 UFC/mL) en caldo NFb (libre de triptofano) se sonicaron y el extracto se centrifugó a 2000 x g por 20 min. El sobrenadante se ajustó a pH 2,5. La partición y el procesamiento posterior de las muestras para la medición de AIA por GC-SIM-MS se llevó a cabo como se describió en el párrafo anterior.

6.6. Medición de etileno

Para la determinación de la producción endógena de etileno en arroz se utilizaron plantas cultivadas en frascos de 10 y 150 mL de capacidad conteniendo medio agarizado Hoagland. El día previo a la determinación de etileno, los frascos se sellaron con tapón de goma y se incubaron en la oscuridad durante 24 h a 30°C. Terminada la incubación se retiró con jeringa 1 mL del gas de cada frasco que se inyectó en el cromatógrafo gaseoso. Terminada la medición, las plantas se retiraron de los frascos para la determinación del peso fresco. La cuantificación del etileno se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 Series II equipado con un detector de ionización de llama y una columna Porapak N (3,2 mm x 2 m; 80-100 mesh). Las temperaturas del inyector, del horno y del detector fueron 110°C, 90°C y 250°C respectivamente; se utilizó N₂ como gas de arrastre a una velocidad de 4,5 cm/seg.

La producción de etileno generado por las plantas de tomate fue medida en fragmentos de tallos y de raíces. Cada muestra (material proveniente de una planta) se colocó en un frasco de 10 mL que contenía 1 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 6,8, los recipientes se taparon herméticamente con tapón de goma y se colocaron a 30°C por 4 h. Terminada la incubación se retiró con jeringa 1 mL del gas de cada frasco que se utilizó para cuantificar etileno siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las plantas de arroz.

Para la determinación del etileno producido por las bacterias, 1 mL de cultivo en caldo NFb (10^7 UFC) se inyectó estérilmente en 5 mL de medio NFb semisólido contenido en frascos de 10 mL. Los frascos se sellaron herméticamente y se incubaron a 30°C por 24 h. A partir de este punto la evaluación del etileno formado se midió en el gas de los frascos como se describió para el material vegetal.

6.7. Extracción y análisis de hidratos de carbono

La concentración de hidratos de carbono se determinó por el método de Lee y col., (2007). Brevemente, un gramo de material vegetal (parte aérea o radicular) se molió en mortero con nitrógeno líquido y sobre el polvo obtenido se realizaron tres lavados con 10 mL de etanol 85% a 80°C. El extracto etílico se concentró en evaporador rotatorio a 54°C. El concentrado se filtró, se llevó a 10 mL con agua milli Q y se extrajeron los pigmentos fotosintéticos con cloroformo. Para la cuantificación de los azúcares se utilizaron 100 µl del extracto final. Se usó un equipo HPLC Agilent 1100, equipado con una columna Agilent Zorbax Carbohydrate Analysis (4,6 x 250 mm x 5 µ) con detector de índice de refracción (Agilent PN 840300-908). El solvente utilizado fue acetonitrilo: agua (75:25). La corrida se llevó a cabo a 30°C con un flujo de 1,4 mL/min. Como patrones se utilizaron soluciones de 10 mg/mL de glucosa, estaquiosa, fructosa, rafinosa, sacarosa y trealosa.

6.8. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo utilizando ARNeasy plant minikit (Quiagen). La integridad del ARN fue monitoreada por electroforesis en geles de agarosa/formaldehído utilizando como control las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S.

La calidad de las muestras de ARN fue evaluado midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y tomando como aceptables valores mayores de 1,9 para la relación DO_{260}/DO_{280} .

La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

6.9. PCR

Para la amplificación del gen de OsACS1 de arroz se usaron los pares de cebadores: cebador directo 5'-GCCGAATTCGATGGTGAGCCAAGTGGTCG-3' 5'- y cebador reverso 5'-GAGCGCGTGGGGTTCTTCT-3' que amplifican un producto de 325 pb (Zarembinsky y Theologis, 1993). Las condiciones de amplificación fueron: 25 ciclos de 60s a 95°C, 60s a 55°C, y 60s a 72 °C. La amplificación de actina, gen de expresión constitutiva, se utilizó como control en cada experimento de amplificación.

Para la amplificación de los genes de tomate se utilizaron los pares de cebadores que se detallan en la Tabla 2; en la misma Tabla se muestran los valores esperados para los fragmentos amplificados. En este caso se utilizaron como controles la amplificación de dos genes constitutivos, actina (*LeACT1*) o ubiquitina (*LeUBI3*).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados en las amplificaciones por PCR de genes de tomate y tamaño de los fragmentos esperados

GEN	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO EN FORWARD	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO EN REVERSE	FRAGMENTO ESPERADO (pb)
<i>Le-Pti4</i>	5'CAGCTCCGGCGGCTGAAACA3'	5'GTTCCGGCGATGCTCGCCTT3'	276
<i>Le-PR1b</i>	5'TCTGGTGTGGGGAGAATCT3'	5'CCGTTGTTGCAACGTGCCCG3'	200
<i>Le-PR2</i>	5'GTGGCCGCAGCGCAAAGCGC3'	5'CAAGCCCTCCATTTCTGCAT3'	270
<i>Le-PR P23</i>	5'CCAAACACCCTAGCCGAGTA3'	5'ACCAGGGCAAGTAAATGTGC3'	348
<i>Le-α-DOX1</i>	5'TATCTTGGAGCACGGCGGAG3'	5'CTAAAGGACTTGAGTGGG3'	407
<i>Le-ACS2</i>	5'CTGGTGGTGCCACTGGGGCT3'	5'CTCTAAATCCTGGTAACCC3'	480
<i>Le-ACS4</i>	5'CAGGATGGGTCTCGCGG3'	5'CCTGGGTATTAGGGTGTGGGG3'	318
<i>St-SN2</i>	5'TGCTCCTTCTCGAGCAAGTCCA3'	5'GCAAGGGCAAGTCTCAGTGTTC3'	227
<i>At-WRKY53</i>	5'GAAAAATGGATTGTGGATTCAA3'	5'CATCATCAGTAGGCCCTTCA3'	363
<i>Le-CO</i>	5'AGCATCCAAATCCTCCAACA3'	5'AAGCCAGAGCAGCTGATGAC3'	377
<i>Le-Cyt P450</i>	5'CCAGATTGGCAAGAGAAAGC3'	5'TCCAAGGCATATCCGAGAAC3'	357
<i>Le-ACT1</i>	5'TGGCATCATACCTTTTACA3'	5'TCCGGGCATCTGAACCCTCTC3'	500
<i>Le-UBI3</i>	5'GGATTCCCCCAGACCAGCAG3'	5'CGAAGCCTCCTGAACCTTCC3'	200

Nota: todos los oligonucleótidos fueron diseñados en base a secuencias de *S. lycopersicum* con excepción de WRKY y Snakin-2 para los cuales se utilizaron las secuencias de los genes de *A. thaliana* y de *Solanum tuberosum* respectivamente depositadas en el banco de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las condiciones de amplificación para los genes de tomate se detallan en el Anexo 1.

7. Análisis transcriptómico de la respuesta de plantas de tomate a la inoculación con *Azospirillum brasilense*

Los experimentos de marcación de ADNc con fluoróforos, la hibridación de las micromatrices y el análisis de los resultados los llevé a cabo en el Laboratorio del Dr Antonio Granell-Ritchart, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, España.

7.1. Preparación del material vegetal

Se utilizaron 100 plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* (ítem 3.2.3) y 100 plantas control sin inocular que fueron crecidas durante 7 y 14 días (50 plantas para cada

tiempo de las inoculadas y de las controles). Se tomaron al azar hojas de las plantas inoculadas y control de los dos tiempos (inoculadas de 7 y 14 días y control de 7 y 14 días) y se hicieron dos extracciones independientes de ARN de cada pool de hojas.

Para la confirmación por RT-PCR y western-blot de los resultados obtenidos con las micromatrices se utilizaron 50 plantas inoculadas y 50 plantas control (25 plantas para cada tiempo del control y del inoculado). En este caso la extracción del ARN se realizó en la parte aérea y radical de cada uno de los pooles de hojas y raíces.

7.1.1. Marcación de muestras de ADNc con fluoróforos

Los ADNc fueron marcados con los fluoróforos siguiendo el protocolo descrito en TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://jcv.org>). Se mezclaron 30 µg de ARN total provenientes de las muestras con oligo dT₂₄-V (6 µg/µL) en un volumen de 18,5 µL y se mantuvo la mezcla por 10 min a 70°C para desnaturalizar los ácidos nucleicos y evitar la formación de estructuras secundarias. Seguidamente, se dejó el tubo a temperatura ambiente 3 min para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos y el ARN. Para comenzar la retrotranscripción se añadió 6 µL del buffer 5X de la enzima, 3 µL DTT 0,1 M, 0,6 µL de una mezcla de nucleótidos que contenía 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 10 mM dTTP y 5 mM de 5-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina 5' trifosfato y 400 µL de SuperScript III RT (200 U/µL). La reacción se dejó 3 h a 50°C y a continuación se hidrolizó el ARN con 10 µL de OHNa 1 M y 10 µL EDTA 0,5 M durante 15 min a 65°C. El ADNc de simple cadena se neutralizó con HCl 250 mM. La purificación del ADNc se realizó utilizando el kit *Qiaquick PCR Purification kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc purificado se secó al vacío durante 1 h a 45°C, se resuspendió en 0,9 M de CO₃Na₂ pH 9 y a esta suspensión se le agregó el fluoróforo adecuado. Los fluoróforos utilizados fueron NHS-éster-Cy3 (Cy3 Mono-Reactive Dye Pack, Amersham Bioscience), verde y NHS-éster-Cy5 (Cy5 Mono-Reactive Dye Pack, Amersham Bioscience), rojo. Estos se unen a la amina del 5'-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (aa-UTP) incorporado en la síntesis de ADNc formando un enlace tipo éster durante la incubación de 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Desde este punto el trabajo se realizó con luz natural tenue, y en ausencia de luz artificial para evitar la degradación de los fluoróforos que son fotolábiles. En la purificación del ADNc marcado se utilizó nuevamente el kit de Qiagen. El ADNc purificado se secó al vacío. El producto seco se resuspendió en 10 µL de agua y se comprobó la eficacia de la marcación del ADNc en un gel vertical de agarosa 1% TAE 1x; la cantidad de ADNc obtenido se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Thermo Fisher Scientific Inc., USA) con 1 µl de muestra y agua como blanco.

7.2. Hibridación de las micromatrices

Se utilizaron micromatrices de ADNc Tom 1 donde se encuentran inmobilizados en un soporte sólido ADNc derivados de un total de 13.440 clones de EST representando 8500 genes de tomate (Cornell USA, <http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/array/basicsearch.cgi>). En nuestro caso se usó un diseño de bucle y por lo tanto fueron utilizadas 8 micromatrices, intercambiando la marcación con los dos fluoróforos entre controles e inoculados (dye-swap). Este diseño permite minimizar el número de micromatrices utilizadas, al mismo tiempo que se obtienen dos replicados de cada muestra, cada uno de ellos marcado con un fluoróforo diferente. Cada hibridación se realizó dos veces, resultando un total de 4 réplicas técnicas de cada muestra, dos marcadas con Cy3 (verde) y dos con Cy5 (rojo). Un esquema del experimento se muestra en la Fig 13.

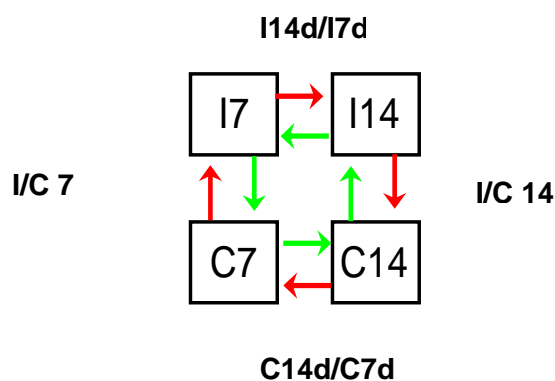


Figura 13. Diseño de bucle utilizado en el análisis transcriptómico. I, inoculado, C, control, a los 7 y 14 DDI. Las flechas representan los fluoróforos (Cy3, verde, y Cy5, rojo) utilizados en las hibridaciones.

Las micromatrices se hibridaron siguiendo las instrucciones de Corning para la hibridación de UltraGaps Coated Slides (www.corning.com/lifescience). En primer lugar, las micromatrices se prehibridaron incubándolas 60 min a 50°C con solución de prehibridación (SSC 3x, SDS 0,1%, BSA 0,1 mg/mL). A continuación, se lavaron con agua e isopropanol durante 15 segundos, se secaron centrifugándolas 6 min a 1000 rpm y finalmente se trataron con aire comprimido y se depositaron en la cámara que contenía unas gotas de agua para aportar humedad a la hibridación y evitar el secado de las muestras marcadas. Los ADNc marcados con los dos fluoróforos se mezclaron con el buffer de hibridación (SSC 3x, SDS 0,1%, DNA de esperma de salmón 0,1 mg/mL) para obtener una muestra de 100 µL. Esta mezcla se desnaturalizó por 5 min a 95°C antes de la hibridación, se enfrió en hielo antes de

depositarla entre la micromatriz y el cubreobjetos. Las micromatrices se mantuvieron toda la noche en un baño de agua a 50°C protegido de la luz.

Al día siguiente, se retiró el cubreobjetos y las micromatrices se lavaron en solución SSC 2x/SDS 0,1% durante 5 min a 42°C. El segundo lavado se llevó a cabo con SSC 0,1x/SDS 0,1%, durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de varios lavados con SSC 0,1x, 1 min a temperatura ambiente. Por último, se enjuagaron con SSC 0,01x unos segundos y se secaron por centrifugación. Todos los lavados se hicieron con agitación. Finalmente, se escanearon las micromatrices hibridadas.

7.3. Análisis de los resultados de las micromatrices

7.3.1. Obtención de imágenes

Las micromatrices fueron escaneadas en un escaner GenePix 4000B (Axon Instruments). El programa utilizado fue GenePix® 4.1 (Axon Instruments). Una vez establecidas las condiciones óptimas del fotomultiplicador en un pre escaneo, los microarreglos se analizaron con una resolución de 10 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Los resultados generados en GenePix consisten en una tabla de datos de las intensidades medidas a cada longitud de onda, la relación entre ellas, el valor del ruido de fondo y una serie de parámetros estadísticos que permiten evaluar la calidad de los datos. Se consideraron como señales buenas aquellas que presentaron un valor de al menos dos veces por encima del ruido de fondo local. A la relación de los datos así filtrados (inoculado/control) se le aplicó la transformación \log_2 para el manejo posterior. La ventaja de la utilización de la transformación \log_2 es que los resultados reflejan los valores de sobre expresión y sub expresión en una escala simétrica. Por ejemplo después de una transformación a \log_2 , un cambio de dos veces en la expresión (2 para la sobre expresión o $\frac{1}{2} = 0,5$ para la sub expresión) tomarán los valores de 1 y -1 respectivamente.

La normalización de los datos se llevó a cabo con el programa Acuity 4.0 utilizando el sistema Lowess (locally weighted linear regresión). La aplicación del análisis Lowess como método de normalización permite eliminar las desviaciones que afectan a los valores \log_2 I/C y que dependen de la intensidad de las señales detectadas (demasiado intensas o demasiado débiles).

Se realizó un análisis ANOVA de una vía con la finalidad de escoger solamente aquellos genes que cambiaban significativamente ($p < 0,055$) entre el conjunto de matrices de todo el experimento. Para las comparaciones entre los tratamientos (inoculado vs control) se seleccionaron aquellos spots que mostraron mayor consistencia entre las dos réplicas.

De los genes que fueron estadísticamente expresados en forma diferencial se eligieron algunos que resultaron especialmente interesantes para nuestro estudio y su expresión diferencial se confirmó por RT-PCR. En algunos casos la expresión de la proteína respectiva se confirmó por Western-blot.

8. Análisis proteómico de la respuesta de plantas de tomate a la inoculación con *Azospirillum brasilense*

8.1. Extracción de proteínas y marcación con fluoróforos

Se extrajeron las proteínas de las mismas plantas utilizadas para el análisis transcriptómico. La extracción se llevó a cabo siguiendo la técnica de Hurkman y Tanaka, (1986). Brevemente 5 g de material fresco (aéreo y radical, por separado) se molió en nitrógeno líquido, y se resuspendió en 2 mL de buffer Tris-ClH 0,5 M pH 6,8 conteniendo sacarosa 0,7 M, EDTA 50 mM, ClK 0,1 M, β -mercaptoetanol 2 % v/v, PMSF 2 mM. La resuspensión se incubó durante 10 min a 4°C y se le agregó igual volumen de agua saturada con fenol. Se agitó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min. Después de la centrifugación se recuperó la fase fenólica y se re-extrajo con igual volumen de buffer de extracción. Posteriormente se agregó a la fase fenólica, 5 vol. de acetato de amonio 0,1 M en metanol y se incubó a - 20°C durante toda la noche. El precipitado obtenido se lavó 3 veces con acetato de amonio y una vez con acetona y se dejó secar. Las muestras se rehidrataron en la solución de rehidratación de las tiras de IEE en un volumen final de 100 μ l.

Se incluyó en el estudio una muestra de proteínas de *A. brasilense* extraída de la misma forma como un control de las proteínas aportadas por la bacteria.

Para la marcación con los fluoróforos se puso en contacto la solución proteica equilibrada a pH 8 y el colorante comercial en una relación de 400 pmoles de colorante cada 50 μ g de proteínas. La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 min en hielo, y finalmente la reacción se detuvo por el agregado de L-lisina 10 mM. Se mezclaron de a dos las muestras marcadas que se deseaba comparar y la referencia (en total 150 μ g de proteínas) y finalmente se sembró cada muestra en una tira de IEE.

En la Tabla 3 se detalla la composición de las muestras proteicas marcadas con los fluoróforos Cy3, Cy5, Cy2 usadas en este estudio.

Tabla 3. Marcación de las muestras con los diferentes fluoróforos

Número de gel	Proteínas marcadas con fluoróforo Cy3*	Proteínas marcadas con fluoróforo Cy5*	Proteínas marcadas con fluoróforo Cy2**
1	CA7	IA7	REF
2	CR7	IR7	REF
3	CA14	IA14	REF
4	CR14	IR14	REF
5	IA14	CR14	REF
6	IR14	CA7	REF
7	IA7	CR7	REF
8	IR7	CA14	REF
9	CR7	<i>A. brasilense</i>	REF

* Las iniciales corresponden a las proteínas provenientes de: C, controles; A, parte aérea; I, inoculados con *A. brasilense*; R, parte radical. Los números indican: 7, muestra correspondiente a 7 DDI; 14, muestra correspondiente a 14 DDI.

** REF, estándar interno que contiene cantidades iguales de todas las proteínas del ensayo y permite la normalización de los geles.

Como ya se explicó en el ítem correspondiente al uso de colorantes en el análisis transcriptómico, la técnica del dye-swap fue utilizada para obtener réplicas técnicas de las muestras y para normalizar las diferencias entre los colorantes.

8.2. Análisis de las imágenes 2D-DIGE

Obtención de imágenes

Una vez obtenidos los geles, estos fueron escaneados en un Typhon 9400 (GE healthcare)® a una resolución de 100 µm usando las longitudes de excitación/emisión adecuadas para los fluoróforos Cy3, Cy2 y Cy5.

El análisis de las imágenes de fluorescencia fue realizado mediante el paquete informático DeCyder® version 7 de GE Healthcare. Este permite la detección de las señales, la sustracción del fondo, la normalización en el gel, la remoción de los artificios y las comparaciones entre geles. Si bien todo este proceso está automatizado, la confirmación de cada spot en cada gel se realizó manualmente.

En primer lugar se obtuvieron las imágenes que generaron los tres fluoróforos y se seleccionaron los spots que coincidieran en las tres imágenes de cada uno de los geles. A continuación se normalizó la señal de cada uno de los dos grupos de muestras que participan en el estudio usando la señal correspondiente al estándar interno Cy3/Cy2 para el grupo 1 y

Cy5/Cy2 para el grupo 2. La presencia del estándar interno permite eliminar las variaciones entre los geles. El paquete informático incluye el módulo DIA que permite analizar las diferencias en el gel (Difference in gel Analysis) y el módulo BVA (Biological Variation Analysis) que permite analizar las diferencias entre geles, es decir las variaciones biológicas permitiendo encontrar diferencias en la expresión de proteínas entre varios geles.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Mecanismos bioquímicos involucrados en la promoción del crecimiento en plantas de arroz

La promoción directa del crecimiento ejercida por las PGPRs en plantas de cereales ha sido extensamente estudiada, especialmente en plantas como trigo (Zaidi y Khan, 2005) y maíz (Seyed Sharifi, 2011). En base a resultados de otros autores que mostraron que *H. seropedicae* tiene efectos benéficos sobre el crecimiento de plantas de arroz (James y col., 2002) y resultados propios que indican que tanto *H. seropedicae* como *A. irakense* y *A. brasilense* promueven el crecimiento de plantas de maíz (Ribaudó y col., 2001; Ribaudó y col., 2006) y de arroz (Ribaudó y col., 2000; Curá y col., 2005) se decidió profundizar el estudio de la interacción de estas PGPRs con plantas de arroz.

A modo de ejemplo se presenta en la Fig.14 los resultados de un experimento donde se ve claramente el efecto promotor del crecimiento de una de las PGPRs utilizadas en nuestro laboratorio (*A. brasilense*) sobre el desarrollo de plántulas de arroz. Como puede observarse, a las 72 h de la inoculación es evidente el efecto promotor sobre el sistema radicular, donde se observa más desarrollo de las raíces laterales (paneles A y B). Los paneles C y D muestran con mayor aumento el sistema radicular y los paneles E y F muestran una magnificación de las zonas marcadas en C y D. Con la mayor magnificación (E y F) se observa también el mayor desarrollo de pelos radiculares en las plantas inoculadas como señalan las flechas. Estas diferencias en el sistema radical comienzan a hacerse evidentes a partir de las 48 h posteriores a la inoculación alcanzando un máximo entre las 72 y 96 h siguientes. En este tiempo no se observan cambios importantes en el desarrollo aéreo. Alrededor de los siete días posteriores a la inoculación la parte aérea alcanza un desarrollo mayor en las plantas inoculadas como puede apreciarse en el panel G. El proceso de formación del sistema radicular (raíces laterales, adventicias y pelos radiculares) ha sido extensamente estudiado en una gran variedad de especies vegetales. De estos estudios surge que la concentración y distribución de nutrientes en el suelo y señales internas como las hormonas (AIA, etileno, jasmonatos, etc.) regulan la densidad, longitud y distribución espacial del sistema radicular durante el desarrollo normal de las plantas (Zhu y col., 2006). Así mismo, las interacciones establecidas entre las raíces y los componentes bióticos del suelo juegan un papel determinante en el crecimiento de las plantas. Si bien los mecanismos que regulan todas estas interacciones son poco conocidos, estudios recientes han develado una complicada red de interconexiones entre senderos de señalización que involucran varias fitohormonas. Auxinas, NO, etileno y JA se encuentran entre las hormonas cuya participación

se postula como mediadoras en las interacciones de las plantas con microorganismos del suelo tanto sean estos patógenos como benéficos.

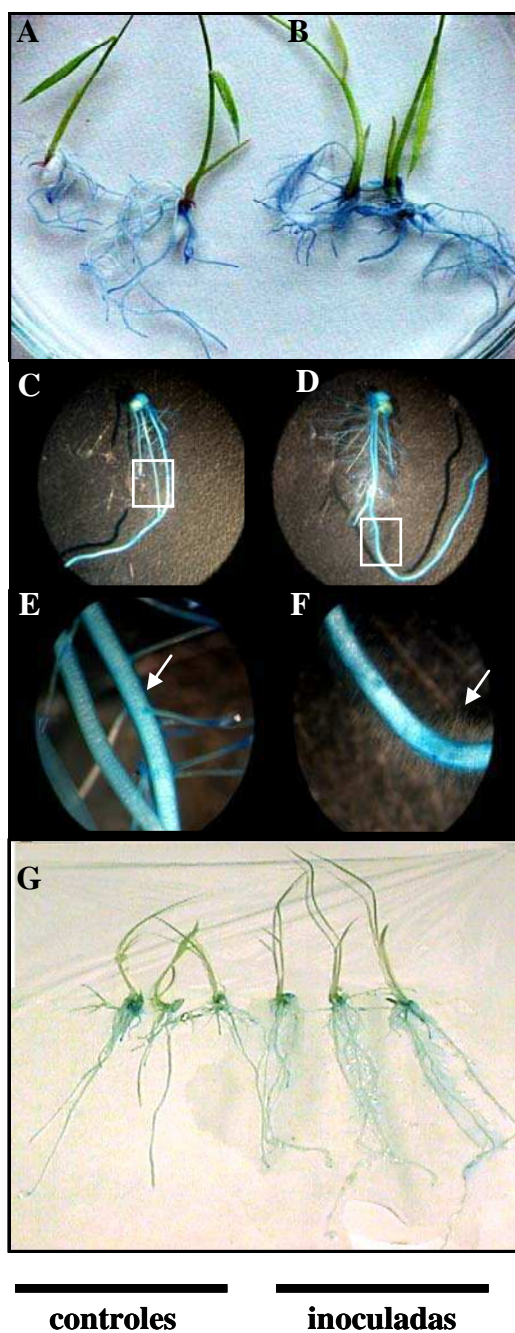


Figura 14. Efecto de la inoculación de plantas de arroz con *A. brasilense*. Paneles A y B, plantas control e inoculadas a las 72 h después de la inoculación. C y D, una vista ampliada de las raíces de plantas en A y B respectivamente. E y F vista ampliada de las áreas marcadas en C y D respectivamente. Las flechas señalan la abundancia de pelos radicales. Panel G, vista completa de plantas control e inoculadas 7 días después de la inoculación.

Nuestro trabajo se centró en el estudio del rol del etileno en el mecanismo de promoción del crecimiento en plantas de arroz inoculadas con *A. irakense*, *H. seropedicae* y *A. brasilense*. Dado que los cambios morfológicos inducidos por la inoculación se hicieron evidentes a tiempos tempranos la mayor parte de los estudios bioquímicos se llevaron a cabo utilizando plantas jóvenes.

1. Producción de etileno por las plantas inoculadas con *A. irakense*, *A. brasilense* y *H. seropedicae*

Se midió la producción de etileno en plantas de arroz desde las tres horas posteriores a la inoculación. Si bien en algunos casos se pudo ver un aumento de la producción de la hormona desde las 9 h, los datos más significativos se obtuvieron en todos los casos a partir de las 24 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 15. En el caso de *A. irakense* los resultados son menos concluyentes ya que solo las mediciones de 24 h indicaron diferencias estadísticamente significativas. En cambio la inoculación con *H. seropedicae* resultó en el mayor incremento significativo a los 72 h (alrededor de 2 veces) y con *A. brasilense* a las 48 y 72 h (entre 4 y 5 veces). A partir de las 96 h las diferencias con el control en todos los tratamientos comienzan a disminuir (resultados no mostrados).

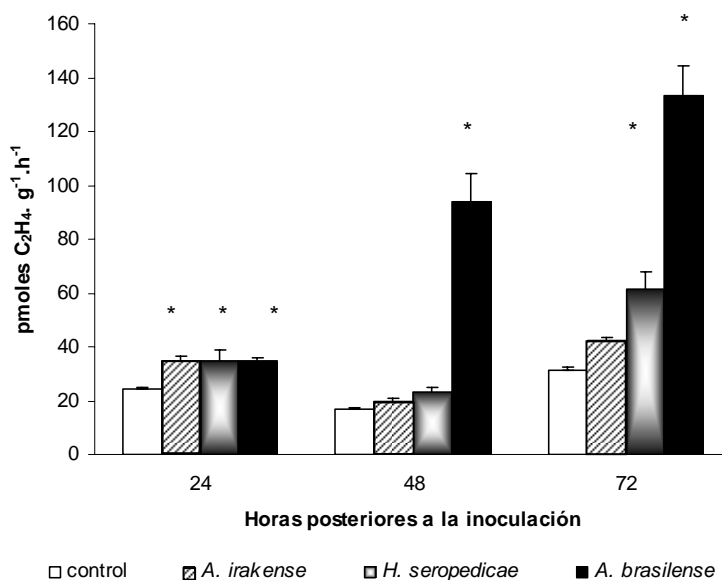


Figura 15. Producción de etileno en plantas enteras de arroz inoculadas con PGPRs. Las barras representan la media de 10 determinaciones \pm el error estándar. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$ Test de Tukey).

Para profundizar en el mecanismo bioquímico que lleva a este aumento en la producción de la hormona después de la inoculación, se midió en cada caso la actividad de

ACS, la enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad en la síntesis de etileno. La medición se llevó a cabo en plantas sin inocular (control) y en plantas de 72 h después de la inoculación que es el tiempo en que se observaron las mayores diferencias en la producción de etileno. Como controles internos para validar la medición de la actividad enzimática, se midió actividad de ACS de plantas sin inocular que habían permanecido el mismo tiempo en medio de cultivo suplementado con AIA, benciladenina (BA) y CILi, inductores de las isoformas 1 y 3 de la ACS de arroz (Zarembinsky y Theologis, 1993) y en plantas tratadas con AVG, inhibidor de la ACS. Las mediciones de la actividad enzimática se llevaron a cabo en condiciones de linealidad con la enzima en todos los casos. Los resultados de estas determinaciones se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad de ACS en plantas de arroz a las 72 h de la inoculación con *H. seropedicae*, *A. irakense* y *A. brasilense* FT326

Tratamiento	Actividad de ACS * (pmoles etileno. min ⁻¹ . mg ⁻¹)
Control	13,09 ± 1,65 b
<i>H. seropedicae</i>	27,39 ± 1,62 c
<i>A. irakense</i>	16,03 ± 1,42 b
<i>A. brasilense</i>	26,02 ± 1,30 c
AIA+BA+CILi	56,90 ± 1,55 d
AVG (10 µM)	6,59 ± 1,12 a

*Los datos mostrados son el promedio de 10 determinaciones ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$ Test de Tukey).

Los cambios en la actividad de ACS son congruentes con los incrementos observados en la producción de etileno mostrados en la Fig.15. Las plantas inoculadas con *H. seropedicae* y con *A. brasilense* son las que mostraron los mayores incrementos (100%). Estos valores resultan relevantes si se los compara con el obtenido con la combinación de inductores que fue del 300%. La presencia de AVG, inhibidor de la ACS, tuvo el comportamiento esperado.

Además de los cambios en la actividad de ACS señalados en la Tabla 4 el uso de ctivadores e inhibidores generó importantes cambios morfológicos. Así las plantas tratadas con AIA+BA+CILi mostraron un desarrollo mucho mayor del sistema radicular que el observado con cualquiera de las inoculaciones, en cambio la presencia de AVG bloqueó completamente el desarrollo de las raíces (resultados no mostrados).

2. Medición de los niveles de expresión de ACS en plantas inoculadas

Seguidamente se evaluó la posibilidad de que los cambios en la actividad de ACS se debieran a regulación de su expresión a nivel génico. Este estudio se llevó a cabo con plantas inoculadas con *H. seropedicae* y con *A. brasilense* en las que los resultados anteriores fueron más concluyentes.

Utilizando los mismos extractos usados para la medición de la actividad enzimática se evaluó la expresión de ACS a nivel de proteína mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti Le-ACS2 de tomate. Un grupo de plantas pertenecientes al mismo ensayo se utilizó para llevar a cabo los experimentos de RT-PCR con cebadores del gen *OsACS1* y *OsACS3*. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.16. Con respecto a la expresión de ACS a nivel de proteína, en ambos casos se observa un importante aumento de la cantidad detectada por el anticuerpo en las plantas inoculadas (Fig. 16, paneles A y C). Es posible que la presencia de dos bandas de movilidad similar que se ha observado siempre en estos experimentos se deba a proteólisis ocurrida durante el proceso de extracción ya que se ha informado que algunas formas de ACS son especialmente sensibles a la proteólisis (Tatsuki y Mori, 2001).

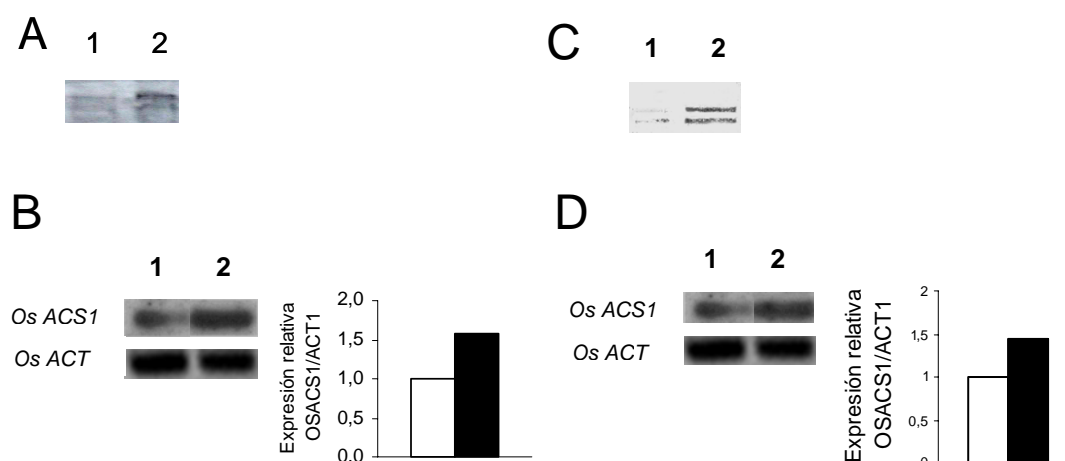


Figura 16. Expresión de ACS en plantas de arroz inoculadas con *H. seropedicae* y *A. brasilense*. Paneles A y C, inmunoblot de la fracción S100 del extracto de planta entera de 72 h reconocida con el anticuerpo anti-ACS2. El control de carga de proteína en cada carril se realizó por tinción con Ponceau previa a la inmunodetección. Panel A, plantas inoculadas con *H. seropedicae* y Panel C, plantas inoculadas con *A. brasilense*. Paneles B y D, ADN amplificado utilizando los cebadores correspondientes a la isoforma *OsACS1* analizado por electroforesis en geles de agarosa. Panel B, plantas inoculadas con *H. seropedicae* y Panel D, plantas inoculadas con *A. brasilense*. En los gráficos de barras se representa la expresión de ACS relativa a la de actina (*ACT*) en muestras control (barras blancas) e inoculadas (barras negras). Se asignó arbitrariamente el valor de 1 para las plantas control. Carril 1, plantas control; carril 2, plantas inoculadas. Tanto para el Western blot como para la RT-PCR se muestran los resultados de un experimento representativo de un total de 3.

Los resultados de RT-PCR semicuantitativa (Paneles B y D) indican en ambos casos un aumento de entre 50 y 60% en la cantidad de mensajero para *OsACS1*. La amplificación con los cebadores para *OsACS3* no mostró diferencia de expresión para este gen (resultados no mostrados).

Tomados en conjunto los resultados de expresión, tanto a nivel de proteína como de mensajero de ACS, los de actividad enzimática y los de niveles de etileno sugieren fuertemente que la inoculación con *H. seropedicae* y *A. brasilense* promueven una activación del sendero biosintético de la hormona en la planta de arroz. En consecuencia podría pensarse como hipótesis que el etileno tiene algún rol mediador en el mecanismo promotor del crecimiento de estas PGPRs sobre arroz.

3. Efecto de un precursor de la síntesis de etileno y de un inhibidor de su percepción

Debido a que las plantas inoculadas con *A. brasilense* presentaron la mayor respuesta en cuanto a la producción de etileno se continuó el estudio de la asociación con esta PGPR.

Para tratar de establecer con mayor certeza una relación entre los niveles de etileno y el mayor desarrollo de las plantas, por un lado se comparó el efecto de un aumento forzado de etileno con el de la inoculación y por otro, se analizó el posible bloqueo del efecto de los tratamientos con un inhibidor de la percepción de etileno. Se utilizó ACC (precursor de la síntesis de etileno) para estimular la síntesis endógena y 1-MCP como inhibidor de la percepción (Sisler y Serek, 2003).

En primer lugar se comprobó que efectivamente la presencia de ACC en el medio de crecimiento estimula la síntesis de etileno en forma comparable a la inoculación con *A. brasilense*.

Como se ve en la Fig. 17 el tratamiento con ACC induce un aumento en la síntesis de etileno comparable a la inducida por la inoculación.

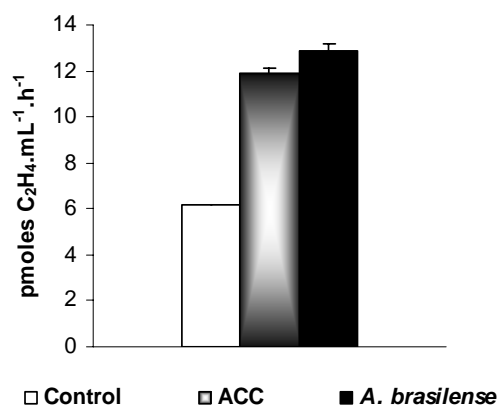


Figura 17. Producción de etileno en plantas tratadas con ACC y en plantas inoculadas con *A. brasilense*. Se midió la producción de etileno después de 72 h de iniciado cada tratamiento (plantas control, presencia de 10 μ M de ACC o inoculación con *A. brasilense*). Las barras muestran el promedio de 10 determinaciones \pm error estándar.

Una vez corroborado el efecto de ACC sobre la síntesis de etileno en la planta se evaluó el efecto del bloqueante de la percepción de la hormona sobre la promoción del crecimiento en plantas tratadas con etileno, o con ACC o inoculadas con *A. brasilense*. Los resultados se muestran en la Fig. 18. En todos los casos la presencia de 1-MCP provocó una disminución en el crecimiento tanto de la parte aérea como radicular comparado con los controles. En el caso de las plantas que habían sido tratadas con etileno se observó una disminución del crecimiento aéreo, un acortamiento de la radícula y una importante disminución en el número de las raíces laterales en presencia del inhibidor (Fig. 18, panel A superior y detalle en la foto inferior). En los casos de los tratamientos con ACC y con *A. brasilense* el efecto del inhibidor es más evidente sobre el sistema radicular que sobre la parte aérea (paneles B y C). En el caso de las plantas inoculadas, el boqueo de la percepción de etileno provocó una disminución en el número y en la longitud de las raíces laterales (panel C, superior y detalle en el inferior).

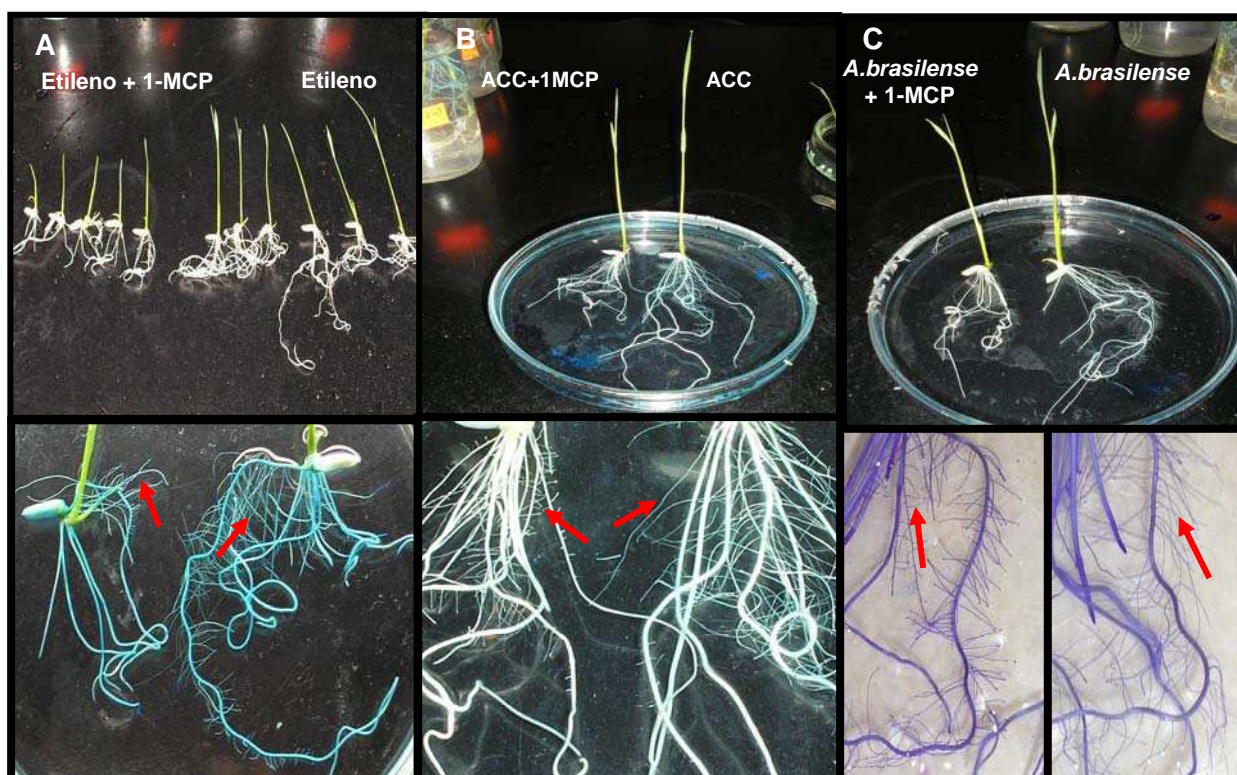


Figura 18. Efecto del 1-MCP sobre el desarrollo de plantas de arroz a los 10 días después del tratamiento con etileno, con ACC o de la inoculación con *A. brasilense*. Panel A: efecto del 1-MCP sobre plantas de arroz tratadas con $1\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ de etileno. Panel B: efecto del 1-MCP sobre plantas tratadas con ACC. Panel C: efecto del 1-MCP sobre plantas inoculadas con *A. brasilense*. En la parte inferior de cada panel se muestra un detalle del sistema radicular. En todos los casos las flechas señalan las raíces laterales en cada tratamiento

4. Endofitismo bacteriano

Para confirmar la presencia de bacterias en el interior de las raíces de las plantas de arroz utilizadas en los experimentos anteriores, se llevó a cabo un recuento de las bacterias contenidas en las raíces. Se desinfectaron superficialmente las raíces, como se describió en Materiales y Métodos y se procedió a realizar el recuento sobre un gramo de raíces para cada uno de los tratamientos. Los valores obtenidos fueron $7,3 \times 10^6$, $1,24 \times 10^7$ y $3,2 \times 10^7$ UFC. mL⁻¹ para *A. irakense*, *H. seropedicae* y *A. brasilense* respectivamente.

5. Actividad de la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ en respuesta a la inoculación con *A. brasilense*

Como fue comentado en la Introducción de esta Tesis, los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular y la percepción de los mismos por sus proteínas sensoras específicas integran una red de senderos que median las respuestas de las plantas a un gran número de señales, entre ellas las señales hormonales y las generadas por estrés biótico y abiótico. Particularmente en el caso del sendero de transducción del etileno en *Pisum sativum* se ha propuesto la mediación de una cascada de quinasas y fosfatasa reguladas por Ca²⁺ (Kwak y Lee, 1997; Liu y Zhang, 2004) y en *N. tabacum* se encontró activada, bioquímica y transcripcionalmente, una CDPK en respuesta a estrés biótico y abiótico (Romeis y col., 2001). En relación a las señales generadas en las plantas en respuesta a la inoculación con PGPRs existen pocos antecedentes en la bibliografía que vinculen el metabolismo del Ca²⁺ con respuestas a la inoculación. En el caso de *Medicago truncatula* inoculada con *Sinorhizobium meliloti*, Gargantini y col., (2006) sugirieron que una isoforma de CDPK, la CPK3, participa en la regulación de la interacción simbiótica.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de que la actividad de alguna quinasa de proteínas dependiente de Ca²⁺ estuviera involucrada en la transducción de señales del etileno en nuestro sistema, se midió la actividad de CDPK en plántulas 24 y 48 h después de la inoculación. Dado que distintas formas de CDPK pueden ser solubles o estar asociadas a membranas, en un primer experimento se midió actividad de histona quinasa dependiente de Ca²⁺ en la fracción soluble (S100) y en la particulada (P100) de los extractos preparados con plántulas enteras de 24 y 48 h inoculadas con *A. brasilense* y controles sin inocular. En la Fig. 19 se resumen los resultados obtenidos. En primer lugar, se observó que la actividad fosfotransferasa es dependiente de Ca²⁺; las diferencias más interesantes entre controles e inoculados se observaron en las muestras de 24 h. En todos los casos la actividad histona

quinasa fue independiente de la presencia de calmodulina (resultados no mostrados) lo que permite asumir que se trata efectivamente de actividad CDPK.

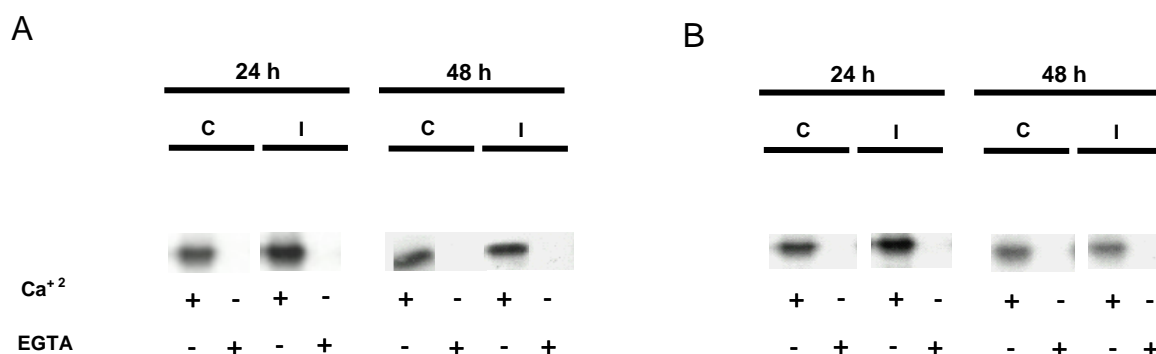


Figura 19. Efecto de la inoculación con *A. brasilense* sobre la actividad histona quinasa dependiente de Ca^{2+} en las fracciones S100 y P100. Los extractos se prepararon como se indica en Materiales y Métodos y la actividad se midió utilizando histona como sustrato en ausencia y en presencia de Ca^{2+} 2 mM y en ausencia y presencia de EGTA 1 mM. Se utilizaron plantas de 24 y 48 h post inoculación. En cada carril se sembraron alícuotas de las mezclas de reacción que contenían 0,5 μg de proteínas. Se muestra la autorradiografía de la electroforesis en SDS-PAGE 12%. Panel A, fracción S100; Panel B, fracción P100.

Con el objeto de profundizar en la caracterización de esta actividad y su relación con la inoculación se analizó su localización en las distintas partes de la plántula (semilla y parte vegetativa que incluye tallo y raíz) y se discriminó entre actividad soluble y asociada a membrana. Para estos experimentos se utilizó histona como sustrato y se midió la actividad después de 24, 48 y 72 h de la inoculación en extractos solubles (S100) y particulados (P100). Para los tres tiempos evaluados la mayor actividad fosfotransferasa y las mayores diferencias entre inoculados y controles se encontraron en la fracción particulada de la parte vegetativa; en el resto de las fracciones la actividad enzimática era baja y las diferencias menores al 5% (resultados no mostrados). En la Fig. 20 A se muestran los resultados de la actividad histona quinasa en la fracción P100 de la parte vegetativa y su dependencia de Ca^{2+} en los tres tiempos. Como se ve claramente la actividad en las plantas inoculadas es mayor, entre 50 y 70%, que en los controles. Para evaluar la posibilidad de que esta actividad enzimática involucre a una CDPK, se repitió la medición en la muestra de 72 h utilizando syntide 2, el sustrato de la proteína quinasa dependiente de calmodulina, en lugar de histona. Como se ve en el panel B la actividad de syntide quinasa muestra el mismo perfil de activación que el de histona quinasa y resulta aproximadamente 40% mayor después del tratamiento.

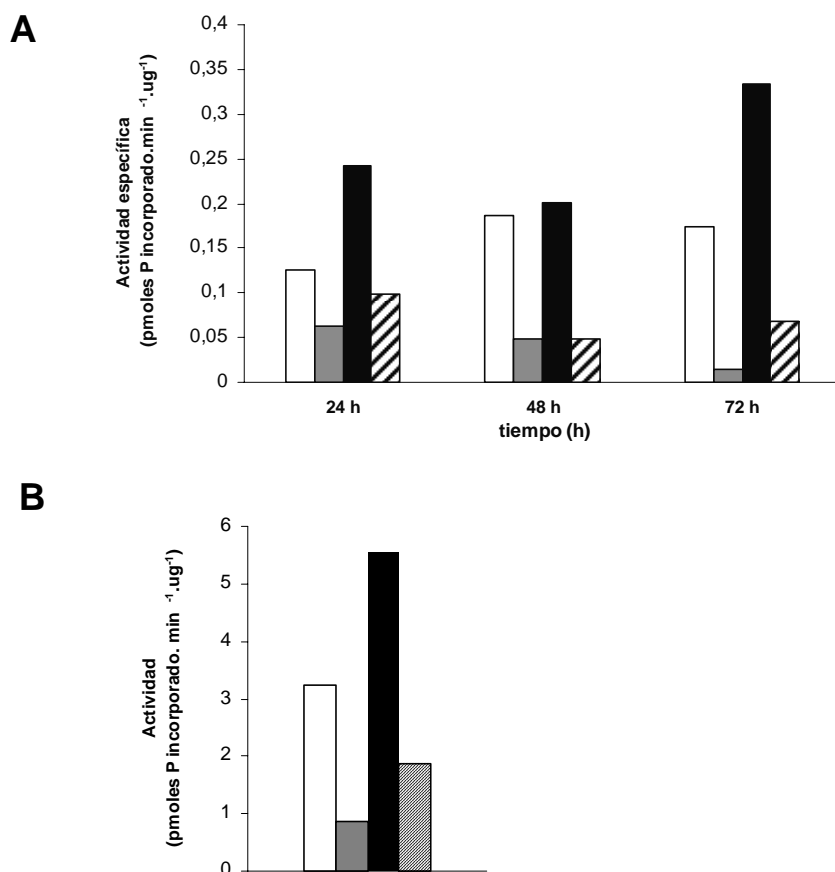


Figura 20. Actividad de quinasa dependiente de Ca²⁺ en la fracción P100. Panel A, actividad histona quinasa dependiente de Ca²⁺. Se determinó la actividad quinasa en plantas control (libres de bacterias) barras blancas y grises e inoculadas (negras y rayadas) a distintos tiempos después de la inoculación, en ausencia (barras blancas y negras) y en presencia (barras grises y rayadas) de EGTA 2 mM. Panel B, actividad syntide quinasa dependiente de Ca²⁺. Se midió la actividad quinasa usando como sustrato el péptido específico como se describió en Materiales y Métodos. Se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Para completar la caracterización de la actividad quinasa del P100 como perteneciente a una CDPK, se evaluó su comportamiento frente a la presencia del antagonista de calmodulina W7 y el reconocimiento por un anticuerpo anti CDPK de soja. La Fig. 21 resume los resultados obtenidos. En el panel A se observa que la actividad histona quinasa es casi completamente inhibida por la presencia de W7 y el panel B muestra que la actividad syntide quinasa es inhibida alrededor del 30% en presencia del antagonista. Esta inhibición está dentro de los valores esperables para una actividad CDPK en presencia de W7.

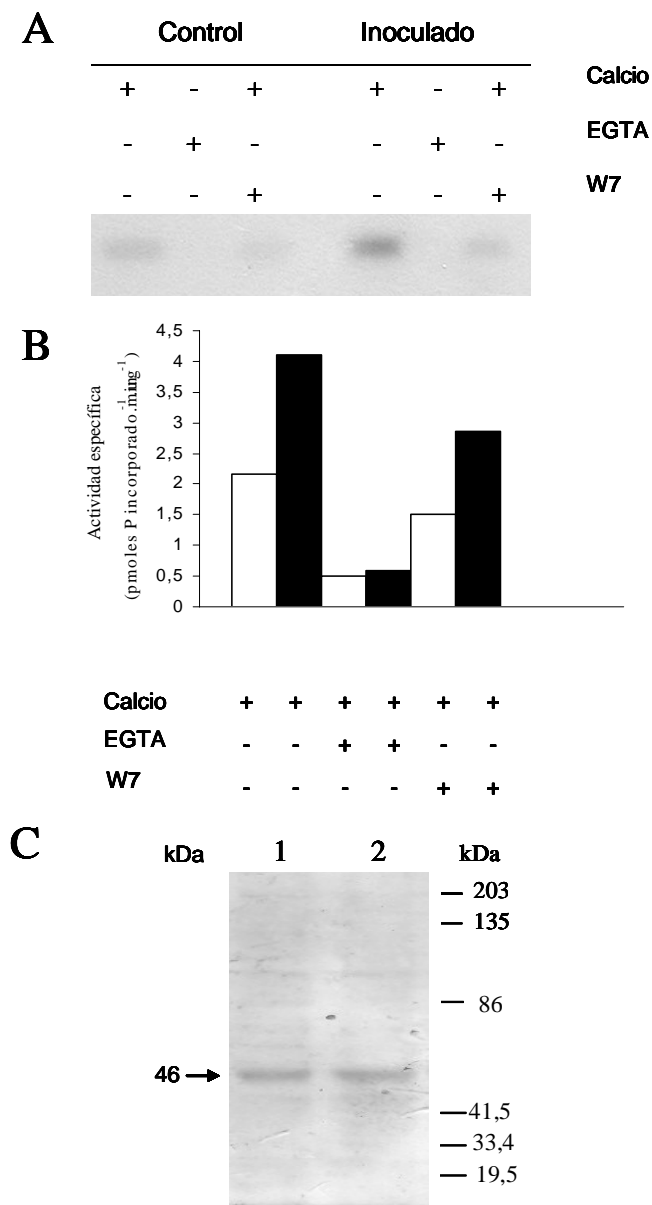


Figura 21. Caracterización de la actividad quinasa dependiente de Ca^{2+} . Panel A, efecto del W7 sobre la actividad histona quinasa del P100. La actividad histona quinasa se evaluó en el P100 de parte vegetativa a las 72 h después de la inoculación de plantas control e inoculadas. Se muestra la dependencia de Ca^{2+} y el efecto del antagonista de CaM, W7. **Panel B, efecto del W7 sobre la actividad syntide quinasa del P100.** Se evaluó la actividad syntide quinasa en el P100 de parte vegetativa en plantas control (barras blancas) e inoculadas (barras negras) a las 72 h después de la inoculación. **Panel C, Western blot de extractos del P100 de la parte vegetativa de 72 h en plantas control e inoculadas.** Para la inmunodetección de la quinasa se utilizó anticuerpo anti CDPK de soja. Alícuotas del extracto utilizado en los experimentos cuyos resultados se muestran en la Fig 20 fueron corridos en SDS-PAGE 12%, transferidos a membrana y ensayados con el anticuerpo. Calle 1: plantas control, calle 2: plantas inoculadas. La flecha señala la banda de 46 kDa reconocida por el anticuerpo.

Finalmente, el panel C muestra el resultado del Western blot. En el control y el inoculado se detecta una banda de aproximadamente 46 kDa que presenta la misma intensidad en ambas muestras. Este resultado podría estar indicando que el aumento en la actividad enzimática detectado en las muestras inoculadas tendría origen en alguna modificación postraducciona de la proteína.

En un intento de correlacionar la proteína de 46 kDa reconocida por el anticuerpo anti-CDPK con la actividad aumentada después de la inoculación, se llevó a cabo un ensayo de actividad quinasa en gel. Como se puede ver en la Fig. 22, panel A, se detecta claramente una banda con actividad quinasa de alrededor de 46 kDa en la muestra inoculada que está ausente en el control (carriles 1 y 2). En presencia de EGTA no se observa actividad en ninguna de las dos muestras (carriles 3 y 4). Por otra parte, cuando replicados de los carriles 1 y 2 fueron separados del gel original, transferidos a membranas de PVDF y ensayados con el anticuerpo anti-CDPK, se obtuvieron los resultados mostrados en el Panel B (carriles 1 y 2). Se ve que, nuevamente, la cantidad de proteína reactiva es prácticamente igual en las dos muestras, lo cual indica a su vez que la señal de fosforilación observada en el ensayo en gel se debe a fosforilación de la histona incluida como sustrato y no a una autofosforilación de la propia CDPK. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el aumento de la actividad de la banda de 46 kDa podría deberse a una modificación postraducciona inducida por la inoculación con *A. brasilense*.

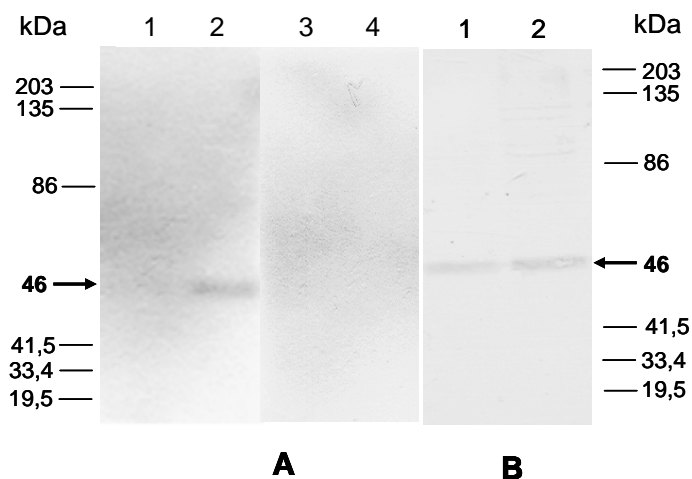


Figura 22. Caracterización de la banda de 46 kDa por ensayo de quinasa en gel. Panel A, ensayo de quinasa en gel. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos usando la fracción del P100 de parte vegetativa de plantas de 72 h, control (carriles 1 y 3) y plántulas inoculadas (carriles 2 y 4) como fuente de enzima. El ensayo se realizó en ausencia (carriles 1 y 2) o en presencia (carriles 3 y 4) de 5 mM EGTA. Panel B, inmunoblot de la fracción P100. Se corrieron alícuotas de las mismas fracciones utilizadas en el panel A y se ensayaron con el anticuerpo anti CDPK de soja. Carril 1, plantas control; carril 2, plantas inoculadas. Las flechas señalan el PM calculado para las bandas de interés.

Para evaluar de qué manera la actividad de CDPK afecta el desarrollo del sistema radicular que se está tomando como evidencia del efecto beneficioso de la inoculación con *A. brasilense*, se repitieron las inoculaciones en presencia o ausencia del antagonista de calmodulina W7. La Fig. 23 muestra, en primer lugar, que W7 disminuye el desarrollo de las raíces laterales en el control sin inocular (paneles de la izquierda), sugiriendo que el desarrollo del sistema radicular que está controlado entre otras hormonas por el etileno endógeno de la plántula es afectado por W7. En los paneles de la derecha se observa que el efecto inductor de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces es también inhibido por W7. Esta inhibición se hace más evidente aún que en los controles, probablemente porque el número y la longitud de las raíces laterales en presencia de *A. brasilense* es siempre mayor. Este resultado sugiere que la actividad de CDPK es requerida para la formación de las raíces laterales y que en consecuencia una modulación de su actividad podría ser parte del mecanismo de respuesta de la planta a la inoculación.

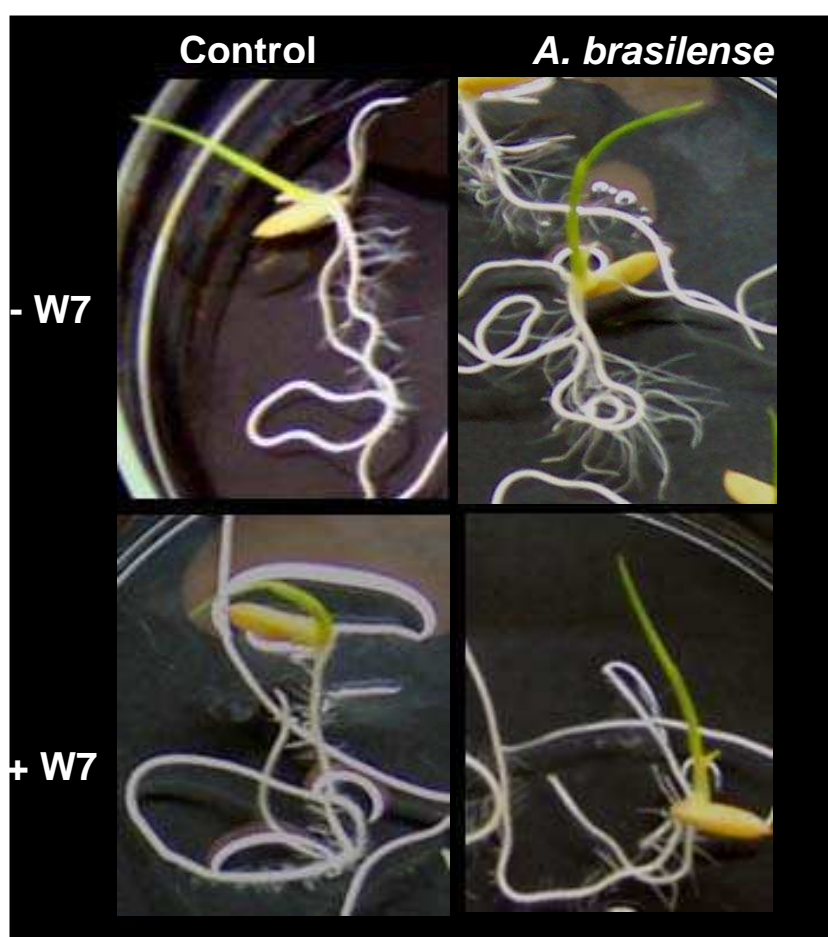


Figura 23. Efecto del inhibidor W7 sobre el desarrollo de las raíces laterales en plantas de arroz Se muestra el desarrollo del sistema radicular de plantas de arroz crecidas e inoculadas en presencia y ausencia de 100 μ M W7. Las fotografías fueron tomadas a las 72 h de iniciado el experimento.

DISCUSIÓN

Dada la importancia del uso de las PGPRs en reemplazo de los agroquímicos, un conocimiento más profundo de las cascadas de transducción de señales que se disparan después de la inoculación con estas bacterias tiene especial relevancia para el mejoramiento y la aplicación de los agentes de biocontrol en general. Hasta el momento los senderos bioquímicos que permiten una colonización endofítica no patogénica de las PGPRs y que regulan los resultados de esta interacción en la planta son poco conocidos.

En este capítulo de la Tesis se enfocó el estudio de los mecanismos bioquímicos que median la respuesta de las plantas de arroz a tres especies bacterianas de las que, como se mencionó al principio de este Capítulo, se conocía su capacidad promotora del crecimiento en plantas de maíz y arroz. Como se señaló en la Introducción de esta Tesis, el etileno es una fitohormona que tiene un rol preponderante como mediador y coordinador de las señales internas y externas que modulan la dinámica de crecimiento y los programas de desarrollo en las plantas. Esta hormona también juega un papel importante en la señalización que media algunas interacciones planta/bacteria como la formación de nódulos en la simbiosis rizobio/leguminosa (Penmetsa y Cook, 1997) y en la defensa frente a patógenos (Feys y Parker, 2000). En base a estos antecedentes se avanzó en la investigación del rol del etileno en la interacción de *A. brasilense* con plántulas de arroz que lleva al establecimiento de una relación beneficiosa microorganismo/planta.

Partiendo de la base de que gran parte del control de los eventos mediados por una hormona ocurre a nivel de su síntesis se comenzó con la medición de la cantidad de etileno producida por las plantas en respuesta a la inoculación. Los resultados obtenidos indican que en los tres casos estudiados la inoculación promueve muy tempranamente un aumento en los niveles de etileno que se hace francamente evidente a las 24 h, se mantiene hasta las 72 h y luego comienza a disminuir. Como era esperable esta respuesta no es igual en las tres asociaciones estudiadas y en base a este resultado se continuó el estudio con *H. seropedicae* y *A. brasilense* que generaron la mayor respuesta en cuanto a la síntesis de la hormona. Dado que el paso limitante de la velocidad de síntesis del etileno está catalizado por la ACS, se evaluaron los posibles cambios en la actividad y en la expresión de la enzima en las plantas inoculadas. La inoculación con ambas bacterias promovió un aumento importante en la actividad global de ACS que llegó al 100% en el caso de *A. brasilense*. Así mismo se detectó un aumento en la expresión a nivel de proteína utilizando un anticuerpo anti ACS2 de tomate y a nivel de mensajero utilizando cebadores correspondientes a OsACS1.

Estos resultados parecían indicar una relación entre la síntesis de etileno y el sendero de transducción que lleva a una respuesta fisiológica a la inoculación. Si esta hipótesis fuera válida, es esperable que la presencia de un estimulador de la síntesis de etileno y el etileno mismo induzcan un sendero de señalización con resultados comparables al desencadenado por la bacteria, y que el bloqueo de la percepción del etileno lo interrumpa. En efecto, se vio que en presencia de etileno o de ACC como inductor de su síntesis se genera una respuesta positiva en la promoción del crecimiento de las raíces laterales y de la parte aérea comparables a la inducida por la inoculación. La presencia de 1-MCP que bloquea la percepción de etileno resulta en la desaparición de la promoción del desarrollo aéreo y radicular en las plantas sometidas a los tres tratamientos. Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de un rol mediador de la hormona en la respuesta frente a la inoculación con *Azospirillum*.

Existen en la bibliografía gran cantidad de trabajos que relacionan el metabolismo del Ca^{2+} y por lo tanto de sus proteínas moduladoras, como mediadores de las respuestas a estrés biótico y abiótico en las plantas que incluye la síntesis de etileno (Ludwig y col., 2005). Con el objetivo de investigar una potencial relación entre actividad de CDPK y respuesta a la inoculación en nuestro sistema, se evaluó dicha actividad en plantas control e inoculadas y se encontró que la inoculación con *A. brasilense* promueve un aumento de una actividad quinasa de proteínas que efectivamente tiene las características de una CDPK. La actividad estuvo localizada fundamentalmente en la fracción particulada de la plántula y la mayor inducción se encontró a las 72 h post inoculación. Utilizando un anticuerpo anti CDPK de soja se detectó una sola banda de aproximadamente 46 kDa de la misma intensidad en el control y en el inoculado. Un ensayo en gel reveló una sola banda con actividad CDPK con una masa de 46 kDa proveniente de las plántulas inoculadas y que estaba ausente en los controles. No se observó aumento en la cantidad de proteína expresada en respuesta a la inoculación de modo que el aumento de la actividad promovido por la misma podría deberse a alguna modificación post traduccional de la enzima. La familia de las CDPKs propia de cada especie suele tener muchas isoformas. En especial en arroz se han descrito hasta el momento 31 genes de CDPKs (Wan y col., 2007) y con nuestros resultados no podemos individualizar la(s) isoforma(s) cuya actividad aumenta en respuesta a la inoculación. No se puede descartar la posibilidad de que la banda visualizada en el experimento en gel no sea la única isoforma de CDPK involucrada en el aumento de la actividad medida *in vitro*. Es sabido que el proceso de desnaturalización y renaturalización que sufren las proteínas en la aplicación de la técnica puede afectar la estabilidad y/o la recuperación de la actividad de las distintas isoformas de maneras diferentes e impedir que alguna de ellas sea localizada en el ensayo.

La presencia de W7 en el medio de crecimiento de las plántulas resultó en un marcado acortamiento de las raíces y una desaparición total del sistema radicular a dosis altas (resultados no mostrados). Cuando el inhibidor se usó en la dosis habitualmente utilizada en experimentos *in vivo* en plantas control e inoculadas el resultado fue una marcada disminución en el desarrollo de las raíces laterales. Este resultado indica que el desarrollo de estas raíces, sea tanto como parte del programa fisiológico de diferenciación de la planta como del estimulado por la colonización por la PGPR está mediado por una actividad que se bloquea por W7. Si bien W7 es ampliamente utilizado en el estudio del rol de CaM en diferentes senderos de señalización, es también un inhibidor relativamente inespecífico de otras enzimas dependientes de Ca²⁺. Sin embargo, pese a las limitaciones de una aproximación farmacológica como es el uso de inhibidores los resultados en su conjunto permiten postular que CDPK y en consecuencia Ca²⁺ forman parte de un sendero de transducción de señales que vincula la inoculación con la promoción del crecimiento radicular.

Como se mencionó al inicio de esta Discusión, los mecanismos moleculares involucrados en la producción de etileno durante la interacción planta/PGPR son prácticamente desconocidos. Sin embargo, se pueden establecer algunas correlaciones con senderos de señalización mediados por etileno en casos de estrés biótico y abiótico estudiados en otros sistemas. En cuanto a las enzimas involucradas en la síntesis de la hormona, si bien la regulación transcripcional de miembros de la familia ACS es un determinante fundamental de la cantidad de etileno producido (Kende, 1993), algunas ACSs también son reguladas a nivel postraduccional. Por ejemplo en tomate, LeACS2 es fosforilada por una CDPK *in vitro* y el sitio de fosforilación está conservado en otros miembros de la familia (Tatsuki y Mori 2001; Sebastia y col., 2004). En *Nicotiana benthamiana* se demostró que la expresión de una forma modificada de CDPK2 constitutivamente activa promueve la producción de ACC y de H₂O₂ y la muerte celular típica de la respuesta HR inducida por patógenos y daño. Estos resultados permitieron establecer un modelo en el que se ubica una CDPK en el sendero de síntesis de etileno (CDPK2 en el caso específico de *N. benthamiana*), activable postraduccionalmente, que fosforilaría entre otros sustratos a alguna forma de ACS activándola a su vez y modulando así los niveles de etileno (Ludwig y col., 2005). Así mismo, en tomate se demostró que la fosforilación/defosforilación de LeACS2 inducida por daño regula su estabilidad aguas arriba del sistema ubiquitina-proteasoma 26S y en consecuencia modula la producción de etileno. Más aún la estabilidad de LeACS2 depende de la fosforilación mediada por MAPK y CDPK y se determinó que LeCDPK2 es una de las quinasas de proteína capaces de fosforilar LeACS2 (Kamiyoshihara y col., 2010). En definitiva, los antecedentes mencionados indican que CDPK tiene un rol regulatorio relevante en la síntesis de etileno.

Se postula que en la interacción planta-PGPR la aparición de respuestas cualitativamente semejantes a las de defensa frente a patógenos tiene un rol en el establecimiento mismo de la interacción. En el establecimiento de una simbiosis asociativa, los endófitos deben desencadenar bajos niveles de respuesta defensivas en las plantas que permitan mantener el número de endófitos bajo estricto control asegurando así la no patogenicidad de la infección. Resultados recientes indican que el etileno, mediador de la respuesta ISR, tendría un papel importante en el establecimiento de una interacción no patogénica disminuyendo la colonización en varios modelos planta/microorganismo (León-Kloosterziel y col., 2005; Iñiguez y col., 2005). En caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se encontró que un receptor de etileno, ER1, y dos factores de transcripción que responden a etileno, ERF1 y ERF2, se expresan diferencialmente en respuesta a la interacción con bacterias benéficas y patógenas: la expresión de ER1 y de ERF2 aumenta drásticamente y la de ERF1 disminuye en la interacción con endófitos fijadores de nitrógeno y estos cambios se invierten en la asociación con patógenos (Cavalcante y col., 2007). Los receptores de etileno son reguladores negativos del sendero (Introducción, Fig. 4) y su sobre expresión en tomate y *Lotus japonicus* produce una disminución en la capacidad defensiva de la planta (Ciardi y col., 2000; Nukui y col., 2004). Por lo tanto, el aumento específico del receptor ER1 en la infección por una bacteria benéfica disminuiría la sensibilidad al etileno y en consecuencia también la defensa de la planta frente a la colonización. Estos resultados parecen indicar que elementos del sendero de transducción del etileno como ER1, ERF1 y ERF2 podrían participar en cascadas de transducción alternativas, todas mediadas por etileno, con la capacidad de discriminar entre los dos tipos de asociaciones (beneficiosas y patógenas). Es interesante señalar que de la comparación de secuencias de los dos factores de transcripción con las del banco de datos del NCBI surge que las secuencias con mayor identidad (98% para *ScERF1* y 85% para *ScERF2*) corresponden a dos ERFs de arroz. Podría ser, en consecuencia, que el mismo etileno tuviera entre sus roles el de regular el endofitismo de *A. brasilense* como en el caso de *S. officinarum* y *H. seropedicae*.

En definitiva, nuestros resultados apuntan a asignar al sendero de transducción del etileno un rol fundamental en el proceso de promoción del crecimiento inducido por la inoculación de plántulas de arroz con la PGPR *A. brasilense*. La inoculación y el incremento del nivel de etileno se acompañan de un aumento en la actividad CDPK que podría tener una función regulatoria sobre la ACS como la descrita en la bibliografía y que se comentó más arriba. No se puede descartar que en el proceso mismo del desarrollo de las raíces laterales esté involucrada la actividad de alguna isoforma de CDPK ya que se ha propuesto que una CDPK de 50 kDa interviene en el desarrollo de raíces adventicias inducido por NO y auxina (Lanteri y col., 2006).

CAPÍTULO II

Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas de tomate

Continuamos nuestro estudio sobre los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento inducido por *Azospirillum* utilizando ahora como modelo plantas de tomate.

Los pocos trabajos relacionados con *Azospirillum* y hortalizas comenzaron en el año 1998 y fueron llevados a cabo en tomate y pimiento (Bashan, 1998). En estos trabajos la promoción del crecimiento fue evaluada por el aumento del peso seco de la planta entera.

Tanto en la Introducción de esta Tesis como la discusión del Capítulo I, se habló de las múltiples implicancias de las fitohormonas, en especial del etileno, en el desarrollo del sistema radicular fundamental para el crecimiento de las plantas.

Nos interesó evaluar en este nuevo sistema planta/PGPR el rol del etileno como mediador del sendero de señalización que media el efecto de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas de tomate.

1. Parámetros de crecimiento

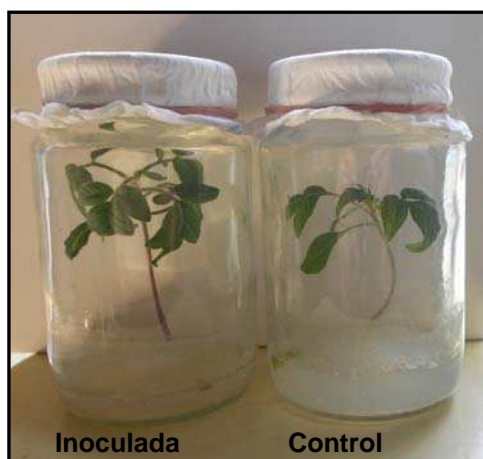


Figura 24. Promoción del crecimiento en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*. Plantas cv. Liso Marglobe inoculadas con *A. brasilense* (izquierda) y sin inocular (derecha) a los 15 DDI.

En primer lugar las plantas de tomate fueron inoculadas con *A. brasilense* como se indicó en Materiales y Métodos y se evaluó el efecto de esta inoculación sobre algunos parámetros de crecimiento.

En la Fig. 24 se puede observar la diferencia en el crecimiento general de las plantas inoculadas.

Se determinó el peso fresco de raíces y de vástagos, la altura de los mismos y la longitud de la raíz principal. Como puede verse en la Fig. 25, el peso fresco de los vástagos y de las raíces de las plantas inoculadas fue cerca de 30% y 8% mayor respectivamente que en las plantas control. También se observó, un pequeño, pero significativo aumento (cerca del 7%) en la altura de los vástagos. No se

observó ninguna diferencia significativa en la longitud de la raíz principal de las plantas inoculadas.

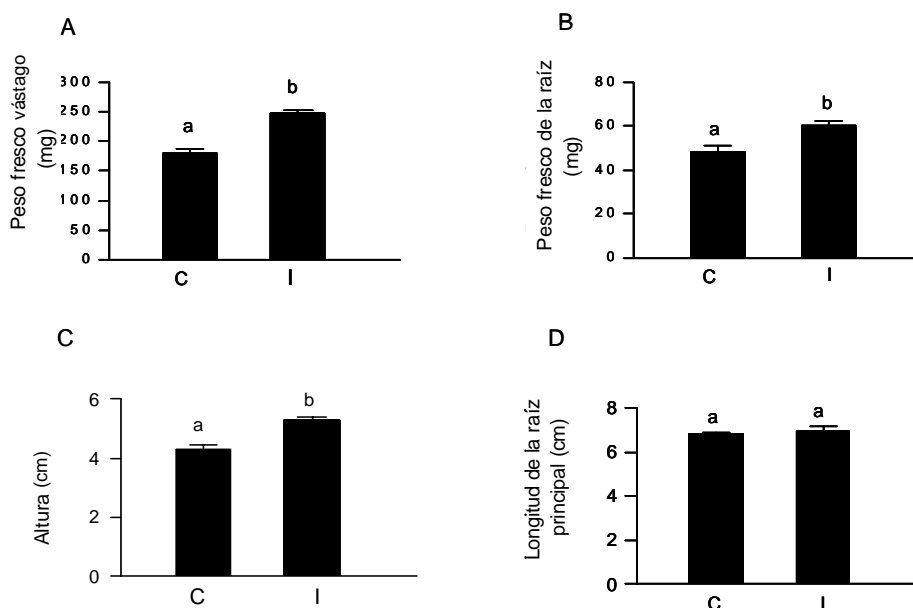


Figura 25. Efecto de la inoculación con *A. brasilense* sobre el crecimiento de plantas de tomate. Peso fresco de vástagos de tomate (A), peso fresco de la raíz (B), altura (C) y longitud de la raíz principal (D). Plantas control, C; plantas inoculadas, I. Las barras representan las medias \pm ES para n=20. Diferentes letras para cada parámetro significa que hay diferencias significativas para $P < 0,05$ (Test de Tukey).

2. Determinación del contenido de AIA

Varios autores han sugerido una relación directa entre crecimiento de las plantas y la producción de AIA por parte de la bacteria (Glick y col., 1999; Patten y Glick, 2002). Se midió el contenido total de AIA dado que no se puede discriminar entre el producido por la planta y el producido por la bacteria. La determinación se realizó tanto en raíces como en parte aérea a los 15 DDI. Como puede observarse en la Tabla 5, se detectó un incremento de 7 veces en los niveles de AIA en la parte aérea y de 19 veces en las raíces de las plantas inoculadas.

Tabla 5. Contenido de AIA en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*

Tratamiento	AIA ($\mu\text{g. g peso seco}^{-1}$)*	
	vástagos	raíces
Control	0,95	1,01
<i>A. brasilense</i>	7,06	18,96

* Los niveles de AIA se determinaron en vástagos y raíces de plantas a los 15 DDI. Los resultados corresponden a un experimento de dos realizados con un n=5.

Para confirmar que *A. brasilense* es una cepa productora de AIA se midió la cantidad de la hormona generada en un cultivo como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de AIA generada por 30 mL del cultivo bacteriano fue de $66,13 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esta cantidad

no da cuenta del incremento que se observa en las plantas inoculadas por lo cual hay que postular algún mecanismo de síntesis endógena de AIA inducido como consecuencia de la inoculación con *A. brasilense*.

3. Producción endógena de etileno

Debido a que el AIA es un regulador positivo de la síntesis de etileno (Abeles y col., 1992; Kende, 1993) y que éste media la promoción del crecimiento ejercido por las PGPRs, se midió la producción endógena de etileno en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*. Como se muestra en la Fig. 26, se observó un incremento del 40% en la producción endógena de la hormona en los vástagos de plantas inoculadas. En las raíces no se logró detectar producción de etileno.

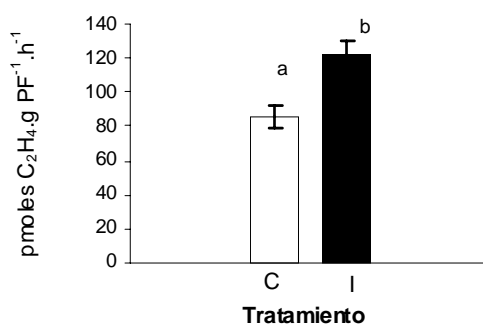


Figura 26. Producción de etileno en vástagos de plantas de tomate. La cantidad de etileno se midió como se indica en Materiales y Métodos. C, plantas control; I, plantas inoculadas. Los resultados son el promedio \pm ES de tres experimentos independientes con $n=20$. Letras distintas indican diferencias significativas para $P < 0,05$ (Test de Tukey).

4. Determinación de la actividad y expresión de ACS en plantas inoculadas

Para determinar si los cambios observados en la producción de etileno se correlacionaban con cambios en la actividad enzimática, se midió la actividad de ACS. Como se ve en la Fig. 27, panel A, se observó un aumento en la actividad de ACS en vástagos y raíces (27 y 100% respectivamente). En la parte aérea se encontró además una mayor cantidad de proteína como indica el inmunoblot (Fig. 27, panel B). No fue posible detectar la proteína en el ensayo de inmunoblot proveniente de muestras de raíces probablemente debido a la baja cantidad de proteínas que se extraen de raíz.

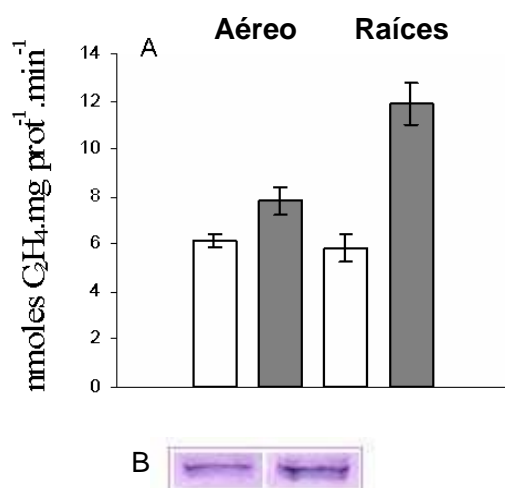


Figura 27. Actividad y expresión de ACS en plantas de tomate. Panel A, actividad ACS en la fracción S-100 de parte aérea y raíces medida como se describió en Materiales y Métodos. Barras blancas, plantas control, barras grises, plantas inoculadas. Panel B, immunoblot de la fracción S-100 de parte aérea utilizando el anticuerpo anti Le-ACS2. Se muestra el resultado de un experimento representativo de tres con similares resultados.

5. Efecto del tratamiento con ethephon

Si el aumento en los niveles de etileno es el responsable de los cambios observados en las plantas, el suplemento exógeno de etileno debería tener el mismo efecto. Con este propósito se incorporó al medio de cultivo ethephon, un compuesto liberador de etileno, y su efecto se comparó con el de *A. brasilense*. El ethephon fue ensayado a 10, 25, 50 y 100 μ M. Dado que 50 y 100 μ M tuvieron el mismo efecto, los experimentos que se muestran se llevaron a cabo con 50 μ M de ethephon. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Efecto del tratamiento con ethephon sobre el crecimiento de plantas de tomate a los 15 días de iniciado el tratamiento.

	Control*	Inoculado*	Ethephon*
Peso fresco aéreo (mg)	179,1 \pm 9,2 b	247,5 \pm 6,1 a	188,7 \pm 15,6 b
Peso fresco de raíz (mg)	48,15 \pm 2,7 b	59,72 \pm 2,6 a	50,35 \pm 3,2 b
Altura de los vástagos (cm)	4,3 \pm 0,2 b	5,3 \pm 0,1 a	4,4 \pm 0,1 b
Longitud de raíz principal (cm)	6,77 \pm 0,1 a	6,95 \pm 0,2 a	6,6 \pm 0,1 a
Superficie radical (cm²)	10,7 \pm 0,3 c	15,2 \pm 0,3 a	12,5 \pm 0,5 b

*Promedio \pm ES (n =12). Diferentes letras en una fila indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos para $P < 0,05$ (T, Test).

Como puede verse en la Tabla 6 la superficie radical aumentó 40% y 16% en las plantas inoculadas y las tratadas con ethephon respectivamente. No se observó ninguna diferencia en los otros parámetros entre el control y el ethephon. Estos resultados son coincidentes con las observaciones microscópicas, como se muestra en la Fig. 28 (A y B).

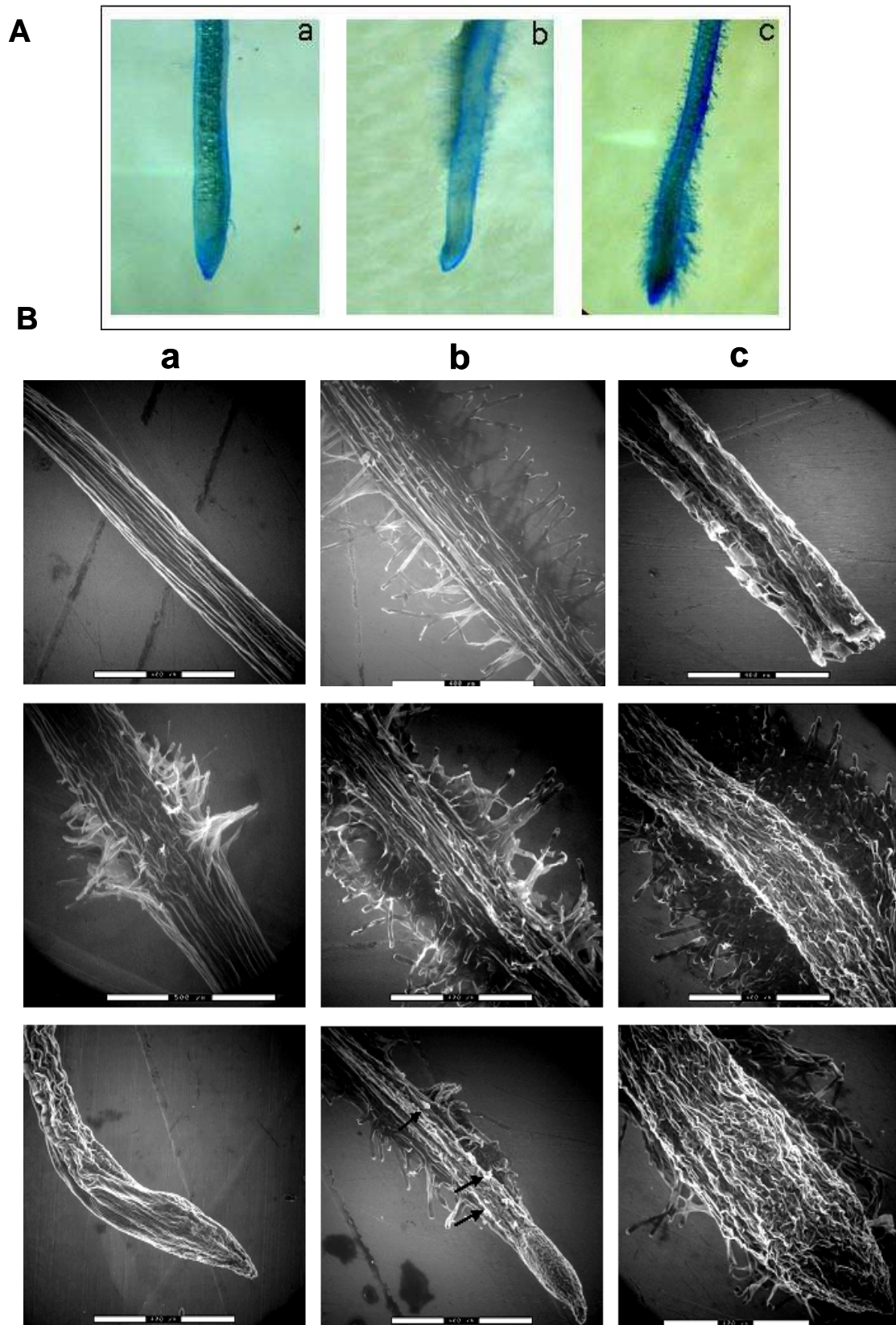


Figura 28. Pelos radiculares en plantas de tomate a los 15 días del tratamiento con ethephon o inoculadas. A. Microscopía óptica mostrando las puntas de las raíces laterales teñidas con azul de metileno:(a), plantas control; (b), plantas inoculadas; (c) plantas tratadas con ethephon. Magnificación: x20. B. Microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA) mostrando, desde la parte superior a la inferior, segmento basal, segmento medio, y tips de raíces de plantas de tomate (a), plantas control; (b), plantas inoculadas (c) plantas tratadas con ethephon. Las flechas señalan la presencia de las bacterias. Magnificación: x115.

En la Fig. 28 A se puede ver el patrón de distribución de pelos radiculares en los fragmentos terminales de las raíces. En el panel B, con mayor amplificación se observaron en las plantas control escasos pelos radiculares ubicados alrededor de los 2 mm por encima del tip en las plantas control. En las plantas inoculadas con *A. brasilense* se observó mayor cantidad de pelos con una distribución algo más uniforme a todo lo largo de la raíz mientras que las plantas tratadas con ethephon mostraron una concentración diferencial de abundantes pelos radiculares cerca del tip.

Las flechas en el panel B (b) señalan las bacterias sobre la superficie de las raíces de las plantas inoculadas.

6. Determinación de la longitud de los pelos radiculares

Se midió la longitud de los pelos radiculares en las plantas sometidas a los dos tratamientos y en las plantas control. En la Fig. 29 se muestran los resultados obtenidos.

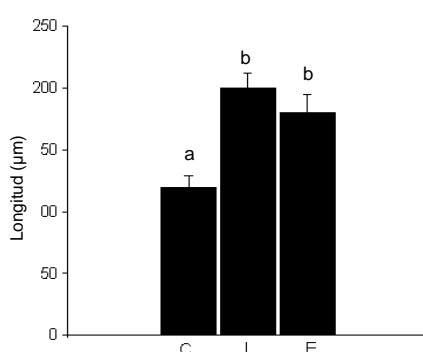


Figura 29. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* y de la presencia de ethephon sobre la longitud de los pelos radiculares. La longitud de los pelos fue medida en muestras de las plantas que se muestran en Fig 28. C, plantas control; I, plantas inoculadas; E, plantas tratadas con ethephon. Las barras representan la media \pm ES (n=15). Letras distintas indican diferencias significativas para $P < 0,05$ (Test de Tukey). La longitud de los pelos fue determinado usando el programa Image-Tool 3.0.

Como puede verse los pelos radiculares resultaron más largos en las plantas inoculadas y en las tratadas con ethephon.

7. Endofitismo bacteriano

Para confirmar la presencia de la bacteria en los tejidos de la planta, se realizó la extracción y el recuento de bacterias contenidas en los tejidos. Para ello, se molió la parte aérea y la radical, por separado, y se evaluó la presencia de bacterias como se describe en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos fueron $2,5 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ peso fresco para la parte aérea y de 3×10^6 UFC.g⁻¹ peso fresco para las raíces. No se recuperaron bacterias de

los tejidos de las plantas control. También se evaluó la presencia de las bacterias en el tejido vegetal por microscopía electrónica como puede verse en la Fig. 30. Tanto el recuento bacteriano del tejido radical y del aéreo, como la microscopía electrónica, evidenciaron la presencia de *A. brasilense* a los 15 días posteriores a la inoculación.

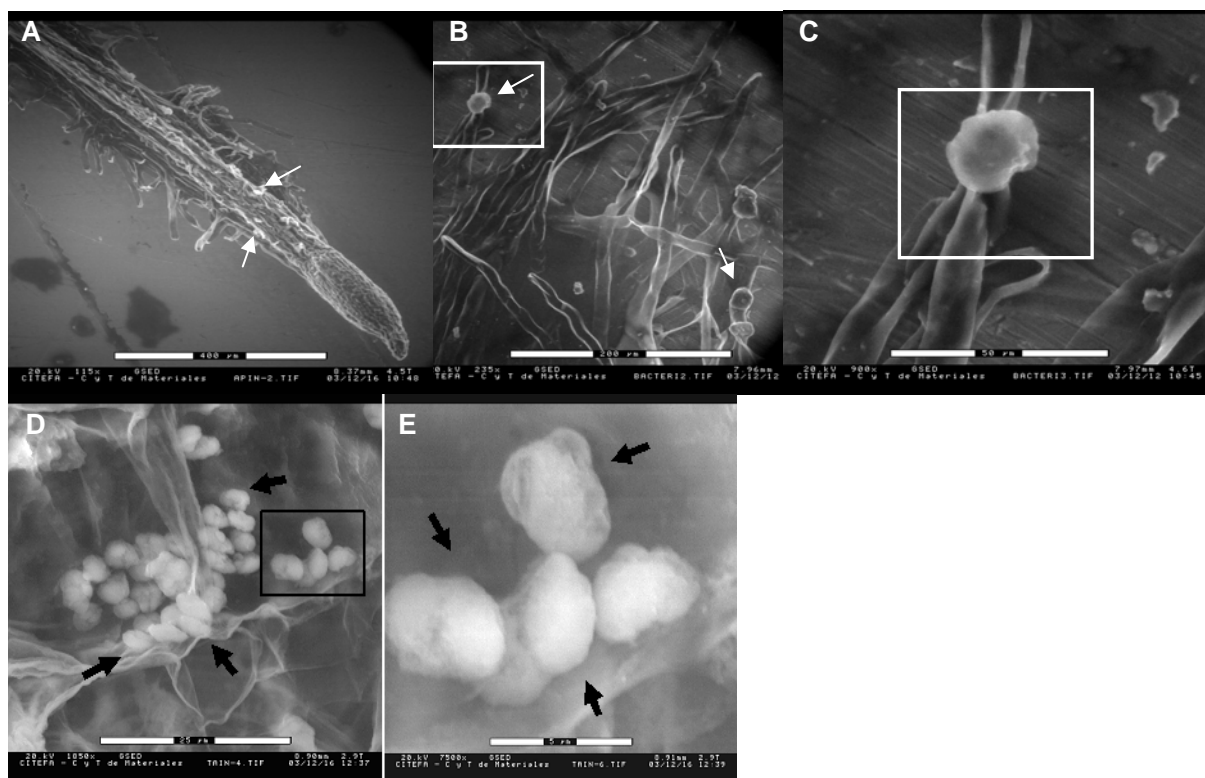


Figura 30. Microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA) de raíces y vástagos de plantas a los 15 DDI. En A se observa la raíz de una planta de tomate inoculada y la presencia de bacterias en la superficie de la misma señalada con flechas. En B, detalle de los pelos radiculares de A (las flechas señalan las bacterias). En C, detalle del recuadro de B. En D, se observan las bacterias contenidas en tejido xilemático de vástagos. En E, se muestra una ampliación de la zona recuadrada en D. Las flechas señalan la presencia de la bacteria en el interior del tejido.

8. Efecto del 1-MCP

Para comprobar si el etileno está efectivamente involucrado en la señalización de la promoción del crecimiento inducido por *Azospirillum* se cultivaron plantas en presencia de 1-MCP, bloqueante de la percepción de etileno (Sisler y Serek, 2003). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Los efectos de la inoculación fueron más evidentes en el peso fresco de la raíz y en la superficie radicular (alrededor del 98 y 68 % de aumento, respectivamente) y en ambos casos la presencia del antagonista de etileno tuvo un efecto bloqueante (30% y 16% de disminución respectivamente).

Tabla 7. Efecto del 1-MCP sobre los parámetros de crecimiento medidos a los 15 DDI en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*

	Tratamiento ^a	Sin agregados	Con 1-MCP
Vástagos (mg)	C	96,68 ± 6,5 a	91,08 ± 6,0 a
	I	92,0 ± 7,0 a	97,5 ± 12,1 a
Raíces (mg)	C	21,17±1,69 b	20,66 ± 2,29 b
	I	42,03 ± 6,06 a	29,33 ± 3,69 ab
Altura vástagos (cm)	C	4,91 ± 0,14 a	4,58 ± 0,18 a
	I	4,71 ± 0,16 a	4,51 ± 0,26 a
Longitud raíz principal (cm)	C	8,95 ± 0,20 a	9,01 ± 0,26 a
	I	8,32 ± 0,28 a	8,55 ± 0,27 a
Superficie radical (cm ²)	C	15,40 ± 0,99 c	18,85 ± 0,92 bc
	I	26,61 ± 1,0 a	22,27± 0,85 b

^a C, control; I, inoculado. Se muestran las medias ± ES (n=12). Diferentes letras en C y en I para cada parámetro significa que hay diferencias significativas para P< 0,05 (Test de Tukey).

En los datos que se muestran en la Tabla 7 se observa un menor desarrollo de la parte aérea que los mostrados en la Tabla 6. Esta diferencia podría deberse a las condiciones de crecimiento de las plantas para llevar a cabo el experimento ya que el uso del 1-MCP requiere que las plantas se desarrollen en un sistema cerrado que podría ser generador de estrés.

9. Efecto del 1-MCP sobre el desarrollo de pelos radiculares promovido por la inoculación con *A. brasilense*

La presencia de 1-MCP en el ambiente de crecimiento de las plantas de tomate inoculadas con *Azospirillum* resultó en una disminución del número de pelos radiculares (Fig. 31). En la Fig 31 A se observan raíces de plantas inoculadas con *A. brasilense*, (a la izquierda) e inoculadas y a su vez tratadas con 1-MCP (a la derecha). Las flechas señalan la acumulación de pelos radiculares obtenidos en cada caso. Como se puede ver en las plantas tratadas con 1-MCP disminuyó sensiblemente la densidad de los pelos radiculares. Esto sugiere que el efecto sobre la promoción del desarrollo de los pelos radiculares inducido por la inoculación depende de señales que involucran al etileno.

El efecto del 1-MCP sobre el crecimiento bacteriano se ensayó como se indica en Materiales y Métodos. Se comprobó que el 1-MCP no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

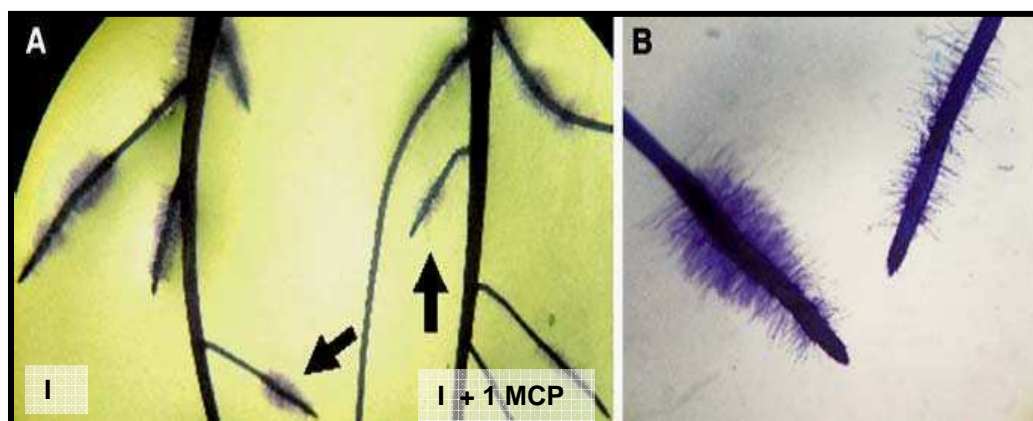


Figura 31. Efecto del 1-MCP sobre el desarrollo de los pelos radiculares promovido por la inoculación con *A. brasilense*. A, raíces de plantas de 15 DDI observadas con una magnificación de 10X. Las flechas señalan una raíz lateral de plantas de tomate inoculadas (I) o inoculadas que además recibieron 1-MCP (I+1 MCP). En B se muestra una magnificación (40X) de las raíces señaladas en A.

DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo demuestran que la inoculación de plántulas de tomate con *A. brasilense* promueve el crecimiento medido como aumento de la masa de tallos y raíces, altura de los tallos y superficie total de la raíz (Fig. 25 y Tabla 6). Estos resultados concuerdan con los informados previamente por Bashan, (1998) relativos al efecto de diferentes especies de *Azospirillum* sobre plantas de tomate.

Con el objetivo de investigar los mecanismos bioquímicos involucrados en esta interacción planta-bacteria se evaluaron los niveles de AIA y etileno, dos hormonas relacionadas con la promoción del crecimiento, especialmente con el desarrollo de la raíz (Riov y Yang, 1989). Se encontró que el contenido de AIA en las plantas inoculadas aumenta 7 y 19 veces en tallos y raíces respectivamente. Dado que *A. brasilense* es productora de AIA, los niveles de hormona medidos son la suma de los producidos por la bacteria y la planta. Es esperable que tal aumento en la producción de la hormona tenga consecuencias importantes en la fisiología de la planta. Por un lado, AIA puede activar *per se* señales bioquímicas que promuevan el crecimiento de la planta y por otro puede estimular la producción de etileno mediante la activación de la ACS (Abeles y col., 1992; Kende, 1993). Con respecto al etileno se encontró que su producción es mayor en plantas inoculadas y que el etileno suministrado exógenamente reproduce el efecto de la inoculación induciendo un aumento en la superficie de la raíz y en la longitud de los pelos radiculares (Fig. 28, Tabla 6 y Fig. 29). También se encontró que la actividad de ACS aumentó en tallo y raíces después de la inoculación, especialmente en estas últimas. Cuando se midió la expresión de ACS utilizando un anticuerpo anti la isoforma ACS2 se vió claramente un aumento en la cantidad de proteína presente en tallos. Los datos de actividad y expresión de ACS sugieren que ambas podrían estar moduladas en el proceso.

La observación microscópica de las raíces de las plantas inoculadas y de las tratadas con ethephon muestra que además de los cambios en la densidad de los pelos radiculares su distribución a lo largo de la raíz principal está alterada en estas últimas. Es importante notar que en este caso el aumento en el nivel de etileno está dissociado de un aumento de la concentración de AIA; como las auxinas también tienen un rol en el desarrollo de los pelos radiculares es posible que la alteración del balance AIA/etileno sea responsable de esta localización anormal de los pelos radiculares.

Los experimentos llevados a cabo utilizando 1-MCP, bloqueante de la percepción de etileno, indican que esta hormona es un regulador positivo del desarrollo de los pelos radiculares y en consecuencia del aumento de la superficie radicular y que es al menos una

de las señales que median el efecto de la inoculación con *A. brasilense* en plántulas de tomate.

Los pelos radiculares son proyecciones cilíndricas de las células epiteliales de la raíz y participan de procesos como la toma de agua y nutrientes, el establecimiento de la simbiosis y de estructuras de la planta relacionadas al parasitismo. En tomate la distribución de los pelos radiculares pertenece al tipo I en el cual todas las células radiculares tienen el potencial de producir pelos. En este tipo de raíces las condiciones ambientales tienen un marcado efecto sobre el desarrollo de los pelos radiculares (Tsai y col., 2004). Estudios recientes han demostrado que la localización y el crecimiento del pelo radicular están controlados por factores genéticos (Grierson y Schiefelbein, 2009) hormonales (Stepanova y col., 2007) y por el estado nutricional (Reymond y col., 2006).

El rol de las auxinas y el etileno como reguladores del crecimiento y desarrollo de las plantas ha sido ampliamente estudiado en varias especies vegetales (para una revisión, Santner y Estelle, 2009). Ambas hormonas juegan roles esenciales en el desarrollo de los pelos radiculares y en la distribución de los mismos como se ha probado con el uso de mutantes deficientes en diversos pasos de los respectivos senderos de señalización (Stepanova y Alonso, 2009).

En lo que se refiere a la participación del etileno se ha visto en *A. thaliana* que las mutantes sobreproductoras de etileno (*eto1-1,2,4*) tienen pelos radiculares más largos que las salvajes en las células tricoblásticas (células especializadas que originan los pelos radiculares). Más aún, la mutante *eto3* que produce más etileno que las anteriores, desarrolla pelos radiculares aún en las células que normalmente no los desarrollarían, las atricoblásticas. La participación del etileno se confirma aún más con el uso del inhibidor de su síntesis, AVG. Las plantas tratadas con este inhibidor tienen pelos más cortos e incluso cuando son tratadas con altas concentraciones del inhibidor no llegan a desarrollar pelos radiculares. Así mismo las mutaciones en algunas de las proteínas que codifican para componentes del sendero de transducción del etileno ponen de manifiesto el rol de esta hormona en la elongación del pelo radicular. Las mutantes en el receptor de etileno, ETR1 producen pelos radiculares entre 50 y 75% más cortos que los correspondientes a la salvaje. Por el contrario las plantas mutantes en CTR1 (*ctr1*) tienen pelos radiculares más largos que las salvajes. La mutante *ein2* tiene un fenotipo parecido al de las mutantes *etr1*. Las auxinas también juegan un rol esencial en el desarrollo de los pelos radiculares. Las mutantes de *Arabidopsis* defectivas en el transporte y en la transducción de señales de las auxinas tienen pelos más cortos que la salvaje o incluso pueden no tenerlos. El estudio de las mutantes *eir* (ethylene insensitive roots) demostró que el etileno regula el transporte de auxinas. Es posible que el sitio donde se inicia la formación del pelo radicular esté controlado por el etileno cuyo efecto se encuentra mediado por las auxinas (Dolam, 2001).

Por otro lado se ha observado que la inoculación de *Arabidopsis* con las PGPRs *B. megaterium*, *A. brasilense* y *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 afectan positivamente la elongación de los pelos radiculares (Desbrosses col., 2009; Galland y col., 2012) lo que indica que diferentes PGPRs tienen efectos similares sobre la estructura de la raíz y sugieren que este fenotipo es una respuesta típica a las bacterias benéficas. En estos casos se han asociado los senderos de transducción que involucran a las auxinas y al etileno en los cambios observados si bien existen algunas discrepancias entre los resultados de los distintos grupos de trabajo que llevan a diferentes hipótesis relativas al entrecruzamiento entre las señales mediadas por auxinas y etileno.

Nuestros resultados son evidencia fuerte para asignarle al etileno un rol intermediario en el sendero de señalización que lleva a un desarrollo aumentado de la densidad de los pelos radiculares en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* y se ven fuertemente apoyados por los antecedentes que se acaban de discutir. Debido a que un sistema radicular bien desarrollado juega un rol esencial en la incorporación de nutrientes mejorando la nutrición de las plantas, *A. brasilense* podría ser un componente importante en la formulación de biofertilizantes para la producción hortícola.

Para profundizar estos estudios a nivel de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados, se encaró un estudio del perfil transcripcional de las plántulas inoculadas con *A. brasilense* cuyos resultados se muestran en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO III

Variación de la expresión génica en la respuesta sistémica de *S. lycopersicum* a la inoculación con *A. brasilense*

La capacidad de las PGPRs de desencadenar procesos benéficos para el desarrollo de las plantas o para el gatillado de mecanismos de resistencia frente a diferentes generadores de estrés depende de que las bacterias puedan colonizar a la planta. Para que esta relación benéfica planta/bacteria se establezca es necesario que la compleja red de reacciones defensivas de la planta discrimine de alguna forma, no conocida por el momento, a las PGPRs como no patógenos. Con el objeto de profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos involucrados en esta interacción se llevó a cabo un análisis global de los transcritos en la parte aérea y de las proteínas expresadas en parte aérea y radical de plantas de tomate a los 7 y 14 días posteriores a la inoculación con *A. brasilense*.

1. Análisis transcriptómico

Como se describió en Materiales y Métodos, se utilizaron las matrices de ADNc TOM1 y se encontraron cambios en los perfiles de expresión inducidos por la inoculación. Los datos obtenidos fueron analizados por el equipo del Dr Granell Richart (Universidad Politécnica de Valencia, España). Después de los procesos de filtrado y normalización de los resultados quedaron para el análisis 12080 ADNc (aproximadamente 90% de los 13440 que contiene la micromatriz TOM1). Los cambios significativos en los niveles de expresión, entre plantas inoculadas y control se determinaron mediante un análisis ANOVA de una vía para grupos múltiples considerando las réplicas técnicas de cada grupo. Este análisis rindió 6049 elementos significativos (considerando como significativo un valor p inferior a 0,05). Finalmente se aplicó un filtro para eliminar aquellos elementos con valores perdidos (ausentes en alguna de las micromatrices consideradas en el análisis, incluidas las réplicas). Un total de 5494 ADNc pasaron el filtro, aproximadamente un 41% de los que contiene la micromatriz TOM1.

En el agrupamiento de los patrones de expresión se utilizó el programa SOM 5x4 (self-organizing map), un método de agrupamiento no jerárquico. Para este agrupamiento se han utilizado las medias de las cuatro replicas de los mensajeros encontrados como significativamente diferentes en el ANOVA (Fig 32).

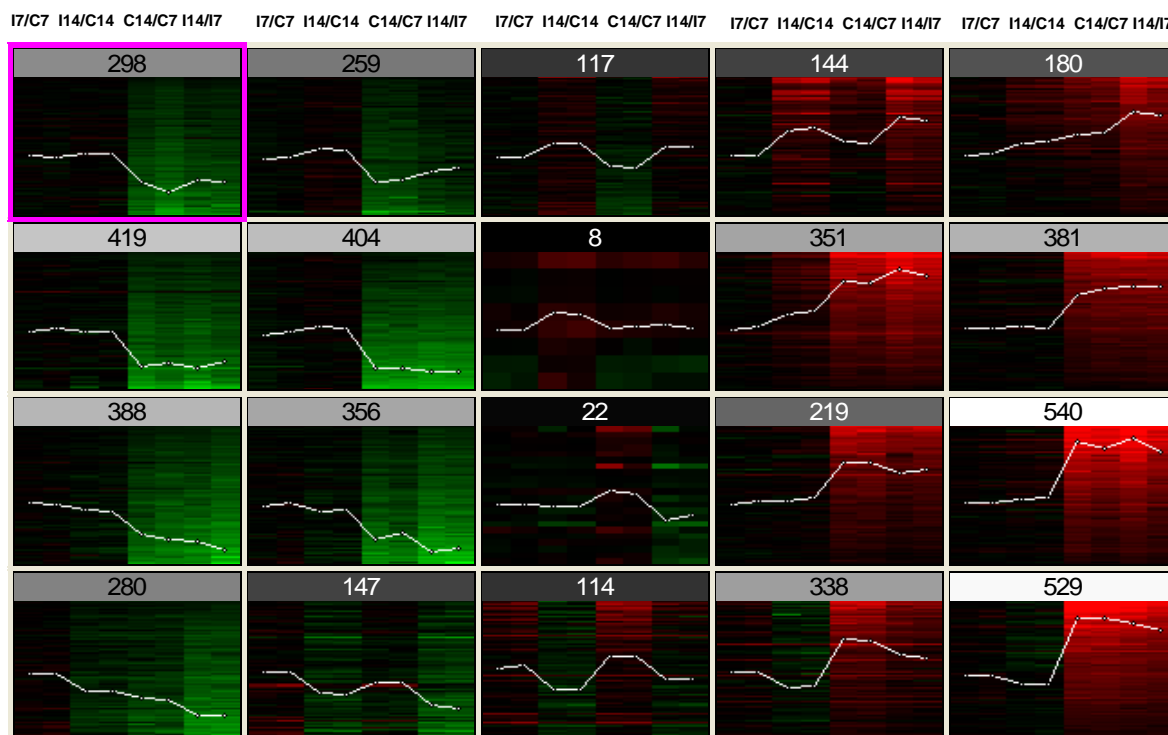


Figura 32. Análisis de agrupamiento no jerárquico de los perfiles de expresión mediante mapas autoorganizados (SOM) de las 5494 sondas diferenciales en plantas inoculadas con *A. brasilense*. Se muestra el agrupamiento en 20 grupos SOM resultantes de un análisis 5x4. En rojo se representan los valores de inducción, en verde se representan los valores de represión y en negro los valores que no cambian. En cada SOM se muestra una línea representativa del perfil promedio del grupo y en la parte superior el número de sondas que se incluyen dentro del perfil.

El análisis de las diferencias entre los tratamientos, plantas inoculadas y plantas control a los 7 DDI y entre plantas inoculadas y plantas control a los 14 DDI se realizó usando el Test de Student de una vía (one sample t-test). En los Anexos 2 a 5 que se encuentran al final de esta Tesis se presenta el listado de aquellos genes cuya expresión cambió debido a la inoculación con *A. brasilense* en forma estadísticamente significativa en las dos micromatrices utilizadas y cuyo promedio entre las dos micromatrices tuviera un Fold change de al menos 0,9 y -0,9 (equivalente a prácticamente un cambio de dos veces en la expresión). En estos Anexos, además del nombre de la proteína codificada por el gen se indica el ID, que es el identificador del “probe” depositado en la micromatriz y el “Fold change” que es el logaritmo en base 2 de la relación entre la expresión del gen en la planta inoculada y la planta control ($\log_2 I/C$). Se analizaron también, por las razones que se comentarán en cada caso, variaciones en la expresión de unos pocos genes en los cuales los cambios fueron menores.

1.2. Genes diferencialmente expresados en la planta a los 7 días posteriores a la inoculación

Se identificaron 24 genes sobre expresados (Anexo 2) y 1 sub expresado a los 7 DDI (Anexo 3).

1.2.1. Genes sobre expresados

Los 24 genes sobre expresados pertenecen a las siguientes categorías funcionales, proteínas PR (25%), metabolismo (17%), factores de transcripción (13%), señalización y biosíntesis de hormonas (8%), relacionados con la defensa (4%), transporte (4%), respuesta al daño (8%) y proteínas de función desconocida o hipotética (21%).

En la Fig. 33 se muestra en un esquema el porcentaje de las categorías funcionales comentado más arriba. Es importante señalar el alto porcentaje de proteínas PR sobre expresadas a los 7 DDI; ninguno de los genes de esta categoría resultó reprimido.

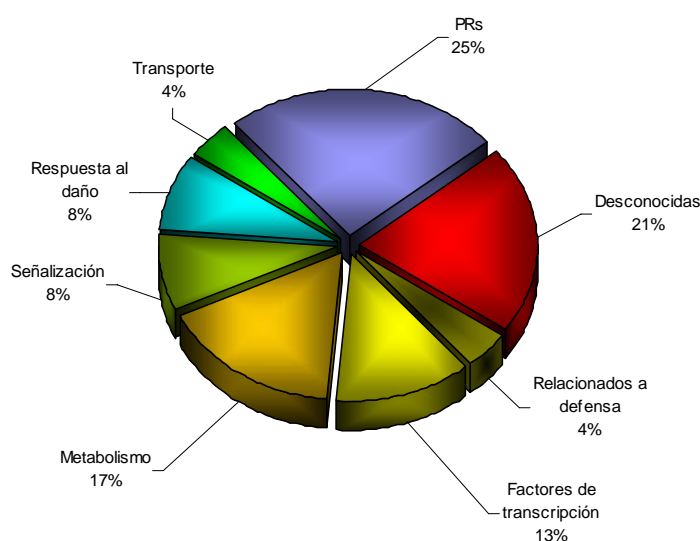


Figura 33. Representación porcentual de las categorías funcionales de genes sobre expresados a los 7 DDI.

Entre los genes sobre expresados las dos categorías funcionales más numerosas (exceptuando los genes desconocidos) pertenecen a los relacionados con los cambios que la bacteria induce en la planta: **promoción del crecimiento y aumento de la resistencia a las enfermedades.**

Los genes que probablemente estén relacionados con la promoción del crecimiento son los involucrados en el metabolismo de los hidratos de carbono como β -galactosidasa

(Fold change: 0,939) y β -amilasa (Fold change: 1,07). Dado el rol conocido de las auxinas en el crecimiento es posible que el gen SAUR-like protein (Fold change: 1,234, Anexo 2), que interviene en el camino de señalización de auxinas tenga también un rol en la promoción del crecimiento.

Los genes relacionados con un aumento de la resistencia a las enfermedades son los de las proteínas PR, los de algunos factores de transcripción, los relacionados con el metabolismo secundario y los de algunas proteínas relacionadas con los senderos de señalización involucrados en la respuesta a distintos tipos de estrés. En nuestro caso resulta interesante destacar que los genes de varias proteínas clasificadas como PRs se encuentran sensiblemente sobre expresados a los 7 DDI: proteína STH-2 (PR10 a) (Fold change: 4,815); precursor de endoquitinasa (Fold change: 2,709); precursor de PR P23 (Fold change: 1,936); precursor de PR1b (Fold change: 2,453) y proteína TSI (PR10) (Fold change: 0,973). Estos genes se han encontrado sobre expresados en plantas de tomate infectadas con patógenos como *Phytophthora infestans* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Matton y Brisson, 1989) *Cladosporium fulvum* (Danhash y col., 1993), con *P. syringae* (Cohn y Martin, 2005) y con el viroide de la corteza externa de los cítricos (CEVd), (Rodrigo y col., 1993). También se ha demostrado que algunos componentes de los senderos de respuesta a diferentes tipos de estrés como MeJA, SA, ABA, GA₃, H₂O₂ y Cu²⁺ conducen a la sobre expresión de los niveles de mensajeros de TSI (PR10) (Jia y Martin, 1999). Esta proteína tiene actividad ribonucleotídica y antimicrobiana y además participa en la senescencia y el desarrollo de las plantas.

El aumento en la expresión del factor de transcripción Pti4 (Fold change: 1,199) es también una señal de encendido de mecanismos de defensa en la colonización por *A. brasilense*. Pti4 pertenece a la familia ERF (ethylene responsive factors) y forma parte del sendero de activación de proteínas de defensa que se activa cuando el receptor PRF reconoce al efector patogénico AvrPto (Introducción, Fig.12). Se encontró también sobre expresado el gen de una peroxidasa (Fold change: 1,231) que aumenta en los procesos de defensa frente a patógenos como en tomate infectado con *P. infestans* (Matton y Brisson, 1989). La Fosfatasa de Proteínas 2C (Fold change: 0,976) también se encuentra sobre expresada. A esta fosfatasa se le asigna un rol importante en la respuesta inducida por el efector AvrRpm1 en *A. thaliana* (Introducción, Fig. 7); esta enzima tiene una función dual, es decir que actúa tanto en la regulación positiva como negativa de la expresión de los genes de defensa (Widjaja y col., 2010).

Dado que *Azospirillum* establece una asociación no patogénica con la planta, la sobre expresión de proteínas PR resulta significativa. Como antecedente de la sobre expresión de PRs en respuesta a la colonización por una PGPR endofítica, existe el caso de Actinobacterias y *A. thaliana* (Conn y col., 2008). Rocha y col., 2007 encontraron que la

colonización de caña de azúcar por *H. seropedicae* resulta en la sobre expresión de la proteína PR1. Las proteínas PR1, PR2, PR5 y PDF-1 se encuentran sobre expresadas en las interacciones benéficas entre *A. thaliana* y *P. putida* y *Bacillus cereus* (Ahn y col., 2007; Niu y col., 2011, respectivamente). Los autores sugieren como una probable explicación que la expresión de estas PRs permitiría a la planta limitar el crecimiento de la bacteria para que no se torne patogénica.

Validación de los resultados de expresión génica

A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR

Los resultados obtenidos mediante el uso de micromatrices, fueron validados utilizando la técnica RT-PCR como se describió en Materiales y Métodos. Para llevar a cabo esta corroboración se eligieron genes, que como se comentó en el ítem anterior, resultaron significativos por su participación relevante en las distintas rutas de respuesta en la interacción planta/bacteria en otros modelos.

Si bien los resultados comentados arriba se obtuvieron utilizando muestras de tejido aéreo pareció interesante incluir el estudio de la expresión de algunos genes en raíz.

Para los experimentos de RT-PCR los cebadores específicos para los genes seleccionados se diseñaron en base a las secuencias disponibles en bancos de datos y se muestran en Materiales y Métodos (Tabla 2); los programas de amplificación utilizados se describen en el Anexo 1. En el Anexo 6 se resumen los datos de validación por RT-PCR de los genes elegidos.

Expresión de genes correspondientes a proteínas de defensa

En la Fig. 34 se muestran los resultados obtenidos por RT-PCR de la expresión de los genes *Le-PR1b* y *Le-PR P23*. Se incluyeron en el estudio plantas tratadas con SA o infectadas con el patógeno *X. campestris pv vesicatoria* como controles de la vía SAR y plantas tratadas con MeJA, como control de vía ISR. Se incluyó también el análisis de la expresión del gen *Le-PR2* (Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa) como control de un gen cuya expresión no se vió modificada en el estudio de micromatrices.

Como puede verse en la Fig. 34, panel A, la expresión de los genes *PR1b* y *PR P23* aparece aumentada en las plantas inoculadas con *A. brasilense*. Los valores detectados fueron 1,6 y 4 veces mayores respectivamente que los de los mensajeros correspondientes en plantas control (Fig. 34 panel B). Puede verse también en la Fig. 34 (paneles A y B) que no se observaron cambios en los niveles de expresión de *PR2* como consecuencia de la inoculación con *A. brasilense*. Todos estos resultados confirman los obtenidos en las

micromatrices. Los tratamientos con SA y MeJA indujeron un aumento de aproximadamente 5 y 8 veces respectivamente en la expresión de *PR1b* y de 8 y 9 veces en la expresión de *PR P23* lo cual indica que en tomate la expresión de estas PRs podría estar relacionada con ambas vías, SAR e ISR. La inoculación con el patógeno generó un aumento marcado (casi dos veces) en la expresión de *PR1b* y de tres veces en la de *PR P23*, como era de esperar para la respuesta frente a un patógeno. La expresión de *Le-PR2* respondió a MeJA (1,4 veces) y no se observan cambios con SA y con el patógeno.

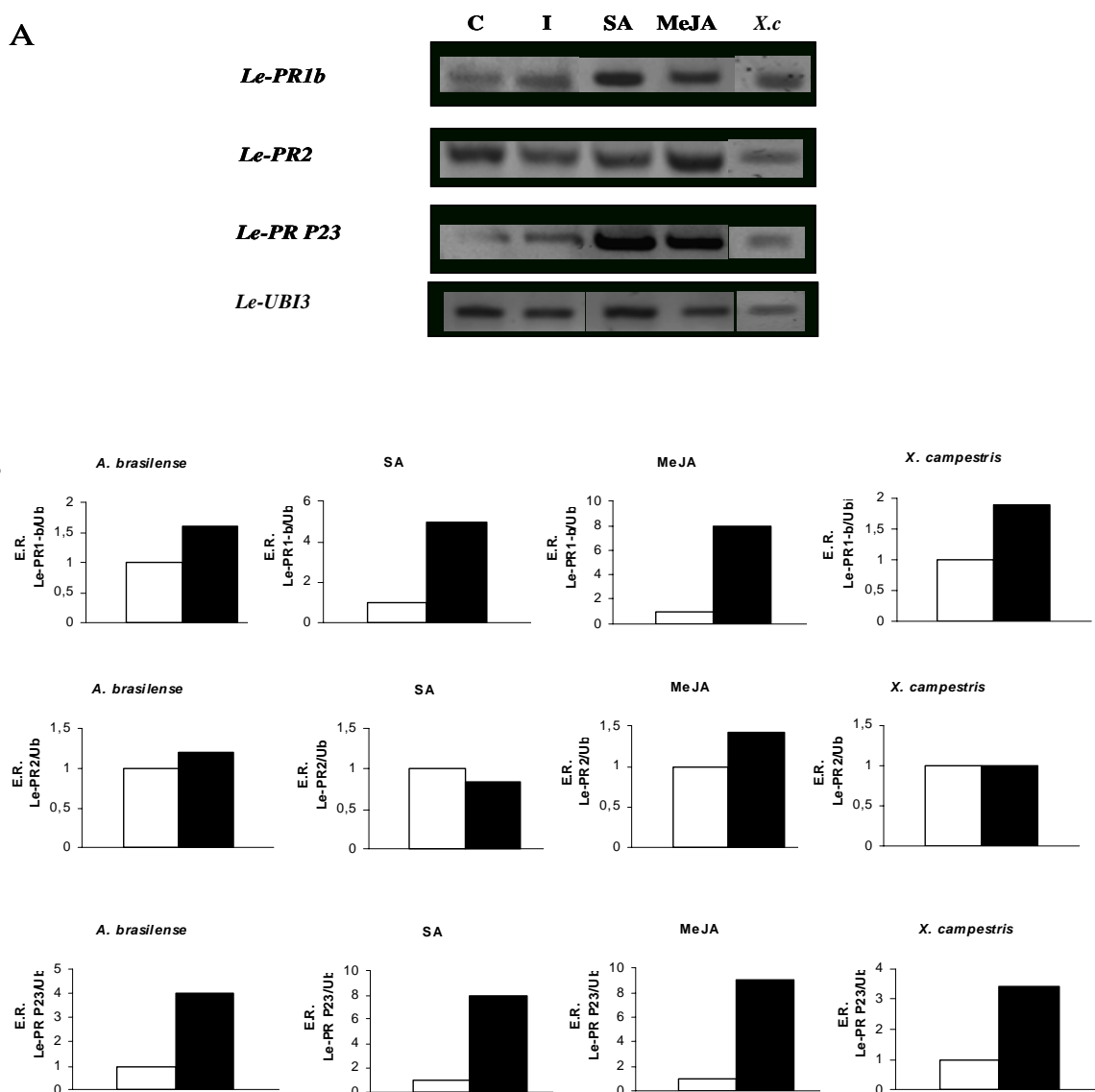


Figura 34. Expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta a la inoculación de *A. brasiliense* en plantas de *S. lycopersicum*. A, acumulación de transcritos en parte aérea de plantas de tomate a los 7 DDI. C: plantas control; I: plantas inoculadas; SA, plantas tratadas con 0,5 mM de ácido salicílico; MeJA, plantas tratadas con metil jasmonato; X.c, plantas infectadas con *X. campestris pv. vesicatoria*. B, cuantificación de las señales detectadas normalizadas a los valores de ubiquitina en cada caso. A los controles se les asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas tratadas con SA o MeJA o inoculadas con *A. brasiliense* o con *X. campestris* como se señala en cada uno de los gráficos.

Expresión del factor de transcripción *Pti4*

En la Fig. 35 se muestran los resultados de amplificación del gen correspondiente al factor de transcripción *Pti4* que, como se comentó más arriba se encontró inducido en el estudio de micromatrices (Anexo 2).

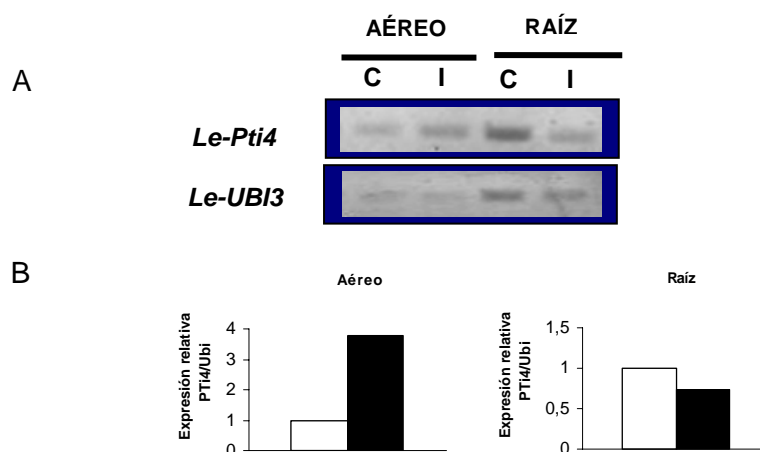


Figura 35. Expresión diferencial del factor de transcripción *Pti4* en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en parte aérea y radicular de plantas de tomate a los 7 DDI. C: plantas control; I: plantas inoculadas. B, cuantificación de las señales detectadas normalizadas a los valores de ubiquitina en cada caso. A los controles se les asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas inoculadas con *A. brasilense*.

Como se puede ver en la parte aérea se encontró un aumento de 3,5 veces en la expresión del gen de *Pti4*. En las raíces la expresión del gen en las muestras inoculadas fue menor que en el control. El resultado de la parte aérea confirma la sobre expresión de *Pti4*.

Expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas

Como se comentó en el Capítulo 2, nuestros resultados sugieren fuertemente que el proceso de promoción del crecimiento inducido por *A. brasilense* y evaluado a los 15 DDI involucra un sendero de transducción de señales en el que el etileno juega un rol central. El aumento en la expresión de la enzima ACS2 fue uno de los resultados tomados en cuenta en aquella conclusión. Los resultados de las micromatrices no mostraron cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas a los 7 DDI. Para corroborar que el aumento de la expresión de ACS2 no se manifiesta a los 7 DDI se evaluó su expresión en estas muestras por RT-PCR. Como controles positivos se incluyeron los tratamientos con SA y MeJA (Rao y col., 2002; Mizuno y col., 2006, respectivamente).

Como se observa en la Fig. 36, no se detectó mensajero de *Le-ACS2* en plantas control e inoculadas. Los tratamientos con SA y MeJA, estimularon levemente la expresión de *Le-ACS2*. Se puede concluir que la planta a los 7 DDI es capaz de responder a estímulos como el SA y el MeJA aumentando la transcripción de *Le-ACS2*. La inoculación con *A. brasilense* no tuvo este efecto.

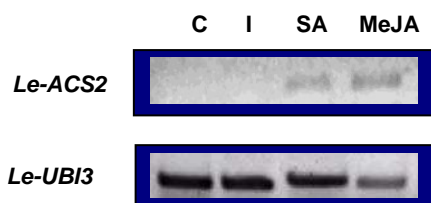


Figura 36. Expresión diferencial del gen *Le-ACS2* en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. Acumulación de transcritos en parte aérea de plantas de tomate a los 7 DDI. C: plantas control; I: plantas inoculadas; SA plantas tratadas con 0,5 mM de ácido salicílico, MeJA plantas tratadas con metil jasmonato.

B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína

Determinación de la expresión de la proteína PR P23

Utilizando un anticuerpo anti PR P23 de tomate se evaluó la expresión de la proteína mediante la técnica de Western blot y se obtuvieron los resultados que se observan en la Fig.37. Como se puede ver la expresión de la proteína PR P23 fue mayor en las plantas inoculadas que en los controles. El resultado obtenido en parte aérea es congruente con los obtenidos en los experimentos de RT-PCR y en las micromatrices.

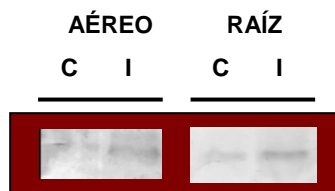


Figura 37: Expresión de la proteína PR P23 en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. Las proteínas fueron corridas en SDS-PAGE 12%, transferidas a membrana de PVDF como se describe en Materiales y Métodos y enfrentadas con el anticuerpo anti PR P23 de *S. lycopersicum*. C: plantas control. I: plantas inoculadas. El control de carga de proteína en cada carril se realizó por tinción con Ponceau previa a la inmunodetección.

1.2.2. Genes reprimidos

En las muestras de 7 DDI se encontraron sólo seis genes reprimidos. El único gen que varió en forma apreciable, es el de flavonoid-1-2 ramnosil transferasa (Fold change: -1,048, Anexo 3). Esta transferasa interviene en la síntesis de flavonoides cuya función entre otras es la de defensa frente a patógenos. El gen de citocromo P450 se sub expresó menos de dos veces (Fold change: -0,688).

Validación de los resultados de expresión génica

Como el gen de la citocromo P450 se encontró sensiblemente sub expresado en *A. thaliana* inoculada con dos especies de la PGPR *P. fluorescens* (Wang y col., 2005; Verhagen y col., 2004), y sin cambios significativos en *A. thaliana* inoculada con la PGPR *Bradyrhizobium* (Cartieaux y col., 2008) y además interviene en la cascada de transducción de señales que involucra a Pti4, pareció interesante corroborar por RT-PCR el resultado obtenido en las micromatrices.

Amplificación por RT-PCR

En el experimento de amplificación del gen de Cyt P450 se incluyeron como controles positivos tratamientos con SA y MeJA.

Como se puede ver en la Fig. 38 la expresión del gen citocromo P450 prácticamente no varió con la inoculación, sin embargo el sistema respondió a SA y MeJA con un aumento en la expresión del orden del 60 y 100% respectivamente como era esperable.

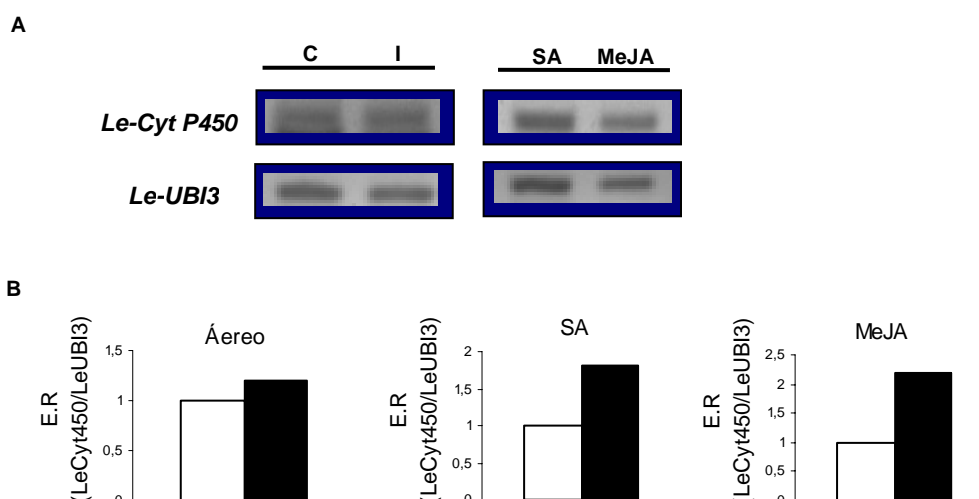


Figura 38: Expresión diferencial del gen Cyt P450 en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en parte aérea de plantas de tomate a los 7 DDI. C: plantas control; I: plantas inoculadas; SA plantas tratadas con 0,5 mM de ácido salicílico, MeJA plantas tratadas con metil jasmonato. B Las señales detectadas fueron cuantificadas como se indica en Materiales y Métodos y normalizadas a los de ubiquitina en cada caso. Al control se le asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas tratadas con SA o MeJA o inoculadas con *A. brasilense* como se señala en cada uno de los gráficos.

1.3. Genes diferencialmente expresados en la planta a los 14 días posteriores a la inoculación

En este estudio se identificaron 87 genes que fueron diferencialmente expresados en respuesta a la inoculación con *A. brasilense* (Anexo 4). De los 87 genes identificados, 60 fueron inducidos y 27 reprimidos. En la Fig. 39 se muestra el porcentaje de las categorías funcionales de los genes sobre expresados y reprimidos.

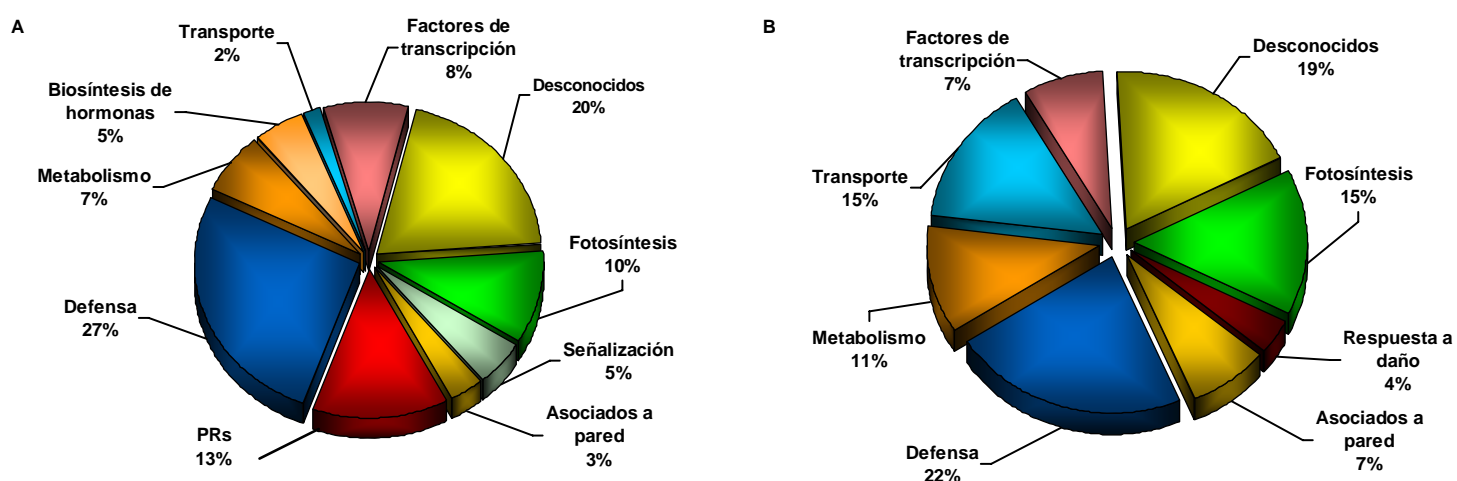


Figura 39. Representación porcentual de las categorías funcionales de genes sobre expresados (A) y reprimidos (B) a los 14 DDI.

1.3.1. Genes sobre expresados

A los 14 DDI se encontraron sobre expresados de manera significativa los genes de proteínas PR y los genes relacionados con la defensa.

Genes relacionados con proteínas de la patogénesis

A los 14 DDI se siguieron sobre expresando los genes de PR1b (inducible por etileno, Fold change: 3,143), PR P23 (Fold change: 1,409) y PR10 (Fold change: 1,213) y aparecieron sobre expresadas cinco nuevas PRs: PR1a (Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor, P4, Fold change: 2,395), quitinasa clase IV (PR3, Fold change: 1,589), Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa (PR2, Fold change: 1,5), Probable glutation S-transferasa (Pathogenesis Related-1, Fold change: 1,205). Todas estas PRs se han encontrado

fuertemente inducidas en plantas de tomate infectadas por los patógenos *C. fulvum* (Danhash y col., 1993), *P. syringae* (Cohn y Martin, 2005) y *P. infestans* (Matton y Brisson, 1989).

Genes relacionados con la defensa

Varios genes relacionados con la defensa se encontraron sobre expresados en nuestro sistema. Nos referiremos a continuación someramente a algunos de ellos.

La inoculación con *A. brasilense* indujo la expresión de genes de tres proteínas pertenecientes a la familia de los inhibidores de proteasas: Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP, Fold change: 1,394); Ethylene-responsive proteinase inhibitor I precursor (Fold change: 1,471); Wound-induced proteinase inhibitor I precursor (Fold change: 1,414). Los inhibidores de proteasas de plantas tienen un importante rol en la defensa contra la herbivoría y se encuentran también inducidos en plantas de tomate infectadas por los patógenos *P. infestans* y *P. syringae*.

También se indujo en nuestro sistema un Precursor de peroxidasa (Fold change: 1,358) que se encuentra reprimida en infecciones con *P. syringae* (Cohn y Martin, 2005).

Una peroxidasa secretoria, Ligin forming anionic peroxidase (Fold change: 1,358) también se encontró sobre expresada. Esta peroxidasa se encuentra en el espacio extracelular o en la vacuola y está implicada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, en el catabolismo de auxinas, en la biosíntesis de lignina y en la respuesta a estrés (Choi y col., 2007). La infección por el patógeno *P. infestans* también induce la expresión de esta peroxidasa (Matton y Brisson, 1989).

El gen de Snakin 2 que también se sobre expresó con un Fold change: 1,216, corresponde a un péptido rico en cisteína con actividad antimicrobiana que aumenta la resistencia a *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia chrysanthemi* en papa (Berrocal-Lobo y col., 2002). Snakin 2 pertenece a una familia de péptidos que cumplen una función importante en defensa, generalmente se encuentran presentes en todos los tejidos, algunos son expresados en forma constitutiva y otros son inducibles por patógenos. Se demostró que en papa Snakin-2 (*StSN2*) se induce localmente por daño (Berrocal-Lobo y col., 2002). Recientemente se ha demostrado en tomate que la sobreexpresión de este péptido limita el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* (Balaji y Smart, 2012).

Dos genes de respuesta a harpinas aparecieron sobre expresados: Hin1-like protein (Fold-change: 1,248) y Harpin-induced protein-related/HIN1-related (Fold-change: 1,085). Las bacterias Gram negativas patógenas de plantas, a través de su sistema de secreción tipo III, secretan proteínas de la familia de las harpinas. Estas proteínas inducen en las plantas no huésped la muerte celular, aumentan la tolerancia a la desecación, la defensa

contra insectos y despierta múltiples respuestas defensivas que incluyen SAR mediado por SA, JA o ET (Zhang y col., 2011).

También se observó la inducción del gen de una proteasa, la ClpC protease (Fold-change: 1,198). Las proteasas Clp representan una gran familia de proteasas dependientes de ATP que en plantas superiores se encuentran localizadas en los cloroplastos. En *A. thaliana* participa en los mecanismos de defensa (Rosano y col., 2011).

Se sobre expresó también el gen de una proteína inhibidora de proteasa transferidora de lípidos (Fold-change: 1,394). Estas proteínas están involucradas en varios procesos fisiológicos, en la defensa contra patógenos y en la interacción planta-microorganismo ya que inhiben la respuesta hipersensible (Blein y col., 2002).

Genes relacionados con la pared celular

El gen de una proteína inducida por siringolina, la xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3, (Fold change: 0,906), clave en los procesos de remodelación de la pared celular, también fue sobre expresado. Siringolina es un péptido efector de *P. syringae* (Cohn y Martin, 2005) que induce genes de resistencia en la planta (Matton y Brisson, 1989). No existe información sobre la existencia de siringolina u otro péptido relacionado en *A. brasilense*, sin embargo la sobre expresión de genes relacionados con la síntesis de pared es una respuesta general de la planta a la presencia de microorganismos.

Otro gen relacionado con la síntesis de pared y que se encontró sobre expresado es el de la MIOX4 (mio inositol oxigenasa 4, Fold change: 1,366). La inositol oxigenasa está involucrada en la biosíntesis de ácido UDP-glucurónico (UDP-GlcA), intermediario en la síntesis de polímeros que forman la pared celular (Kanter y col., 2005).

Genes relacionados con el metabolismo

Se encontraron sobre expresados tres genes de enzimas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos: treonina deaminasa (Fold change: 1,053), lisina-cetoglutarato reductasa (Fold change: 0,928) y la hidroxifenil piruvato dioxigenasa (Fold change: 0,936).

Otro gen sobre expresado fue el de la GTP ciclohidrolasa (Fold change: 1,037) relacionado con la síntesis de riboflavina.

Genes relacionados con el transporte

Apareció inducido en forma relevante un transportador de hexosas (Fold change: 1,382) que presenta homología con los transportadores *LeHT1* y *LeHT2* que pertenecen a una superfamilia de transportadores localizados en membrana plasmática que presentan 12 dominios transmembrana (Gear y col., 2000). Los transportadores de hexosas y disacáridos

permiten coordinar el intercambio de azúcares bajo distintas condiciones ambientales y en la interacción con los microorganismos. Este gen se ha encontrado sobreexpresado en plantas de tomate infectadas con el patógeno bacteriano *P. syringae* pv tomato (Cohn y Martin, 2005).

Genes relacionados con la biosíntesis de hormonas

El gen de la ACS4 (Fold change: 0,972), enzima clave en la síntesis de etileno se encontró sobre expresado en nuestro sistema. La misma respuesta fue informada para la infección por *P. infestans* y *P. syringae* (Cohn y Martin, 2005; Matton y Brisson, 1989).

También son importantes los cambios de los genes observados en los genes relacionados con la síntesis de oxilipinas y jasmónico y sus derivados: la lipoxigenasa LX3 (Fold change: 1,768) y la aleno óxido sintasa (Fold change: 1,389). Las lipoxigenasas catalizan la oxigenación inicial de los ácidos grasos poliinsaturados que lleva a la síntesis de oxilipinas (Hamberg y col., 2003). La aleno oxidasa es una de las enzimas que modifica los productos de las lipoxigenasas generando intermediarios en la síntesis de jasmónico y otras oxilipinas.

Genes correspondientes a factores de transcripción

De los genes de factores de transcripción sobre expresados después de la inoculación, dos pertenecen a familias cuya participación en los procesos de señalización inducidos por la interacción planta-microorganismo han sido demostrados en otros sistemas. Uno de ellos con un Fold change de 1,33, pertenece a la familia WRKY (con alta homología a WRKY41 y a WRKY53 de *A. thaliana*) algunos de cuyos miembros intervienen en la respuesta a la flagelina de *P. syringae* y en la respuesta ISR a *B. japonicum*, probablemente mediada por etileno, ambos en *A. thaliana* (Higashi y col., 2008; Cartieaux y col., 2008).

El otro factor de transcripción que se encontró sobre expresado pertenece a la familia de los MYB. Este factor de transcripción (Fold change: 1,33) presenta alta homología con MYB111 y MYB59 de *A. thaliana*. La expresión de estas proteínas ha sido relacionada con el metabolismo secundario (por ejemplo la síntesis de flavonoides), desarrollo de la raíz, regulación de muerte celular, tolerancia a estrés y patógenos (Mu y col., 2009).

Van der Ent y col., (2008) demostraron que el factor MYB72 tiene un rol fundamental en las primeras etapas de señalización para el establecimiento de una respuesta ISR mediada por etileno e inducida por la bacteria no patogénica *P. fluorescens* WCS417r. En la Fig. 8 de la Introducción se muestra la ubicación probable del MYB72 en un modelo de respuesta ISR. Sin embargo la función biológica de la mayoría de los factores MYB es desconocida (Van der Ent y col., 2008).

Genes relacionados con fotosíntesis

El gen de la Ribulosa bifosfato carboxilasa (subunidad menor) (Fold change: 1,26) apareció sobre expresado en esta interacción PGPR-tomate. En *A. thaliana* infectada por *P. syringae*, este mismo gen aparece reprimido (Cartieaux y col., 2007).

El gen de la proteína oxigen-evolving complex de 25.6 kD correspondiente a una proteína del complejo escindidor del agua del fotosistema II también apareció sobre expresada (Fold change: 2,766).

Validación de los resultados de expresión génica

A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR

Se evaluó la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PRs) y con la síntesis de hormonas relacionadas con la respuesta ISR (*ACS2*, *ACS4* y *α -DOX1*). Los cebadores se diseñaron como fue explicado en Materiales y Métodos. Las secuencias se muestran en la Tabla 2 y las condiciones de amplificación en el Anexo 1.

Expresión de genes correspondientes a proteínas de defensa

En la Fig. 40 se muestran los resultados que corroboran los obtenidos en las micromatrices para la expresión de los genes correspondientes a tres proteínas PRs, Le-PR1b, Le-PR2 y Le-PR P23. Se incluyó un tratamiento con SA como control de respuesta SAR. Los resultados indican un aumento del 100% en la expresión de *PR1b* en parte aérea y de más del 100% en raíces. El aumento en la expresión de *PR1b* fue informado en hojas de tomate en respuesta al tratamiento con etileno (Tornero y col., 1997).

PR2, perteneciente a otra familia de PRs, tiene como ya se comentó en el análisis de los 7 DDI actividad endo β -1,3-glucosidasa, muy importante en la hidrólisis de los componentes de la pared de los hongos. Se vió también sobre expresada a los 14 DDI: 69% en la parte aérea y más del 100% en las raíces.

En la misma Fig. se ve que PR P23, que corresponde al gen de osmotina de tomate, se sobre expresó más de 200% en raíz y alrededor de 60% en parte aérea de plantas inoculadas. Jia y Martin (1999), informaron la sobre expresión de una β -1,3 glucanasa y de osmotina como parte de la respuesta de plantas de tomate infectadas con *P. syringae pv tomato*.

Los tratamientos realizados con SA resultaron también en la sobre expresión de PR1b y PR2 (más de 100% y casi 300% respectivamente).

En conjunto estos resultados indican que la sobre expresión de estas PRs (PR1b y PR2) son eventos compartidos por la respuesta SAR (inducida por SA) y por ISR (inducida por la inoculación por *Azospirillum*). La inducción de la expresión de PR1 (considerada

anteriormente como marcadora de respuesta SAR), PR2, PR5 y PDF1.2 fue informada recientemente en *A. thaliana* inoculada con la PGPR *P. putida* (Ahn y col., 2007).

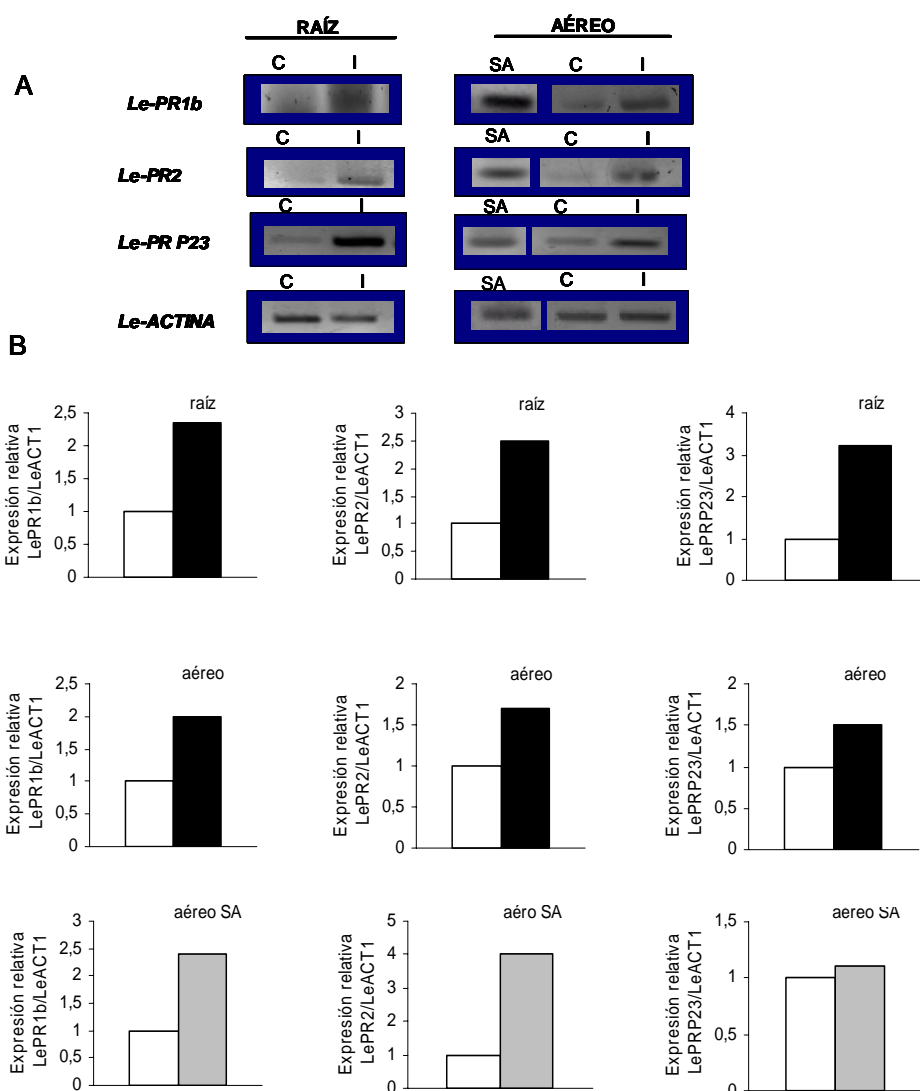


Figura 40. Expresión diferencial de los genes *Le-PR1b*, *Le-PR2*, *Le-PR P23* en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en raíces y parte aérea de plantas de tomate a los 14 DDI. C, control; I, inoculado; SA, plantas tratadas con 0,5 mM de ácido salicílico. B, Cuantificación de las señales detectadas y normalización con respecto a la señal de *Le-ACT1* en cada caso. A los controles se le asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas inoculadas, barras grises plantas tratadas con SA.

Expresión de genes relacionados con la defensa

Como se mencionó anteriormente, Snakin2 es un péptido relacionado con la defensa y que resultó sobre expresado en el experimento de micromatrices.

En la Fig. 41 se muestran los resultados de la amplificación de *Snakin2* por RT-PCR y como se puede ver la expresión del péptido aumenta un 100% en la raíz y un 36% en la parte

aérea de las plantas inoculadas; este último resultado confirma el obtenido en las micromatrices. Se puede observar también un aumento del 41% en la expresión de *Le-SN2* en plantas control tratadas con ACC y una disminución de alrededor del 20% en la expresión en plantas tratadas con SA

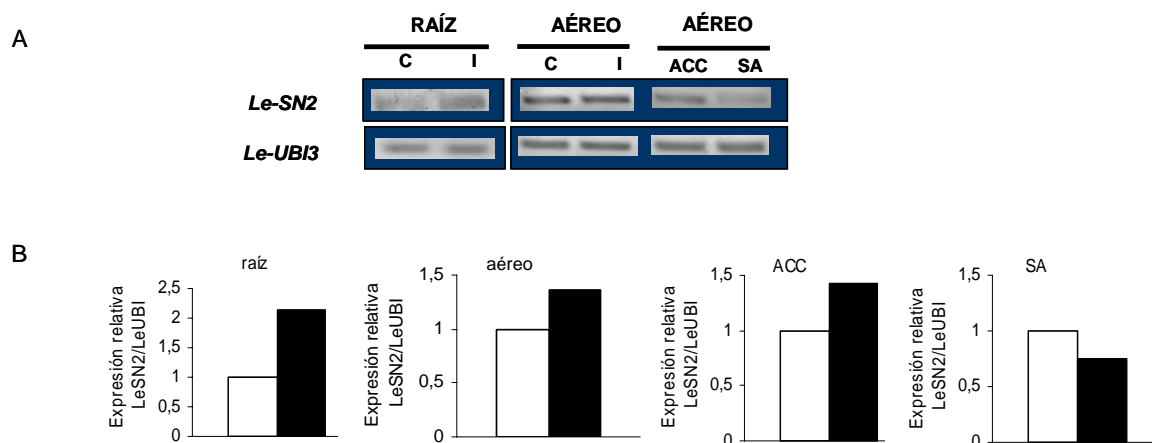


Figura 41. Expresión diferencial del gen Snakin2 (*SN2*) en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en raíces y parte aérea de plantas de tomate a los 14 DDI. C, control; I, inoculado, ACC plantas tratadas con 100 μ M ACC y SA, plantas tratadas con 0,5 mM de SA. B, cuantificación de las señales detectadas y normalización con respecto a la señal de *Le-UBI3* en cada caso. A los controles se les asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas inoculadas o tratadas con ACC o SA.

Expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas

A los 14 DDI se detectó un aumento en la expresión de la isoforma 4 de la ACS (Fold change: 0,972); se validó este resultado utilizando RT-PCR tanto para esta isoforma como para la isoforma 2. Se agregó a este estudio el análisis de la expresión de la dioxigenasa *Le- α -DOX1*; la inclusión de *α -DOX1* en este análisis se debió a que si bien en los resultados mostrados en el Anexo 4 este gen no aparece entre los que sufrieron cambios, en un estudio preliminar (resultados no mostrados) en que se compararon solo dos micromatrices (control e inoculado de 14 DDI) este gen apareció sobre expresado. Las dioxigenasas son enzimas que catalizan la α -oxidación de ácidos grasos generando una familia de oxilipinas diferentes de las producidas por las lipoxigenasas y que protegerían a las plantas de la excesiva necrosis resultado del estrés oxidativo modulando, así la respuesta HR (Hamberg y col., 2005).

En la Fig. 42 se muestran los resultados obtenidos. La abundancia de mensajeros correspondientes a *Le-ACS4* fue mayor en las raíces y en la parte aérea en las plantas inoculadas (83 y más del 100% respectivamente). La expresión de *Le-ACS2* también se encontró aumentada, más de tres veces en parte aérea y más de dos en la raíz. Con respecto

a la expresión del gen *Le- α -DOX1* en plantas inoculadas, se encontró un incremento del 30% en la raíz y alrededor del 50% en la parte aérea.

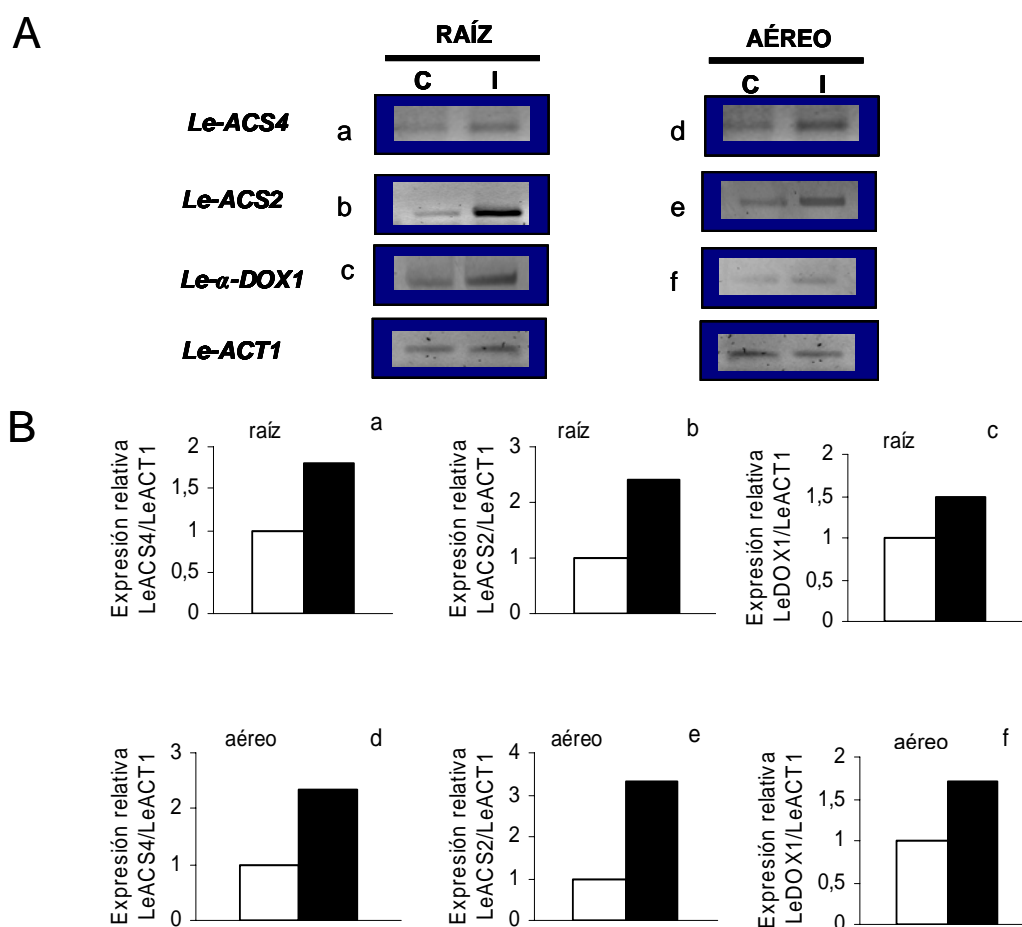


Figura 42. Expresión diferencial de los genes *Le-ACS2*, *Le-ACS4* y *Le- α -DOX1* en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en raíces y parte aérea en plantas de tomate a los 14 DDI. C, control; I, inoculado. B, Cuantificación de las señales detectadas y normalización con respecto a la señal de *Le-ACT1* en cada caso. A los controles se les asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas inoculadas.

Con respecto a ACS4 se confirma el resultado obtenido en la micromatriz, sin embargo la sobre expresión de ACS2 y α -DOX1 detectada por RT-PCR no se condice con el resultado de las micromatrices. Es posible que estos mensajeros se encuentren poco representados en el total de mensajeros de una célula, en cuyo caso podrían llegar a no ser detectados en la técnica de micromatrices (Draghici, 2001).

Expresión de factores de transcripción

La expresión de los factores de transcripción de la familia WRKY ha sido también relacionada con la inducción de reacciones de defensa. Dado que WRKY53 apareció con un Fold change de 1,09 en el análisis por micromatrices y que al menos en *Arabidopsis* está

involucrado en la expresión de PR1, se validó su expresión mediante RT-PCR. Como se ve en la Fig. 43, se detectó una importante expresión de *Le-WRKY53* en la raíz y un 40% en la parte aérea de plantas inoculadas. El resultado en parte aérea coincide con el obtenido por micromatrices. WRKY53 es considerado un factor de transcripción componente de la vía ISR (Cartieaux y col., 2008).

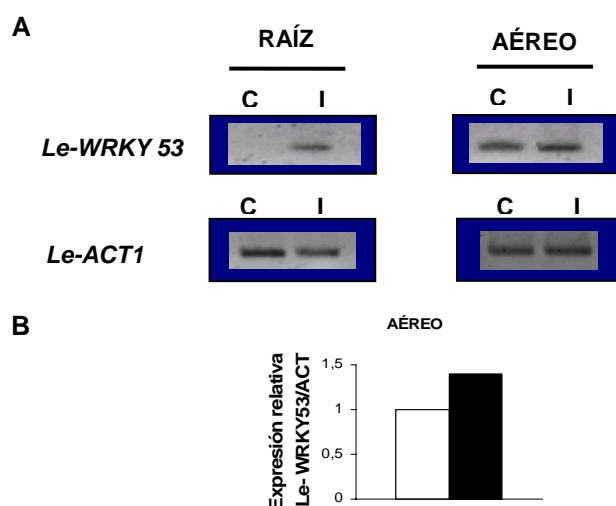


Figura 43. Expresión diferencial del factor de transcripción WRKY53 en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. A, acumulación de transcritos en raíz y parte aérea. C, control; I, inoculado. B, cuantificación de las señales detectadas y normalización con respecto a la señal de *Le-ACT1* en cada caso. A los controles se le asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: plantas inoculadas.

B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína

Expresión de la proteína PR P23

Utilizando anticuerpos anti PR P23 de tomate se evaluó la expresión de esta proteína. En la Fig. 44 se muestran los resultados del Western blot correspondiente.

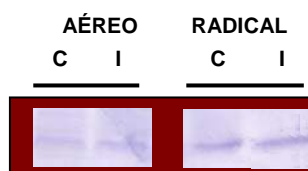


Figura 44. Expresión de la proteína PR P23 en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. Las proteínas fueron corridas en SDS-PAGE 12%, transferidas a membrana de PVDF como se describe en Materiales y Métodos y enfrentadas con el anticuerpo anti PR P23 de *S. lycopersicum*. C: plantas control. I: plantas inoculadas. El control de carga de proteína en cada carril se realizó por tinción con Ponceau previa a la inmunodetección.

Como se observa en la Fig. 44, la expresión de la proteína PR P23 fue mayor en las plantas inoculadas, tanto en la parte aérea como radical. Los resultados de la parte aérea son coincidentes con los hallados en las micromatrices y en la amplificación por RT-PCR (Fig. 40).

Expresión de las proteínas ACS4, ACS2 y α -DOX1

Utilizando los anticuerpos anti ACS4, anti ACS2 y anti α -dioxigenasa de tomate se evaluó la expresión de las respectivas proteínas. Dado que existe en la bibliografía un antecedente que vincula la expresión aumentada de α -DOX1 en tomate con alto nivel de etileno (Tirajoh y col., 2005), se incluyeron en este experimento plantas tratadas con ACC (parte aérea) como control interno.

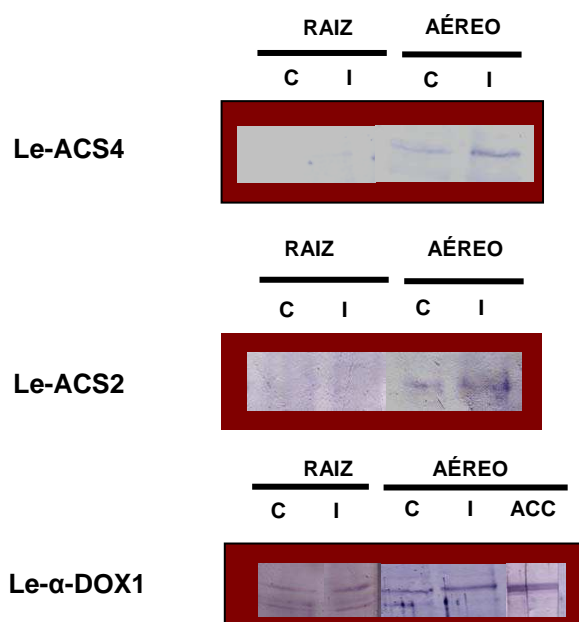


Figura 45. Expresión de las proteínas ACS4, ACS2 y α -DOX1 en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *A. brasilense*. Las proteínas fueron corridas en SDS-PAGE 12%, transferidas a membrana de PVDF como se describe en Materiales y Métodos y enfrentadas con los anticuerpos anti Le-ACS4, anti Le-ACS2 y anti Le- α -DOX1. C: plantas control, I: plantas inoculadas; ACC: plantas tratadas con 100 μ M ACC. El control de carga de proteína en cada carril se realizó por tinción con Ponceau previa a la inmunodetección.

Como puede verse en la Fig. 45, se detectó claramente un aumento en la expresión de la ACS4 en la parte aérea de las plantas inoculadas y no se obtuvo señal en la raíz. Los mismos resultados se obtuvieron cuando se utilizó el anticuerpo anti ACS2. Con respecto a la expresión de α -DOX1, se observó un aumento considerable en respuesta a la inoculación sobre todo en la parte aérea. Estos resultados son congruentes con el aumento de expresión de mensajero en plantas inoculadas (Fig 42 d, e y f).

1.3.2. Genes reprimidos

Se detectaron 27 genes reprimidos a los 14 DDI (Anexo 5), de ellos 2 correspondieron a metabolismo, 4 a transporte, 8 a defensa, 4 a fotosíntesis, 2 a genes asociados a pared, 2 a factores de transcripción y 5 resultaron de función desconocida (Fig. 39 B).

Genes relacionados con fotosíntesis

Tres de los cuatro genes reprimidos relacionados con la fotosíntesis pertenecen al complejo antena de los fotosistemas I y II. El gen de geranylgeranyl reductasa está relacionada con la síntesis de clorofila.

Existen en la bibliografía antecedentes de la represión de estos genes en infecciones por patógenos como *P. syringae* y *P. infestans* (Cohn y Martin, 2005; Matton y Brisson, 1989).

Genes relacionados con metabolismo

Se encontró disminuída la expresión del gen de una AIA-Ala-hidrolasa cuya función es hidrolizar los conjugados inactivos de AIA a sus formas activas (Fold change: -1,074). En infecciones por *P. syringae* y *P. infestans* este gen se encontró sobre expresado (Cohn y Martin, 2005; Matton y Brisson, 1989).

El gen de la Histidina descarboxilasa también apareció reprimido. En infecciones de tomate con *P. syringae* este gen se encontró sobre expresado (Cohn y Martin, 2005).

Genes relacionados con transporte

Se encontraron reprimidos 4 genes relacionados con el transporte de agua (Fold change: -1,955; -1,977, -0,991; -0,922). Estas proteínas son las acuaporinas o proteínas canal ubicadas en la membrana plasmática y en las membranas intracelulares. Por su rol de transportar metabolitos además de agua cumplen roles importantes en el desarrollo de las plantas, en las adaptaciones de las mismas a condiciones cambiantes del medio, en el transporte de CO₂ y en la fijación del nitrógeno. No se ha profundizado en el estudio de la función de las acuaporinas en el estrés biótico, pero dada su probada relación con el metabolismo de ROS (Boursiac y col., 2008) es posible que jueguen un rol importante en las interacciones planta-microorganismo.

Genes relacionados con la defensa

ELI3 (elicitor-activated gene 3; Fold change: 0,922) codifica para una proteína con actividad de cinamil alcohol deshidrogenasa. Varios genes que codifican para diferentes tipos de alcohol deshidrogenasas se relacionan con la defensa de las plantas frente al ataque de patógenos. En *A. thaliana* la cinamil alcohol deshidrogenasa está asociada con síntesis de lignina y por ende forma parte de los mecanismos de defensa frente a patógenos como *P. syringae* pv tomato (Tronchet y col., 2010).

Precursor de la catecol oxidasa (CO, Fold change: - 2,109). La catecol oxidasa pertenece a la familia de las polifenol oxidasas (PPOs) que catalizan la oxidación de fenoles a quinonas. Las quinonas producidas por PPOs pueden actuar directamente como antibióticos o citotóxicos y son intermediarias en la formación de ROS. En la interacción de tomate con el patógeno *P. infestans* este gen está altamente sobre expresado (Matton y Brisson, 1989).

Peroxidasa secretoria, (PER, Fold change: -1,17). Pertenece a la clase III de peroxidasas, tiene varias funciones en los distintos tejidos como la oxidación de compuestos tóxicos, defensa frente al daño, catabolismo del AIA. La transformación heteróloga de *A.thaliana* con este gen en orientación antisentido, transformó a las plantas en más susceptibles a patógenos bacterianos y fúngicos (Bolwel y col., 2002).

En nuestro caso la sub expresión de los tres genes que se acaban de discutir podría ser un mecanismo que permitiera la dispersión y el establecimiento endofítico de *A. brasilense*.

Glucosil transferasa (Fold change: -1,331) se induce como respuesta al estrés por frío y en respuesta a patógeno (Song y col., 2009). El producto del gen de una glucosil transferasa (AtSGT1) que aparece sobreexpresado en respuesta al ataque de *P. syringae* en plantas de *A. thaliana*, cataliza la transformación de salicílico endógeno a su forma conjugada (SA 2-O-β-D-glucosido, SAG) y al gluco-éster de salicílico (SGE), formas inactivas de SA. En nuestro caso la subexpresión de este gen explicaría la aparición de algunos componentes de la respuesta SAR como se discutió más arriba en el caso de las PRs.

Remorina (Fold change: -1,08) pertenece a una familia de proteínas cuya función se ha relacionado con la defensa frente a la dispersión viral (Raffaele y col., 2009). Últimamente también se le ha asignado un rol positivo en el establecimiento de la colonización de *M. truncatula* con *Shinorizobium melliloti* (Lefebre y col., 2010).

Germina, (Germin like protein, Fold change: -0,958) es una oxalato oxidasa generadora de peróxido de hidrógeno involucrada en la defensa contra estrés biótico y abiótico que también presenta actividad superóxido dismutasa (SOD). Recientemente se ha

relacionado a miembros de la familia de germinas en la respuesta defensiva de *Brassica napus* a la infección por *Sclerotinia sclerotiorum* (Rietz y col., 2012).

También se encontró reprimido el gen de una proteína con actividad de E3-ligasa (Putative-RING proteína, Fold change: -1,047). Este gen ha sido relacionado con la inducción de muerte celular y la ubiquitinación durante las respuestas de defensa al ataque por patógenos (Lee y col., 2011).

El gen de la malato deshidrogenasa (Fold change: -0,638) es uno de aquellos cuyo Fold change es menor que -0.9 sin embargo fue tenido en cuenta como dato relevante ya que provee poder reductor (NADPH) para los procesos relacionados con la defensa como la síntesis de fitoalexinas, la deposición de lignina y para la producción de ROS. No se ha informado esta respuesta en infecciones por patógenos ni por PGPRs. En la Discusión de este capítulo se discutirá más extensamente la importancia que asignamos a los procesos oxidativos en el establecimiento de la interacción *A. brasilense*-planta de tomate.

Genes correspondientes a factores de transcripción

Se encontró sensiblemente disminuída la expresión de dos genes con función de factores de transcripción. El MYB62 (Fold change: -1,195) tiene una alta homología de secuencia con los genes NtMYB2 y con AtMYB2. Sugimoto y col., 2000, encontraron que el gen NtMYB2 se induce por daño y elicitores y a su vez es un regulador transcripcional de genes de defensa.

Otro de los genes que codifica para factores MYB que apareció reprimido fue el methyl jasmonate induced MYB-related Transcription factor (Fold change: -1,447). Este gen presenta una alta homología de secuencia con el factor de transcripción NtMYBJS1. NtMYBJS1 participa en el camino de transducción de señales del metil jasmonato y en la inducción de genes de la biosíntesis de fenilpropanoides durante situaciones de estrés (Galis y col., 2006).

Validación de los resultados de expresión génica

A) Amplificación de los mensajeros por RT-PCR

En la Fig. 46 se muestran los resultados obtenidos para catecol oxidasa.

Como puede verse en la Fig. 46 la expresión del gen de catecol oxidasa medida por RT-PCR también indica una disminución en las plantas inoculadas con *A. brasilense* tanto en la parte aérea como en la raíz. Sin embargo los tratamientos control llevados a cabo en presencia de SA y MeJA provocaron un aumento de 100% y 150% respectivamente como era de esperar.

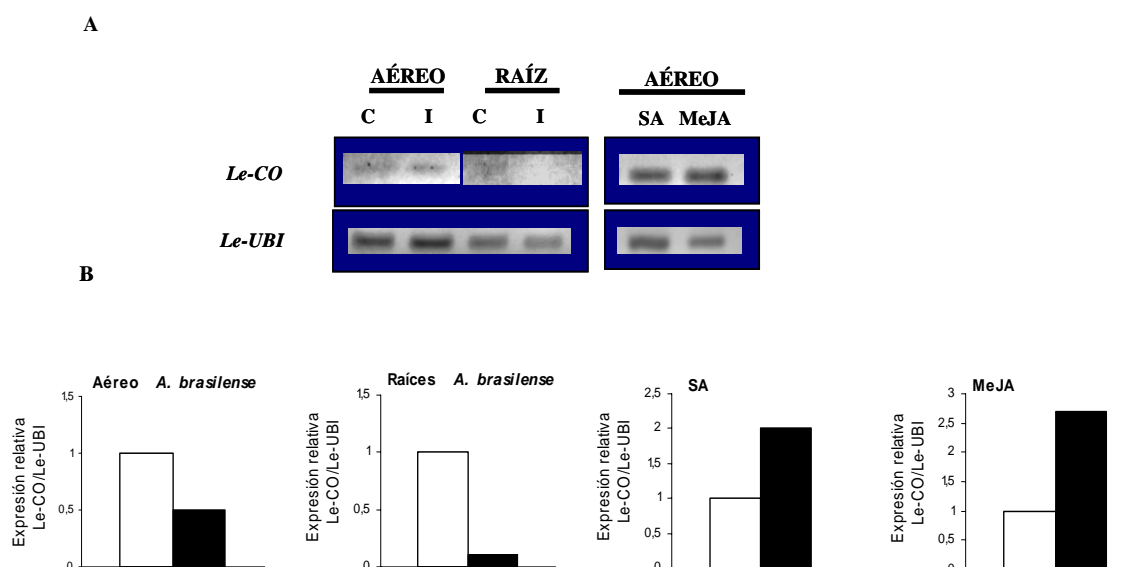


Figura 46: Expresión diferencial del gen de catecol oxidasa en plantas de *S. lycopersicum* a los 14 DDI. A, acumulación de transcritos en parte aérea y radical de plantas de tomate a los 14 DDI y de plantas tratadas con SA o con MeJA. C, control; I, inoculado. B, las señales detectadas fueron cuantificadas y los valores obtenidos fueron normalizados a los de ubiquitina en cada caso. A los controles se le asignó valor uno. Barras blancas: plantas control; barras negras: inoculadas o tratadas con SA o MeJA como se señala en cada uno de los gráficos.

B) Corroboración de la expresión a nivel de proteína

Expresión de la proteína malato deshidrogenasa

Se midió la expresión de la malato deshidrogenasa a través de Western-blot. Los resultados se muestran en la Fig.47. Como puede verse la cantidad de proteína reconocida por el anticuerpo fue mayor en el control que en el inoculado. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en las micromatrices.

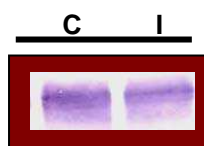


Figura 47. Expresión de malato deshidrogenasa en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*. Las proteínas de la fracción soluble de parte aérea fueron corridas en SDS-PAGE 12% y transferidas a membrana de PVDF como se describe en Materiales y Métodos y enfrentadas con el anticuerpo anti malato deshidrogenasa (MDH) de arveja. C: plantas control; I: plantas inoculadas. El control de carga de proteína en cada carril se realizó por tinción con Ponceau previa a la inmunodetección.

2. Contenido de azúcares en plantas inoculadas

Como se mencionó más arriba la inoculación con *A. brasilense* indujo un aumento en la expresión de un gen que codifica para un transportador de hexosas, y de varios genes relacionados con la fotosíntesis. Estos resultados podrían relacionarse con un aumento en la síntesis y movilización de hexosas generado por la inoculación y/o por el establecimiento de la simbiosis planta-PGPR. Se investigó el contenido de fructosa, glucosa, manosa, ramnosa, sacarosa y xilosa de la parte aérea de la planta mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Los únicos azúcares detectados fueron glucosa y fructosa. En la Fig. 48 se muestran los resultados para ambas hexosas en plantas control e inoculadas.

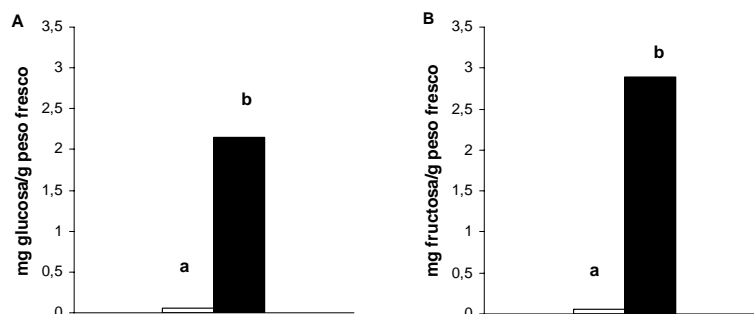


Figura 48. Contenido de glucosa y fructosa en plantas de *S. lycopersicum* a los 14 DDI. Se midió el contenido de glucosa y fructosa en el tejido aéreo de plantas control (barras blancas) y de plantas inoculadas (barras negras). Las barras representan el valor promedio de tres extracciones. Letras distintas significa que existen diferencias significativas entre los tratamientos, $P < 0,05$ (Test de Tukey).

El gen del transportador de hexosas se encontró sobre expresado en hojas de plantas infectadas con patógenos y micorrizas (Fotopoulos y col., 2003; García-Rodríguez y col., 2005).

A los azúcares se les asigna un rol importante en el mantenimiento de la actividad metabólica incrementada que resulta del establecimiento de una respuesta al estrés como el aumento de la respiración y el reforzamiento de la pared. En especial se incrementa el flujo de glucosa hacia el sitio de infección.

En nuestro caso el notable aumento en la contenido de glucosa y fructosa en las plantas inoculadas y el aumento de la expresión del transportador de hexosas podría indicar que estos monosacáridos tienen un rol en la interacción tomate-*A. brasilense*. Sin embargo los resultados de las micromatrices no detectaron una inducción en paralelo de la expresión de la invertasa, como sería esperable para explicar el marcado aumento en el contenido de las hexosas libres (Fotopoulos y col., 2003).

3. Análisis proteómico

Utilizando la técnica de 2D-DIGE se comenzó el análisis de los perfiles de proteínas expresadas en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense*. El estudio se llevó a cabo en hojas y raíz de plantas inoculadas a los 7 y 14 DDI. En la primera columna de la Tabla 8 se especifican los pares de muestras comparadas en cada gel y la marcación de cada muestra.

Tabla 8. Análisis de la expresión diferencial de proteínas mediante DeCyder-DIA

Muestras comparadas*	Detectados	Excluidos	Incluidos	Subexpresados	Sin cambios	Sobreexpresados
Cy3CA7-Cy5IA7	3978	1188	2790	767	1315	708
Cy3CR7-Cy5IR7	6841	2349	4495	3422	901	2515
Cy3CA14-Cy5IA14	4402	672	3730	1558	625	1547
Cy3CR14-Cy5IR14	4414	996	3418	1399	429	1590
Cy3IA14-Cy5CR14	4836	391	4445	2216	427	1802
Cy3IA7- Cy5CR7	5621	737	4884	2358	498	2028
Cy3IR14-Cy5CA7	5525	2344	3181	1211	286	1684
Cy3IR7-Cy5CA14	5356	2742	2614	1245	315	1054
Cy3CR7-Cy5Bact	6838	2348	4490	2094	537	1859

* I: inoculado; C: control; A: aéreo; R: raíz; 7 y 14 representan los días después de la inoculación (DDI)

A modo de ejemplo en la Figs. 49 y 50 se muestran los geles correspondientes al análisis de las proteínas expresadas en la parte aérea de las plantas a los 7 y 14 DDI (primera y tercera filas respectivamente de la Tabla 8).

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software DeCyder-DIA, que permitió evaluar la calidad de cada uno de los spots que aparecen en los geles como así también seleccionar aquellos que están sobre expresados o reprimidos al menos dos veces en cada situación. En el caso del análisis correspondiente a las proteínas de hojas de 7 DDI, de un total de 3978 spots que fueron analizados, 1188 fueron excluidos por no pasar los criterios de selección. De los 2790 restantes, 708 spots (25,4%) mostraron sobre expresión, 767 (27,5%) represión, y 1315 (47,1%) no mostraron cambios.

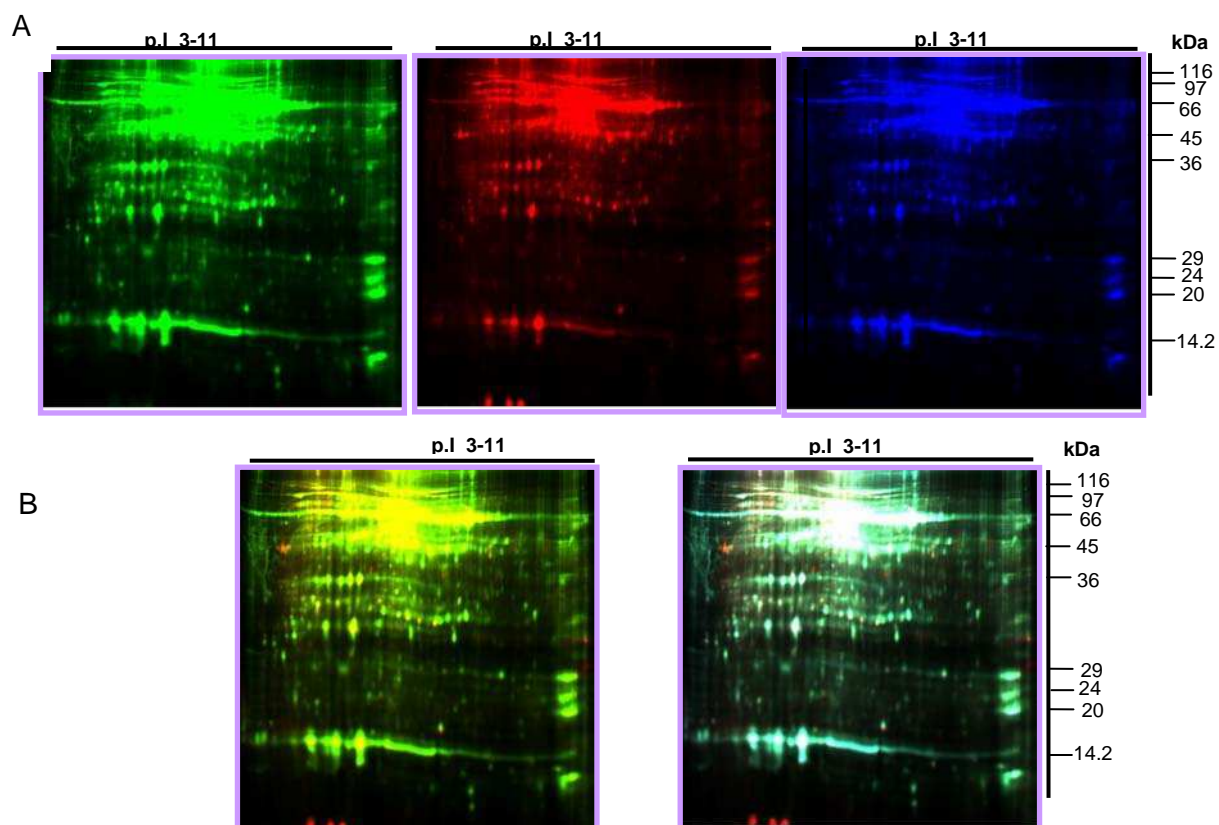


Figura 49. Proteoma de hoja de tomate a los 7 DDI. Panel A, se muestra el gel 2D-DIGE de la mezcla de proteínas correspondientes a (de izquierda a derecha) hojas control (Cy3), hojas inoculadas (Cy5) y estándar interno (Cy2). Las imágenes fueron obtenidas exponiendo el gel a las longitudes de onda correspondientes a la excitación de cada fluoróforo. Panel B, la imagen de la izquierda muestra la superposición de Cy3 y Cy5 y la de la derecha muestra la superposición de Cy3, Cy5 y Cy2.

En muestras de 14 DDI, se obtuvieron un total de 4402 spots de los cuales 672 fueron excluidos, quedando un total de 3370. De estos, 1547 (41,5%) indicaron sobre expresión, 1558 (41,8%) represión y 625 (16,8%) no mostraron cambios.

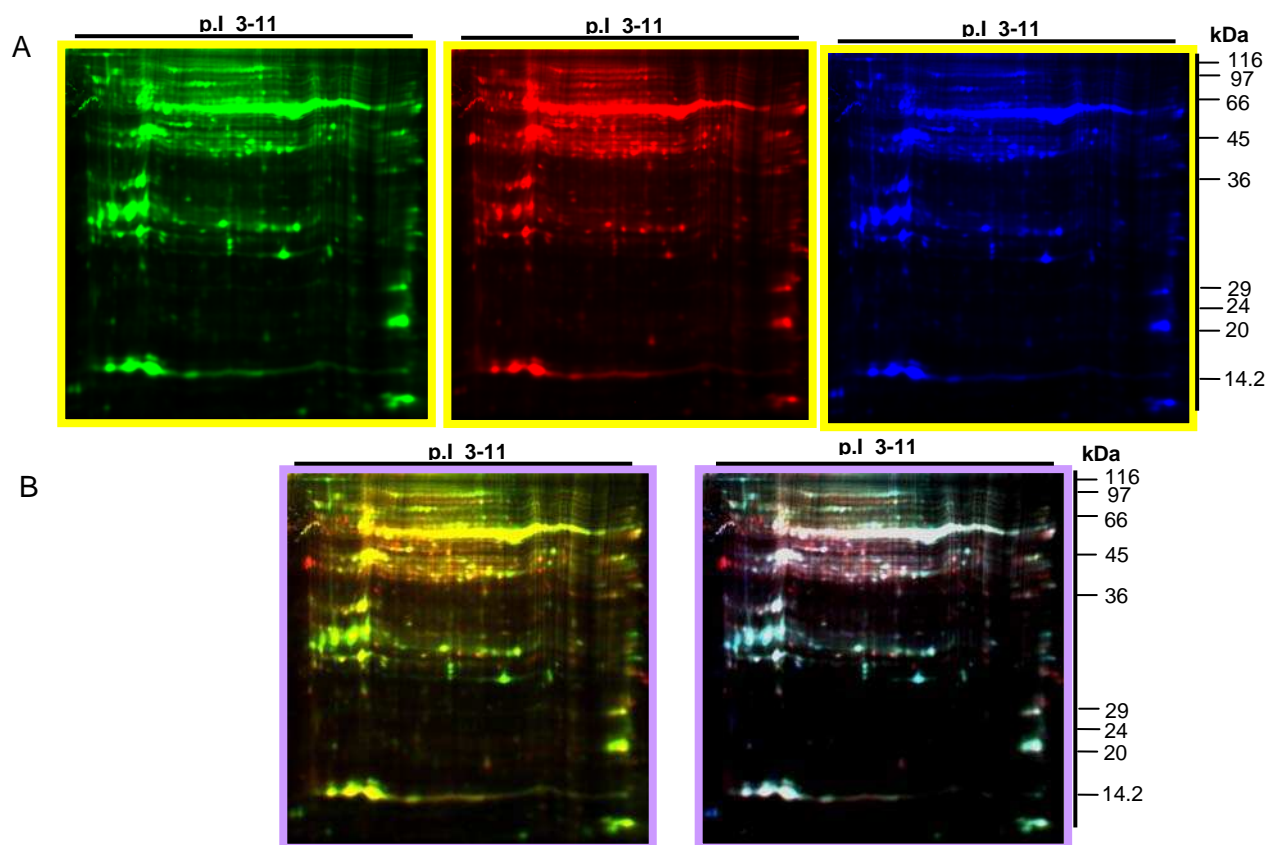


Figura 50. Proteoma de hoja de tomate a los 14 DDI. Panel A, se muestra el gel 2D-DIGE de la mezcla de proteínas correspondientes a hojas control (Cy3), hojas inoculadas (Cy5) y estándar interno (Cy2). Las imágenes fueron obtenidas exponiendo el gel a las longitudes de onda correspondientes a la excitación de cada fluoróforo. Panel B, la imagen de la izquierda muestra la superposición de Cy3 y Cy5 y la de la derecha muestra la superposición de Cy3, Cy5 y Cy2.

La Fig 51 resume la distribución porcentual de los cambios mencionados en hoja de 7DDI (panel A) y de 14 DDI (panel B).

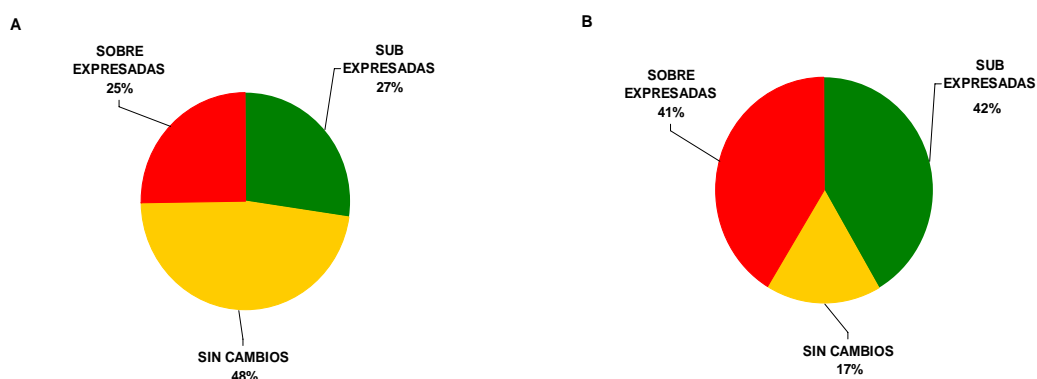


Figura 51. Representación porcentual del número de spots que mostraron sobre expresión, represión, o que resultaron sin cambios en hojas de tomate de 7 y 14 DDI (paneles A y B, respectivamente).

En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos al comparar la expresión de las proteínas en todas las muestras proteicas correspondientes al material aéreo y radicular de 7 y 14 DDI.

Los resultados presentados en la Tabla 8 están siendo sometidos a la etapa del análisis de las variaciones biológicas entre geles (BVA) que forma parte del software utilizado. Una vez concluída esta etapa aquellas proteínas que muestren un cambio de al menos 1,2 veces entre el control y las muestras tratadas (con $P < 0,05$) serán seleccionadas para su identificación por espectrometría de masa. El material para esta identificación será obtenido de geles preparativos de las muestras seleccionadas teñidos con SYPRO[®]-Ruby.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos en el Capítulo 2 de esta tesis demostraron que *A. brasilense* se comporta como una PGPR en tomate, que efectivamente coloniza simbióticamente la planta y que el etileno juega un rol en el establecimiento de esa interacción. Resultó de interés entonces ahondar en el estudio de los mecanismos que median la interacción entre *A. brasilense* y tomate y con ese objetivo se llevó a cabo un análisis global de los perfiles de expresión génica asociados a la colonización de *S. lycopersicum* por *A. brasilense* utilizando micromatrices TOM1 de ADNc de tomate.

El análisis posterior de los resultados se centró fundamentalmente en la expresión de los genes que se asocian a los senderos de respuesta en otros modelos planta-rizobacterias y planta-patógenos.

Analizando globalmente los resultados obtenidos se observa que la colonización por *A. brasilense* estimuló la expresión de una variedad de genes muchos de los cuales se han encontrado también sobre expresados en *A. thaliana*, *N. tabacum*, *S. lycopersicum*, etc. en respuesta a la infección con patógenos o afectadas por agentes generadores de estrés. Es importante destacar que el nivel de expresión de estos genes encontrados en nuestro trabajo es siempre menor que el inducido por los patógenos.

Concretamente, el perfil de expresión génica a los 7DDI (resultados en ANEXO 2) indica claramente la sobre expresión de varios genes reconocidos en otros sistemas como determinantes de respuestas defensivas de la planta: varias proteínas PR, un factor de transcripción, un gen relacionado con la defensa, dos que responden al daño y uno involucrado en senderos de señalización de los mecanismos de defensa. Entre las proteínas PR se encuentra sensiblemente sobre expresada la PR-1, un precursor de endoquitinasa, relacionada con adelgazamiento de la pared, la proteína PR P23 y la proteína PR10. La proteína STH-2 (actualmente denominada PR-10a) que es la que presenta mayor sobre expresión, ha sido bien caracterizada en papa, se induce por estrés biótico frente al patógeno *P. infestans* (Matton y Brisson, 1989) y aumenta la tolerancia osmótica y salina (El-Banna y col., 2010) pero no se conoce su mecanismo de acción. Es interesante notar que se expresaron simultáneamente PRs clásicamente asociadas a la vía ISR y otras asociadas a la vía SAR y/o al sendero del etileno. El factor de transcripción Pti4 que pertenece a la familia de los factores de transcripción que responden a etileno, también está entre los sobre expresados.

El hecho de encontrar sobre expresado el factor de transcripción Pti4 tiene algunas implicancias interesantes. La familia de factores de transcripción Pti4,5,6 fue identificada y caracterizada en tomate en base a su interacción con la quinasa Pto como parte de la

respuesta defensiva a la infección por *P. syringae* pv. *tomato* (Zhou y col., 1997). Pti4 se une a las secuencias GCC presentes en muchos genes de resistencia siendo esta actividad de unión incrementada por fosforilación mediada por Pto (Gu y col., 2000). Pto es parte del mecanismo de resistencia “gene-for-gene” puesto en juego por la planta cuando los factores de avirulencia AvrPto o AvrPtoB de *Pseudomonas* son inyectados en el tejido vegetal mediante el sistema III de secreción (Fig.7, Introducción). Pti4 también se induce en hojas de tomate por daño, o por exposición a etileno, JA o SA (Gu y col., 2002).

No se conoce la existencia del sistema III de secreción en *A. brasilense* ni la presencia de factores de avirulencia similares a los de *P. syringae* pero el aumento de la concentración de etileno que se genera por la inoculación con *A. brasilense* puede estar involucrado en el aumento de la expresión de Pti4. Mysore y col., (2002) y Chakravarthy y col., (2003) demostraron que en plantas de tomate infectadas por *P. syringae* una serie de genes entre ellos algunas PRs, están bajo el control de Pti4. Coincidentemente varias de estas proteínas se encontraron sobre expresadas en nuestro sistema y se las señala resaltadas en color en la Tabla de genes sobre expresados de 7DDI (Anexo 2). Una fosfatasa de proteína perteneciente a la familia PP2C también se encuentra sobre expresada. Esta familia de fosfatasas es muy numerosa, por ejemplo en *A. thaliana* tiene 76 miembros, y a muy pocos de ellos se les ha asignado una función específica en los senderos de transducción de señales en la defensa en plantas. En *A. thaliana* se ha demostrado que una PP2C, identificada como PIA1, se acumula después de la infección con *P. syringae* que expresa el efector tipo III AvrRpm1, activa la proteína de resistencia correspondiente RPM1 e induce la expresión de genes de defensa (Widjaja y col., 2010).

El único gen sub expresado a los 7 DDI está relacionado con la síntesis de flavonoides.

A los 14 DDI (Anexo 4) aumenta el número de genes relacionados con la respuesta defensiva que se encuentran sobre expresados, sobre todo los agrupados dentro de la categoría *Genes relacionados con la defensa*. Con respecto a las proteínas PR cinco de las ocho sobre expresadas en estas muestras no se habían encontrado sobre expresadas a los 7 DDI y también han sido relacionadas en otros sistemas tanto con la vía SAR como con los senderos relacionados con JA y etileno. Para la proteína PR P23 se mantuvo el valor de sobre expresión detectado a los 7 DDI. Los resultados referidos a la expresión de PR1, PR2 y PR5 están en concordancia con lo encontrado por Wang y col., (2005) en plantas de *A. thaliana* inoculadas con la rizobacteria *P. fluorescens* FPT 9601.

Es interesante notar que la expresión de PR2 en estas plantas de 14 días, además de inducirse por la inoculación se estimula en las plantas tratadas con SA hecho que no ocurría en plantas de 7 días (experimentos de validación por RT-PCR pág. 106). Como muestran claramente los resultados de la Fig. 32 existe un grupo de genes cuya expresión varía en

función del tiempo como única variable; es posible que alguno(s) de estos genes relacionados con la edad de la planta modulen la respuesta a SA que no se observa a los 7 DDI.

Entre los factores de transcripción sobre expresados, el WRKY53 ha sido identificado por Cartieaux y col. (2008) como específico de la vía ISR en la interacción de la PGPR *B. japonicum* ORS278 con *A. thaliana*. El factor de transcripción relacionado con la familia MYB que se encuentra también sobre expresado presenta según la base de datos SGN (<http://solgenomics.net/>) la mayor homología con los factores MYB111 y MYB59, involucrados en la síntesis de flavonoides, desarrollo de la raíz y tolerancia a estrés.

Entre los genes sobre expresados que pertenecen a los senderos de síntesis de hormonas relacionadas con la defensa hay tres que están involucradas en la formación de oxilipinas (lipoxigenasa, LOX; aleno oxidasa ciclasa y α -DOX1). Las oxilipinas son una familia de compuestos biológicamente activos derivados del metabolismo oxidativo de los ácidos poli insaturados. Las dos primeras enzimas nombradas son la primera y tercera respectivamente de las involucradas en el sendero que lleva a la síntesis de jasmónico y sus derivados. Distintas oxilipinas generadas por la actividad LOX están involucradas en procesos fisiológicos como crecimiento y fertilidad y en reacciones de defensa contra el ataque de bacterias, hongos e insectos (Cartieaux y col., 2008). Así, se ha demostrado que miembros de esta familia regulan el desarrollo de las raíces laterales y la respuesta defensiva en *A. thaliana* (Vellosillo y col., 2007) y que, al menos en parte, el efecto protector contra patógenos podría estar relacionado con la capacidad antimicrobiana de las oxilipinas *per se* (Prost y col., 2005). El ácido jasmónico y sus derivados pertenecen a esta familia de compuestos y provienen de la oxidación del ácido linolénico por esta vía. Una vía alternativa de oxidación de ácidos grasos poli insaturados involucra a las α -dioxigenasas y ha sido recientemente relacionada con la respuesta de defensa frente al ataque por patógenos en *A. thaliana* y tabaco especialmente cuando la infección resulta en una respuesta hipersensible (HR). En *Arabidopsis* α -DOX1 se induce por SA y por la presencia de ROS y óxido nítrico (NO), tres moléculas mediadoras de muerte celular. Esta correlación entre la expresión de α -DOX1 y muerte celular sugiere que esta actividad previene en la planta la generación de excesiva necrosis y que por lo tanto forma parte del mecanismo de defensa inducido para proteger las células del estrés oxidativo (Vellosillo y col., 2010). En nuestro caso no se detectó la inducción de α -DOX1 en las micromatrices pero si en los experimentos de RT-PCR resultados que fueron corroborados a nivel de la proteína presente tanto en parte aérea como en raíz. El tratamiento con el precursor de etileno (ACC) estimuló la expresión de α -DOX1, en cambio la presencia de SA no tuvo ningún efecto. La sobre expresión de α -DOX1 en plantas de tomate tratadas con ethephon o sometidas a estrés salino ya había sido informada por Tirajoh y col., 2005.

La familia de las ACS (enzimas claves en la regulación de la síntesis de etileno) tiene 9 miembros en tomate (Lin y col., 2009). La isoforma 4 se encontró sobre expresada en las micromatrices, resultado que se corroboró por RT-PCR y Western-blot. Como ya se había demostrado un aumento de ACS2 a nivel de proteína presente en las muestras de parte aérea de plantas inoculadas (Capítulo 2, Fig. 27), se investigó por RT-PCR la expresión de esta isoforma y se la encontró sobre expresada. El aumento en la disponibilidad de estas enzimas (o de alguna de ellas) podría explicar el aumento de la actividad ACS y del nivel de etileno inducido por la inoculación (Capítulo 2, Fig. 26). De hecho, resultados de nuestro laboratorio demuestran que las plantas de tomate línea A11.1 antisentido para el gen de ACS2, derivadas de las Cv. VF36 usadas en este trabajo, muestran que la producción de etileno es 40% más baja que en la planta salvaje y que las plantas son más sensibles a la infección por el hongo necrotrófico *Sclerotium rolfsii* (Riva y col., 2013, enviado para su publicación).

También se sobre expresaron a los 14 DDI genes que se relacionan con conocidas respuestas a estrés biótico como los que intervienen en la síntesis de lignina o síntesis de pared y otros cuyos mecanismos de acción no son bien conocidos.

La expresión de dos genes claves de la fotosíntesis se encuentra apreciablemente aumentada, el de la subunidad menor de la Rubisco y el del complejo escindidor del agua. La modulación de estos genes ha sido asociada en *A. thaliana* a la respuesta ISR inducida por la PGPR *B. japonicum* ORS278 (Cartieaux y col., 2008). Este aumento debería generar mayor cantidad de hidratos de carbono para compensar el gasto energético en la expresión de genes involucrados en el metabolismo y la defensa de la planta.

Otro de los genes sobre expresados es el del transportador de hexosas. Como se comentó anteriormente este gen se ha encontrado sobre expresado en hojas de plantas infectadas con patógenos y micorrizas. Se ha propuesto que el aumento del transportador de hexosas tendría como función aumentar la provisión de azúcares a los tejidos a partir de las reservas de sacarosa para enfrentar la mayor actividad metabólica generada por la infección/colonización. Se sabe también que las células reorientan el flujo de la glucosa desde la glucólisis hacia el camino de las pentosas fosfato para contrarrestar las perturbaciones en el estado redox del citoplasma generado por las situaciones de estrés (Ralser y col., 2007). Es bien conocido también el rol que juegan los azúcares en los procesos de señalización relacionados con el desarrollo (Koch, 2004).

A los 14 DDI (Anexo 5) se encontraron sub expresados genes pertenecientes a prácticamente todas las categorías excepto proteínas PRs. Es interesante destacar que se sub expresan genes relacionados con la defensa que están directamente implicados en el establecimiento de la respuesta hipersensible. Eli3 es una cinamil alcohol deshidrogenasa que participa en la síntesis de fenilpropanoides y se induce en respuesta a patógenos en

papa, *A. thaliana* y tomate. La catecol oxidasa está involucrada en la síntesis de quinonas (con actividad antibiótica y citotóxica) que a su vez pueden ser intermediarias en la síntesis de ROS; la catecol oxidasa se sobre expresa fuertemente en tomate frente a la infección por *P. infestans*. La germin like protein pertenece a una familia de proteínas algunas de las cuales tienen actividad de oxalato oxidasa y otras de superóxido dismutasa, ambas actividades generadoras de H₂O₂ y por lo tanto pertenecientes al grupo de las proteínas de defensa implicadas en la respuesta HR. Otra de las enzimas implicadas en la defensa y sub expresada en nuestro sistema es la malato deshidrogenasa; esta enzima provee poder reductor (NADPH) necesario para la síntesis de fitoalexinas y para la generación de ROS. La subexpresión de la malato deshidrogenasa podría disminuir el estallido oxidativo en respuesta a la presencia del microorganismo.

Entre los factores de transcripción sub expresados se encuentra dos pertenecientes a la familia MYB (methyl jasmonate induced MYB-related Transcription factor y myb-related transcription factor MYB62). La familia de factores de transcripción MYB es muy numerosa y muchos de sus miembros han sido relacionados con las reacciones frente al estrés generado por daño, patógenos y deficiencias nutricionales en *N. tabacco* y *A. thaliana* (Sugimoto y col., 2000, Devaiah y col., 2009).

Parece lógico suponer que en el caso de la colonización por *A. brasilense* la represión en la expresión de estos genes está dirigida a permitir la permanencia y proliferación de la bacteria.

Tomados en conjunto los resultados indican que la inoculación de tomate con *A. brasilense* moduló la expresión de un número importante de genes involucrados en la regulación de diferentes aspectos fisiológicos de la planta como los relacionados con el metabolismo y la defensa.

Existen pocos antecedentes de análisis global de la expresión génica en plantas como consecuencia de la inoculación con una bacteria benéfica como *A. brasilense*. Los perfiles de inducción y represión de genes de defensa obtenidos en nuestro estudio muestran similitudes y diferencias con los sistemas planta/microorganismos benéficos estudiados anteriormente. Verhagen y col., (2004) y Cartieaux y col., (2008) analizando la respuesta de *A. thaliana* a la inoculación con PGPRs no relacionadas, como *P.fluorescens* WCS 4175 y *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 respectivamente, encontraron que ambas inducían la expresión de genes asociados a la respuesta ISR, dependiente de JA/etileno, típica de la inoculación con PGPRs, y que esta inducción sólo era detectada después que la planta había sido desafiada con un patógeno. Este estado de las plantas inoculadas, conocido como estado cebado, le proveería una mayor capacidad de respuesta frente a un patógeno invasor en cuanto a la rapidez y a la intensidad de la misma. En cambio, Wang y col., (2005) en un análisis transcriptómico llevado a cabo tres semanas después de la inoculación de *A. thaliana* con una especie endofítica de

Pseudomonas, encontraron que se modulan genes pertenecientes al sistema ISR y también al sistema SAR. Como en nuestro caso, se sobre expresaron algunos genes relacionados con las reacciones de defensa (como proteínas PRs) y se sub expresaron otros y todos estos cambios se evidenciaron sin que las plantas inoculadas hayan sido infectadas con patógenos. En otro estudio menos extensivo, Conn y col., (2008) analizaron la expresión de PR1 y PR5 como representativas de respuesta SAR y de PDF1.2 y Hel como representativas de ISR en el sistema *A.thaliana*/actinobacterias endofíticas a las siete semanas de la inoculación. Si bien no todas las especies utilizadas en el estudio respondieron cuali y cuantitativamente de la misma forma, en tres de las cuatro se evidenció una inducción relativamente baja de genes SAR y de genes dependientes de JA/etileno aún cuando las plantas no habían sido infectadas con patógenos. Después de la infección con un patógeno estos mismos genes se sobre expresaron fuertemente y aparecieron sobre expresados una gran cantidad de otros genes relacionados con la defensa. Se propone que la sobre expresión de genes de defensa como resultado de la inoculación con la PGPR prepara a la planta para una respuesta de mayor intensidad y más rápida cuando es atacada por un patógeno. Resultados recientes de Niu y col., (2011) indican que el fenómeno de inducción paralela de respuestas dependientes de SA e ISR no está limitado a las PGPRs endofíticas; en efecto, *Bacillus cereus* AR156 induce resistencia sistémica en *A. thaliana* activando simultáneamente senderos de defensa dependientes de SA y de JA/etileno que resultan en un efecto aditivo en el nivel de protección. Van Wees y col., (2008) por su parte, demostraron que la activación simultánea de los senderos SAR e ISR resulta en un mayor nivel de protección frente a la infección de *Arabidopsis* por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 que la alcanzada por cada uno de ellos individualmente. Es decir, las PGPRs capaces de inducir simultáneamente respuestas sistémicas que compartan características de ambos senderos serían capaces de establecer un nivel de resistencia mayor y más versátil en el huésped.

A. brasilense comparte la característica de estas PGPRs de inducir una respuesta de defensa en la que se solapa la expresión de genes pertenecientes a las vías ISR y SAR. En consecuencia es de esperar que *A. brasilense* tenga la capacidad de proteger a las plantas contra la infección por patógenos que operan por diferentes mecanismos.

Hemos comenzado en nuestro laboratorio a evaluar esta hipótesis llevando a cabo experimentos de biocontrol utilizando plantas de tomate infectadas con diferentes patógenos. Se utilizó: un hongo necrotrófico (*Sclerotium rolfsii*), un hongo biotrófico (*Fusarium solani* pv *solani*) y una bacteria hemibiotrófica (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). Encontramos que *A. brasilense* disminuye la incidencia de la infección (15%) y la mortalidad (40%) en plantas de tomate infectadas con *S. rolfsii*. Las plantas infectadas con *F. solani* resultaron protegidas contra el daño en un 100% a los 40 días después de la infección. Con respecto a la infección con *X. campestris* se observó que el tratamiento con *A. brasilense* provocó una

disminución apreciable del área necrotizada (Riva y col., trabajo en preparación). Es decir, la hipótesis elaborada en base a la expresión diferencial de genes de defensa en las plantas inoculadas según la cual *A. brasilense* debería comportarse como agente de biocontrol se ve apoyada por estos resultados experimentales en una especie vegetal de gran importancia económica y en la cual las enfermedades causadas por patógenos como los ensayados, tiene una alta incidencia económica.

Para complementar el estudio de los cambios en la expresión génica inducidos por la inoculación de las plantas de tomate con *A. brasilense* se comenzó el análisis de la expresión proteica en las mismas condiciones. Globalmente los resultados mostraron las mayores variaciones en los perfiles proteicos en las muestras tomadas a los 14 DDI; vale recordar que también a los 14 DDI se encontraron las mayores diferencias de expresión a nivel de ARNs mensajeros.

CONCLUSIONES

- ✓ Las tres rizobacterias evaluadas en esta tesis promovieron el crecimiento vegetal de las plantas de arroz principalmente del sistema radicular a tiempos cortos. De ellas la más eficiente resultó ser *A. brasilense* por lo cual se utilizó esta bacteria para continuar los estudios bioquímicos.
- ✓ Los estudios bioquímicos indican fuertemente que un sendero de señalización que involucra al etileno cumple un rol decisivo en el establecimiento de la respuesta fisiológica a la presencia de la rizobacteria.
- ✓ En el caso de la interacción arroz-*A. brasilense*, se presentan evidencias de que componentes de dicho sendero están relacionados con el metabolismo del calcio. Así, una CDPK resulta activada como resultado de la inoculación y un inhibidor de CaM bloquea el aumento en el desarrollo de las raíces. La intervención de una actividad CDPK entre los elementos reguladores de la síntesis de etileno ha sido demostrada en varias interacciones planta-microorganismo.
- ✓ *A. brasilense* resultó ser también un promotor del crecimiento de plantas de tomate. La bacteria se comportó como un endófito tanto en raíz como en parte aérea.
- ✓ La inoculación indujo en la planta la síntesis de AIA y de etileno.
- ✓ Las evidencias bioquímicas indicaron que el etileno está involucrado en el desarrollo de los pelos radiculares.
- ✓ El estudio global de la expresión de genes mostró cambios importantes inducidos por la inoculación de plantas de tomate con *A. brasilense*. Los cambios más notables corresponden a genes que pertenecen a los senderos de respuestas defensivas frente al ataque por microorganismos patógenos o a situaciones ambientales generadoras de estrés descritas en otros sistemas. Como se ha visto en otros sistemas planta-PGPR, las variaciones son en general cuantitativamente menores que las inducidas por patógenos.
- ✓ La inoculación de plantas de tomate con *A. brasilense* indujo cambios en la expresión de componentes de senderos defensivos pertenecientes tanto a SAR como a ISR. La posibilidad de inducir ambos senderos le otorgaría a este microorganismo la capacidad de proteger a su hospedador de un amplio rango de patógenos.
- ✓ Se destaca especialmente una disminución de la expresión de genes involucrados en la respuesta hipersensible lo que probablemente favorezca el establecimiento de la interacción endofítica tomate-*A. brasilense*.
- ✓ Los cambios en la expresión génica fueron acompañados de cambios en el perfil de proteínas cuyo análisis está en proceso.

Perspectivas futuras

✓ Basándonos en los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico se tratará de comprobar que efectivamente la sobre expresión de algunos de los genes relacionados con la defensa cumplen un rol en los mecanismos defensivos de la planta. En este sentido se comenzó la preparación de plantas de tomate transgénicas que sobre expresen el gen de Le-PR1. Este gen había resultado sobre expresado con un Fold change de 3,143 en el experimento de las micromatrices (Anexo 4). En este momento se ha llegado a la obtención de callos transformados con *Agrobacterium tumefaciens* portadores del gen Le-PR1. Es de esperar que las plantas resultantes que sobre expresen este gen presenten una mayor resistencia o tolerancia a diferentes patógenos.

✓ Por otro lado se completará el análisis global de las proteínas diferencialmente expresadas. De acuerdo a los resultados que se obtengan se seleccionarán algunas de las que presenten características llamativas en su expresión diferencial para ser identificadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME. (1992). Ethylene in Plant Biology, Ed 2. Academic Press, San Diego.
2. Abo-EI-Saad M, Wu R. (1995). A rice membrane calcium-dependent protein kinase is induced by gibberellin. *Plant Physiol.* 108: 787-793.
3. Ahn I-P, Lee S-W, Suh S-C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 759-768.
4. Ansari SA, Pramod K, Gupta BN. (1995). Root surface area measurements based on adsorption and desorption of nitrite. *Plant and Soil* 175:133-137.
5. Arnold DL, Jackson RW, Waterfield NR, Mansfield JW. (2007) Evolution of microbial virulence, the benefits of stress. *Trends Genet.* 23: 293-300.
6. Ausubel F. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
7. Ausubel FM. (2005). Are innate immune signaling pathways in plant and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973-979.
8. Axtell MJ, Staskawicz BJ. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis thaliana* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112:369-377.
9. Babu-Khan S, Yeo TC, Martin WL, Duron MR, Rogers RD, Goldstein AH. (1995). Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and environmental Microbiology* 61(3):972-978
10. Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo B-C, Harmon, AC, Huber SC. (1996). . Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell* 8: 505-517.
11. Balaji V, Smart CD. (2012). Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Res.* 21: 23-37.
12. Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov.sp.nov., a root-associated nitrogen-fixed bacterium. *Intl. J. System. Bacteriol.*36: 86-93.
13. Baldani, JI, Pot B, Kirchhof, G, Falsen, E, Baldani, VLD, Olivares, FL, Hoste, B, Kersters, K, Hartmann A. (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol* 46, 802–81.

14. Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J. (2000). Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fertil Soil* 30: 485–491.
15. Baldani JI, Baldani VLD. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(3): 549-579.
16. Ballester AR, Molthoff J, Vos Rde, Hekkert Bas te L, Orzaez D, Fernandez-Moreno JP, T Pasquale, Grandillo S, Martin C, Heldens J, Ykema M, Granell A, Bovy A. (2010). Biochemical and Molecular Analysis of Pink Tomatoes: Deregulated Expression of the Gene Encoding Transcription Factor SIMYB12 Leads to Pink Tomato Fruit Color. *Plant Physiol.* 152: 71-84.
17. Barassi CA, Sueldo RJ, Creus CM, Carrozzi LE, Casanovas EM, Pereyra MA. (2007). *Azospirillum* spp., a Dynamic Soil Bacterium Favourable to Vegetable Crop Production *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1(2), 68-82 Global Science Books.
18. Barbieri P, Galli E. (1993). Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indo-3-acetic acid production *Res. Microbiol.* 144, 69-75.
19. Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D. (1996) Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9(4):525-35.
20. Bashan Y, Levanony H, Klein E. (1986). Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3069-3073.
21. Bashan Y, Dubrovsky JD. (1996). *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biol. Fertil. Soils* 23: 435-440.
22. Bashan Y (1998). *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can J Microbiol* 44: 168–174.
23. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan L. (2004). *Azospirillum*–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J Microbiol* 50:521-577.
24. Bashan Y, de-Bashan. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assesment. *Adv Agron.* 108:77-136.
25. Bent A, Mackey D. (2007). Elcitors, effectors and R genes: the new paradigm and life time supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:399-436.
26. Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A. (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128: 951-61.

27. Blein J-P, Coutos-Thévenot P, Marion D, Ponchet M. (2002). From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science* 7: 293-296.
28. Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-76.
29. Bonshtien A, Lev A, Gibly A, Debbie, P, Avni, A, Sessa G. (2005). Molecular properties of the *Xantomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interactions* 18: 300-310.
30. Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN. (1996). Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Mol. Biol.* 30: 1129-37.
31. Bottini R, Cassan F, Piccoli P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:497–503.
32. Boursiac Y, Prak S, Boudet J, Postaire O, Luu D-T, Tournaire-Roux C, Santoni V, Maure C. (2008). The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. *Plant Signal Behav.* 3: 1096–1098.
33. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
34. Breviario D, Morello I, Giani S. (1995). Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* 27: 953-967.
35. Briat JF. (1992). Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2475-2483.
36. Camoni L, Harper JF, Palmgren MG. (1998). 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett.* 430: 381–384.
37. Cara B, Giovannoni JJ. (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science* 175:106–113.
38. Cartieaux F, Contesto C, Gallou A, Desbrosses G, Kopka J, Taconnat, Ludivine Renou Jean-Pierre, Touraine Bruno. (2008). Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 leads to complex transcriptome changes. *Molec. Plant Microbe Interaction* 21: 244-59.

39. Cassan F, Bottini R, Schneider G, Piccoli P. (2001). *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolize conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol* 125:2053–2058.
40. Cavalcante JJV, Vargas C, Nogueira EM, Vinagre F, Schwarcz K, Baldani JI, Ferreira PCG, Hemery AS. (2007). Members of the ethylene signaling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J. Exp. Bot.* 58: 673-686.
41. Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ. (2000). Response to *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol.* 123, 81-92.
42. Clough J, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK, Bent AF. (2000). The *Arabidopsis* dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9323–9328.
43. Cohn JR, Martin GB. (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene dependent cell death in tomato. *The Plant Journal* 44: 139-154.
44. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 4951-4959.
45. Conn VM, Walker AR, Franco MM. (2008). Endophytic actinobacteria induces defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interaction* 21: 208-218.
46. Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozzo MJ. (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1002-1071.
47. Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900-905.
48. Creus C, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Pantarulo S, Barassi CA, Lamattina. (2005). Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato. *Planta*, 221: 297–303.
49. Croes CL, Moens S, Van Bastelaere E, Vanderleyden J, Michiels KW. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2261–2269.
50. Crozier A, Arruda P, Jasmim J, Monteiro A, Sandberg G. (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2833–2837.
51. Curá JA, Ribaudó CM, Gaetano AM, Ghiglione HO. (2005). Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las

primeras etapas de desarrollo. Revista Foro Arrocero Latinoamericano 11/1(21), ISSN: 0122-9524.

52. Cutler D. (1978). Applied Plant Anatomy, Longman. London.
53. Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB. (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. Plant Cell. 15: 3033-3050.
54. Chen KH, Miller AN, Patterson GW, Cohen JD. (1988). A Rapid and Simple Procedure for Purification of Indole-3-Acetic Acid Prior to GC-SIM-MS Analysis. Plant Physiol 86: 822-825.
55. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol. 34: 33–41.
56. Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM. (2002). A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. Plant Physiol. 128: 256-70.
57. Choi HW, Kim YJ, Lee SC, Hong JK, Hwang BK. (2007). Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. Plant Physiol. 145: 890-904.
58. Chubatsu LS, Monteiro RA, de Souza EM, de Oliveira MAS, Yates MG, Wassem R, Bonatto AC, Huergo LF, Reynaud Steffens MB Rigo LU, de Oliveira Pedrosa (2012). Nitrogen fixation control in Herbaspirillum seropedicae. Plant Soil 356:197–207.
59. Chung K-W, Igari K, Uchida N, Tsaka M. (2008). New perspectives in plant defense responses through modulation of developmental pathways. Mol. Cells 26: 107-112.
60. Danhash N, Wagemakers CA, van Kan JA, De Wit PJ. (1993). Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum* infected tomato. Plant Mol. Biol. 22: 1017-29.
61. Davletova S, Meszaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, Dudits S, Deak M. (2001). Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin-like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. J. Exp. Bot. 52: 215-21.
62. Devaiah BN, Madhuvanathi R, Karthikeyan AS, Raghothama KG. (2009). Phosphate starvation responses and Gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 Transcription Factor in Arabidopsis. Molecular Plant. 2: 43-58.
63. De Wit PJGM. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. Cell Mol. Life Sci. 64, 2726-2732.
64. Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B. (2009). PGPR-Arabidopsis interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. Plant Signal Behav. 4: 321–323.

65. Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng D X, Khounlotham M, Bouche C, Somssich I, Genin S, Marco Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8024-8029.
66. Devoto A, Turner JG. (2003). Regulation of jasmonate plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 92: 329-337.
67. Döbereiner J, Marriel IE, Nery M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
68. Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI. (1995). How isolate and identify diazotrophic bacteria of non legume plants. Brasilia: EMBRAPA-SPI, Itaguaí, RJ, EMBRAPA-CNPAB, 60 pp.
69. Döbereiner J, Pedrosa F. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers, Estados Unidos. p. 155.
70. Dolam L. (2001). The role of ethylene in root hair growth in *Arabidopsis*. *J. Plant Nutrition Soil Science* 164: 141-145.
71. Dong J, Chen C, Chen Z. (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51: 21-37.
72. Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Zhang LH. (2004). Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* 70:954-960.
73. Draghici, S. (2001). Data Analysis tools for DNA Microarrays. Chapman and Hall. CRC Press LLC.p.506.
74. Dubeikovskiy AN, Mordukhova EA, Kocetkov VV, Polikarpova FY, Boronin AM. (1993). Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biol. Biochem.* 25:1277-1281.
75. Eckert B, Weber OB, Kirchof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 51, 17-26
76. Edreva A. (2005). Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology* 31: 105-124.
77. Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant J.* 36: 905-917.
78. El-Banna A, Hajirezaei M-R, Wissing J, Ali Z, Vaas L, Elke H-D, Jacobsen HJ, Schumacher H M, Kiesecker H. (2010). Over-expression of PR-10a leads to increased salt and osmotic tolerance in potato cell cultures. *J. Biotechnol.* 150: 277-287.

79. Elbeltagy AK, Nishioka T, Sato H, Suzuki B, Ye T, Hamada T, Isawa H, Mitsui K, Minamisawa. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* spp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5285-5293.
80. Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Rios G, Roig L, Moreno V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 107: 190-190.
81. Falk EC, Döbereiner J, Johnson, N.R. Krieg. (1985). Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et.al.1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
82. F.A.O. (2002). El papel del arroz en la seguridad alimentaria, el desarrollo rural y la defensa del ambiente. Reunión de la Comisión Internacional del Arroz en Bangkok. En Internet: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2002/7538-es.html>
83. Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 372–378.
84. Feys BJ, Parker JE. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16: 449-455.
85. Finlayson SA, Reid DM. (1994). Influence of CO₂ and ACC oxidase activity from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Phytochemistry* 35, 847-851.
86. Fluhr R, Mattoo AK. (1996). Ethylene- biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:479-523.
87. Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbetafruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132: 821-829.
88. Franz S, Britta E, Liese A, Kurth,J, Cazalé A-C, Romeis, T. (2011). Calcium-Dependent Protein Kinase CPK21 Functions in Abiotic Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 4: 83-96.
89. Galazka A, Król M, Perzynski A. (2012).The efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum* sp and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHS and Diesel Fuel. *Pol. J. Environ. Stud.* 21 (2):345-353.
90. Galis I, Simek P, Narisawa T, Sasaki M, Horiguchi T, Fukuda H, Matsuoka K. (2006). A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant J.* 46: 573-92.
91. Galland M, Gamet L, Varaquaux F, Touraine B, Touraine B, Desbrosses G. (2012). The ethylene pathway contributes to roots hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicarcearum* STM196. *Plant Science* 190: 74-81.

92. García de Salamone I, Döbereiner J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils*, 21: 193-196.
93. García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. (2005). Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica* infected plants. *Mycorrhiza* 15: 489–496.
94. Gargantini PR, Gonzalez-Rizzo S, Chinchilla D, Raíces M, Giammaría V, Ulloa R, Frugier F, Crespi M. (2006). A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 48: 843-856.
95. Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW. (2000). Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Mol. Biol.* 44: 687-697.
96. Gear ML, McPhillips Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Sculz A, Shabala KS, Palmgren MG, Zhu JK. (2007). *Arabidopsis* protein kinase PK55 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell.* 19: 1617-1634.
97. Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends biotechnol.* 20:338-343.
98. Gilroy S, Trewavas A. (2001). Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:307-14.
99. Giovannoni JJ. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 10: 283-289.
100. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopatol.* 43: 205-227.
101. Glick, B. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
102. Glick BR, Jacobson GB, Schwarze MK, Pastenak JJ. (1994). 1-aminocyclopropano 1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation *Can. J. Microbiol.* 40,911-915.
103. Glick BR, Karaturović DM, Newell, PC. (1995). A novel procedure for isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* 41: 533-536.
104. Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London: Imperial College Press.
105. Glick BR. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications *Scientifica* (ID 963401, 15 p. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>).
106. Gómez-Gómez L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology* 41: 1055–1062.

107. Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 425-449.
108. Grierson C, Schiefelbein J. (2009). Genetics of root hair formation. *Root Hair Plant Cell Monographs* 12: 1-25. Eds Emons A, Ketelaar T. Springer.
109. Gu Y-Q, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GJ. (2000). *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12: 771-785.
110. Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang T, He X, Han Y, Martin GB. (2002). Tomato transcription factors *Pti4*, *Pti5* and *Pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. 14: 817-831.
111. Hall JA, Peirson D, Ghosh S, Glick BR. (1996). Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Isr. J. Plant Sci.* 44:37-42.
112. Hamberg M, Sanz A, Rodriguez MJ, Calvo AP, Castresana C. (2003). Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 278: 51796-51805.
113. Hamberg M, Ponce de León I, Rodríguez MJ, Castresana C. (2005). α -Dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 338: 169-174.
114. Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16 (10):463-471.
115. Harmon AC, Putnam-Evans C, Cormier MJ. (1987). A calcium-dependent but calmodulin independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* 83: 830-37.
116. Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. (2000). CDPKs-a kinase for every Ca_2^+ signal? *Trends Plant Sci.* 5:154-59.
117. Harper JF, Sussman MR, Schaller GE, Putnam-Evans C, Charbonneau H, Harmon AC. (1991). A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252: 951-54.
118. Hartmann A, Stoffels M, Eckert B, Kirchhof G, Schloter M. (2000). Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. p.727 En E. W. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
119. Hartmann A, Zimmer W. (1994). Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum/Plant Associations*, ed. Y. Okon. Pp. 15-39, Boca Raton: CRC Press.
120. Hegeman AD, Rodriguez M, Han B-W, Uno Y, Phillips GN, Jr, Hrabak EM, Cushman JC, Harper JF, Harmon AC, Sussman MR. (2006). A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* 6: 3649–3664.

121. Herbers K, Meuwly P, Frommer W, Métraux J-P, Sonnewald U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8: 793–803.
122. Higashi K, Ishiga Y, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics*. 279:303-12.
123. Hurkman WJ, Tanaka CK. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* 81: 802-806.
124. Iñiguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defences. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 169-178.
125. Jain DK, Patriquin, DG (1985). Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
126. James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivares FL, Ladha JK. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microb. Interact.* 15: 894-906.
127. Jia Y, Martin G. (1999). Rapid transcript accumulation of pathogenesis related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease resistant tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 40: 455–465.
128. Johnson PR, Ecker JR, (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32, 227-254.
129. Johri BN, Sharma A, Viridi JS. (2003). Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 84:49-89.
130. Jones JDG, Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
131. Kamiyoshihara Y, Iwata M, Fukaya T, Tatsuki M, Mori H. (2010). Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *The Plant Journal* 64: 40-50.
132. Kanter U, Usadel B, Guerineau F, Li Y, Pauly M, Tenhaken R. (2005). The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta* 221: 243-254.
133. Kende H. (1993). Ethylene Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283-307.
134. Kende H, Zeevart JAD. (1997). The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.

135. Khammas KM, Kaiser P. (1991). Characterization of pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137: 75-79.
136. Klee HJ. (2002). Control of ethylene-mediated processes in tomato at the levels of receptors. *J. Exp. Bot.* 53 (377): 2057-2063.
137. Klimecka M, Muszynska G. (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica Polonica* 54: 219-233.
138. Kloepper JW, Rodriguez-Ubana R, Zehnder GW, Murphy JF, Sikora E, Fernandez C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potencial extensión to systemic and foliar diseases. *Austral. Plant Pathol.* 28:21-26.
139. Knoester M, Pieterse CMJ, Bol JF, Van loon LC. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria required ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant Microb. Interactions* 12:720-727.
140. Koch K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 235-246.
141. Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4718-23.
142. Kwak SH, Lee SH. (1997). The requirements for Ca^{2+} , protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1142-1149.
143. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
144. Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L. (2006). Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J. Exp. Bot.* 57: 1341-51.
145. Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M. (2010). *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:2832-2837.
146. Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14: 2627–2641.
147. Lee JY, Yoo BC, Harmon AC. (1998). Kinetic and calcium binding properties of three calcium dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* 37: 6801–6809.
148. Lee HC, Htoon AK, Paterson JL. (2007). Alkaline extraction of starch from Australian lentil cultivars Matilda and Digger optimized for starch yield and starch and protein quality. *Food. Chem.* 102: 551–559.

149. Lee DH, Choi HW, Hwang BK. (2011). The Pepper E3 Ubiquitin Ligase RING1 gene, CaRING1, is required for cell death and the salicylic acid-dependent defense response. *Plant Physiology* 156: 2011–2025.
150. Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Herve C, Toth K, et al. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 2343–2348.
151. Lemanceau P. (1992). Effects bénéfiques de rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas spp fluorescens*. *Agronomie*. 12: 413-434.
152. León-Kloosterziel KM, Verhagen BW, Keurentjes JJ, Van Pelt JA, Rep M, Van Loon LC, Pieterse CM. (2005). Colonization of *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. *Plant Molecular Biology* 57: 731-748.
153. Li N, Mattoo AK. (1994). Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key enzyme in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme. *J. Biol. Chem.* 269, 6908-6917.
154. Li J, Brader G, Palva ET. (2004). The WRKY transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-331.
155. Lin Z, Zhong S, Grierson D. (2009). Recent advances in ethylene research. *J. Exp. Botany* 60: 3311-3336.
156. Lin X, Hou Z, Feng Y, Zhao S, Ye J. (2011). Isolation and Characteristics of Efficient Carbendazim Degradation Bacterium. *Advances in Biomedical Engineering*. 2: 384-388.
157. Lindemayr C, Saalbach G, Durner J. (2005). Proteomic identification of N-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 921-930.
158. Lizada MCC, Yang SF. (1979). A simple and sensitive assay for l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid. *Anal Biochem* 100: 140-145.
159. Liu Y, Zhang S. (2004). Phosphorylation of 1 aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6 a stress response mitogen activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386-3399.
160. Ljung K, Bhalearo RP, Sandberg G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28, 465-474.
161. Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Roberto S. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1938–1950.
162. Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternak C, Boller T, Jones JDG, Romeis T. (2005). Ethylene mediated cross-talk between calcium-dependent protein

kinases and MAPK signaling controls stress responses in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 10736-10741.

163. Lund ST, Stall RE, Klee HJ. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. Plant Cell 10: 371-382.

164. Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. Cell 108, 743-754.

165. Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nat. Genet. 26: 403-10.

166. Mangana D, Suttle JC. (1991). The Plant Hormone Ethylene, Quinta Edición

167. Matton DP, Brisson N. (1989). Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. Mol. Plant Microbe Interact. 2: 325-31.

168. Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. (2007). *Azospirillum canadiense* sp.nov. a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 620-624.

169. Meuwly P, Pilet PE. (1991). Local treatment with indole-3-acetic acid induces differential growth responses in *Zea mays* L. roots. Planta 185: 58-64

170. Mikkelsen MD, Petersen BL, Glawischnig E, Jensen AB, Andreasson E, Halkier BA. (2003). Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. Plant Physiol 131: 298–308.

171. Mizuno S, Hirasawa Y, Sonoda M, Nakagawa H, Sato T. (2006). Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). Plant Science 170: 1156-1163.

172. Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. Mol. Plant Microbe Interact. 21: 1001-1009.

173. Mu RL, Cao YR, Liu YF, Lei G, Zou HF, Liao Y, Wang HW, Zhang WK, Ma B, Du JZ, Yuan M, Zhang JS, Chen SY. (2009). An R2R3-type transcription factor gene AtMYB59 regulates root growth and cell cycle progression in *Arabidopsis*. Cell Res. 19: 1291-304.

174. Munnik T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. Trends Plant Sci 6: 227–233.

175. Mysore KS, Crasta OR, Tuori RP, Folkerts O, Swirsky PB, Martin GB. (2002). Comprehensive transcript profiling of *Pto* and *Prf* mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Plant J. 32: 299-315.

176. Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A. (1998). Differential Expression and Internal Feedback Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-

- Carboxylate Synthase, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, and Ethylene Receptor Genes in Tomato Fruit during Development and Ripening. *Plant Physiol.* 118: 1295-1305.
- 177.** Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Duand, C. (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Interactive Plant Biology* 52: 195-204.
- 178.** Neilands JB, Leong SA. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 187-208.
- 179.** Nico M, Ribaudó CM, Gori JI, Cantore ML, Cura JA. (2012). Phosphate uptake and vegetative growth promotion in glucose-exuding plants (*Oryza sativa*) inoculated with Plant Growth Promoting Bacteria. *Applied Soil Ecology* 61:190-195.
- 180.** Niu D-D, Liu H-X, Jiang C-H, Wang, Y-P, Wang Q-Y, Jin H-L, Guo J-H. (2011). The Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate-and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 533-542.
- 181.** Nguyen HN, Kim JH, Hyun WY, Nguyen NT, Hong SW, Lee H. (2013). TTG1-mediated flavonols biosynthesis alleviates root growth inhibition in response to ABA. *Plant Cell Rep.* Jan 10. [Epub ahead of print]
- 182.** Nukui N, Ezurra H, Minamisawa K. (2004). Transgenic *Lotus japonicus* with an ethylene receptor gene CM-ERS1/H70A enhances formation of infection threads and nodule primordials. *Plant and Cell Physiology* 45: 427-435.
- 183.** O'Sullivan DJ, O'Gara F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- 184.** Ogura Y, Ishihara A, Iwamura H. (2001). Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Z Naturforsch* 56: 93–202.
- 185.** Ordentlich A, Elad Y, Chet I. (1988). The role of chitinase of *Serratia marcescens* in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84-88.
- 186.** Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A. (2006). Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140: 3-11.
- 187.** O'Sullivan DJ, O'Gara F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- 188.** Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the IAA-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132, 1241-1248.
- 189.** Patten CL, Glick BR. (1996). Bacterial biosynthesis of indol-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42,207-220.

- 190.** Patten CL, Glick B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- 191.** Pendley KF, Martin GB. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease. *Annu. Rev. Phytopatol.* 41: 215-243.
- 192.** Peng G, Wang H, Zhang G, Hou W, Liu Y. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1263-1271
- 193.** Penmetsa RV, Cook DR. (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275: 527-530.
- 194.** Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV. (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.
- 195.** Perrot-Rechenmann C, Napier RM. (2005). Auxins. *Vitam. Horm* 72, 203-233.
- 196.** Piccoli P, Lucangeli C, Schneider G, Bottini R. (1998). Hydrolysis of 17,17-[2H₂]-Gibberellin A20-Glucoside and 17,17-[2H₂]-Gibberellin A20-Glucosyl Esther by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul.* 23: 179-182.
- 197.** Pieterse CM, vanWees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1571–80.
- 198.** Pieterse CMJ, Van Loon LC. (2004). NPR1: the spider in the web of pathways induced resistance signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7:456-464.
- 199.** Pieterse CMJ, Dicke M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular, mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science* 12 (12) 564–569.
- 200.** Pinheiro RD, Boddey LH, James EK, Sprent JI, Boddey RM. (2002). Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil* 246: 151–166.
- 201.** Prasad G, Evan K, Natarajan M, Pallavolu M, Reinhold-Hurek B, Ladha J. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183: 2634-2645.
- 202.** Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé MT, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol* 4: 1902-13.
- 203.** Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. (2002). Antibiotic production by bacteria biocontrol agents. *Antonie Leeuwenhoek*, 81:537-547.

- 204.** Raíces M, Chico JM, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM. (2001). Molecular characterization of StCDPK1 a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Molecular Biology* 46: 591-601.
- 205.** Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noiro E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. (2009). Remorin, a Solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* 21: 1541–1555.
- 206.** Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA, Klipp E, Jakobs C, Breitenbach M, Lehrach H, Krobitsch S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology* 6: 10-15.
- 207.** Rao MV, Lee H-I, Keith DR. (2002). Ozone induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal* 32: 447–456.
- 208.** Ray, P Agarwal, R Arora, S Kapoor, AK Tyagi. (2007). Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Molecular Genetics and Genomics* 278:493–505.
- 209.** Reddy ASN. (2001). Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci.* 160:381-404.
- 210.** Reinhold B, Hurek T, Niemann EG, Fendrik I. (1986). Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- 211.** Rennie RJ, Thomas JB. (1987). ¹⁵N-determined effect of inoculation with N₂-fixing bacteria on nitrogen assimilation in western Canadian wheat. *Plant Soil* 100:213-223.
- 212.** Reymond M, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L, Desnos T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell & Environment* 29: 115–125.
- 213.** Ribaudó CM, Castilla R, Trincheró GD, Vasallo GJ, Cantore ML, Curá JA. (2000). *Azospirillum irakense* induces a rise in biomass and changes in the SDS-phosphoprotein pattern in rice seedlings. Annual Meeting of Plant Physiologist. San Diego, California U.S.A.
- 214.** Ribaudó CM, Rondanini DP, Curá JA, Fraschina AA. (2001). Response of Zea mays to the inoculation with *Azospirillum* on the nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biologia Plantarum* 44 (4): 631-634.
- 215.** Ribaudó CM, Rondanini DP, Trincheró GD, Curá, JA. (2006). Influence of *Herbaspirillum seropedicae* on Maize Nitrogen Metabolism. *Maydica* 51: 481-485.

216. Ribaudó, CM, Paccusse NA, Curá JÁ, Frascina AA. (1998). Azospirillum-maize association: effects on yield dry matter content and the nitrate reductase activity. *Agricultura Tropica et Subtropica*. 31:61-69.
217. Riechman JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
218. Rietz S, Bernsdorff FEM, Cai D. (2012). Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Exp. Bot.* 63: 695–709.
219. Riov J, Yang SF. (1989). Ethylene and auxin ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiate*) cuttings. *J. Plant Growth Regul.* 8: 131-141.
220. Riva DS, Curá JA, Cantore ML, Ribaudó CM. (2013). Early responses of tomato plants to the infection with *Sclerotium rolfsii*. Involvement of ethylene and *LE-ACS2* expression on the disease development. *Enviado a Phytopatology*.
221. Rocha F, Papini-Terzi F, Nishiyama Jr MY, Vêncio RZN, Vicentini R, Duarte RDC, de Rosa Jr, VE Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues, FA, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti JA, Almeida RS, Figueira AO, Hemerly A S, Silva-Filho MC, Menossi M, Souza GM. (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8: 71.
222. Rodrigo I, Vera P, Tornero P, Hernandez-Yago, J, Conejero V. (1993). cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23 characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.*102: 939-945.
223. Rodríguez-Cáceres E. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
224. Roitsch T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:198–206.
225. Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG. (2001). Calcium-dependent protein kinase plays an essential role in a plant defense response. *The EMBO J.* 20: 5556-5567.
226. Romeis T (2012). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.10.024.
227. Romero A, Correa OS, Moccia S, Rivas JG. (2003). Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion in the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato *Journal of Applied Microbiology* 95:832–838.
228. Roncato-Maccari LD, Ramos HJ, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MB, Souza EM. (2003). Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:39–47.

229. Rosano GL, Bruch EM, Ceccarelli EA. (2011). Insights into the Clp/HSP100 chaperone system from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 286: 29671-80.
230. Roskoski R. (1983). Assay of protein kinase. In: Methods in Enzymology. Corbin, J. D., & Hardman, J. G., (ed.), 99, pp. 3-6, Academic Press, San Diego.
231. Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K. (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. The Plant J. 23: 319-327.
232. Saleena LM, Rangarajan S, Nair S. (2002). Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants grown in saline and non saline sites of coastal agricultural ecosystem. Microbial Ecol. 44: 271-277.
233. Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA. (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. Plant Physiol. 117: 465–72.
234. Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell Supplement 401-417.
235. Santner A, Estelle M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. Nature 459: 1071-8.
236. Sebastià HC, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC. (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. Arch. Biochem. Biophys. 428: 81-91.
237. Seyed Sharifi R. (2011) .Study of grain yield and some of physiological growth indices in maize (*Zea mays* L.) hybrids under seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) . Journal of Food, Agriculture and Environmental 3: 189-192.
238. Shah S, Li J, Moffat BM, Glick BR. (1997). ACC deaminase genes from plant growth promoting Rhizobacteria: present status and future prospects, (eds) A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino, OECD, Paris. Pp 320-324.
239. Sharma VK, Nowak YJ. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro coculture of seedlings with a plant growth-promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). Can. J. Microbiol. 44: 528-536.
240. Shiu S-H, Bleeket AB. (2001). Receptor-like kinase from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 10763-10768.
241. Shoebitz M, Ribaudó CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Cura JA. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 41:1768–1774.
242. Shoji T, Nakajima K, Hashimoto T. (2000). Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. Plant Cell Physiol. 41: 1072–1076.

243. Singh CS. (1992). Prevalence of *Azospirillum* within the stem nodules of *Aeschynomene* spp. and *Neptunia* sp. Z. Mikrobiol. 147: 455-458.
244. Singh K, Foley RC, Onate-Sancuez L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 430-436.
245. Sisler EC, Serek M. (2003). Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. Plant Biol. 5: 473-480.
246. Smeeckens S. (2000). Sugar-Induced Signal Transduction In Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 49-81.
247. Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, Vanderleyden J. (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 71:1803–10.
248. . (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Cells 22: 233-238.
249. Song JT, Koo YJ, Park JB, Seo YJ, Cho YJ, Seo HS, Choi YD. (2009). The expression patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 encoding a salicylic acid (SA) methyltransferase and a SA glucosyltransferase, respectively, in Arabidopsis plants with altered defense responses. Mol Cells. 28: 105-109.
250. Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. Plant Cell 19: 2169–2185.
251. Stepanova AN, Alonso JM. (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. Current Opinion in Plant Biology 12: 548-555.
252. Stulemeijer IJE, Joosten MHAJ. (2008). Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. Molecular Plant Pathology 9: 545-560.
253. Stulemeijer IJE, Stratmann JW, Joosten MHAJ. (2007). Tomato mitogen-activated protein kinases LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 are activated during the Cf-4/Avr4-induced hypersensitive response and have distinct phosphorylation specificities. Plant Physiology 144: 1481–1494.
254. Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H. (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. Plant Cell 12: 2511–2527.
255. Szczegieliak J, Klimecka M, Liwosz A, Ciesielski A, Kaczanowski S, Dobrowolska G, Harmon AC, Muszyńska G. (2005). A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. Plant Physiol. 139(4):1970-83.
256. Tatsuki M, Mori Y. (2001). Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, Le-ACS2, at the C terminal region. J. Biol. Chem. 276: 28051-28057.
257. BR, Jones AM. (2007). The plant heterotrimeric G-protein complex. Annu. Rev. Plant Biol. 58: 249-266.

- 258.** Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B. (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363–375.
- 259.** Thuler D, Flosch E, Handro W, Barbosa M. (2003). Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined medium. *Lett Appl Microbiol* 37:174–178.
- 260.** Tirajoh A, Aung T, McKay AB. (2005). Stress-responsible α -dioxigenase expression in tomato roots. *J. Exper. Botany.* 56: 713-723.
- 261.** Tornero P, Gadea J, Conejero V, Vera P. (1997). Two PR-1 Genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 624–634.
- 262.** Tronchet M, Balagué C, Kroj T, Jouanin L, Roby D. (2010). Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 11: 83-92.
- 263.** Tsai S, Harris PJ, Lovell PH. (2004). Bands of root hairs are produced in tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to specific combinations of thermoperiods and photoperiods. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 3: 121-129.
- 264.** Ulloa RM, Raíces M, MacIntosh GC, Maldonado S, Téllez-Iñón MT. (2002). Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 115:417-27.
- 265.** Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K.(1994). Two genes that encode Ca_2^+ - dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 244: 331-40.
- 266.** Van der Ent S, Verhagen BWM, Van Doorn R, Bakker D, Verlaan MG, Pel MJC, Joosten RG, Proveniers MCG, Van Loon LC, Ton J, Pieterse CMJ. (2008). MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146:1293–1304.
- 267.** Van der Hoorn RAL, Wulff BBH, Rivas S, Durrant MC, Van der Ploeg A, De Wit, PJGM, Jones JDG. (2005). Structure-function analysis of Cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmatic leucine-rich repeats. *Plant Cell* 17:1000-1015.
- 268.** Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. (2006, a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plants Sci.* 11: 184-191.
- 269.** Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. (2006, b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- 270.** Van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 443-448.

- 271.** Vasconsuelo A, Giuletti AM, Picotto G, Rodriguez-Talou J, Boland R. (2003). Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. *Plant Sci.* 165: 429–436.
- 272.** Velloso T, Martínez M, López M, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell.* 19: 831–846.
- 273.** Velloso T, Vicente J, Kulasekaran S, Hamberg M, Castresana C. (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol.* 154: 444-448.
- 274.** Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC. (2004). The transcriptome of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 895–908.
- 275.** Viehveger K, Dordschbal B, Roos W. (2002). Elicitor-activated phospholipase A2 generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14: 1509–1525.
- 276.** Voisard C, Keel C, Haas D, Défago G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8: 351-358.
- 277.** Walker MJ, Birch, RG, Pemberton, JM. (1988). Cloning and characterization of an albicidin resistance gene from *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol* 2: 443-454.
- 278.** Wan B, Lin Y, Mou T. (2007). Expression of rice Ca²⁺ dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Lett.* 581: 1179-89.
- 279.** Wang KLC, Li H, Ecker JR. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell Supp.* 131-151.
- 280.** Wang Y, Ohara Y, Nakashiki H, Tosa, Ayama NS. (2005). Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 385-396.
- 281.** Welbaum G, Sturz, Dong Z, Nowak J. (2004). Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23 (2):175-193.
- 282.** Weller DM. (1988). Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- 283.** Widjaja I, Lassowskat I, Bethke G, Eschen-Lippold, L, Long, H-H, Naumann, K, Dangl, JL, Scheel D, Lee, J. (2010). A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector

AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* 6: 249-258.

284. Wilkins M, Pasquali C, Appel R, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Andrew A, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology* 14: 61–65.

285. Wubben JP, Lawrence CB, De Wit PJGM. (1996). Differential induction of chitinase and translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38: 1102–1113.

286. Xie CH, Yokota A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1435-8.

287. Xie H, Pasternak JJ, Glick BR. (1996). Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indolacetic acid. *Curr.Microbiol.* 32:67-71.

288. Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata C, Torki M, Ban Y, Nishimura S, Shibata D. (2005). Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* 356:127-134.

289. Yang G, Komatsu S. (2000). Involvement of calcium-dependent protein kinase in rice (*Oryza sativa* L.) lamina inclination caused by brassinolide. *Plant Cell Physiol.* 14: 1243-1250.

290. Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell Supp* 14: 375–388.

291. Yip WK, Dong JG, Yang SF. (1991). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple fruits. *Plant Physiol.* 95: 251-257.

292. Yoo S-D, Cho Y, Sheen J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends in Plant Science* 14:270-279.

293. Zarebinsky TI, Theologis A. (1993). Anaerobiosis and plant growth hormone induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Biol. Cell* 4: 363–373.

294. Zaidi A, Khan MS. (2005). Interactive effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of wheat. *J. Plant Nutr.* 28: 2079-2092.

295. Zhang L, Birch RG. (1996). Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Letters in Applied Microbiology* 22(2):132–136.

296. Zhang XS, Choi JH. (2001). Molecular Evolution of Calmodulin-Like Domain Protein Kinases (CDPKs) Plants and Protists. *J. Mol. Evol.* 53: 214–224.

- 297.** Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M. (2011). Overexpression of a Harpin-encoding gene hrf1 in rice enhances drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 62: 4229-38.
- 298.** Zhao J, Wang X. (2004). *Arabidopsis* phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 279: 1794–1800.
- 299.** Zhao J, Guo Y, Fujita K, Sakai K. (2004a). Involvement of cAMP signaling pathway in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *New Phytol.* 161: 723–733.
- 300.** Zhao J, Guo Y, Sakai K. (2004, b). Rapid metabolism of phosphoinositides and its possible role in phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Planta.* 129: 121–131.
- 301.** Zhao J, Zheng SH, Fujita K, Sakai K. (2004, c). Jasmonate and ethylene signaling pathways and their interaction are integral parts of the elicitor signal transduction leading to phytoalexin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell culture. *J. Exp. Bot.* 55: 1003–1012.
- 302.** Zhou J, Tang X, Martin G, (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* 16: 3207- 3218.
- 303.** Zhu C, Gan L, Shen Z, Xia K. (2006). Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57: 1299-308.
- 304.** Zipfel C, Felix G. (2005). Plant and animal: a different taste for microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 353-360.
- 305.** Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749-760.

Anexo 1: Programa de amplificación de los genes de 7 DDI y 14 DDI

Gen	PROGRAMA		
	Nº de paso	Temperatura (°C)	Tiempo
<i>Le-PR1-b</i>	1	94	2 min
	2	94	30 seg
	3	55	1 min
	4	72	1 min
	5	repetir 25 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-PR2</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	57	45 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-PR P23</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	60	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 25 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-Cyt P 450</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	60	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-CO</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	60	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
<i>Le-Pti4</i>	7	4	hold
	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	52	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 25 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
7	4	hold	
<i>Le-WRKY</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	58	30 seg
	4	repetir 25 veces del paso 2 al 4	
	5	72	5 min

	6	4	hold
	7	4	hold
<i>Le-α DOX1</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	57	45 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-ACS2</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	58	45 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	4 min
	7	4	hold
<i>Le-ACS4</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	53	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-SN2</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	53	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-ACT 1</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	52	30 seg
	4	72	45 seg
	5	repetir 25 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold
<i>Le-UBI3</i>	1	94	1 min
	2	94	30 seg
	3	62	45 seg
	4	72	1 min
	5	Repetir 30 veces del paso 2 al 4	
	6	72	5 min
	7	4	hold

Anexo 2: Genes sobre expresados a los 7 DDI

SGN	ID	Fold Change	Gen correspondiente	Score	E-value	P-value
	PRs					
SGN-U212990	1-1-1.2.20.4	4,815	Pathogenesis-related protein STH-2	269	3,00E-70	2,71E-02
SGN-U213790	1-1-1.2.9.4	2,709	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	530	8,00E-149	2,22E-02
SGN-U213451	1-1-2.3.10.15	2,453	PR1 protein [Solanum lycopersicum]	391	5,00E-107	3,69E-02
SGN-U143414	1-1-6.3.17.2	1,936	NP24 protein precursor (Pathogenesis-related protein PR P23)	546	2,00E-153	3,14E-02
SGN-U213616	1-1-8.4.13.6	1,791	Dormancy-associated protein -related [Arabidopsis thaliana]	137	1,00E-32	1,64E-02
SGN-U212989	1-1-1.3.2.6	0,973	TSI-1(PR10)	254	8,00E-66	4,62E-02
	Factores de transcripción					
SGN-U216022	1-1-7.2.10.20	1,199	Transcription factor Pti4 - tomato (fragment)	377	1,00E-102	2,83E-02
SGN-U146364	1-1-1.3.11.20	1,158	MTD1 [Medicago truncatula]	94	3,00E-17	2,37E-02
SGN-U224034	1-1-2.2.8.13	1,277	Homeobox-leucine zipper protein PHZ1 [imported]	235	2,00E-61	4,48E-03
	Relacionados con la defensa					
SGN-U213351	1-1-3.1.15.5	1,231	Peroxidase [Nicotiana tabacum]	174	2,00E-42	5,23E-02
	Relacionados con el metabolismo					
SGN-U229479	1-1-2.4.2.12	1,07	Beta-amylase PCT-BMY1 [Solanum tuberosum]	470	2,00E-130	3,21E-02
SGN-U216614	1-1-2.2.3.19	1,234	Putative auxin-induced SAUR-like protein [Capsicum annuum]	156	2,00E-36	2,82E-02
SGN-U217651	1-1-1.2.9.20	1,372	POZ domain protein family A. thaliana]	492	5,00E-137	3,44E-02
SGN-U220946	1-1-3.1.4.7	0,939	Putative beta-galactosidase BG1 [Vitis vinifera]	414	1,00E-113	1,71E-02
	Relacionados con el transporte					
SGN-U147962	1-1-3.2.20.2	1,128	Mitochondrial carrier protein family [Arabidopsis thaliana]	418	1,00E-114	2,88E-03
	Respuesta al daño					
SGN-U216159	1-1-1.3.11.20	1,117	MTD1		3,00E-17	2,37E-02
SGN-214024	1-1-1.3.15.13	1,28	Dehydration-induced protein ERD15 ,L. esc.	208	1,00E-51	2,19E-02
	Señalización					
SGN-U228349	1-1-5.2.19.12	0,976	Protein phosphatase 2C [Nicotiana tabacum]	163	2,00E-38	2,19E-02
SGN-U228690	1-1-2.1.18.16	0,949	DHHC-type zinc finger domain-containing protein [A. thaliana]	131	1,00E-28	2,49E-02
	Función desconocida					
SGN-232709	1-1-8.1.15.11	1,897	Unknown protein - tomato	485	3,00E-135	4,97E-02
SGN-213680	1-1-6.1.13.13	1,628	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	229	4,00E-60	2,45E-02
SGN-213913	1-1-2.3.10.8	1,521	Hypothetical protein - tomato	350	1,00E-94	3,85E-02
SGN-215303	1-1-3.2.15.15	1,394	Hypothetical protein At2g24100– A. thaliana	324	1,00E-88	7,42E-03
SGN-213666	1-1-8.4.14.11	1,072	Expressed protein [A. thaliana]	387	7,00E-108	2,99E-02

Anexo 3: Genes reprimidos a los 7 DDI

SGN	ID	Fold change	Gen correspondiente	Score	E-value	P-value
	Relacionados con el Metabolismo					
SGN-U220393	1-1-7.3.5.8	-1,048	Flavonoid 1-2 rhamnosyltransferase	154	1,00E-36	5,11E-02

Anexo 4: Genes sobre expresados a los 14 DDI

SGN-U	ID	Fold change	Gen correspondiente	Score	E-value	P-value
	PRs					
SGN-U212922	1-1-2.4.16.4	3,143	Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6) (Ethylene-induced protein P1) (PR1-b)	346	2,00E-93	4,02E-02
SGN-U212923	1-1-5.2.16.3	2,395	PR1a (Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor (P4)	347	2,00E-93	2,38E-03
SGN-U214902	1-1-8.2.15.11	1,589	class IV chitinase [Vitis vinifera] (PR-3)	391	7,00E-107	2,97E-02
SGN-U212827	1-1-1.3.20.14	1,5	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B precursor (PR2)	681	7,00E-194	4,63E-02
SGN-U212928	1-1-6.3.17.2	1,409	NP24 protein precursor (Pathogenesis-related protein PR P23) (Salt-induced protein)(PR5)	546	2,00E-153	1,54E-02
SGN-U212747	1-1-8.2.11.2	1,205	Probable glutathione S-transferase (Pathogenesis-related prot 1)	384	7,00E-105	3,89E-02
SGN-U212989	1-1-1.3.2.6	1,213	TSI-1 (pathogenesis-related protein 10)	283	1,0E-074	1,66E-02
SGN-U222086	1-1-5.1.18.12	1,141	germin-like protein family [Arabidopsis thaliana]	145	5,00E-35	4,91E-02
	Factores de transcripción					
SGN-U216986	1-1-5.2.18.12	1,365	putative DNAJ protein [Nicotiana tabacum]	419	5,00E-115	1,67E-02
SGN-U226247	1-1-4.2.17.9	1,33	WRKY53; DNA binding / protein binding / transcription activator/transcription factor	68	3,00E-12	4,72E-02
SGN-U215236	1-1-8.1.13.21	1,275	CHP-rich zinc finger protein, putative [Arabidopsis thaliana]	105	1,00E-22	5,31E-02
SGN-U217726	1-1-4.3.6.12	1,33	Myb family transcription factor [Arabidopsis thaliana]	166	2,00E-41	3,61E-02
SGN-U236404	1-1-5.3.20.13	1,24	transducin / WD-40 repeat protein family [Arabidopsis thaliana]	172	3,00E-43	4,60E-03
	Fotosíntesis					
SGN-U225509	1-1-8.3.3.13	1,26	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3A/3C	302	5,00E-80	9,51E-03
SGN-U213041	1-1-6.3.9.7	1,017	chlorophyll a/b-binding protein (cab-11) - tomato	515	5,00E-144	1,06E-04
SGN-U217000	1-1-8.1.3.14	1,017	Plastid-specific 30S ribosomal protein 3, chloroplast precursor (PSRP-3)	180	2,00E-43	1,06E-02
SGN-U216625	1-1-1.3.18.7	0,964	chloroplast nucleoid DNA-binding protein -related [Arabidopsis thaliana]	303	2,00E-80	2,24E-02
SGN-U232360	1-1-7.1.7.9	1,198	ClpC protease [Spinacia oleracea]	107	7,00E-22	4,90E-02
SGN-U217618	1-1-2.3.16.4	2,766	oxygen-evolving complex 25.6 kD protein, chloroplast precursor, putative [Arabidopsis thaliana]	261	1,00E-67	5,20E-02
	Relacionados con el metabolismo					
SGN-U212860	1-1-4.3.16.11	1,053	threonine deaminase	909	3,00E-262	5,40E-02
SGN-U226881	1-1-8.1.19.7	1,037	GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase-like protein [Oryza sativaoup] riboflavin biosynthetic process	196	2,00E-50	7,57E-03
SGN-U213373	1-1-1.3.13.20	0,928	bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase [Gossypium hirsutum]	557	3,00E-156	4,85E-02
SGN-U212913	1-1-5.1.20.6	0,936	hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD) (HPD) (HPPDase)	634	1,00E-179	9,87E-03
	Relacionados con la síntesis de hormonas					
SGN-U226360	1-1-4.4.15.2	0,972	ACC synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 4 - tomato	131	2,00E-29	1,07E-02
SGN-U212785	1-1-5.2.16.18	1,768	lipoygenase (EC 1.13.11.12) LX-3 - potato	225	3,00E-57	3,89E-02
	1-1-8.3.10.17	1,389	allene oxide cyclase [Lycopersicon esculentum]			2,41E-02
	Relacionados con la defensa					
SGN-U213160	1-1-3.2.9.6	1,248	hin1-like protein [Solanum tuberosum]	420	1,00E-115	1,84E-02
SGN-U226252	1-1-1.1.1.4	1,446	bacterial-induced peroxidase precursor [Gossypium hirsutum]	298	4,00E-79	7,08E-03
SGN-U216391	1-1-1.1.8.9	1,428	heat shock protein 18p - common tobacco	230	2,00E-58	3,48E-02
SGN-U213200	1-1-7.2.4.19	1,239	N-hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyl transferase THT1-3 [Lycopersicon esculentum]	475	5,00E-132	3,61E-02
SGN-U215231	1-1-8.3.20.5	1,358	Lignin forming anionic peroxidase precursor(peroxidasa secretoria)	538	4,00E-151	2,47E-03
SGN-U213159	1-1-2.3.13.17	1,085	Harpin-induced protein-related / HIN1-related	394	5,00E-94	5,47E-02
SGN-217308	1-1-7.3.20.7	1,04	TMV-induced protein I [Capsicum annum]	275	4,00E-72	2,56E-02
SGN-U217180	1-1-3.4.20.13	1,12	harpin-induced protein-related	174	7,00E-44	5,20E-02
SGN-U232360	1-1-7.1.7.9	1,198	ClpC protease [Spinacia oleracea]	107	7,00E-22	4,90E-02
SGN-U214374	1-1-5.2.15.15	1,216	Snakin 2	192	2,00E-47	2,48E-02
SGN-U218425	1-1-2.2.3.16	1,394	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family [Arabidopsis thaliana]	93	2,00E-19	5,14E-02

SGN-U217278	1-1-7.4.1.16	1,471	Ethylene-responsive proteinase inhibitor I precursor	235	1,00E-59	4,75E-02
SGN-U213023	1-1-2.4.13.7	1,414	Wound-induced proteinase inhibitor I precursor	222	2,00E-56	4,74E-02
SGN-U216625	1-1-1.3.18.7	0,964	non-symbiotic hemoglobin class 1 [Lycopersicon esculentum]	303	2,00E-80	2,24E-02
SGN-U241397	1-1-4.3.17.3	0,911	biotic cell death-associated protein [Nicotiana glutinosa]	326	2,00E-87	4,47E-02
SGN-U214430	1-1-6.1.20.11	0,949	proteína de resistencia a enfermedades relacionada con LRR [Arabidopsis thaliana]	590	1,00E-166	4,27E-02
	Relacionados con el transporte					
SGN-U221086	1-1-8.3.1.7	1,382	hexose transporter [Lycopersicon esculentum]	281	6,00E-74	1,46E-03
	Señalización					
SGN-U213418	1-1-2.2.18.1	1,385	phosphoprotein phosphatase 2A	1106	0.0	4,54E-02
SGN-U241073	1-1-2.3.12.17	1,231	calmodulin-binding family protein	383	1,00E-106	5,12E-02
SGN-U233109	1-1-1.2.18.1	1,307	WAK3 (wall associated kinase 3)	220	1E-57	1,79E-02
	Síntesis de pared					
SGN-U213044	1-1-8.4.13.10	0,906	xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3	552	3,00E-155	3,00E-02
SGN-U214186	1-1-8.4.14.20	1,366	MIOX4; inositol oxygenase	484	6,00E-137	4,25E-02
	Función desconocida					
SGN-U220543	1-1-5.4.20.18	1,705	expressed protein [Arabidopsis thaliana]	227	1,00E-59	1,52E-02
SGN-U227667	1-1-4.2.11.9	1,675	no hits found			2,52E-02
SGN-U213607	1-1-6.4.20.5	1,488	At1g17620 [Arabidopsis thaliana]	165	5,00E-41	4,99E-02
SGN-U220811	1-1-4.4.18.9	1,486	Tic22 -related [Arabidopsis thaliana]	190	2,00E-46	5,92E-03
SGN-U213689	1-1-2.3.13.18	1,402	unknown protein	68	5,00E-12	1,02E-02
SGN-U218405	1-1-8.3.18.20	1,234	expressed protein [Arabidopsis thaliana]	52	8,00E-07	1,06E-02
SGN-U214524	1-1-5.2.15.3	1,227	No hits found			4,86E-02
SGN-U217499	1-1-4.4.9.1	1,161	proline-rich protein-related [Arabidopsis thaliana]	98	1,00E-18	2,73E-02
SGN-U219903	1-1-5.4.20.13	1,044	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	313	4,00E-83	1,79E-02
SGN-U213982	1-1-5.2.17.1	0,976	P0034C11.13 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	333	5,00E-89	3,44E-02
SGN-U236931	1-1-2.1.13.6	0,975	No hits found			4,96E-02
SGN-U214170	1-1-7.3.20.10	0,942	unnamed protein product [Vitis vinifera]	582	1,00E-163	2,62E-02

Anexo 5: Genes reprimidos a los 14 DDI

SGN-U	ID	Fold change	Gen correspondiente	Score	E-value	P-Value
	Factores de transcripción					
SGN-U230369	1-1-7.3.11.6	-1,195	myb-related transcription factor MYB62 Arabidopsis thaliana	116	1,00E-26	2,83E-02
SGN-U216881	1-1-7.3.13.5	-1,447	methyl jasmonate induced MYB-related Transcription factor [Nicotiana tabacum] *	245	7e-063	2,7E-02
	Fotosíntesis					
SGN-U212938	1--8.2.2.17	-0,973	Chlorophyll A-B binding protein 13, chloroplast precursor (LHCII type III CAB-13)	518	4,00E-145	9,03E-03
SGN-U214067	1-1-8.2.12.18	-1,22	geranylgeranyl reductase [Nicotiana tabacum]	860	1,00E-247	3,13E-02
SGN-U212865	1-1-6.4.1.21	-0,935	Chlorophyll A-B binding protein 5, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-5) (LHCP)	141	2,00E-32	5,37E-03
SGN-U218905	1-1-7.3.10.21	-1,257	Chlorophyll A-B binding protein 1B, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-1B) (LHCP)	518	5,00E-145	5,41E-02
	Relacionados con metabolismo					
SGN-U214626	1-1-1.4.9.18	-1,074	IAA-Ala hydrolase (IAR3) [Arabidopsis thaliana]	600	1,00E-171	1,26E-02
SGN-U143318	1-1-8.2.1.3	-1,195	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)		E-146	3,16E-02
	Relacionados con la defensa					
SGN-U212734	1-1-3.4.4.19	-1,17	secretory peroxidase [Nicotiana tabacum]	602	1,00E-169	3,31E-02
SGN-U223255	1-1-8.1.18.12	-2,109	catechol oxidase (EC 1.10.3.1) precursor - fava bean	97	2,00E-18	3,64E-02
SGN-U230373	1-1-6.1.12.20	-0,922	ELI3 [Lycopersicon esculentum]	197	1,00E-48	2,41E-02
SGN-U213263	1-1-7.3.4.15	-0,958	germin protein [Nicotiana tabacum]	349	3,00E-94	8,50E-04
SGN-U213190	1-1-1.3.20.19	-1,331	cold-induced glucosyl transferase [Solanum sogarandinum]	868	5,00E-250	4,10E-05
SGN-U217504	1-1-2.1.6.10	-1,047	putative RING protein	167	2,00E-39	1,62E-02
SGN-U215942	1-1-5.3.13.17	-1,08	remorin family protein [Arabidopsis thaliana]	124	9,00E-29	5,22E-03
SGN-U233544	1-1-5.2.6.4	-0,948	RelA-SpoT like protein RSH1 [Nicotiana tabacum]	213	2,00E-53	1,66E-02
	Relacionados con transporte					
SGN-U214206	1-1-6.2.1.2	-1,955	aquaporin 2 [Samanea saman]		1,00E 141	1,75E-02
SGN-U213516	1-1-8.2.11.16	-1,977	plasma intrinsic protein 2,1 [Juglans regia]	95	5,00E-18	2,95E-02
SGN-U231972	1-1-1.3.15.8	-0,991	aquaporin PIP-type pTOM75 (Ripening-associated membrane protein) (RAMP)	156	7,00E-37	3,30E-02
SGN-U213272	1-1-8.3.9.6	-0,922	similar to aquaporin [Solanum lycopersicum]	501	9,00E-140	3,30E-02
	Síntesis de pared					
SGN-U217111	1-1-6.2.13.5	-0,925	glycosyl hydrolase family 5/cellulase ((1-4)-beta- mannan endohydrolase) [Arabidopsis thaliana]	582	3,00E-166	2,10E-02
SGN-U218653	1-1-7.1.18.11	-1,005	probable sterol 24-C-methyltransferase (EC 2.1.1.41) - common tobacco (fragment)	654	1,00E-185	1,30E-03
	Función desconocida					
SGN-U216194	1-1-3.4.2.1	-1,049	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	347	1,00E-93	2,81E-02
SGN-U214232	1-1-7.4.1.19	-0,96	hypothetical protein [Vitis vinifera]	276	5,00E-72	1,26E-02
SGN-U215850	1-1-6.2.11.2	-0,96	hypothetical protein isoform 1 [Vitis vinifera]	220	3,00E-55	3,22E-02
SGN-U215850	1-1-7.4.11.1	-1,801	hypothetical protein [Vitis vinifera]	212	8,00E-53	3,99E-02
SGN-U215614	1-1-4.1.6.3	-1,879	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	94	1,00E-19	5,40E-02

* este gen al momento de llevar a cabo el estudio estaba catalogado como: related protein Ph2 - garden petunia

Anexo 6: Confirmación de los datos de las micromatrices por RT-PCR

ID	Gen correspondiente	Fold change (I/C)	Expresión relativa RT-PCR (I/C)
Genes sobre expresados a los 7 DDI			
Factores de transcripción			
1-1-7.2.10.20	Transcription factor Pti4 - tomato	1,133	3,5
PRs			
1-1-6.3.17.2	Pathogenesis-related protein PR P23	2,032	4
1-1-2.3.10.15	PR1 protein [Solanum lycopersicum]	2,596	1,61
Genes sub expresados a los 7 DDI			
Relacionados con la defensa			
1-1-8.1.16.2	Probable cytochrome P-450	-0,64	1,2
Genes sobre expresados a los 14 DDI			
PRs			
1-1-2.4.16.4	Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor Ethylene induced (<i>PR1-b</i>)	3,143	2
1-1-1.3.20.14	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (<i>PR2</i>)	1,5	1,5
1-1-6.3.17.2	NP24 protein precursor (Pathogenesis Pathogenesis-related protein PR P23)	1,409	1,5
Relacionados con síntesis de hormonas			
1-1-4.4.15.2	ACC synthase 4 - tomato	0,972	2
Factores de transcripción			
1-1-4.3.6.12	WRKY53; DNA binding / protein binding / transcription activator/ transcription factor	1,33	1,4
Relacionados con la defensa			
1-1-5.2.15.15	Snakin 2	1,216	1,4
Genes sub expresados a los 14 DDI			
Relacionados con la defensa			
1-1-8.1.18.12	Catechol oxidase precursor - fava bean	-2,109	0,5

Nómina de publicaciones generadas por esta Tesis

José A. Curá; Claudia M. Ribaudó; Andrés M. Gaetano; Hernán O. Ghiglione (2005). Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. Revista Foro Arrocero Latinoamericano Marzo. 10-13. vol 11/1(21), ISSN: 0122-9524.

Ribaudó CM, Krumpholz, Cassán FD, Bottini R, Cantore ML, Curá JA (2006). *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. Journal of Plant Growth Regulation 25 (2) 175–185. ISSN: 0721-7595.

Curzi MJ, Ribaudó CM, Trincheró GD, Curá JA, Pagano EA (2008). Changes in the content of amino and organic acids and ethylene production of rice plants in response to the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. Journal of Plant Interactions 3 (3), 163-173.(ISSN:1742-9153)