

La planta leguminosa *Medicago truncatula* y la rizobacteria *Arthrobacter agilis* se perciben mutuamente por medio de sus compuestos orgánicos volátiles

Crisanto Velázquez-Becerra, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Lourdes I. Macías-Rodríguez, Idolina Flores-Cortez, Gustavo Santoyo Pizano y Eduardo Valencia-Cantero

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Resumen

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) son bacterias que colonizan las raíces de las plantas e inducen un mayor crecimiento de las mismas, por lo que la relación planta-microorganismo que se establece es considerada benéfica. Para el establecimiento de la relación, actualmente se considera que existe una comunicación química entre plantas y microorganismos. En el presente trabajo se muestra que la PGPR *Arthrobacter agilis* UMCV2 promueve el crecimiento de la leguminosa *Medicago truncatula*, al tiempo que mejora su estatus nutricional por hierro. Un análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *A. agilis* y *M. truncatula* en sistemas *in vitro* por separado y en un sistema donde solamente inte-

raccionan por medio del espacio gaseoso, muestra una producción diferencial de VOCs de cada organismo en presencia de su contraparte. De esta forma, *M. truncatula* dejó de emitir VOCs con propiedades antimicrobianas como el carvol y el eucaliptol. *A. agilis* incrementó su producción de dimetilhexadecilamina, un compuesto con probado efecto promotor del crecimiento vegetal. Con estos datos, proponemos que *M. truncatula* y *A. agilis* reconocen mutuamente por medio de la emisión de VOCs.

Palabras clave: Compuestos orgánicos volátiles, interacción planta-microorganismo, dimetilhexadecilamina.

Abstract

The **Plant Growth Promoting Rhizobacteria** (PGPRs) are bacteria that colonize plant roots and induce further growth of its host plants, so the established plant-microorganisms interaction is considered as beneficial. Currently it is considered that to establish a beneficial interaction between plant and microorganism there should occur a primary chemical communication. The present work shows that the PGPR *Arthobacter agilis* UMCV2 promotes the growth of the legume plant *Medicago truncatula* while improving the plant iron nutritional status. An analysis of volatile organic compounds (VOCs) produced by *A. agilis* and *M. truncatula* in *in vitro* systems separately and in a system where they only interact through the gaseous space, shows a differential production of VOCs from each organism in the presence of its counterpart. Thus *M. truncatula* lacked the emission of VOCs with antimicrobial effects as carvol and eucalyptol, and *A. agilis* increased its production of dimethylhexadecylamine, a compound with proven plant growth-promoting effect. With these data, we propose that *M. truncatula* and *A. agilis* are able to recognize each other by the emission of VOCs.

Keywords: Volatile organic compounds, plant-microorganisms interaction, dimethylhexadecylamine.

INTRODUCCIÓN

El sistema radicular de las plantas es una estructura que funciona para el anclaje al suelo, toma de agua y nutrientes, además presenta la característica de liberar distintos compuestos en la zona denominada rizosfera (Bais *et al.*, 2006). La rizosfera es un espacio entre el suelo y la raíz que está influida de manera directa por los exudados de la planta, en esta zona también se encuentran microorganismos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs, por sus siglas en inglés) que son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas (de la Peña *et al.*, 2008).

La naturaleza de los exudados vegetales puede ser variada, básicamente se pueden clasificar en 3 tipos: (1) compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos, iones, oxígeno libre, agua, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, vitaminas y fitosideróforos); (2) compuestos de alto peso molecular (mucílagos, polisacáridos y proteínas); y (3) compuestos orgánicos

volátiles o VOCs (alcoholes, aldehídos, cetonas y CO₂, entre otros). Los VOCs son definidos como todos aquellos compuestos que presentan una presión de vapor de 0.01 kPa o más a 293.15 °K (20 °C) (Insam y Seewald, 2010), por lo que son volátiles a temperatura ambiente.

Los VOCs pueden ser liberados de manera constitutiva o bajo condiciones de estrés biótico o abiótico y ser usados por las plantas como mediadores de una comunicación entre organismos del mismo o de diferente reino. Tienen un papel fundamental en repeler el ataque de enemigos naturales o en el establecimiento de una simbiosis (Walker *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2006).

Las PGPRs también participan en el bienestar de las plantas mediante la emisión de VOCs, ya que se ha visto que la liberación de compuestos como amonio, cianuro de hidrógeno, alcoholes y otros, tiene una repercusión directa sobre la antibiosis y biocontrol sobre fitopatógenos. Además, la emisión de volátiles bacterianos también tienen un papel en la inducción en las plantas de un fenómeno llamado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (Thimmarajuet *et al.*, 2010). Esta aparece cuando el mecanismo de defensa de las plantas es estimulado y preparado para resistir la infección de patógenos. Ryu y colaboradores (2003a) encontraron que los VOCs emitidos por *Bacillus subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a estimularon una ISR en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, lo que confirió protección a la planta contra la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora*.

Para conocer cómo los VOCs de PGPRs pueden inducir el crecimiento en las plantas, Zhang y colaboradores (2007) examinaron los niveles de RNAm en plántulas de *A. thaliana* expuestas a los VOCs de la bacteria *B. subtilis* GB03. Los autores observaron un incremento de más de 26 mil transcritos que codifican a proteínas, muchos de ellos relacionados con modificaciones en la pared celular, metabolismo primario y secundario y la homeostasis de auxinas, mostrando así que los VOCs bacterianos influyen directamente en las rutas metabólicas involucradas en la morfogénesis de las plantas. Anteriormente se había mostrado que la planta leguminosa *Medicago truncatula* es capaz de percibir acilo homoserilactonas (AHLs) producidas por rizobacterias y reaccionar de manera diferencial dependiendo de si el compuesto es producido por una PGPR o una bacteria fitopatógena (Mathesius *et al.*, 2003), lo que perfila la posibilidad de un diálogo bioquímico extenso entre bacterias y plantas.

Arthrobacter agilis UMCV2 es una rizobacteria capaz de promover el crecimiento de las leguminosas, frijol (*Phaseolus vulgaris*) y alfalfa (*M. sativa*) cuando es inoculada en las raíces de estas plantas (Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Velázquez-Becerra 2007). Un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación mostró que *A. agilis* UMCV2 produce dimetilhexadecilamina, un compuesto volátil estructuralmente relacionado a las AHLs capaz de promover el crecimiento vegetal de *M. sativa* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que *M. truncatula* y *A. agilis* UMCV2 se perciben mutuamente a través de sus VOCs y que al percibirse modifican su perfil de VOCs para adecuarse a una posible interacción. Nuestros resultados confirman esta hipótesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se usaron semillas de *Medicago truncatula* A17 Jemalong, proporcionadas por la Dra. Esperanza Martínez-Romero (Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.). Las semillas se almacenaron a 4 °C hasta su uso. También se utilizó la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2, (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), conservada en glicerol al 40% a -20 °C hasta su uso.

Efecto de UMCV2 sobre el crecimiento de *Medicago truncatula*

Las semillas de *M. truncatula* se esterilizaron superficialmente con ácido sulfúrico concentrado por 8 min, se enjuagaron con agua corriente, se agregó hipoclorito de sodio por 2 min y se enjuagó nuevamente por 5 ocasiones con agua estéril. Las semillas se colocaron en cajas de petri con agar-agua a 4 °C por 48 h y después se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a unaintensidad de luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 22-23 °C hasta su germinación. Los germinados se colocaron en frascos de vidrio de 18 cm de alto y 9 cm de diámetro con 200 mL de medio nutritivo de Hoagland (Hoagland y Arnon 1950), más 6 g L⁻¹ de agar de micropropagación. Después de 11 días, a la mitad de los frascos, se les colocó un plato de 3 cm de diámetro con agar nutritivo (AN) inoculado con la bacteria *A. agilis* UMCV2, a la otra mitad de los frascos se les colocó en plato sin inocular. El experimento se mantuvo hasta que las plantas cumplieron 21 días de edad.

Después de este tiempo, las plantas se midieron y pesaron. La concentración de clorofila en los brotes de las plantas se determinó por el método de Lichtenthaler y Welburn (1983). Al momento de la determinación, los brotes de las plantas fueron cosechados y pesados en una balanza analítica, e inmediatamente macerados con nitrógeno líquido y 5 ml de acetona al 80% en un mortero. Las muestras fueron filtradas con papel filtro Whatman No. 1. Se determinó la absorbencia de las muestras a 663 y 646 nm para calcular la concentración de clorofila a y clorofila b empleando las siguientes fórmulas: Clorofila a (mg) = (12.21) (A₆₆₃) - (2.81) (A₆₄₆); Clorofila b (mg) = (20.13) (A₆₄₆) - (5.03) (A₆₆₃); Clorofila total = (mL acetona) (contenido de clorofila) / peso de la muestra.

Análisis de compuestos volátiles

Para el análisis cromatográfico se montaron los siguientes tratamientos: i) **VOCs de la bacteria**. Cajas de petri con AN donde creció la cepa UMCV2 durante 4 días; ii) **VOCs de la planta**. Frascos de 1L de volumen con 200 mL de medio nutritivo de Hoagland más 6 g de agar de micropropagación donde creció la planta de *M. truncatula*, tal como se explica en el segmento anterior; iii) **VOCs de la interacción planta-bacteria**. Frascos de 1L de volumen con 200 mL de medio nutritivo de Hoagland más 6 g de agar de micropropagación donde creció la planta de *M. truncatula* con bacteria *A. agilis*UMCV2, tal como se explica en el seg-

mento anterior; y iv) **Controles** que consistieron en cada uno de los medios de cultivo por separado, cuyos VOCs fueron descartados en la tabla final de resultados.

El análisis se realizó con la técnica de microextracción en fase sólida o SPME (por sus siglas en inglés), colocando la fibra azul (PDMS/DVB) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.) por 30 min a 30 °C, posteriormente, se desorbió por 30 s en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (Agilent 6850 Series II; Agilent, Foster City, CA, USA). Se utilizó una columna capilar de 25 m × 0.52 mm, grosor de 0.32 μm (HP-FFAP, Agilent), con helio (1 mLmin⁻¹) como gas acarreador. Las rampas de temperatura fueron las siguientes: La columna fue mantenida por 13 min a 40 °C, y después se aumentó la temperatura a razón de 3 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 180 °C, la cual fue mantenida por 25 min. Los tratamientos se muestrearon a los 21 días de germinada la semilla de *M. truncatula*.

La técnica de SPME no permite hacer una cuantificación de los VOCs y debe considerarse como semicuantitativa, por lo tanto la abundancia de los VOCs se expresó de manera normalizada en base porcentual. Para realizar la normalización se empleó la siguiente fórmula: Cantidad normalizada de compuesto volátil = (área del pico de compuesto volátil) / (total del área del pico de todos los compuestos volátiles).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron con una n = 4 y cada experimento se realizó al menos 2 veces de forma independiente. Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de t de *Student* (significancia de $p = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la idea de extender a otra leguminosa nuestros resultados previos que muestran la estimulación de crecimiento de *M. sativa* por los VOCs de *A. agilis* UMCV2 (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011), y demostrar la hipótesis de un reconocimiento entre plantas leguminosas y bacterias mediante la emisión de compuestos volátiles, se efectuaron experimentos de interacción planta-bacteria empleando *M. truncatula* y *A. agilis* UMCV2. Se empleó un sistema consistente de frascos, donde las plantas no estuvieran sometidas a estrés por falta de espacio y compartieran sólo el espacio gaseoso con un pequeño cultivo bacteriano. De esta manera, se evitó el contacto directo entre planta y bacteria pero se logró que los VOCs producidos por la bacteria interactuaran con la planta y viceversa.

En estas condiciones fue notorio que los VOCs bacterianos causaron un efecto estimulador del crecimiento en los brotes aéreos de las plantas, medido como longitud de los tallos (Figura 1a, y 1d), y más claramente como biomasa de las plantas, ya que estas tuvieron alrededor de un 30% más de peso fresco que las plantas control (Figura 1b).

En *A. thaliana*, bacterias como *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a también promueven el crecimiento vegetal mediante la emisión de VOCs, tales como el

2,3-butanediol y acetoina (Ryu *et al.*, 2003b). La diversidad de bacterias que alteran el crecimiento vegetal vía emisión de VOCs puede ser variada (Kai *et al.*, 2008); por ejemplo, los

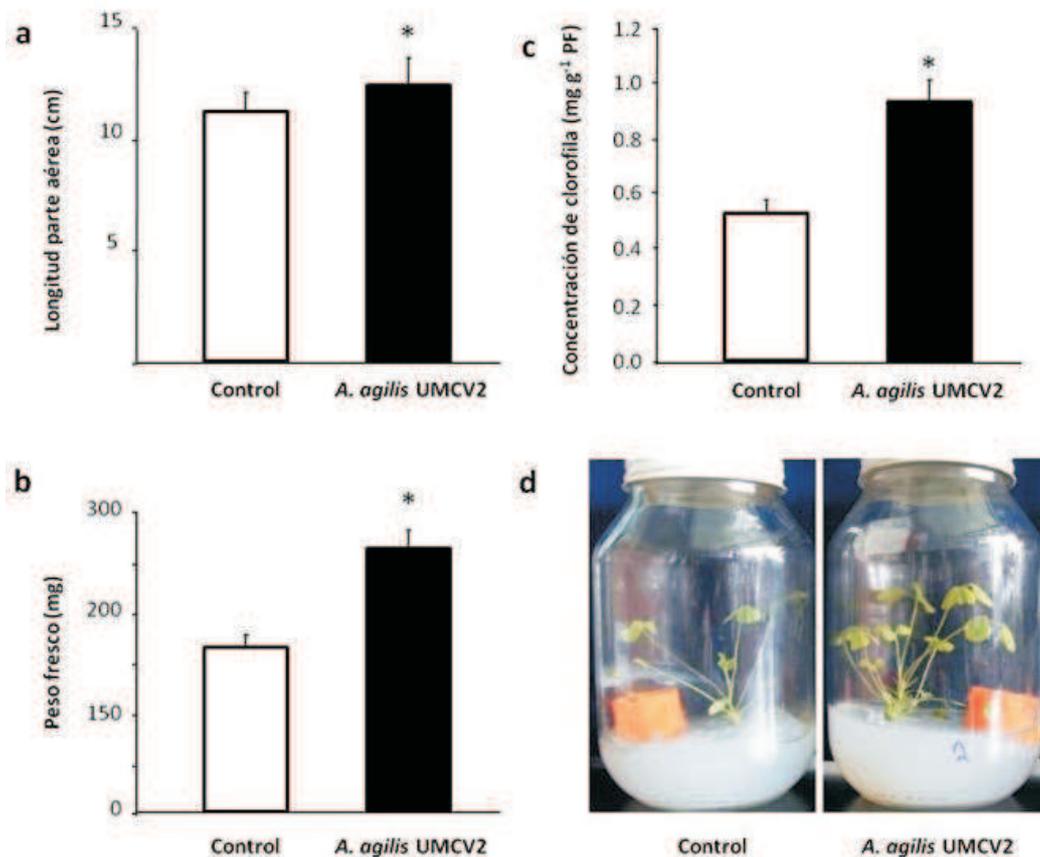


Figura 1. Efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre el crecimiento de *M. truncatula*. (a) Longitud de la parte aérea, (b) Peso fresco, (c) Concentración de clorofila, (d) imágenes representativas del tratamiento control y del tratamiento inoculado con *A. agilis*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p=0.05$).

VOCs producidos por *P. fluorescens* L13-6-12 y *S. maltophilia* R3089 también alteran el crecimiento vegetal, en especial el peso fresco de las hojas de *A. thaliana* (Vespermann *et al.*, 2007; Tarkka y Piechulla 2007). Un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación muestra que *A. agilis* UMCV2 produce VOCs capaces de promover el crecimiento vegetal de *M. sativa*, medido como producción de biomasa y que adicionalmente modifica la estructura de la raíz de esta planta (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

Otra característica que resultó evidente en las plantas crecidas en presencia de las bacterias fue un aumento en la concentración de clorofila, que fue prácticamente el doble de la encontrada en las plantas control crecidas en frascos sin bacteria (Figura 1c). Esto último fue especialmente interesante, dado que la concentración de clorofila es considerada como un indicador del estatus nutrimental del hierro en las plantas (Terry y Abadía 1986; Masalha *et al.*, 2000).

Un efecto similar fue reportado por Zhang y colaboradores en 2009, pero en plantas de *A. thaliana* y empleando la bacteria *B. subtilis* GB03. Ellos muestran que el aumento en la concentración de clorofila es debido a una inducción en la expresión de los genes *FRO2* e *IRT1* (requeridos para la reducción y captación de hierro por parte de las plantas), y que está relacionada con una acidificación del medio por el efecto de compuestos volátiles ácidos, probablemente ácido glioxílico, ácido metil-butanoico y ácido dietil-acético. En un trabajo distinto, se muestra que los VOCs de esta misma cepa inducen la acumulación de aceites esenciales y la promoción del crecimiento cuantificada como aumento de área foliar y peso fresco en plantas de *Ocimum basilicum*, pero sin identificar el compuesto responsable o el mecanismo de acción involucrado (Banchio *et al.*, 2009). En nuestro caso, fue imposible encontrar una variación en el pH del medio debido a la presencia de la bacteria en cualquiera de los experimentos (datos no mostrados).

Como se menciona a continuación, en los experimentos en el sistema *A. agilis*-*M. truncatula* se determinaron los VOCs, sin encontrarse el ácido glioxílico, ácido metil-butanoico o el ácido dietil-acético. Sin embargo, no se descarta que el aumento en la concentración de la clorofila en plantas de *M. truncatula* se deba a una variación en la expresión de los genes relacionados con la toma de hierro.

Con el análisis cromatográfico realizado, a los cultivos bacterianos y a la planta en condiciones axénicas, y al sistema de interacción *M. truncatula*-*A. agilis* UMCV2 se identificó una gama importante de VOCs. De ellos, sólo el ácido acético estuvo presente en todos los tratamientos (**Tabla 1**). En la mezcla de compuestos emitidos por la bacteria *A. agilis* UMCV2 encontramos a la 2,5-dimetil-pirazina, el 2,4-di-tertbutil-fenol y la N,N-dimetil-1-hexadecanamina (dimetilhexadecilamina) (**Tabla 1**), que han sido reportados previamente como VOCs de origen bacteriano (Xu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008). En especial, la dimetilhexadecilamina fue encontrada dentro del perfil de VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 en un trabajo previo y se había demostrado su actividad como molécula moduladora del crecimiento de *M. sativa* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

TABLA 1			
VOCs producidos por <i>A. Agilis</i> UMCV2, <i>M. Truncatula</i> y <i>A. Agilis-M. truncatula</i>			
	Abundancia normalizada de compuesto volátil (%) ^a		
	<i>A. Agilis</i> UMCV2	Interacción	<i>M. truncatula</i>
VOC presente en todas las condiciones			
Ácido acético	4.9 ±4.3	0.6 ±0.1	3.1 ±1.0
VOCs atribuibles a <i>A. Agilis</i> UMCV2			
2,5-Dimetil pirazina	22.6 ±4.4	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
3-Metil quinolina	13.5 ±1.8	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
2,4-Di-tertbutil-fenol	57.8 ±4.9	0.2 ±0.1	0.0 ±0.0
Dimetilhexadecanamina	1.2 ±0.5	8.4 ±4.9	0.0 ±0.0
VOCs atribuibles a la interacción <i>A. Agilis-M. truncatula</i>			
Dimetil disulfuro	0.0 ±0.0	15.7 ±7.5	0.0 ±0.0
3-Heptanona	0.0 ±0.0	1.7 ±0.3	0.0 ±0.0
2-Etil hexanal	0.0 ±0.0	1.8 ±0.4	0.0 ±0.0
4-Octanona	0.0 ±0.0	0.6 ±0.1	0.0 ±0.0
3-Octanona	0.0 ±0.0	4.1 ±1.0	0.0 ±0.0
2-Octanona	0.0 ±0.0	0.5 ±0.1	0.0 ±0.0
Dimetil trisulfuro	0.0 ±0.0	10.5 ±5.4	0.0 ±0.0
Nonanal	0.0 ±0.0	1.1 ±0.5	0.0 ±0.0
1,4-Dicloro benzeno	0.0 ±0.0	13.2 ±1.7	0.0 ±0.0
2,6-Di-tert-butil-4-sec-butilfenol	0.0 ±0.0	1.3 ±1.3	0.0 ±0.0
Phenilethil alcohol	0.0 ±0.0	1.0 ±0.4	0.0 ±0.0
4-Octadecil morfolina	0.0 ±0.0	4.5 ±2.6	0.0 ±0.0
P-Amino acetofenona	0.0 ±0.0	0.8 ±0.2	0.0 ±0.0
2-Morfolinometil-1,3-difenil-2-propanol	0.0 ±0.0	8.7 ±5.5	0.0 ±0.0
2-Hexadecanol	0.0 ±0.0	0.5 ±0.3	0.0 ±0.0

TABLA 1
VOCs producidos por *A. Agilis* UMCV2, *M. Truncatula* y *A. Agilis-M. truncatula*

	Abundancia normalizada de compuesto volátil (%) ^a		
	<i>A. Agilis</i> UMCV2	Interacción	<i>M. truncatula</i>
VOCs atribuibles a <i>M. truncatula</i>			
3-Ciclohepten-1-ona	0.0 ±0.0	3.3 ±1.0	2.6 ±1.6
1-Octen-3-ol	0.0 ±0.0	0.6 ±0.1	3.3 ±1.5
1,2,3,4-Tetrahidro naftaleno	0.0 ±0.0	0.4 ±0.1	1.0 ±0.3
2-Etil 1-hexanol	0.0 ±0.0	16.9 ±6.0	35.1 ±10.4
1-Octanol	0.0 ±0.0	0.3 ±0.1	4.1 ±1.0
2-Decenal	0.0 ±0.0	0.3 ±0.1	11.2 ±3.3
p-Metil-1-en-octenol	0.0 ±0.0	0.6 ±0.1	4.1 ±1.0
1-Dodecanol	0.0 ±0.0	1.1 ±0.2	29.5 ±6.9
1-Hexadecanol	0.0 ±0.0	0.2 ±0.2	1.6 ±0.3
Eucaliptol	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.1 ±0.3
Carvol	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.1 ±0.7
2-Dodecenal	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.8 ±0.6

^aCantidad normalizada de compuesto volátil. Los valores representan los porcentajes de 4 réplicas ± el error estándar de un experimento representativo.

Fue interesante observar que la abundancia relativa de la dimetilhexadecilamina se incrementó siete veces, de 1.2% en los cultivos de bacterias axénicas a 8.4% en los sistemas de interacción *M. truncatula* – *A. agilis* UMCV2, lo cual sugiere que la dimetilhexadecilamina es un compuesto de origen bacteriano, que es sobreproducido cuando la bacteria percibe a la planta por medio de los VOCs que esta emite.

Por otra parte, se encontraron una serie de compuestos cuya presencia se puede atribuir a la interacción planta-microorganismo, ya que no están presentes en los tratamientos con cultivos bacterianos puros o en los tratamientos con *M. truncatula*, sin la presencia de *A. agilis*. Entre estos compuestos destacan el dimetil-disulfuro y el trimetil-disulfuro (Tabla 1), ambos reportados como componentes de aceites esenciales de plantas con efecto antibacteriano (Bendimerad *et al.*, 2005), o con efectos en el control de fitopatógenos (Wang *et al.*, 2009); el nonanal, que se sabe es producido por plantas inoculadas con hongos fue detectado en la interacción *Medicago-Arthrobacter* (Jeleñ *et al.*, 2005), este compuesto causa inhibición del crecimiento de bacterias como *B. cereus* o *Listeria monocytogenes* (Bisignano *et al.*, 2001). Otro VOC producto de la interacción fue la 3-octanona, que es uno de los VOCs

característico de los hongos, pero que al igual que el 1-octen-3-ol es producido también por plantas, en especial leguminosas y que pudiera tener efecto como antibacteriano y antifúngico (Höckelmann y Jüttner 2004; Boué *et al.*, 2005; Maksimoviæ *et al.*, 2008).

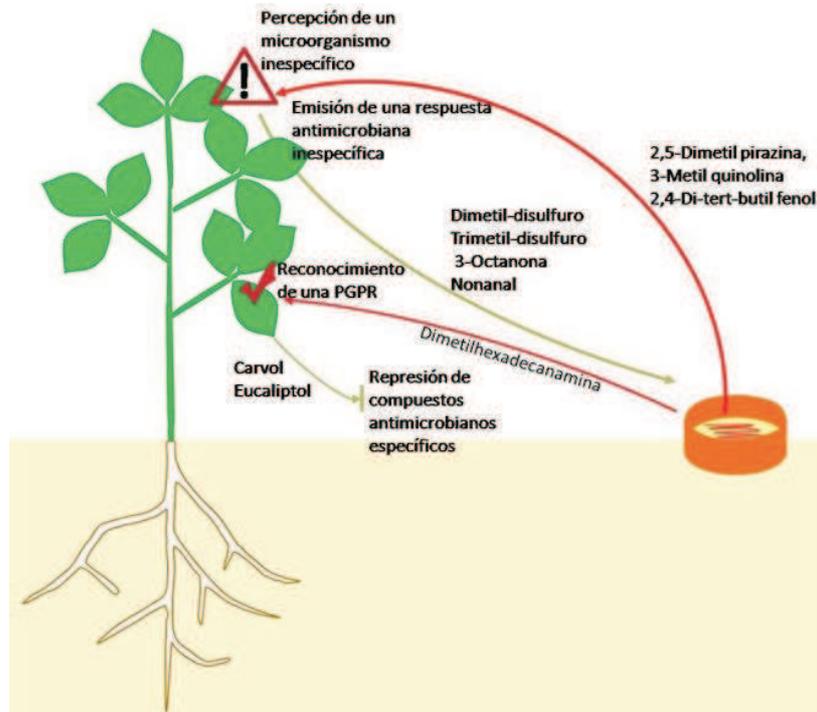


Figura 2. Hipótesis propuesta sobre diálogo bioquímico entre *A. agilis* UMCV2 y *M. truncatula*. *A. agilis* UMCV2 emite los VOCs 2,5-dimetil pirazina, 3-metil quinolina y 2,4-di-tert-butil fenol mediante los cuales *M. truncatula* percibe de manera inespecífica a un microorganismo y responde con la emisión de los VOCs antimicrobianos dimetil-disulfuro, trimetil-disulfuro, 3-octanona y nonanal (entre otros); sin embargo, la producción de VOCs antimicrobianos potentes como el carvol y el eucaliptol por parte de la planta, es inhibida por el reconocimiento de *A. agilis* como PGPR debido a la presencia de dimetilhexadecilamina (compuesto fitoestimulante, Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

Ese conjunto de VOCs producto de la interacción, parece indicar que *M. Truncatula* percibe a *A. Agilis* por medio de los VOCs emitidos por la bacteria y desencadena una respuesta defensiva; sin embargo, en un sentido opuesto, también encontramos un grupo de compuestos producidos por *M. truncatula*, entre los cuales está el eucaliptol (1,8-ceneol) y carvol, que están presentes en el perfil de VOCs de las plantas axénicas y que desaparecen en el perfil de VOCs de la interacción planta-microorganismo (Tabla 1). Tanto el eucaliptol y el carvol son compuestos con potente actividad antifúngica y antibacteriana, y se ha propuesto que incluso tienen un papel en la selección de las poblaciones de rizobacterias (Vo-

kou *et al.*, 2001; Karamanoli *et al.*, 2000; Sokoviæ y van Griensven 2006; Bader *et al.*, 2007). Estos compuestos muestran que *M. truncatula* percibe la presencia de *A. agilis* UMCV2 y en respuesta, elimina la emisión de algunos VOCs. Dada la actividad antimicrobiana del carvol y el eucaliptol, se puede plantear la hipótesis de que la planta percibe a *A. agilis* UMCV2 como un organismo benéfico y por tanto al entrar en contacto con los VOCs de la bacteria abate la producción de algunos de sus propios compuestos antimicrobianos, como una manera de posibilitar el establecimiento de una interacción con este microorganismo. La aparente contradicción pudiera resolverse considerando la siguiente hipótesis: *M. truncatula* al detectar la presencia de un microorganismo despliega una respuesta defensiva general contra microorganismos patógenos, pero al reconocer a *A. agilis* como PGPR, suspende la producción de compuestos capaces de inhibir a esta bacteria (Fig. 2). Esta hipótesis concuerda con el hecho documentado de la capacidad de *M. truncatula* para distinguir diferentes autoinductores provenientes, tanto de microorganismos patógenos como de PGPRs (Mathesius *et al.*, 2003; de la Peña *et al.*, 2008), pero su comprobación requiere de trabajos posteriores.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se mostró que los volátiles producidos por *A. agilis* son capaces de promover el crecimiento vegetal de *M. truncatula*, mostrando que la promoción del crecimiento vía volátiles, descrito previamente (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011) en el sistema *A. agilis*-*M. sativa*, es extensivo al menos a otra leguminosa. Adicionalmente, fue manifiesto que los VOCs de *A. agilis* UMCV2 son capaces de mejorar el estado nutricional del hierro en plantas de *M. truncatula*, según pudo observarse por un aumento notable en la concentración de clorofila de las plantas, quedando por dilucidar el mecanismo por el que se produce este efecto. Finalmente, se mostró que la PGPR *A. agilis* UMCV2 y la leguminosa *M. truncatula* son capaces de percibirse mutuamente por medio de los VOCs en la interacción y reaccionar a esta percepción modificando el perfil de sus propios VOCs emitidos. Con base en estos resultados proponemos que los VOCs representan una nueva categoría de moléculas señalizadoras en el establecimiento de las relaciones benéficas PGPR-leguminosas.

Agradecimientos: Agradecemos a la Dra. Esperanza Martínez-Romero por proporcionarnos amablemente las semillas de *M. truncatula* A17 Jemalong con las que se realizó este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber financiado este estudio vía los proyectos 60999 (LIMR) y 128341 (EVC), y a los revisores anónimos que tan pacientemente procesaron este manuscrito.

LITERATURA CITADA

Bader A., Panizzi L., Cioni P.I. yG. Flamini. 2007. *Achillea ligustica*: composition and antimicrobial activity of essential oils from the leaves, flowers and some pure constituents. Central European Journal of Biology 2: 206-212.

- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., y J.M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.
- Banchio E., Xie X., Zhang H., y P.W. Paré. 2009. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 653-657.
- Bendimerad N., Bendiab S.A.T., Benabadji A.B., Fernandez X., Valette L. y L.L. Cuvelier. 2005. Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) essential oil from Algeria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 2947-52.
- Bisignano G., Laganà M.G., Trombetta D., Arena S., Nostro A., Uccella N., Mazzanti G. y A. Saija. 2001. *In vitro* antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters* 198: 9-13.
- Boué S., Shih B.Y., Carter-Wientjes C.H. y T.E. Cleveland. 2005. Effect of soybean lipoxygenase on volatile generation and inhibition of *Aspergillus flavus* mycelial growth. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 4778-4783.
- de la Peña C., Lei Z., Watson B.S., Sumner L.W. y J.M. Vivanco. 2008. Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry* 283: 25247-25255.
- Hoagland D.R. y D.I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plant without soil. California. College of Agric. Univ. Circular 347.
- Höckelmann C. y F. Jüttner. 2004. Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of *Calothrix* and *Plectonema*. *Water Science & Technology* 49: 47-54.
- Insam H. y M.S.A. Seewald. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils* 46: 199-213.
- Jeleń H.H., Krawczyk J., Larsen T.O., Jarosz A. y B. Goëbniak. 2005. Main compounds responsible for off-odour of strawberries infected by *Phytophthora aactorum*. *Letters in Applied Microbiology* 40: 255-259.
- Kai M., Vespermann A. y B. Piechulla. 2008. The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. *Plant Signal and Behavior* 3: 1-3.
- Karamanoli K., Vokou D., Menkissoglu U. y H.I. Constantinidou. 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of mediterranean aromatic plants. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2035-2048.
- Lichtenthaler H.K. y A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Liu W., Wei M., Bingyu Z. y L. Feng. 2008. Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Research in Bacteriology* 1: 28-34.

- Maksimoviæ Z., Milenkoviæ M., Vuèiæeviæ D. y M. Ristiæ. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) essential oil. *Central European Journal of Biology* 3: 149-154.
- Masalha J., Kosegarten H., Elmaci O., yK. Mengel. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility Soils* 30:433-439.
- Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anollés G., Rolfe B.G. y W.D. Bauer. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1444-1449.
- Thimmaraju R., Biedrzycki L.M., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymmek K.J., Paré P.W. y H.P. Bais. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Communicative and Integrative Biology* 3: 130-138.
- Ryu C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Pare, P.W. y J.W. Kloepper. 2003a. Volatiles produced by PGPR elicit plant growth promotion and induced resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the Sixth International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, Calicut, India. pp. 436-443.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W. y J.W. Kloepper. 2003b. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4927-4932.
- Sokoviæ M. y L.J.L.D. van Griensven. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 116: 211-224.
- Tarkka M.T. y B. Piechulla. 2007. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. *New Phytologist* 175:383-386.
- Terry N., y J. Abadia. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* 9: 609-64.
- Valencia-Cantero E., Hernández-Calderón E., Velázquez-Becerra C., López-Meza J.E., Alfaro-Cuevas R. y López-Bucio J. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil* 291: 263-273.
- Velázquez-Becerra C. 2007. Participación de las bacterias ferrirreductoras en el suministro de hierro a la planta de alfalfa (*Medicago sativa*) en sus primeros estadios de crecimiento. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 75pp.
- Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Flores-Cortez I. y E. Valencia-Cantero. 2011. A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro. *Plant and Soil* 339: 329-340.

- Vespermann A., Kai M., yP. Piechulla. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5639–5641.
- Vokou D., Chalkos D., Karamanlidou G. yM. Yiangou. 2001. Activation of soil respiration and shift of the microbial population balance in soils as a response to *Lavandula stoechas* essential oil. *Journal of Chemical Ecology* 28: 755-768.
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E.yJ.M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132: 44–51.
- Wang D., Rose C., Kinkel L., Cao A. Tharayil N. yJ. Gerik. 2009. Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens. *Plant and Soil* 324: 185-197.
- Xu C., Mo, M., Zhang, L. y K. Zhang. 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1997-2004.
- Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M.A., Ryu C.M., Allen R., Melo S. yP.W. Paré. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 839–851.
- Zhang H., Sun Y., Xie X., Kim M.S., Dowd S.E. yP.W Paré. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal* 58: 568-577.