

Ciencia Nicolaita 85

ISSN: 2007-7068



Universidad
Michoacana
de San Nicolás
de Hidalgo

***Azospirillum brasilense* induce la producción del antimicrobiano 6-metoxi-2- benzoxazolinona (MBOA) en el follaje y la raíz de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

***Azospirillum brasilense* induces the production of antimicrobial 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) in the foliage and root of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)**

Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda*

Para citar este artículo: Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda*, 2022. *Azospirillum brasilense* induce la producción del antimicrobiano 6-metoxi-2- benzoxazolinona (MBOA) en el follaje y la raíz de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Ciencia Nicolaita no. 85, 6-16. DOI: <https://doi.org/10.35830/cn.vi85.617>



Historial del artículo:

Recibido: 4 de marzo de 2022

Aceptado: 4 de julio de 2022

Publicado en línea: septiembre de 2022



Ver material suplementario



Correspondencia de autor: egpineda@umich.mx



Términos y condiciones de uso: <https://www.cic.cn.umich.mx/cn/about/privacy>



Envíe su manuscrito a esta revista: <https://www.cic.cn.umich.mx/cn/about/submissions>



***Azospirillum brasilense* induce la producción del antimicrobiano 6-metoxi-2- benzoxazolinona (MBOA) en el follaje y la raíz de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.)**

***Azospirillum brasilense* induces the production of antimicrobial 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) in the foliage and root of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)**

Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edif. A1', Morelia, Michoacán CP 58040, México

Resumen

Los Benzoxazinoides (Bx) son compuestos químicos derivados de ácidos hidroxámicos, con propiedades aleloquímicas y antimicrobianas. En este estudio se reporta el efecto de *Azospirillum brasilense* sobre la producción de Bx en plántulas de trigo. El análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) de extractos de plántulas de cuatro días de germinación, identificó a la benzoxazolinona 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA). El metabolito se acumuló más en follaje que en raíz, en condiciones naturales. En follaje, su acumulación fue mayor 24 h después de la inoculación con *A. brasilense*, y en respuesta a la concentración de inóculo. El crecimiento de la bacteria en presencia de MBOA disminuyó ligeramente su crecimiento. Se discute la posible función de MBOA en relación a su papel durante la interacción de la bacteria con la plántula de trigo.

Palabras clave: Benzoxazinoides, Aleloquímico, Cromatografía de gases, Cromatografía en placa fina.

Abstract

Benzoxazinoids (Bx) are chemical compounds derived from hydroxamic acids with allelochemical and antimicrobial properties. In this study, the effect of *Azospirillum brasilense* on Bx production in wheat seedlings is reported. The benzoxazolinone 6-methoxybenzoxazolin-2-one (MBOA) was identified in extracts of seedlings, four days after germination, by GC/MS analysis. In natural conditions, the metabolite was higher accumulated in foliage than in root. In foliage, their accumulation increased 24 h after inoculation with *A. brasilense*, and in response to inoculum concentration. The growth of the bacterium in presence of MBOA slightly decreased its growth. The probable function of MBOA in relation with its role during the interaction of the bacteria with wheat seedling is discussed.

Keywords: Benzoxazinoids, Allelochemical, Gas chromatography, Thin layer chromatography

Introducción

Los estudios sobre cambios globales en el metabolismo (metaboloma) son importantes para comprender los detalles moleculares de la interacción entre rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (RPCV) y las plantas (Alberton et al., 2020). Las RPCV colonizan las raíces de una gran diversidad de plantas, y como resultado modulan sus rutas metabólicas (Ramamoorthy et al., 2001; Jourdan et al., 2008). En consecuencia, modifican los perfiles del metabolismo primario y secundario en las raíces, los brotes y en la savia del xilema (Osbourn et al., 2003; Mishra et al., 2006; Walker et al., 2011; Chamam et al., 2013; Rozier et al., 2016; Lade et al., 2018).

Azospirillum es una de las RPCV más estudiadas debido a su capacidad para mejorar la productividad de diferentes especies vegetales de interés económico (Bashan et al., 2004). El establecimiento de *Azospirillum* en las raíces de las plantas es un paso crítico en la promoción del crecimiento vegetal (Okon y Kapulnik, 1986; Bashan et al., 2004). Esta rizobacteria se localiza en la rizósfera y coloniza la superficie de las raíces de las plantas, sin embargo, algunas cepas tienen la capacidad para colonizar el interior de la raíz (Patriquin et al., 1983; Baldani et al., 1986; Döbereiner et al., 1995). Asimismo, puede colonizar diferentes zonas de la raíz, incluyendo las raíces laterales y los pelos de la raíz (Vande-Broek et al., 1993). Además, la inoculación con *Azospirillum* altera el metabolismo vegetal, resultando en cambios en la producción de metabolitos secundarios (Chamam et al., 2013).

A. brasilense es la especie más utilizada para mejorar el crecimiento vegetal, y la producción de granos en cereales (Cassán et al., 2016). Por ejemplo, la inoculación de *A. brasilense* en semillas de trigo incrementa la producción de granos entre 6.1 % y 18 % (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009; Hungría et al., 2010).

Los Benzoxazinoides (Bx) son metabolitos secundarios sintetizados por miembros de la familia Poaceae, la cual incluye al trigo, el maíz y el arroz. Además, son considerados como moléculas de defensa. Estos compuestos, modifican su concentración en

respuesta a la inoculación con cepas de *Azospirillum* (Park et al., 2004; Walker et al., 2011).

Los Bx son compuestos hidroxámicos que contienen un grupo químico hidroxilamino unido a un ácido carboxílico. Se han aislado de trigo y de maíz (Wahlroos y Virtanen, 1959) y, además de su actividad como compuestos de defensa, tienen actividades alelopáticas (compuestos químicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos; Singh et al., 2009), fungicidas (Martyniuk et al., 2006), insecticidas (Escobar et al., 1999) y mutagénicas (Hashimoto y Shudo, 1996). Su modo de acción se atribuye a la formación de un enlace *N*-covalente con aminoácidos y ácidos nucleicos (Hashimoto y Shudo, 1996). Su producción es alta durante la germinación, con concentraciones fungistáticas presentes en tejido de hoja, lo que sugiere que estos compuestos contribuyen activamente a la defensa durante la edad temprana de la plántula (Copaja et al., 1999). Además, su concentración también se incrementa después del ataque por patógenos y en respuesta a compuestos que estimulan la defensa, por lo que son considerados como fitoalexinas (Oikawa et al., 2001, 2004).

Los Bx agrupan a las benzoxazolinonas, tales como la 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA); a los ácidos hidroxámicos, que incluyen a los compuestos 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA), 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA), sus correspondientes glucósidos (DIBOA-Glu y DIMBOA-Glu) y lactámicos tales como 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (HBOA) (Hanhineva et al., 2011). Los ácidos hidroxámicos se acumulan en las plantas en forma de β -glucósidos. En los cereales, se encuentran principalmente en la raíz y las hojas (Villagrasa et al., 2006).

En trigo, la aglucona (forma química no glucosilada) más abundante es el DIMBOA (Nakagawa et al., 1995) y cuando la raíz la exuda se convierte rápidamente en MBOA, la cual es más resistente a la degradación (Macías et al., 2004). Actualmente se desconoce el efecto de la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* sobre la acumulación de Bx.

En este estudio se analizó el efecto de diferentes concentraciones de inóculo y el tiempo de exposición



de *A. brasilense* sobre la producción de Bx en plántulas de trigo, así como su efecto sobre el crecimiento de la rizobacteria.

Material y métodos

Para el estudio se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) del cultivar Nana F2007, donadas por el Dr. Mario González Chavira, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, México.

La cepa de *Azospirillum brasilense* Sp245 (Baldani *et al.*, 1986) fue donada por la Dra. Gladys Alexandre, de la Universidad de Tennessee, USA. La bacteria se mantuvo en medio Luria-Bertani (LB) con 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g L⁻¹ de NaCl, 0.186 g L⁻¹ de MgSO₄, 0.277 g L⁻¹ de CaCl₂ y 15 g L⁻¹ de agar.

Para la preparación del inóculo, las bacterias se crecieron en 50 mL de medio LB líquido durante 20 h (fase exponencial), a 27°C, con agitación constante [(100 revoluciones por minuto [rpm]) (Labnet 211DS, Edison, NJ, U.S.A.). El cultivo se lavó dos veces con una solución de NaCl al 0.9 % y se centrifugó a 4300 rpm, durante 10 min (Terlab, Zapopan, Jal, México). Las células se resuspendieron en 1 mL de buffer de MgSO₄ 0.01 M, y se ajustaron a la concentración final deseada por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL.

El compuesto 6-methoxy-2-benzoxazolinone (Cat. 543541) se adquirió comercialmente de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.).

Germinación de las semillas y tratamientos

Las semillas se lavaron con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 %, en agitación durante 3 min. Posteriormente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 5 min, en agitación constante. Se lavaron 4 veces con agua destilada estéril (ADE) y se germinaron en cajas Petri, cubiertas con papel filtro humedecido con ADE, durante un periodo de 3 a 4 días, a 28°C, en oscuridad.

Para los tratamientos, cinco plántulas de tres días de germinación se transfirieron a matraces de 100 mL, conteniendo 10 mL de diferentes concentraciones de inóculo (1 y 3x10⁶ UFC/mL). El inóculo se preparó diluyendo la cantidad deseada de bacterias en

ADE. Los controles se trataron de la misma forma, sin la adición de bacterias. Las plántulas se colocaron en los matraces de tal manera que solo las raíces de las plantas estuvieron en contacto con el inóculo. La interacción de la raíz con la rizobacteria se incubó a diferentes tiempos (24 y 48 h), y posteriormente se realizó la extracción de Bx.

Extracción y análisis de Bx

Para la extracción de los Bx, el tejido vegetal se maceró en un mortero con 1 mL de ADE. El macerado se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se agitó en vortex durante 30 s, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se realizó una extracción con dietil éter [(C₂H₅)₂O] (1:1 v/v) por agitación durante 30 s. y se centrifugó a 12,000 rpm, durante 5 minutos. Se retiró la fracción orgánica de [(C₂H₅)₂O], se colocó en un tubo de 1.5 mL y el solvente se evaporó en un Termomixer a 60°C.

Para la identificación de los compuestos, el extracto se disolvió en (C₂H₅)₂O y se sometió a un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (CG/EM) (Hewlett Packard 5890 Series II, Palo Alto, CA, U.S.A.). Se utilizó una columna capilar de silica con 5 % de fenilmetil silicona [(C₇H₈osi)N] (HP-1, Hewlett Packard, Wilmington, DE, U.S.A.). Las condiciones de corrida fueron: helio a 15 psig (libras por pulgada cuadrada de calibre), con un programa de temperatura de 45°C (3 min) a 300°C (1 min) a 10°C/min. Los resultados se analizaron en la librería de espectros de masas del software Xcalibur™ 2.2 de Thermo Scientific (Waltham, MA, U.S.A.).

Para la identificación de Bx por cromatografía en placa fina (CPF), el extracto se re-suspendió en 50 µL de acetato de etilo (C₄H₈O₂) y se aplicó en una placa fina. La cromatografía se desarrolló en un sistema de solventes compuesto por 10 mL de metanol y 90 mL de cloroformo (CHCl₃) (1:9 v/v). La placa se reveló por aspersión con una mezcla de cloruro férrico (FeCl₃) al 5% en etanol al 95%. Los Bx se localizaron por la presencia de manchas de color azul violeta (Baker and Smith, 1977).

Para la cuantificación, se raspó cuidadosamente la zona de ubicación del MBOA en la placa fina sin revelar y se eluyó con 1 mL de metanol (CH₃OH). Se centrifugó y el sobrenadante se analizó a 264 nm en un

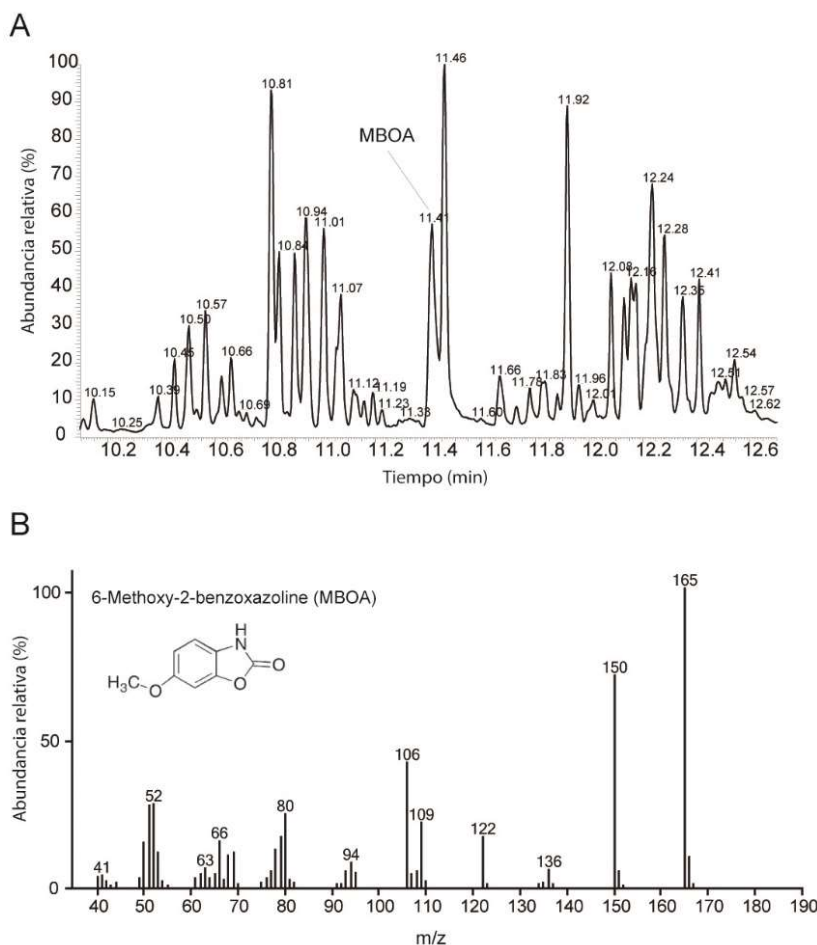


Figura 1. Análisis por cromatografía de gases (A), e identificación del benzoxazinoide 6- metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) por espectrometría de masas (B).

espectrofotómetro, longitud de onda UV absorbida por el compuesto (Nakagawa et al., 1995).

Para analizar la liberación por hidrólisis de MBOA del precursor glucosilado, el macerado acuoso inicial se incubó a diferentes tiempos (0, 1 y 1.5 h) para permitir la hidrólisis y posteriormente se realizó su extracción.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron tres veces, con una $n = 3$ por lote. Los datos se reportan como la media de cada lote experimental. Los análisis del efecto del MBOA sobre el crecimiento de la bacteria fueron realizados con una $n = 10$. Los datos se reportan con media \pm DE en cada lote. A estos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p \geq 0.05$), utilizando el programa STATISTICA 13.3

(<http://www.statsoft.com>) (StatSoft, Inc., OK, U.S.A).

Resultados

Identificación de Bx

Un extracto inicial se sometió a análisis por CG/EM. Un pico con un tiempo de retención de 11.41 min (Figura 1A), se identificó como la benzoxazolinona 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) (Figura 1B). Sin embargo, por razones desconocidas, no se identificaron otros Bx reportados para la planta.

Localización y producción MBOA

Se analizó la acumulación natural de MBOA por cromatografía en placa fina en dos tejidos de la plántula: raíz y follaje. Se observó la acumulación del metabolito en ambos tejidos, sin embargo, por la intensidad de la zona revelada en la placa, la cantidad fue diferente en los dos tejidos. Su acumulación fue mayor en el tejido de follaje, en relación a la raíz (Figura 2A).

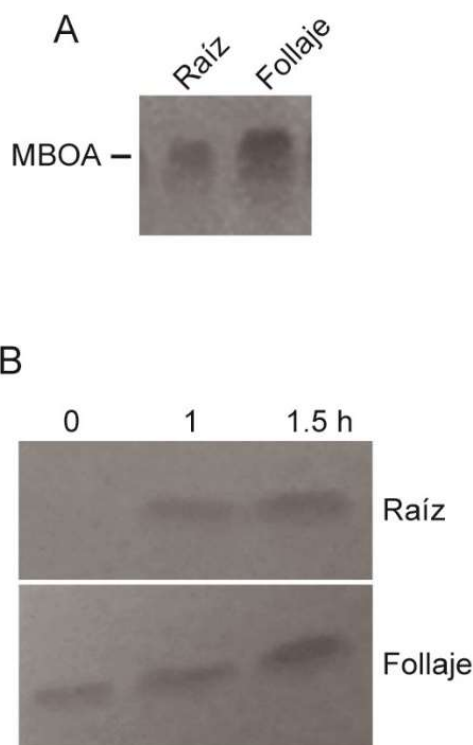


Figura 2. Producción de MBOA en diferentes tejidos de plántulas de trigo (A) y después de la incubación del extracto acuoso a diferentes tiempos (B). El análisis se realizó por cromatografía en placa fina.

Los Bx se acumulan formando complejos con glucosa, los cuales son solubles en agua. En respuesta a la infección, la glucosa se separa por hidrólisis enzimática y se libera la aglucona (Walker *et al.*, 2010). Se analizó la acumulación de MBOA por hidrólisis del precursor glucosilado. El análisis por CPF mostró que la cantidad de MBOA se incrementó en raíz y follaje, en relación con el tiempo de incubación del extracto (hidrólisis; Figura 2B). Lo anterior sugiere que su acumulación está relacionada con la liberación de la glucosa de la forma glucosilada en relación con el tiempo de hidrólisis.

***A. brasilense* estimula la acumulación de MBOA**

Para analizar la acumulación de MBOA en respuesta a la inoculación con *A. brasilense*, las plántulas de trigo se inocularon, y se incubaron a diferentes tiempos (24 y 48 h).

La acumulación de MBOA disminuyó en la raíz, pero incrementó en follaje 24 h después de la inoculación. Se observó la misma tendencia en su acumulación en la raíz 48 h después de la inoculación (Figuras 3A-C).

La concentración de bacteria incrementa la acumulación de MBOA

Se realizó un experimento para analizar el efecto de la concentración de inóculo sobre la acumulación de MBOA con dos concentraciones de bacteria, 1 y 3×10^6 UFC/mL. En ambos tejidos, raíz y follaje, se observó un incremento en la acumulación de MBOA, y el incremento correlacionó con la concentración de inóculo. La concentración más alta de bacteria acumuló la mayor cantidad del metabolito (Figuras 4A, B).

Efecto del MBOA sobre el crecimiento de *A. brasilense*

Se realizó un experimento para analizar el efecto de la adición exógena del MBOA, sobre el crecimiento de *A. brasilense*. Para el ensayo se adquirió el compuesto químico comercial, y se adicionó al medio de crecimiento de la bacteria en diferentes concentraciones (0, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Después de 24h de incubación del cultivo, se cuantificó el crecimiento de la bacteria por espectrofotometría. Con la concentración más baja se observó un ligero incremento en el

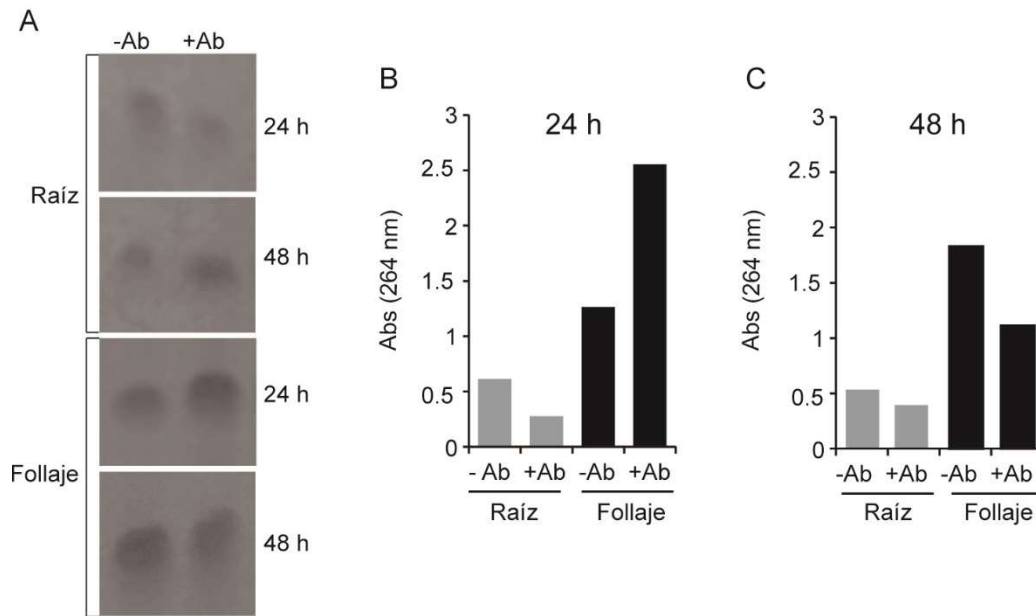


Figura 3. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* sobre la producción de MBOA en plántulas de trigo. A. Análisis por cromatografía en placa fina. B. Cuantificación por espectrofotometría. Ab = *Azospirillum brasilense*.

crecimiento de la bacteria (aprox. 2 %) y con la concentración más alta el crecimiento mostró una notoria disminución (18%) (Figura 5). Los resultados sugieren que el MBOA puede afectar el crecimiento de *A. brasilense* dependiendo de la concentración utilizada.

Discusión

Se ha reportado que la concentración de Bx es más alta en plántulas jóvenes, de pocos días de germinación y decrece gradualmente con la edad. Este perfil de acumulación sugiere que están involucrados en la defensa en edades tempranas de las plantas

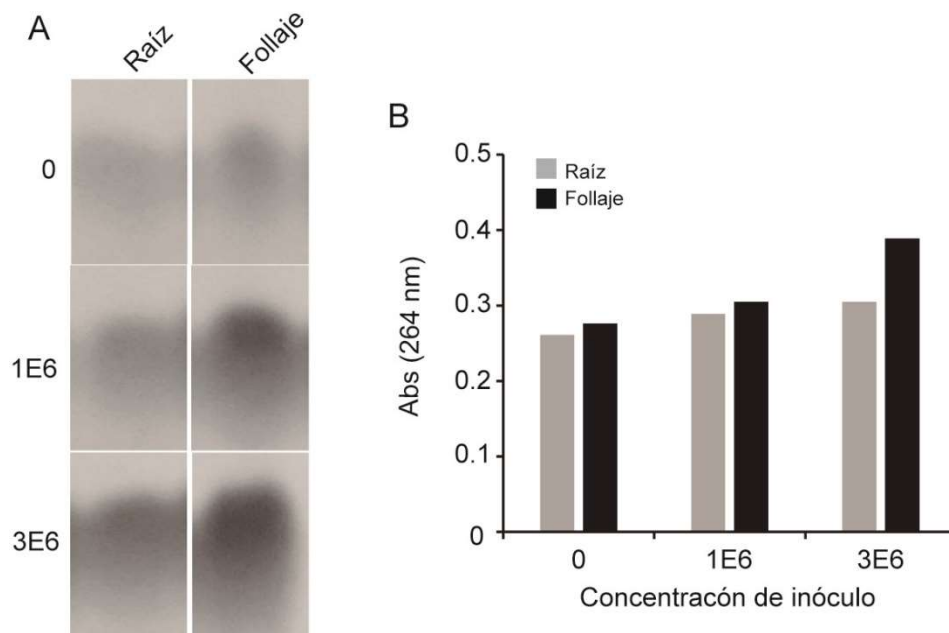


Figura 4. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de MBOA. A. Análisis por cromatografía en placa fina en diferentes tejidos. B. Cuantificación por espectrofotometría.

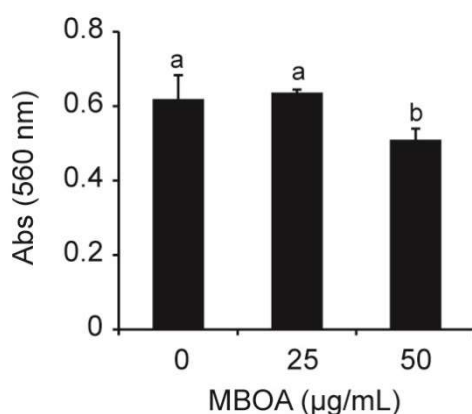


Figura 5. Crecimiento de *A. brasilense* en diferentes concentraciones de MBOA. Los datos representan la media \pm DE. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los tratamientos de acuerdo al análisis de ANOVA ($P \geq 0.05$).

(Masayuki *et al.*, 2021), lo que les permitiría crecer en una condición más sana.

En este estudio, se identificó a la benzoxazinona 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA), un benzoxazinoide producido por plántulas de trigo. Este es un derivado más tóxico que su precursor, el 4-*O*-methyl-DIMBOA-Glc (HDMBOA) y resulta de la degradación de esta glucona (Mazayuki *et al.*, 2021).

Existen pocos reportes del efecto de rizobacterias sobre la producción de Bx en cereales. Un estudio describe la variación en la producción de Bx en maíz inoculado con *Azospirillum* (Walker *et al.*, 2012). En nuestro estudio se reporta que la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* incrementa la producción de MBOA en el follaje, pero no en la raíz. Probablemente como resultado de la estimulación de la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), un fenómeno de estimulación de compuestos de defensa en la planta promovido por rizobacterias. Este tipo de resistencia se manifiesta en zonas alejadas del sitio de colonización por la rizobacteria (van Loon *et al.*, 1998). Además, el incremento fue dependiente de la concentración del inóculo, como lo mostró la intensidad del compuesto analizado por CPF. La contribución del incremento de MBOA en follaje a la resistencia de la plántula de trigo es desconocida hasta ahora.

El MBOA, al igual que otros benzoxazinoides, es secretado por las raíces de los cereales hacia la rizósfera, lo cual altera a las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas a la raíz, disminuyendo el crecimiento vegetal, incrementando las defensas de la planta, y suprimiendo la herbivoría. Lo anterior revela

una función importante del MBOA, en la función de la microbiota asociada a la raíz (Hu *et al.*, 2018).

En adición, se ha reportado que el DIMBOA, el principal benzoxazinoide exudado por la raíz de plántulas de maíz, estimula la atracción de la rizobacteria benéfica *Pseudomonas putida* KT2440 hacia la raíz, sugiriendo su importancia para el reclutamiento de microorganismos benéficos por la planta (Neal *et al.*, 2012).

Si bien los Bx tienen propiedades antimicrobianas, las bacterias benéficas parecen tolerar su producción por la planta. Lo anterior se demostró en un ensayo del crecimiento *in vitro* de bacteria *P. putida* KT2440 en presencia de diferentes concentraciones de DIMBOA. La bacteria creció de manera similar al control a una concentración de DIMBOA de 0.5 mM. En contraste, el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, otra bacteria de suelo, se afectó incluso a concentraciones menores. Al parecer la tolerancia se debió a la capacidad para degradar el metabolito (Neal *et al.*, 2012). Si bien no existen reportes en la literatura sobre el efecto de Bx en *A. brasilense*, es probable que, al igual que en otras bacterias benéficas, tenga la capacidad de tolerar ciertas concentraciones producidas por la planta de trigo, lo cual podría favorecer la colonización de la raíz. Se requieren más estudios para analizar esta posibilidad. Estos resultados contribuyen a comprender el mecanismo para establecer una relación benéfica planta-rizobacteria.

Conclusiones

La inoculación de la rizobacteria benéfica *A. brasilense* estimula la acumulación de MBOA en plántulas

de trigo. La rizobacteria es tolerante a diferentes concentraciones del compuesto.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH por el apoyo financiero otorgado para la realización de este estudio.

Referencias

- Alberton, D., Valdameri, G., Moure, V.R., Monteiro, R.A., Pedrosa, F.O., Müller-Santos, M., and de Souza, E.M., 2020, What did we learn from plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-grass associations studies through proteomic and metabolomic approaches? *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 607343. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.607343>.
- Baker, E.A., and Smith, I.M., 1977, Antifungal compounds in winter wheat resistant and susceptible to *Septoria nodorum*, *Analytical and Applied Biology*, 87, 67-73. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb00660.x>.
- Baldani, V.L.D., Alvarez, M.A., Baldani, J.A., and Döbereiner, J., 1986, Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field-grown wheat and sorghum, *Plant Soil*, 90, 35-46.
- Bashan, Y., Holguin, G., and de-Bashan, L.E., 2004, *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 521-577. <https://doi.org/10.1139/w04-035>.
- Cassán, F.D., and Díaz-Zorita, M., 2016, *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field, *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.
- Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dye, F., Bertrand, C., and Prigent-Combaret, C., 2013, Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association, *Phytochemistry*, 87, 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>.
- Copaja, S.V., Nicol, D. and Wratten, S.D., 1999, Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination, *Phytochemistry*, 50, 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00479-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00479-8).
- Díaz-Zorita, M., and Fernández-Canigia, M.V., 2009, Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity, *European Journal of Soil Biology*, 45, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.07.001>.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., and Reis, V.M., 1995, Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik I, Del Gallo M, Vanderleyden J, de Zamaroczy M (eds) *Azospirillum* VI and related microorganisms. Springer, Berlin, pp 3-14.
- Escobar, C.A., Sicker, D., and Niemeyer, H.M., 1999, Evaluation of DIMBOA analogs as antifeedants and antibiotics towards the aphid *Sitobion avenae* in artificial diets, *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1543-1554. <https://doi.org/10.1023/A:1020832731546>.
- Hanhineva, K., Rogachev, I., Aura, A. M., Aharoni, A., Poutanen, K., and Mykkanen, H. J., 2011, Qualitative characterization of benzoxazinoid derivatives in whole grain rye and wheat by LC-MS metabolite profiling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 921-927. <https://doi.org/10.1021/jf103612u>.
- Hashimoto, Y., and Shudo, K., 1996, Chemistry of biologically active benzoxazinoides, *Phytochemistry*, 43, 551-559. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00330-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00330-5).
- Hu, L., Robert, C.A.M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., van der Heijden, M.G.A., Schlaeppi, K., and Erb, M., 2018, Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota, *Nature Communications* 9, 2738. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05122-7>.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., and Pedrosa, F.O., 2010, Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil, *Plant Soil*, 331, 413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.
- Jourdan, E., Ongena, M., and Thonart, P., 2008, Molecular characteristics of the rhizobacteria triggered plant immunity, *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 12, 437-449.
- Lade, S. B., Roman, C., Cueto-Ginzo, A. I., Serrano, L., Sin, E., Achon, M. A., Medina, V., 2018, Host-specific proteomic and growth analysis of maize and tomato seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* Sp7, *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 381-393. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.024>.
- Macias, F. A., Oliveros-Bastidas, A., Marin, D., Castellano, D., Simonet, A.M. and Molinillo, J.M.G., 2004, Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3 (4H)-one (DIMBOA) and its degradation products,



- phytotoxic allelochemicals from Gramineae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6402–6413. <https://doi.org/10.1021/jf0488514>
- Martyniuk, S., Stochmal, A., Macias, F.A., Marin, D. and Oleszek, W., 2006, Effects of some benzoxazinoids on in vitro growth of *Cephalosporium gramineum* and other fungi pathogenic to cereals and on *Cephalosporium stripe* of winter wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1036–1039. <https://doi.org/10.1021/jf050901x>.
- Masayuki, S., Fujii, M., and Fujimaki, T., 2021, Increased benzoxazinoid (Bx) levels in wheat seedlings via jasmonic acid treatment and etiolation and their effects on Bx genes including Bx6, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 27, 101059. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101059>.
- Mishra, R. P. N., Singh, R. K., Jaiswal, H. K., Kumar, V., and Maurya, S., 2006, Rhizobium mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.), *Current Microbiology*, 52, 383–389. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0296-3>.
- Nakagawa, E., T. Amano, N. Hirai, and Iwamura, H., 1995, Non-induced cyclic hydroxamic acids in wheat during juvenile stage of growth, *Phytochemistry*, 38, 1349–1354.
- Neal, A.L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., and Ton, J., 2012, Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere, *PLoS ONE* 7(4): e35498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035498>.
- Oikawa, A., Ishihara, A., Hasegawa, M., Kodama, O., and Iwamura, H., 2001, Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves, *Phytochemistry*, 56, 669–675. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00494-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00494-5)
- Oikawa, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Mori, N., Tsuda, M. and Iwamura, H., 2004, Accumulation of HDMBOA-Glc is induced by biotic stresses prior to the release of MBOA in maize leaves, *Phytochemistry*, 65, 2995–3001. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.09.006>.
- Okon, Y., and Kapulnik, Y., 1986, Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots, *Plant Soil*, 90, 3–16.
- Osborn, A. E., Qi, X., Townsend, B., and Qin, B., 2003, Dissecting plant secondary metabolism-constitutive chemical defences in cereals, *New Phytologist*, 159, 101–108. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00759.x>.
- Park, W.J., Hochholding, F., and Gierl, A., 2004, Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral- and crown root emergence in *Zea mays*, *Journal of Plant Physiology*, 161, 981–985. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.005>.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R., 2001, Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases, *Crop Protection*, 20, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00056-9).
- Patriquin, D.G., Dobereiner, J., and Jain, D.K., 1983, Sites and processes of association between diazotrophs and grasses, *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 900–915.
- Rozier, C., Erban, A., Hamzaoui, J., Prigent-Combaret, C., Comte, G., Kopka, J., Czarnes, S., and Legendre, L., 2016, Xylem sap metabolite profile changes during phytostimulation of maize by the plant growth-promoting rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1, *Metabolomics*, 6, 3. <https://doi.org/10.4172/2153-0769.1000182>.
- Singh, P., Shrivastava, A.K., Suman, A., Arya, N., Tiwari, P., Rai, R.K., Singh, J., and Singh, A.K., 2009, Allelopathic effects of hydroxamic acids from sugarcane leaves on germination and growth of crops, *Allelopathy Journal*, 23, 203–212.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A., and Pieterse, C.M., 1998, Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>.
- Vande Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A., and Vanderleyden, J., 1993, Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association, *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 6, 592–600.
- Villagrasa, M., Guillamón, M., Labandeira, A., Taberner, A., Eljarrat, E., and Barceló, D., 2006, Benzoxazinoid allelochemicals in wheat: distribution among foliage, roots and seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1009–1015. <https://doi.org/10.1021/jf050898h>.
- Wahlroos, O., and Virtanen, A.I., 1959, The precursors of 6-methoxy-benzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties, *Acta Chemica Scandinavica*, 13, 1906–1908.

Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moenne-Loccoz, Y., Bally, R., and Comte, G., 2011, Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*, *New Phytologist*, 189, 494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x>.

Walker, V., Couillerot, O., von Felten, A., Bellvert, F., Jansa, J., Maurhofer, M., Bally, R., Moënné-Loccoz., and Y, Comte, G., 2012, Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions, *Plant Soil*, 356, 151–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0960-2>.