

UCh-FC
Q. Ambiental
F. 596
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“EFECTO BIOFERTILIZANTE DE *RHIZOBIUM ETLI* EN PLANTAS
DE *PHASEOLUS VULGARIS*: BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS Y
TOLERANCIA A COBRE”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Químico Ambiental

NATHALIE FLEIDERMAN LEIGHTON

Directora del Seminario de Título:
Dra. María Cecilia Rojas Garrido



Enero 2017
Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“EFECTO BIOFERTILIZANTE DE *RHIZOBIUM ETLI* EN PLANTAS DE *PHASEOLUS VULGARIS*: BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS Y TOLERANCIA A COBRE”

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta:

Nathalie Fleiderman Leighton

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental.

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Director Seminario de Título: Dra. María Cecilia Rojas

Presidente Comisión: M Cs. Sylvia Copaja

Evaluador y corrector: Dra. Inmaculada Vaca

M. Cecilia Rojas

S. Copaja

I. Vaca

Santiago de Chile, 12 de enero 2017

RESEÑA



Nathalie Fleiderman Leighton nació el 29/05/1992 en Santiago, Chile. Cursó su Educación Básica y Media en el Colegio Instituto Santa María; donde adquirió un interés por la ciencia. Debido a esto, continuó la Educación Superior ingresando en el año 2011 a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en la carrera de Química Ambiental.

Obtuvo el grado de Licenciada en Ciencias Ambientales con mención en Química el año 2015 y finalizó sus estudios de pregrado realizando su trabajo de Seminario de Título en el laboratorio de Bio-orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

DEDICATORIA

*Dedicado a mi familia por su amor y apoyo incondicional.
A mi madre, Leonor por guiarme en mi desarrollo personal.*

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Dra. María Cecilia Rojas por todo su apoyo, orientación y guía en la realización de este trabajo y por todo el conocimiento aprendido durante este proceso.

A mis compañeras del Laboratorio de Bio-orgánica, Mariana y Constanza por sus consejos y colaboración. A Patricia Corrales por su ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A la profesora Cecilia Baginsky por proporcionar la cepa de *Rizobium etli* y semillas de *P. vulgaris* usadas en este trabajo.

Le agradezco a mi familia por su apoyo en todo momento. A mi madre Leonor, por su dedicación y apoyo en mi crecimiento, a mis abuelos por el cariño entregado y a mi tía Ximena, por sus consejos y apoyo.

A Marisol Aravena, Secretaria de pregrado de la facultad de Ciencias, por su ayuda y disposición.

Finalmente le doy las gracias a mis amigos, por los momentos que compartimos durante nuestra formación profesional.

Este Seminario de Título fue realizado en el laboratorio de Bio-orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y financiado por el Proyecto FONDECYT 1150797.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESEÑA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Beneficios del uso de rizobacterias como fertilizantes alternativos para cultivos agrícolas.....	1
1.2 Mecanismo de la acción bacteriana en la simbiosis.....	2
1.3 Síntesis de fitohormonas.....	3
1.4 Cobre en suelo y su toxicidad en sistemas vegetales.....	7
1.5 Atenuación del efecto tóxico del cobre sobre plantas y rizobios.....	8
1.6 Efecto de rizobacterias sobre el crecimiento de leguminosas cultivadas en suelos contaminados con cobre.....	9
1.7 Hipótesis.....	10
1.8 Objetivo General.....	11
1.9 Objetivos Específicos.....	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Cultivo de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto común).....	12
2.2 Cultivos bacterianos.....	13
2.3 Obtención de bacteroides de <i>R. etli</i>	13
2.4 Sustratos marcados con ¹⁴ C.....	14
2.5 Metabolización de precursores de GAs.....	14
2.6 Extracción y purificación de productos.....	14
2.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	14
2.8 Cuantificación de radiactividad por centelleo líquido.....	15

2.9	Mediciones de parámetros de crecimiento vegetal.....	15
III.	RESULTADOS.....	16
3.1	Parámetros de crecimiento de plantas de <i>P. vulgaris</i> en simbiosis con <i>R. etli</i>	16
3.2	Parámetros de crecimiento de plantas de <i>P. vulgaris</i> en presencia de NH_4NO_3	20
3.3	Biosíntesis de GAs en bacteroides de <i>R. etli</i>	21
3.4	Efecto del Cu(II) sobre plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivadas en presencia de <i>R. etli</i>	27
3.5	Efecto del Cu(II) sobre plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivadas en presencia de NH_4NO_3	32
3.6	Efecto del Cu(II) sobre el crecimiento de <i>R. etli</i> en cultivos líquidos.	34
IV.	DISCUSIÓN.....	35
V.	CONCLUSIONES.....	40
VI.	REFERENCIAS.....	41
VII.	ANEXOS.....	45
7.1	Cromatogramas de HPLC obtenidos por cuantificación de la radiactividad de cada fracción mediante centelleo líquido.....	45
7.2	Calidad y procedencia de los reactivos.....	48



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros de crecimiento en plantas de <i>P. vulgaris</i> inoculadas con <i>R. etli</i>	17
Tabla 2	Parámetros de nodulación a lo largo del desarrollo de la planta.....	17
Tabla 3	Parámetros de crecimiento de plantas de <i>P. vulgaris</i> en presencia de NH_4NO_3 o <i>R. etli</i> . Plantas de 25 días.....	20
Tabla 4	Actividad de la <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa en bacteroides de <i>R. etli</i> aislados en distintas etapas de desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	25
Tabla 5	Actividad de la C20 oxidasa de GAs en bacteroides de <i>R. etli</i> aislados en distintas etapas de desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	25
Tabla 6	Parámetros de crecimiento en plantas de <i>P. vulgaris</i> tratadas con <i>R. etli</i> y CuSO_4	28
Tabla 7	Parámetros de nodulación de <i>P. vulgaris</i> inoculado con <i>R. etli</i> . Efecto del CuSO_4	30
Tabla 8	Parámetros de crecimiento en plantas de <i>P. vulgaris</i> ⁷ tratadas con distintas concentraciones de CuSO_4	32
Tabla 9	Cromatogramas estándares de GAs.....	45
Tabla 10	Cromatogramas de los productos formados a partir de ^{14}C -KA por bacteroides de <i>R. etli</i> en distintas etapas de crecimiento de la planta...46	46
Tabla 11	Cromatogramas de los productos formados a partir de ^{14}C -GA ₁₂ por bacteroides de <i>R. etli</i> en distintas etapas de crecimiento de la planta..47	47
Tabla 12	Calidad y procedencia de los reactivos.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Estructura de GA. A: Esqueleto tetracíclico del *ent*-giberelano (20 carbonos) y orden de numeración de los carbonos. B: Estructura de las GAs bioactivas de 19 carbonos..... 4
- Figura 2** Reacciones de la biosíntesis de giberelinas a partir del precursor GGPP. Izquierda: sistema fúngico (*Fusarium fujikuroi*), centro: sistema bacteriano (*B. japonicum*). Derecha: sistema vegetal (*Curcubita máxima*). 5
- Figura 3** Esquema de operón de síntesis de GAs para *B. japonicum* y *R. etli*. 6
- Figura 4** Plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*. A: Desarrollo vegetativo. (21 dpi). B: Prefloración (dpi). C: floración (28 dpi). D: formación de vainas (35 dpi). E: Vainas llenas (42 dpi). 16
- Figura 5** Variación de los parámetros de nodulación en distintos períodos del crecimiento vegetal..... 18
- Figura 6** Nódulos extraídos en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*. A: nódulos de 25 dpi. B: nódulos de 42 dpi. 19
- Figura 7** Variación de parámetros de crecimiento de *P. Vulgaris* en distintos tiempos. Izquierda: variación de masa seca. Derecha: variación en la longitud de la sección aérea..... 19
- Figura 8** Variación de parámetros de crecimiento de *P. vulgaris* en presencia de NH_4NO_3 o *R. etli*. Plantas de 25 días. 20
- Figura 9** Perfiles de HPLC de los productos formados a partir de ^{14}C -KA por bacteroides de *R. etli* obtenidos a diferentes tiempos de crecimiento de las plantas. 22
- Figura 10** Perfiles de HPLC de los productos formados a partir de ^{14}C -GA₁₂ por bacteroides de *R. etli* obtenidos a diferentes tiempos de crecimiento de las plantas 23
- Figura 11** Perfiles de HPLC de estándares de GAs en las mismas condiciones de las Figuras 9 y 10..... 24
- Figura 12** Plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* en presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 . A: Plantas de 25 dpi. B: Síntomas de toxicidad en hojas. C: raíces de 25 dpi. 28
- Figura 13** Variación de parámetros de crecimiento de *P. vulgaris* inoculada con *R. etli* en presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 29
- Figura 14** Nódulos extraídos en plantas de *P. vulgaris* de 25 dpi inoculadas con *R. etli* en presencia de CuSO_4 29
- Figura 15** Variación de los parámetros de nodulación en presencia de CuSO_4 30
- Figura 16** Corte transversal de un nódulo radicular aislado de *P. vulgaris* de 25 dpi crecida en ausencia y presencia de CuSO_4 31

Figura 17	Plantas de <i>P. vulgaris</i> tratadas con NH_4NO_3 y distintas concentraciones de CuSO_4 . Izquierda: plantas de 14 días. Derecha: Raíces plantas de 25 días.....	33
Figura 18	Variación de los parámetros de crecimiento de <i>P. vulgaris</i> bajo tratamiento con NH_4NO_3 y distintas concentraciones de CuSO_4	33
Figura 19	Curvas de crecimiento de <i>R. etli</i> en medio YEM con distintas concentraciones de CuSO_4	34
Figura 20	Crecimiento de <i>P. vulgaris</i> inoculadas con <i>R. etli</i> o NH_4NO_3 en presencia de CuSO_4	36
Figura 21	Ruta de biosíntesis de GAs en bacterides de <i>R. etli</i> a partir del ácido <i>ent</i> -kaurenoico.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

GAs	Giberelinas
GGPP	Geranil geranil difosfato
GGPS	Geranil geranil difosfato sintasa
KA	Ácido <i>ent</i> -kaurenoico
7 β OH-KA	Ácido 7 β hidroxí-kaurenoico
CPS	<i>ent</i> -copalil difosfato sintasa
KS	<i>ent</i> -kaureno sintasa
Fd	Ferredoxina
SDR	Alcohol deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
CYP	Citocromo P450
ATP	Adenosin trifosfato
GTP	Guanosin trifosfato
TES	Ácido 2 - [(2-hidroxí-1,1-bis (hidroximetil) etil) amino] etanosulfónico
YEM	Medio nutritivo que contiene manitol y extracto de levadura
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
DPI	Días post inoculación
YEMA	Medio nutritivo que contiene manitol, extracto de levadura y agar
CPM	Cuentas por minuto
DPM	Decaimientos por minuto

RESUMEN

La industria agrícola demanda el uso de fertilizantes nitrogenados que optimicen el rendimiento y calidad de los cultivos, sin embargo, su aplicación inadecuada genera efectos adversos en el medio ambiente. Los rizobios, bacterias del suelo simbiotes de leguminosas, pueden ser usados como alternativa a los fertilizantes químicos ya que fijan N₂ atmosférico, promueven el crecimiento vegetal y pueden reducir la toxicidad de metales pesados sobre plantas que crecen en suelos contaminados.

En este Seminario de Título se caracterizó el efecto biofertilizante de *Rhizobium etli* sobre plantas de *Phaseolus vulgaris* (poroto común), con respecto a la biosíntesis de fitohormonas diterpénicas (giberelinas, GAs) y en relación al efecto protector de la bacteria frente a la toxicidad por Cu(II). Las plantas se hicieron crecer en cultivo hidropónico y fueron inoculadas con *R. etli* o alternativamente se cultivaron en presencia de un fertilizante nitrogenado (NH₄NO₃). Se agregó CuSO₄ x 5H₂O en la solución de riego y se registraron, después de 25 días post inoculación, los parámetros de crecimiento y/o de nodulación de las plantas. Además se determinó la actividad de dos enzimas de la biosíntesis de GAs, la *ent*-kaurenoico oxidasa y la C₂₀ oxidasa, en bacteroides aislados desde nódulos radiculares de *P. vulgaris* e incubados con los sustratos ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y ¹⁴C-GA₁₂.

Mediante cromatografía líquida de alta resolución y centelleo líquido se detectó actividad de ambas oxidasas de GAs en los bacteroides, observándose como productos de metabolización el ácido 7β hidroxí-¹⁴C-kaurenoico, ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, ¹⁴C-GA₁₂, ¹⁴C-GA₁₅, ¹⁴C-GA₂₄ y ¹⁴C-GA₉. Esto indica que *R. etli* podría sintetizar GAs durante la simbiosis favoreciendo el crecimiento de *P. vulgaris*.

Con respecto al efecto de la adición de cobre, se observó tanto en las plantas inoculadas con *R. etli* como en las plantas tratadas con NH₄NO₃ una disminución en masa y en longitud del tejido aéreo de *P. vulgaris* con respecto a las plantas no tratadas, sin embargo, las raíces presentaron un mayor grosor y biomasa en presencia de Cu(II), probablemente como un mecanismo de defensa de la planta para evitar la translocación del metal al tejido aéreo.

Las plantas inoculadas con *R. etli* y cultivadas en presencia de Cu(II) se desarrollaron sin síntomas de necrosis, clorosis o marchitamiento, aunque su biomasa aérea disminuyó en un 38%. Esto podría deberse al efecto nocivo del Cu(II) sobre la simbiosis como lo indica la disminución del número y masa de nódulos radiculares observado en presencia de Cu(II) (45% y 43% respectivamente). El crecimiento reducido que se encontró para *R. etli* en cultivos líquidos con Cu(II) sugiere que el efecto tóxico de este metal sobre la bacteria disminuiría la eficiencia de la nodulación.

Aunque el aporte de amonio por *R. etli* a la planta fue menor que el logrado con la adición de NH_4NO_3 (menor biomasa), el crecimiento en longitud de las plantas inoculadas fue mayor, lo que podría atribuirse a las GAs bacterianas. Por otra parte, en presencia de Cu(II) se obtuvo una biomasa similar para las plantas inoculadas con *R. etli* o crecidas con el fertilizante químico lo que sugiere que el efecto protector de la toxicidad del Cu(II) se relacionaría básicamente con la disponibilidad de amonio por la planta. Este efecto, junto con la producción de GAs, sugiere que *R. etli* podría usarse como biofertilizante para el cultivo de *P. vulgaris* en ambientes contaminados con este metal.

SUMMARY

The agricultural industry demands the use of nitrogen fertilizers that optimize the yield and quality of the crops, however, its inadequate application produces negative effects on the environment. *Rhizobium*, soil bacteria which are legume symbionts, can be used as an alternative to chemical fertilizers because they do nitrogen fixation, promote plant growth and can reduce the toxicity of heavy metals on plants growing on polluted soils.

In this Thesis the biofertilizer effect of *Rhizobium etli* on plants of *Phaseolus vulgaris* (common bean) was characterized, in relation to the biosynthesis of diterpene phytohormones (gibberellins, GAs) and the bacterial supporting effect against the Cu(II) toxicity. The plants were grown in hydroponic condition and were inoculated with *R. etli* or alternatively cultivated in presence of a nitrogenous chemical fertilizer (NH_4NO_3). Exogenous CuSO_4 was added to the nutrition solution and plant growth and /or the nodulation parameters were measured after 25 days post inoculation. In addition, the activity of two enzymes of GA biosynthesis, entkaurenoic oxidase and C20 oxidase, were established in bacteroids isolated from root nodules of *P. vulgaris* incubated with the labelled substrates ent- ^{14}C -kaurenoic acid and ^{14}C -GA₁₂.

R. etli bacteroids present activity of both GA oxidases. The products 7 β -hydroxy- ^{14}C -kaurenoic acid, ^{14}C -GA₁₂ aldehyde, ^{14}C -GA₁₂, ^{14}C -GA₁₅, ^{14}C -GA₂₄ and ^{14}C -GA₉ were detected by high performance liquid chromatography and liquid scintillation. This result indicates that *R. etli* could synthesize GAs during the symbiosis promoting the growth of *P. vulgaris*.

With respect to the effect of the addition of copper, it was observed in the plants inoculated with *R. etli* and in the plants cultivated with NH_4NO_3 a decrease in mass and in length of *P. vulgaris*; however the roots were thicker and have more biomass than plants cultivated without the presence of copper, probably due to a defense mechanism of the plant to avoid the translocation of the metal to the air tissue.

Plants inoculated with *R. etli* and grown in the presence of Cu(II) did not develop necrosis, chlorosis or wilting symptoms, although their aerial biomass decreased by 38%. This could be due to the negative effect of Cu(II) on symbiosis seen as a decrease in the number and mass of root nodules observed in the presence of Cu(II) (45% and 43%, respectively). The reduced growth found for *R. etli* in liquid cultures in the presence of Cu(II) suggests that the toxic effect of this metal on the bacteria would decrease the efficiency of nodulation.

Although the ammonium contribution by *R. etli* to the plant was lower than the achieved with the addition of NH_4NO_3 (lower biomass), the length growth of inoculated plants was higher, which could be attributed to bacterial GAs. On the other hand, in the presence of Cu(II) a similar biomass was obtained for the plants inoculated with *R. etli* or grown with the chemical fertilizer suggesting that the protective effect on Cu(II) toxicity would basically relate to the availability of ammonium by the plant. This effect, together with the production of GAs, suggests that *R. etli* could be used as a biofertilizer for the growth of *P. vulgaris* in metal polluted environments.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Beneficios del uso de rizobacterias como fertilizantes alternativos para cultivos agrícolas.

La industria agrícola demanda el uso de fertilizantes que puedan proveer a los cultivos con diversos nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio que permitan optimizar su rendimiento y calidad. Sin embargo, la aplicación inadecuada y muchas veces en exceso de fertilizantes químicos, genera efectos adversos en el medio ambiente y en los propios cultivos como fitotoxicidad, daño a las semillas, volatilización aproximada del 50% del nitrógeno como amoníaco en el caso de la urea, disminución del rendimiento de los cultivos a largo plazo y acumulación de nitratos que pueden lixiviar hacia aguas subterráneas causando su eutrofización (Bohloul y col., 1992; Bremer, 1995). Además, los compuestos volátiles derivados de la aplicación de fertilizantes nitrogenados contribuyen en la formación de lluvia ácida y son nocivos para la población (Bohloul y col., 1992). La aplicación de fertilizantes conlleva a la incorporación de impurezas provenientes de los procesos de manufactura a los suelos, puesto que la riqueza (concentración de elementos nutritivos asimilables por la planta) es del orden del 48%. Muchas de estas impurezas corresponden a metales pesados como Cd, Cu y Co, así como grandes cantidades de sodio y magnesio, especialmente en los fertilizantes potásicos, que provocan la salinización de los suelos. Finalmente, el uso continuo de fertilizantes amoniacales provoca acidificación de los suelos debido a la liberación de iones H^+ durante el proceso de nitrificación (oxidación de amonio a nitrato y nitrito) (Ramos, 2009).

Los rizobios, bacterias del suelo simbiotes de plantas de leguminosas, pueden ser usados como alternativa a los fertilizantes químicos en estos cultivos ya que promueven efectivamente el crecimiento vegetal, evitando el uso de agroquímicos nitrogenados (Gopalakrishnan y col., 2014).

Estudios realizados en cultivos de soya demuestran los beneficios del uso de inóculos de *Bradyrhizobium japonicum* como biofertilizante (Seneviratne y col., 2000). Específicamente se demostró que la acción del inóculo en el cultivo es comparable a los efectos de un fertilizante químico como la urea en términos de

masa seca, densidad de plantas, rendimiento de semillas y contenido de nitrógeno frente a cultivos que no recibieron ningún tratamiento. Además, se ha observado en cultivos con elevada densidad de plantas que éstas producían una mayor cantidad de semillas cuando eran inoculadas, lo cual no sucede con un fertilizante comercial, otorgándole de esta forma una ventaja a los inoculantes por sobre los fertilizantes químicos.

Es por esto que en África y algunos países como Argentina y Sri Lanka se ha masificado el uso de biofertilizantes (Gomez y col. 1997; Hassen y col. 2014). Se ha demostrado que su implementación evitaría el uso de 55-220 kg de urea por hectárea de suelo y aumentaría los niveles de nitrógeno en el suelo (Gomare y col., 2013).

1.2 Mecanismo de la acción bacteriana en la simbiosis.

La acción biofertilizante de estos microorganismos se fundamenta principalmente en la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico durante la simbiosis mediante la enzima nitrogenasa, entregando a la planta ion amonio necesario para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados. De hecho, el 80% del nitrógeno que utilizan las leguminosas proviene de las rizobacterias simbiotes (Das y col., 2013). Los rizobios colonizan las raíces de las leguminosas formando nódulos en los que la bacteria se diferencia a un estado llamado bacteroide, que presenta un metabolismo alterado que incluye la capacidad de fijar N_2 (Gomare y col., 2013; Keyser & Li 1992).

El establecimiento de la relación simbiótica planta-rizobio es un proceso altamente específico que ocurre cuando existe un déficit de nitrógeno. Es mediado por cambios morfológicos en la raíz y una serie de señales químicas que conllevan a la formación de nódulos radiculares, en el cual se genera un ambiente con baja concentración de oxígeno; óptimo para la actividad de la nitrogenasa, a cambio de este proceso la bacteria recibe desde la planta ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos como malato y fumarato como fuente de carbono (Moris y col., 2005).

La formación de los nódulos inicia con el proceso de reconocimiento entre la planta y el rizobio mediante un intercambio de señales químicas; la planta exuda flavonoides, los cuales actúan como moléculas de reconocimiento para los rizobios que responden produciendo factores de nodulación como oligosacaridos que inducen

la invaginación de la membrana plasmática y la curvación de los pelos radicales permitiendo la entrada de los rizobios por una estructura tubular. En respuesta a la infección bacteriana, las células corticales de la raíz se dividen generando el nódulo como un nuevo órgano. (Caetano-anollés & Gresshoff 1991; Meschini y col., 2008).

La formación de nódulos radiculares en plantas de *Phaseolus vulgaris* (poroto común) inoculadas con *Rhizobium etli* es un proceso rápido, encontrándose nódulos a partir de los 4 días post inoculación (dpi), esto se debe a que la transcripción de los genes que participan en el proceso de nodulación en la planta se inicia 24 horas después de la inoculación donde alcanzan una máxima expresión en las raíces y en el nódulo por sobre otros tejidos (Meschini y col., 2008).

Además, los rizobios pueden otorgar a la planta otros beneficios, que han sido menos estudiados como la capacidad de biosintetizar fitohormonas, aumentar la cantidad de fosfato biodisponible solubilizando el fosfato unido a iones hierro, calcio y aluminio en el suelo, además de la producción de sideróforos, proteínas capaces de unirse al ion Fe(III) del suelo haciéndolo más accesible para la planta (Glick, 2012; Das y col., 2013).

1.3 Síntesis de fitohormonas.

Particularmente interesa, dentro del rol biofertilizante, la producción de hormonas vegetales por las rizobacterias entre las que están las giberelinas (GAs), fitohormonas diterpénicas derivadas del *ent*-kaureno (MacMillan, 1997). Las GAs son sintetizadas por todas las plantas superiores participando en la floración, germinación de semillas y elongación del tallo entre otros procesos del desarrollo de la planta (Hedden & Proebsting 1999; Sponsel, 2003). Además de las plantas, algunos hongos y bacterias producen GAs como metabolitos secundarios (MacMillan, 2002). Esta capacidad biosintética se ha demostrado para *B. japonicum* (simbionte de soya) y en este trabajo se investigó para *R. etli*, un simbionte del poroto común.

Las giberelinas se denominan mediante la sigla GA seguida de un subíndice que indica su orden de identificación. De acuerdo a su estructura se pueden agrupar en GAs de 20 carbonos (C20, precursores de las GAs de 19 carbonos) y GAs de 19 carbonos (C19, GAs bioactivas) (Figura 1). Las características estructurales

esenciales para la actividad biológica son una función 19, 10- γ lactona, un grupo carboxilato en C7 y una hidroxilación en C3.

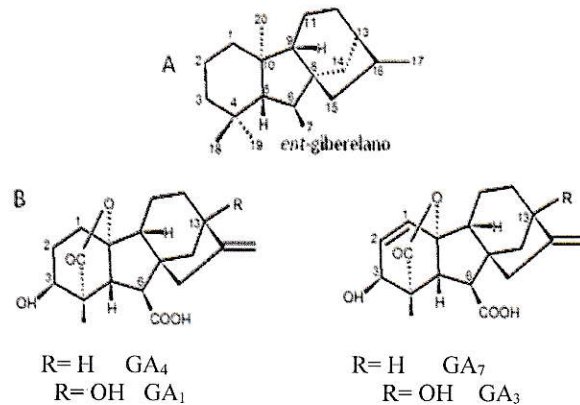


Figura 1 Estructura de GAs. A: Esqueleto tetracíclico del *ent*-gibberelano (20 carbonos) y orden de numeración de los carbonos. B: Estructura de las GAs bioactivas de 19 carbonos.

La biosíntesis de GAs se ha descrito en detalle tanto en plantas superiores como en hongos (Hedden y col., 2002), no así para sistemas bacterianos, para los que únicamente se han descrito genes y enzimas de la biosíntesis de GAs en el simbionte de la soya *B. japonicum* (Méndez y col., 2014; Hershey y col., 2014; Tully y col., 1998).

Las reacciones de la biosíntesis de GAs inicia con el precursor geranil geranil difosfato (GGPP) el cual es ciclado por las ciclasas CPS y KS para generar *ent*-kaureno; el primer intermediario específico de la vía (Figura 2). Las siguientes etapas de la ruta biosintética corresponden a reacciones de oxidación que permiten la formación de GAs de 19 carbonos (Hedden y col., 2002).

En los sistemas fúngicos y vegetales se observan hidroxilaciones en C3 y C13, las cuales ocurren en distinto orden (Figura 2), en plantas se genera primero la hidroxilación en C13 mediante la transformación de GA₁₂ a GA₅₃ seguido de la oxidación del C20 y la hidroxilación en C3 mediada por el paso de GA₂₀ a la GA bioactiva GA₁. En cambio, en sistemas fúngicos se observa en primer lugar la hidroxilación en C3 en la transformación de GA₁₂-aldehído a GA₁₄-aldehído seguido de la oxidación del C20 y la hidroxilación en C13 en la transformación de GA₄ a la GA bioactiva GA₃. A diferencia de los sistemas fúngicos y vegetales;

en *B. japonicum* está presente sólo la vía no hidroxilada de la biosíntesis de GAs, que forma GA₉ como producto final (Figura 2), un precursor de las GAs bioactivas que no es activa como fitohormona (Méndez y col., 2014).

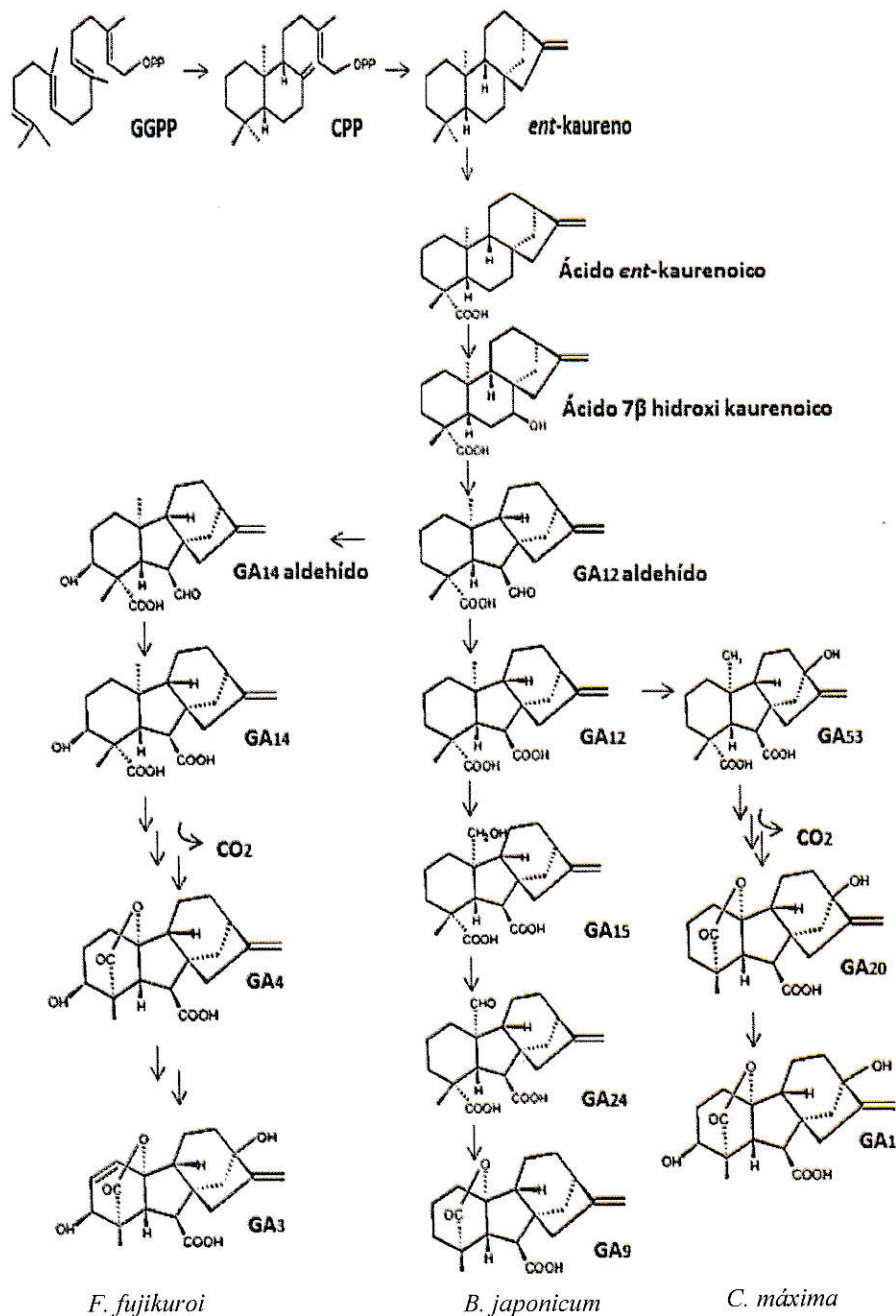


Figura 2 Reacciones de la biosíntesis de giberelinas a partir del precursor GGPP. Izquierda: sistema fúngico (*Fusarium fujikuroi*), centro: sistema bacteriano (*B. japonicum*). Derecha: sistema vegetal (*Curcubita máxima*).

Se ha encontrado en el genoma de *B. japonicum* un operón asociado a la biosíntesis de GAs (Figura 3) (Tully y col., 1998; Hershey y col., 2014). Este operón está también presente en otras especies de rizobios como *R. etli* (Figura 3) aunque con algunas diferencias.

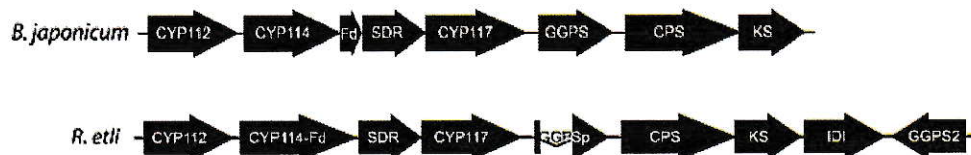


Figura 3 Esquema de operón de síntesis de GAs para *B. japonicum* y *R. etli*.

El operón de *B. japonicum* está compuesto por 3 genes que codifican para monooxigenasas P450 (*CYP112*, *CYP114* y *CYP117*), un gen homólogo a genes de ferredoxina (*Fd*), un gen de prenil transferasa (geranil geranil difosfato sintasa; *GGPS*), dos genes de diterpeno ciclasas (copalil difosfato sintasa y *ent*-kaureno sintasa; *CPS* y *KS*) y un gen homólogo a genes de deshidrogenasa alcohólica/reductasa de cadena corta (*SDR*) (Hershey y col., 2014). En *R. etli* el operón presenta el gen *GGPS* truncado y fusionados los genes *CYP114-Fd* lo que podría influir en la capacidad de este microorganismo para sintetizar GAs. El gen *GGPS2*; ubicado fuera del operón en *R. etli* podría reemplazar al gen truncado *GGPS* aunque esto no se ha demostrado. Tampoco se ha estudiado el efecto que los genes fusionados (*CYP114-Fd*) provocarían en la síntesis de GAs de este organismo.

En *B. japonicum* se encontró que los genes de la biosíntesis de GAs se expresan en condiciones simbióticas, dentro de los nódulos radiculares de las plantas de soya en período de floración y llenado de vainas, obteniéndose una alta actividad de oxidasas de GAs en los bacteroides (Méndez y col., 2014).

Para *R. etli* no se ha estudiado la expresión de genes ni la actividad de oxidasas de GAs, aunque se demostró que los genes *CPS* y *KS* son funcionales y participan en la síntesis de *ent*-kaureno mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli* de los genes *CPS* y *KS* de *R. etli* con el gen *GGPS* del sistema vegetal *Abies grandis* (abeto de Vancouver) (Hershey y col., 2014).

1.4 Cobre en suelo y su toxicidad en sistemas vegetales.

El cobre es un metal pesado, persistente y no degradable, es un micronutriente necesario para el desarrollo de las plantas. Participa en los procesos de fotosíntesis como constituyente de la plastocianina, enzima con propiedades REDOX encargada del transporte de electrones (Lightbody & Krogmann 1967). Además participa en la asimilación de NO_3^- por la planta, reacción catalizada por la enzima nitrato reductasa la cual posee un cofactor de molibdeno que es sintetizado en presencia de cobre (Pilon y col., 2006). Por último, este elemento es necesario en el proceso de respiración celular formando parte del centro REDOX del citocromo c oxidasa, última enzima de la cadena transportadora de electrones (Yruela, 2009).

Sin embargo, cuando se acumula en exceso (>20 mg/Kg masa seca de hojas) presenta efectos tóxicos en la planta como la generación de especies oxigenadas reactivas ($\cdot\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$), cambios en la forma y tamaño de cloroplastos, alteración de la fotosíntesis y cambios en la permeabilidad de la membrana. Estos cambios se reflejan en síntomas de clorosis, marchitamiento y disminución de parámetros de crecimiento como biomasa y longitud (Drazkiewicz y col., 2004; Sanchez-Pardo & Zornoza 2014).

Este elemento se encuentra asociado a sulfuros en minerales del suelo como la calcopirita (CuFeS_2) y su biodisponibilidad depende de condiciones edáficas como pH, estructura, contenido de materia orgánica y contenido y tipo de arcillas, las cuales determinan la capacidad de intercambio catiónico del suelo (CIC), es decir la capacidad de adsorber cationes en la superficie de la fracción coloidal del suelo, regulando su disponibilidad para los cultivos. El cobre se puede encontrar en varios estados de oxidación y especies químicas en la solución suelo como Cu^+ , Cu^{+2} , CuOH^+ y $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$ aunque en forma predominante se encuentra formando quelatos con la materia orgánica, asociado con ácidos húmicos (macromoléculas coloidales complejas, con un núcleo aromático unido en su periferia a grupos COOH , OH) y como cobre soluble en un rango de pH 5-6 (Kabata-Pendias, 2011).

Los aportes de cobre hacia el suelo se atribuyen a la meteorización del suelo de origen y a factores antrópicos como el uso de plaguicidas en base a CuSO_4 para combatir plagas (Mackie y col., 2012), herbicidas e insecticidas, actividad minera y

fundiciones de cobre y aportes urbanos asociados a la generación de residuos sólidos electrónicos (Kabata-Pendias, 2011).

La contaminación del suelo por cobre constituye un importante problema ambiental puesto que este metal ingresa a la cadena trófica incorporándose en los cultivos agrícolas, a los cuales se ve expuesta la población; ocasionando daños hepáticos y neurológicos (Uriu-Adams & Keen, 2005). Pese a la relevancia de la contaminación de terrenos de cultivo por metales, nuestro país no posee una legislación que regule las concentraciones máximas permitidas de estos elementos. Si bien, la concentración total del metal en el suelo no es un indicador de su biodisponibilidad, este parámetro se emplea como referencia en varios países. Por ejemplo, en la guía canadiense de calidad de suelo, se indica una concentración máxima permitida de cobre total en suelos agrícolas de 63 mg Kg^{-1} (CCME, 1999).

Chile posee una producción de 5,74 Mt /año de cobre (COCHILCO, 2014); lo cual lo convierte en el país con la mayor producción del mundo, debido a esto muchos terrenos de uso agrícola presentan altos niveles de cobre. La línea base de la concentración total de cobre en la cuenca del río Aconcagua es de $70\text{-}155 \text{ mg Kg}^{-1}$; estos elevados niveles se deben a procesos geológicos y al uso constante de fungicidas con contenido de cobre. Además, suelos agrícolas cercanos a complejos mineros, fundiciones y depósitos de desechos de estas industrias presentan niveles de $700\text{-}4000 \text{ mg Cu Kg}^{-1}$ en la cuenca del río Aconcagua (Aguilar y col., 2011) y hasta 5267 mg Kg^{-1} en la localidad de Puchuncaví (González y col., 2014) en la V región.

1.5 Atenuación del efecto tóxico del cobre sobre plantas y rizobios.

El cobre es un micronutriente que participa en el metabolismo de los rizobios. Si bien, los niveles requeridos de este metal varían según la especie de rizobacteria, se sabe que la presencia de Cu(II) en el suelo puede afectar la actividad enzimática de estos microorganismos. Por ejemplo, concentraciones de CuCl_2 $100 \mu\text{M}$ en cultivos líquidos anaeróbicos en medio YEMA en presencia de ácidos dicarboxílicos (Pagan, 1975) de *Bradyrhizobium* producen una disminución de la actividad de la nitrogenasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa. Sin embargo, en *Sinorhizobium meliloti* se potencia la actividad de estas enzimas para la misma concentración de

CuCl₂ (Arora y col., 2010). Esto sugiere la existencia de distintos niveles de tolerancia entre los rizobios.

Para *Mesorhizobium amorphae* se han identificado genes relacionados con la tolerancia a cobre, que codifican para proteínas dependientes de ATP y GTP, entre otros (Hao y col., 2015). El cobre en cantidades superiores a las requeridas es tóxico en el citoplasma; por esto, la bacteria posee mecanismos encargados de expulsarlo al espacio extracelular. En su estado de oxidación Cu(I) este metal presenta mayor toxicidad; debido a esto la bacteria oxida el Cu(I) a Cu(II) y lo expulsa mediante transporte activo.

En las plantas, el Cu(II) se incorpora a las células de las raíces mediante transporte activo y proteínas transportadoras. Una vez dentro de las células, metaloproteínas solubles receptoras de metales transportan los metales divalentes dentro de los tejidos (Yruela, 2009). La planta responde al exceso de este elemento produciendo antioxidantes que contrarresten el estrés oxidativo, acumulando el metal en las raíces evitando que dañe los tejidos superiores y formando quelatos con ácidos orgánicos (Drazkiewicz y col., 2004; Yruela, 2009).

1.6 Efecto de rizobacterias sobre el crecimiento de leguminosas cultivadas en suelos contaminados con cobre.

Estudios realizados con las leguminosas *Vigna radiata* (poroto chino) y *Vigna angularis* (poroto azuki) cultivadas en suelos con cenizas con alto contenido de Fe, Zn, Cu y Cd e inoculadas con sus respectivas rizobacterias simbiotes demuestran que estos microorganismos potencian la elongación de la planta hospedera, su biomasa y los niveles de clorofila, carotenoides y proteínas en las hojas (Chaudhary y col., 2011). Esto sugiere que podrían usarse rizobacterias para atenuar los efectos tóxicos de metales sobre plantas de leguminosas.

Para varias especies de leguminosas inoculadas con rizobios se han desarrollado estudios de toxicidad por Cu(II) (Fatnassi y col., 2015; Laguerre y col., 2006; Sanchez-Pardo & Zornoza 2014); encontrando que el Cu(II) provoca necrosis de hojas, clorosis, disminución de nódulos radiculares, alteraciones en la morfología de la raíz, disminución de la elongación de la parte aérea y raíces; así como

disminución en la biomasa, los cuales podrían disminuir en presencia de inóculo bacteriano.

Estudios realizados en plantas de *Vicia faba* (haba) demuestran que concentraciones de 1 y 2 mM de CuSO_4 en el medio de riego, disminuyen los parámetros de crecimiento de la planta, en contraste con plantas inoculadas con un conjunto de microorganismos del suelo dentro los que destaca *Rhizobium sp* y *Rhizobium leguminosarum*. Estas últimas presentaron un aumento del peso seco aéreo y la elongación de la raíz (Fatnassi y col., 2015). Además, se ha demostrado que la presencia de *Bradyrhizobium* como simbionte; potencia un aumento de crecimiento de la parte aérea en un 15% y 25% para plantas de *Lupinus albus* (altramuz blanco) y *Glycine max* (soya) respectivamente; para concentraciones de CuSO_4 48 μM en el medio de riego; y potencia un aumento de crecimiento de la raíz en un 12% y 37% respectivamente en comparación a plantas crecidas en presencia de KNO_3 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Sanchez-Pardo & Zornoza 2014). Considerando estos antecedentes resulta importante investigar el efecto que tienen las rizobacterias sobre la tolerancia al cobre de plantas de otras especies de leguminosas.

En este Seminario de Título se investigó el efecto biofertilizante de *R. etli* sobre plantas de poroto común (*Phaseolus vulgaris*), la leguminosa más cultivada en nuestro país, preferentemente en las regiones del Maule, Biobío y Araucanía (ODEPA, 2014-2015). Específicamente, se investigaron dos factores relacionados con el efecto beneficioso de esta rizobacteria sobre el crecimiento y desarrollo de la planta: la capacidad de biosintetizar fitohormonas diterpénicas (GAs) y su potencial efecto sobre la tolerancia al $\text{Cu}(\text{II})$.

1.7 Hipótesis

- En presencia de $\text{Cu}(\text{II})$, *R. etli* permite el crecimiento de *P. vulgaris* evitando el uso de fertilizantes nitrogenados.
- El efecto biofertilizante de *R. etli* incluye la capacidad de fijación de N_2 y la biosíntesis de GAs.

1.8 Objetivo General

Investigar el efecto biofertilizante de *R. etli* sobre cultivos de *P. vulgaris* con respecto al crecimiento vegetal, biosíntesis de fitohormonas y tolerancia de las plantas a Cu(II).

1.9 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la rizobacteria y del NH_4NO_3 sobre el crecimiento de plantas de *P. vulgaris*.
2. Investigar midiendo la actividad de oxidasas de GAs, la capacidad de sintetizar estas fitohormonas en bacteroides de *R. etli*.
3. Determinar el efecto de Cu(II) sobre el crecimiento de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. etli* o en presencia de NH_4NO_3 .
4. Determinar el efecto de Cu(II) sobre el crecimiento de *R. etli* en cultivos líquidos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo de plantas de *Phaseolus vulgaris* (poroto común).

Las semillas de *P. vulgaris* fueron esterilizadas con etanol al 95%, NaClO comercial al 25% y lavadas con agua estéril (agua destilada, esterilizada en autoclave con vapor de agua por 15 minutos a 1 atm y 121 °C). Las semillas se hicieron germinar en placas de agar al 1% a 28°C por 4 días. Se sembraron 3 semillas por cada maceta de tipo jarras de Leonard (Vincent, 1970). Este sistema de cultivo cuenta con dos compartimientos, el compartimiento inferior contiene 500 mL de solución nutritiva la cual asciende por capilaridad a través de una gasa al compartimiento superior el cual contiene vermiculita como soporte inerte; en este último compartimiento las semillas germinadas fueron sembradas. Sobre cada una de las semillas se agregó 2 mL de cultivo líquido en medio YEM de *R. etli* en fase de crecimiento exponencial ($A_{600nm}:1,5$).

Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo con una humedad relativa del 68%, radiación fotosintética activa de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con ciclos de 24 h de luz los primeros dos días, 16 h luz-8 h oscuridad por dos semanas y 12 h luz-12 hrs oscuridad por el tiempo restante en un rango de temperatura de 24/28 °C. Las plantas fueron regadas 1-3 veces por semana, manteniendo el sistema hidropónico con 500 mL de una solución de riego que no contiene compuestos nitrogenados; compuesta por: K_2HPO_4 0,174 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2465 g/L; KCl 0,0745 g/L; $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g/L, citrato de Fe(III) 0,018 g/L y oligoelementos ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,11 mg/L, H_3BO_3 0,715 mg/L, $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1,015 mg/L, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,15 μM y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,005 mg/L) (Vincent, 1970).

Los nódulos se cosecharon desde las raíces de las plantas a distintos tiempos (8, 11, 14, 21, 25, 28, 35, 42, 49 y 56 dpi) y se almacenaron a -20° C para su posterior análisis. En los ensayos con plantas sin inóculo bacteriano se añadió al medio de riego NH_4NO_3 6 mM. (Sánchez y col., 2004).

Finalmente, para determinar la tolerancia a Cu(II) de la planta, en presencia de *R. etli* o NH_4NO_3 , se emplearon concentraciones de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ en el medio de

riego de 100, 300 y 1000 μM . Estas plantas fueron cosechadas a los 25 días después de plantar.

2.2 Cultivos bacterianos.

Se utilizó la cepa *R. etli* 1026 proporcionada por la Dra. Cecilia Baginsky, proveniente de la colección de la Universidad Politécnica de Madrid. Se realizó un cultivo líquido (metódica de crecimiento de microorganismos en medios líquidos nutritivos) del rizobio en medio YEM (medio nutritivo que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de rizobacterias), que contiene levadura (0,4 g/L), manitol (10 g/L), NaCl (0,1 g/L), K_2HPO_4 (0,5 g/L) y $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L). Este cultivo se mantuvo con agitación a 150 rpm a 28°C en un agitador orbital (Thermoscientific modelo MaxQ 4450) y se utilizó para inocular semillas de *P. vulgaris* en germinación y obtener nódulos radiculares con bacteroides de la cepa respectiva.

Para la realización de curvas de crecimiento, se midió la absorbancia del cultivo en medio YEM a 600 nm en un espectrofotómetro (JENWAY modelo 6320D). Las curvas de crecimiento se realizaron en presencia de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0, 10, 50 y 100 μM . La absorbancia se midió a distintos tiempos entre 0 y 240 h. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

2.3 Obtención de bacteroides de *R. etli*.

0,22 g de nódulos se maceraron en un mortero con una solución de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0, ascorbato de sodio 200 mM y polivinilpolipirrolidona (1g/g de nódulos). El homogenizado se filtró por 3 capas de gasa y se centrifugó a temperatura ambiente a 155 xg durante 10 minutos (Centrifuga Hettich modelo Rotofix 32) para eliminar restos vegetales. El sobrenadante se centrifugó a 8981xg por 10 minutos a 4°C (Centrifuga Hettich modelo Univeral 320R) para sedimentar los bacteroides, quedando en el sobrenadante los componentes provenientes del citosol de las células vegetales. El pellet de bacteroides se lavó con 20 mL de una solución buffer compuesta por TES 50 mM pH 7,5; MgCl_2 2,5 mM y K_2HPO_4 1 mM (la calidad y procedencia de los reactivos se muestra en la Tabla 12, ver Anexo), finalmente el pellet de bacteroides se resuspendió en 2 mL del mismo buffer para los ensayos de metabolización de precursores de GAs.

2.4 Sustratos marcados con ^{14}C .

Los sustratos ácido *ent*- $^{14}\text{C}_1$ -kaurenoico (^{14}C -KA) y $^{14}\text{C}_1$ -GA₁₂ marcados en C17, fueron sintetizados por el Dr. L. Mander en la Universidad Nacional de Australia, Camberra.

2.5 Metabolización de precursores de GAs.

Se utilizó una suspensión de bacteroides preparada a partir de 0,22 g de nódulos. Se agregaron precursores marcados con ^{14}C en forma de soluciones metanólicas y se incubó la suspensión de bacteroides por 2 días a 28°C con agitación orbital a 150 rpm. Para los ensayos se utilizaron 20000-50000 decaimientos por minuto (dpm) de los precursores ^{14}C -KA y ^{14}C -GA₁₂.

2.6 Extracción y purificación de productos.

La suspensión de bacteroides incubada por dos días fue centrifugada a 12800 xg durante 15 minutos (Centrifuga Eppendorf modelo 5410) para separar el pellet de bacteroides del sobrenadante, el cual contiene las ^{14}C -GAs. El sobrenadante fue acidificado a pH 3,0 con HCl 6 M para protonar los grupos carboxilato de las GAs y permitir su extracción desde la fase acuosa a una fase orgánica de acetato de etilo (3 extracciones con 5 mL de acetato de etilo cada una).

El solvente de las fases orgánicas combinadas de cada extracción con acetato de etilo se eliminó en un rotaevaporador (Buchi modelo R110) y el residuo se disolvió en metanol al 20% en H₂O pH 3.0 para purificar la muestra mediante cromatografía en fase sólida en columnas C₁₈ (Sep-Pack, Waters). Los eluidos metanólicos de las columnas C₁₈ (volumen: 2 mL) se concentraron bajo N₂ y se analizaron por HPLC. En todas las etapas se cuantificó la radiactividad mediante centelleo líquido.

2.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El eluido de Sep-Pack, C₁₈ se inyectó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC Shimadzu SPD 20A equipado con una columna C₁₈ de fase inversa de 5µm; 250x4 mm. Para la separación de los distintos productos se utilizó un gradiente lineal de MeOH de 60 a 100% en H₂O pH=3,0 durante 30 minutos seguida por 6 min de flujo isocrático de MeOH. Se utilizó un flujo de 1 mL/min y se

colectaron alícuotas de 1 mL de cada fracción para cuantificar su radiactividad. Esta técnica cromatográfica se empleó para separar e identificar los productos de las oxidasas de GAs por comparación de los tiempos de retención con los respectivos estándares de GAs marcados con ^{14}C por medio de la cuantificación de la radiactividad de cada fracción mediante centelleo líquido.

2.8 Cuantificación de radiactividad por centelleo líquido.

Se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Perkin Elmer Tri-carb 2810 TR) utilizando una solución de centelleo que contiene 0,125 g de 1,4-bis[2-(feniloxazolil)]-benceno (POPOP), 4 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 500 mL de detergente (Arcopal) en 1L de tolueno. La eficiencia de conteo para ^{14}C fue de 93%. Se realizó calibración del equipo con estándar de ^{14}C en tolueno de 123600 cpm. Rango de conteo lineal: 200-150000 cpm. Conteo basal: 40 ± 10 cpm.

2.9 Mediciones de parámetros de crecimiento vegetal.

Se midió la longitud de parte aérea de las plantas de *P. vulgaris*, así como la masa húmeda y masa seca de la parte aérea (tallo más hojas) y de las raíces. Para obtener la masa seca; las muestras se calentaron a 70 °C por 3 días hasta masa constante, dejándolas enfriar en un desecador antes de registrar su masa. Se contabilizó el número, aspecto y masa de los nódulos radiculares en las distintas etapas del crecimiento de la planta. Los parámetros de crecimiento fueron expresados como porcentaje en comparación con el tratamiento control correspondiente. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar de un mínimo de 3 plantas y un máximo de 6 plantas.

III. RESULTADOS

3.1 Parámetros de crecimiento de plantas de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. etli*.

Se inocularon semillas germinadas de *P. vulgaris* con un cultivo líquido de *R. etli* 1026 y las plantas inoculadas se crecieron en condiciones controladas (ver sección de materiales y métodos).

Luego de los 24 días post inoculación (dpi) se obtuvo crecimiento vegetativo, iniciándose la formación de botones florales a los 25 dpi. En la semana 4 (28 dpi) las plantas estaban en plena floración, comenzando la formación de vainas en la quinta semana. En la semana 6, las plantas presentaron vainas llenas y en la semana 7 las hojas comenzaron a marchitarse (Figura 4).



Figura 4 Plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*. A: Desarrollo vegetativo (21 dpi). B: prefloración (25 dpi). C: floración (28 dpi). D: formación de vainas (35 dpi). E: Vainas llenas (42 dpi).

Semanalmente se cosecharon plantas y se aislaron los nódulos radiculares. Adicionalmente, se registraron los parámetros de crecimiento de las plantas (masa húmeda, longitud parte aérea y masa seca) (Tabla 1) así como los parámetros de nodulación (Tabla 2). A los 8 dpi se observó la presencia de nódulos radiculares, ubicados en la base de la raíz principal, evidenciando la infección que inicia la simbiosis. Los nódulos simbióticos, de coloración interna rojiza debido a la leghemoglobina, se obtuvieron a partir de los 11 dpi.

Tabla 1 Parámetros de crecimiento en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*.

Tiempo (dpi)	Masa húmeda Parte aérea/planta (g)	Masa húmeda ¹ Raíz/planta (g)	Longitud Parte aérea (cm)	Masa seca Parte aérea/planta (g)	Masa seca Raíz/planta (g)
8	2,15±0,49	1,85	11,3±2,4	0,19±0,06	0,10
11	2,95±0,64	2,05	15,5±7,1	0,34±0,17	0,14
14	3,07±0,91	2,93	19,4±4,2	0,34±0,16	0,27
21	4,90±2,95	4,90	26,6±9,7	0,65±0,37	0,32
25	8,57±1,47	4,99	50,2±3,1	1,06±0,18	0,32
28	9,23±3,33	6,23	38,9±3,7	1,23±0,39	0,55
35	14,1±6,20	10,6	40,8±3,3	2,24±0,93	0,83
42	25,2±10,1	6,90	45,2±5,9	3,37±1,38	0,78
49	44,3±2,20	6,60	37,9±5,1	4,99±1,94	0,84
56	35,8±3,10	10,9	37,3±4,5	5,82±1,45	1,41

Tabla 2 Parámetros de nodulación a lo largo del desarrollo de la planta.

Tiempo (dpi)	Nº nódulos simbióticos/planta	Masa nódulos simbióticos/planta (g)	Masa promedio/ Nódulo (mg)
8	40	0,02	0,50
11	175	0,25	1,43
14	200	0,22	1,10
21	200	0,61	3,05
25	404	1,31	3,24
28	425	1,48	3,48
35	700	2,45	3,50
42	940	3,31	3,52
49	933	3,30	3,54
56	416	1,47	3,53

¹ El grado de humedad en la raíz es afectado en mayor medida que la parte aérea por variables propias del cultivo como contacto con la solución de riego.

Los nódulos radiculares obtenidos presentaron un aumento progresivo de tamaño hasta alcanzar un máximo de 4 mm a partir de la semana 4. Los primeros nódulos se encontraron en la base de la raíz principal y posteriormente se generaron nódulos en secciones inferiores de la raíz principal y raíces laterales pero en menor proporción. Debido a esto las raíces presentaron nódulos en distinto estado de maduración.

Se encontró un aumento sostenido de la masa y número de nódulos radiculares por planta hasta alcanzar un máximo en la sexta semana de crecimiento de las plantas (Figura 5), sin embargo el promedio de masa por nódulo permaneció constante a partir de la floración (Figura 5).

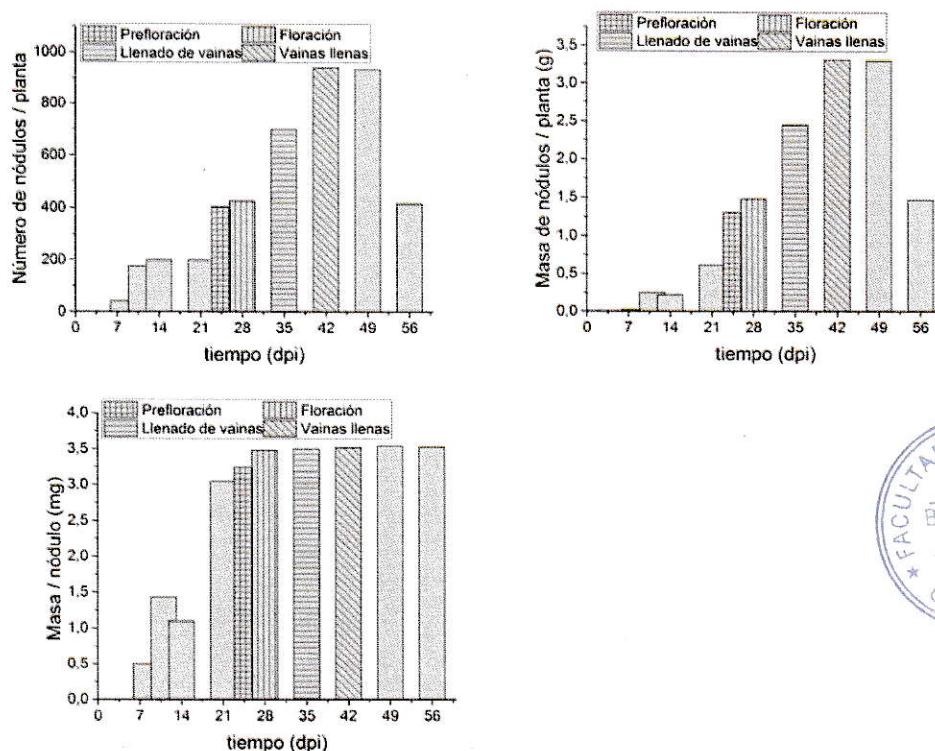


Figura 5 Variación de los parámetros de nodulación en distintos períodos del crecimiento vegetal.

Los nódulos encontrados hasta los 28 dpi presentaron una coloración parda-atigrada (Figura 6A). Posteriormente, desde los 42 dpi algunos de los nódulos se volvieron oscuros y luego alcanzaron un estado de senescencia adquiriendo una textura blanda (Figura 6). Sin embargo, estas plantas también presentaron nódulos



firmes y de coloración parda, que junto a los oscuros y firmes se cosecharon para cuantificar la biosíntesis de GAs.

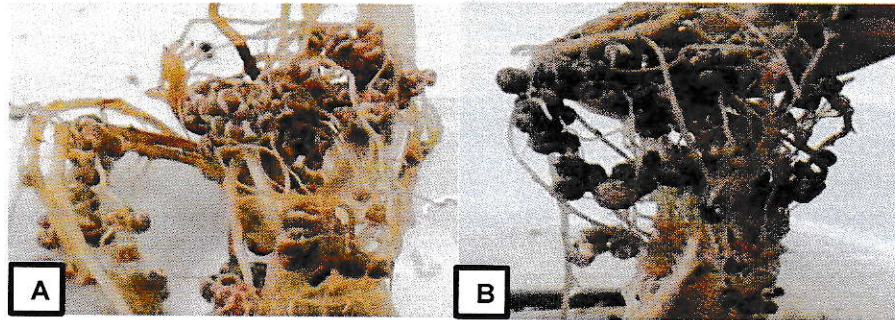


Figura 6 Nódulos extraídos en plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*. A: nódulos de 25 dpi. B: nódulos de 42 dpi.

En relación a los parámetros de crecimiento se observó un aumento progresivo de la biomasa y del crecimiento en longitud de la parte aérea de la planta (Figura 7). El aumento en la biomasa de la parte aérea fue de mayor magnitud que el encontrado en la raíz debido al desarrollo de las vainas.

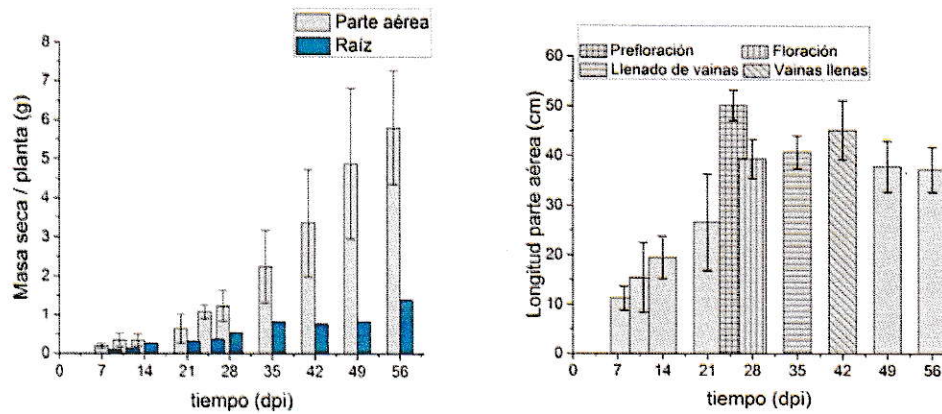


Figura 7 Variación de parámetros de crecimiento de *P. Vulgaris* en distintos tiempos. Izquierda: variación de masa seca. Derecha: variación en la longitud de la sección aérea.

La raíz en cambio, presentó un aumento moderado en biomasa manteniéndose la masa seca aproximadamente constante a partir de los 35 dpi. No fue posible medir la longitud de la raíz debido a la dificultad de separar las raíces de cada planta en una maceta.

3.2 Parámetros de crecimiento de plantas de *P. vulgaris* en presencia de NH_4NO_3

Con la finalidad de comparar el nivel de crecimiento de la planta en presencia de un fertilizante comercial (NH_4NO_3) y en presencia de *R. etli*; se cultivaron plantas de *P. vulgaris* empleando una solución de riego que contiene NH_4NO_3 6 mM. Las plantas se cosecharon a los 25 días de tratamiento y se registró sus parámetros de crecimiento (masa húmeda, longitud parte aérea y masa seca). En la Tabla 3 se comparan estos parámetros con los de plantas cultivadas en simbiosis con *R. etli*.

Tabla 3 Parámetros de crecimiento de plantas de *P. vulgaris* en presencia de NH_4NO_3 o *R. etli*. Plantas de 25 días.

Tratamiento	Masa húmeda Parte aérea/planta (g)	Masa húmeda Raíz/planta (g)	Longitud Parte aérea (cm)	Masa seca Parte aérea/planta (g)	Masa seca Raíz/planta (g)
NH_4NO_3	23,6±4,40	8,48±2,43	39,1±2,8	2,72±0,31	0,68±0,01
<i>R. etli</i>	8,57±1,47	4,99±0,97	50,2±3,1	1,06±0,18	0,32±0,12

La biomasa (aérea y de la raíz) fue mayor en las plantas crecidas con NH_4NO_3 . Sin embargo, las plantas inoculadas con *R. etli* presentaron una mayor longitud (Figura 8).

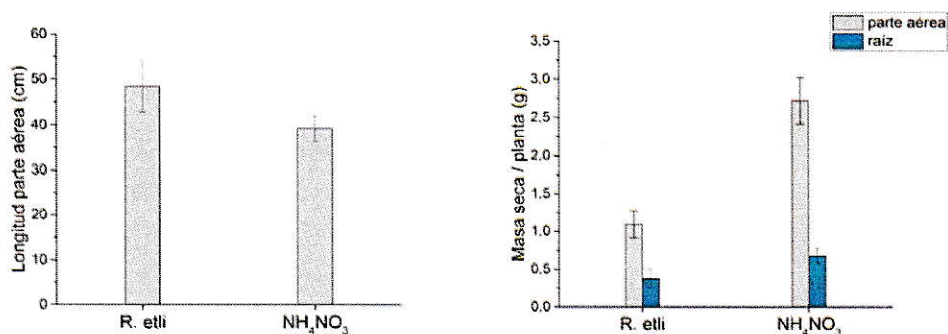


Figura 8 Variación de parámetros de crecimiento de *P. vulgaris* en presencia de NH_4NO_3 o *R. etli*. Plantas de 25 días.

Estos resultados sugieren que la simbiosis con esta cepa de *R. etli* proporciona menos nitrógeno en forma de NH_4^+ a la planta que el tratamiento con NH_4NO_3 6 mM. El NH_4^+ entregado a la planta por la bacteria se incorpora a aminoácidos y proteínas siendo esencial para aumentar la biomasa. Por otra parte, la mayor longitud del tallo observada en las plantas inoculadas con *R. etli* sugiere que se debería a la biosíntesis de GAs por la bacteria puesto que, uno de los efectos más característicos de estas fitohormonas sobre el crecimiento vegetal es la elongación del tallo.

3.3 Biosíntesis de GAs en bacteroides de *R. etli*

Con la finalidad de determinar si los bacteroides de *R. etli* aislados de nódulos radiculares de *P. vulgaris* presentan la capacidad de sintetizar GAs, se ensayó la actividad de dos enzimas de esta vía metabólica: *ent*-kaurenoico oxidasa y C20 oxidasa, utilizando los sustratos ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico (^{14}C -KA) y ^{14}C -GA₁₂ (C20 metilo).

Los sustratos se incubaron con una suspensión de bacteroides y los productos de metabolización se aislaron mediante partición líquido-líquido, cromatografía en fase sólida y HPLC (Ver sección Materiales y métodos), obteniéndose los perfiles de HPLC que se muestran en las Figuras 9 y 10. Adicionalmente, los cromatogramas respectivos se muestran en las Tablas 9, 10 y 11 (Ver Anexos). Los productos se identificaron comparando sus tiempos de retención (t_R) con los de GAs patrón que son intermediarios o productos finales de la ruta biosintética descrita en *B. japonicum* (Figura 11).

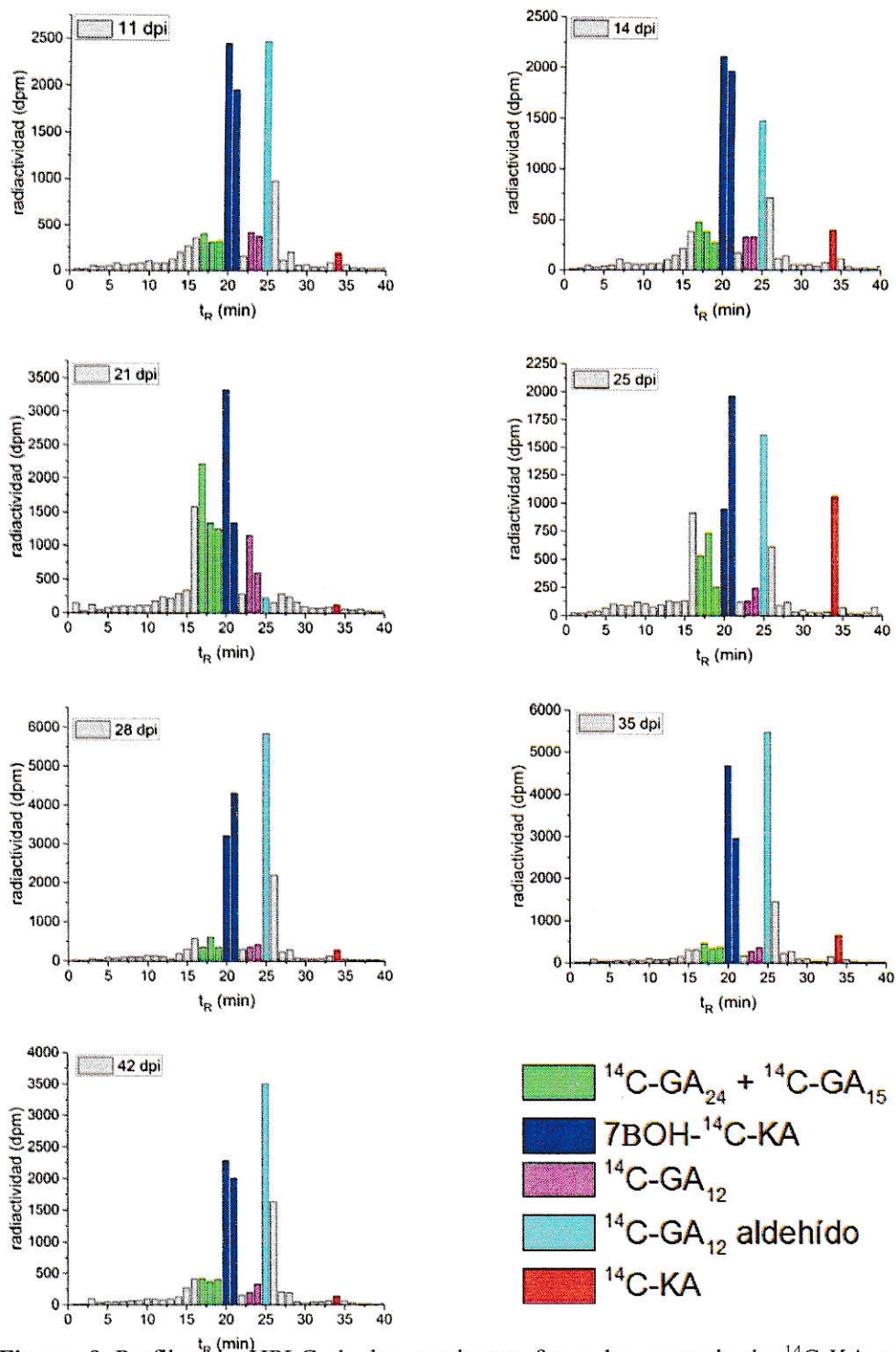


Figura 9 Perfiles de HPLC de los productos formados a partir de ^{14}C -KA por bacteroides de *R. elli* obtenidos a diferentes tiempos de crecimiento de las plantas.

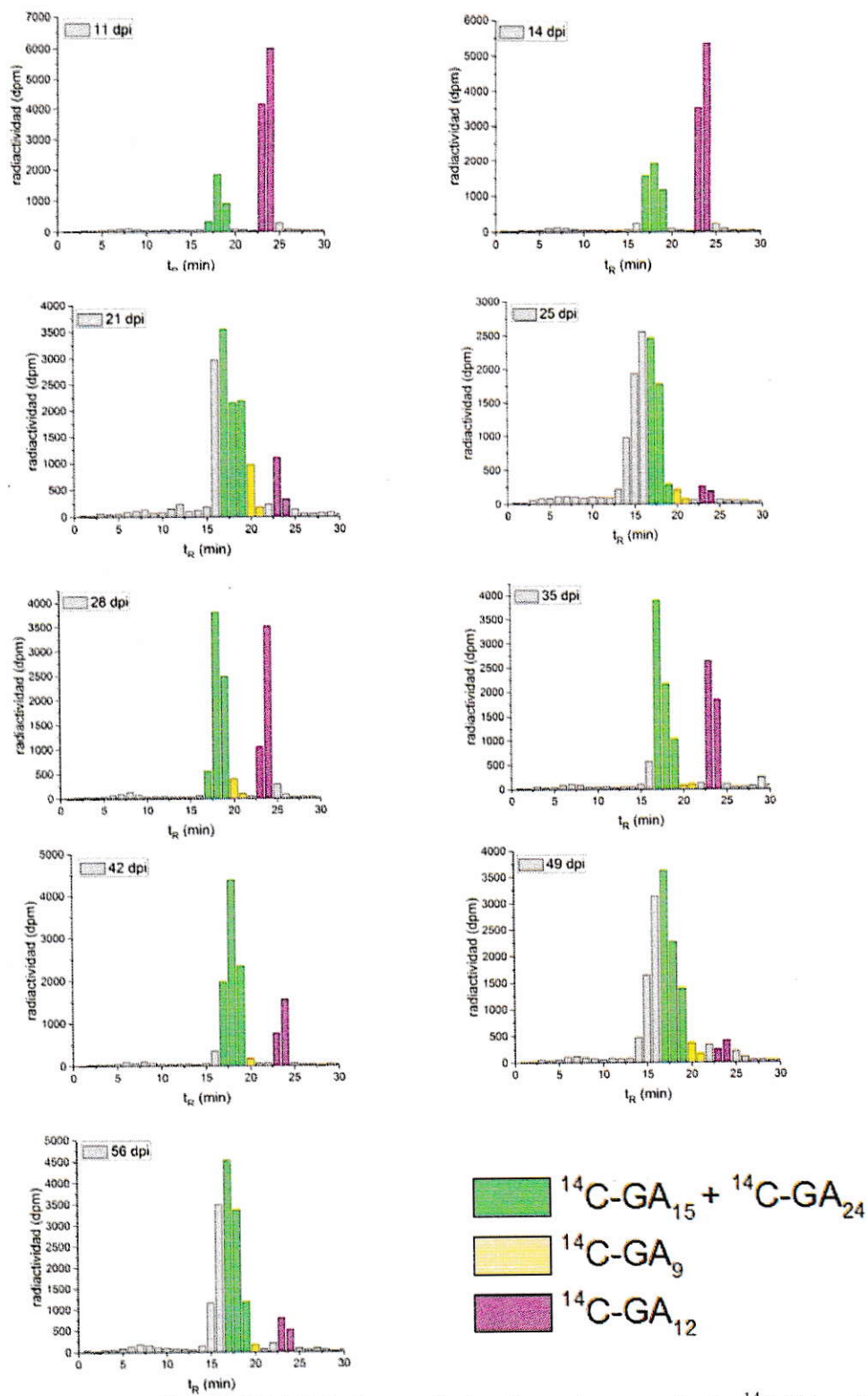


Figura 10 Perfiles de HPLC de los productos formados a partir de $^{14}\text{C-GA}_{12}$ por bacteroides de *R. etli* obtenidos a diferentes tiempos de crecimiento de las plantas.

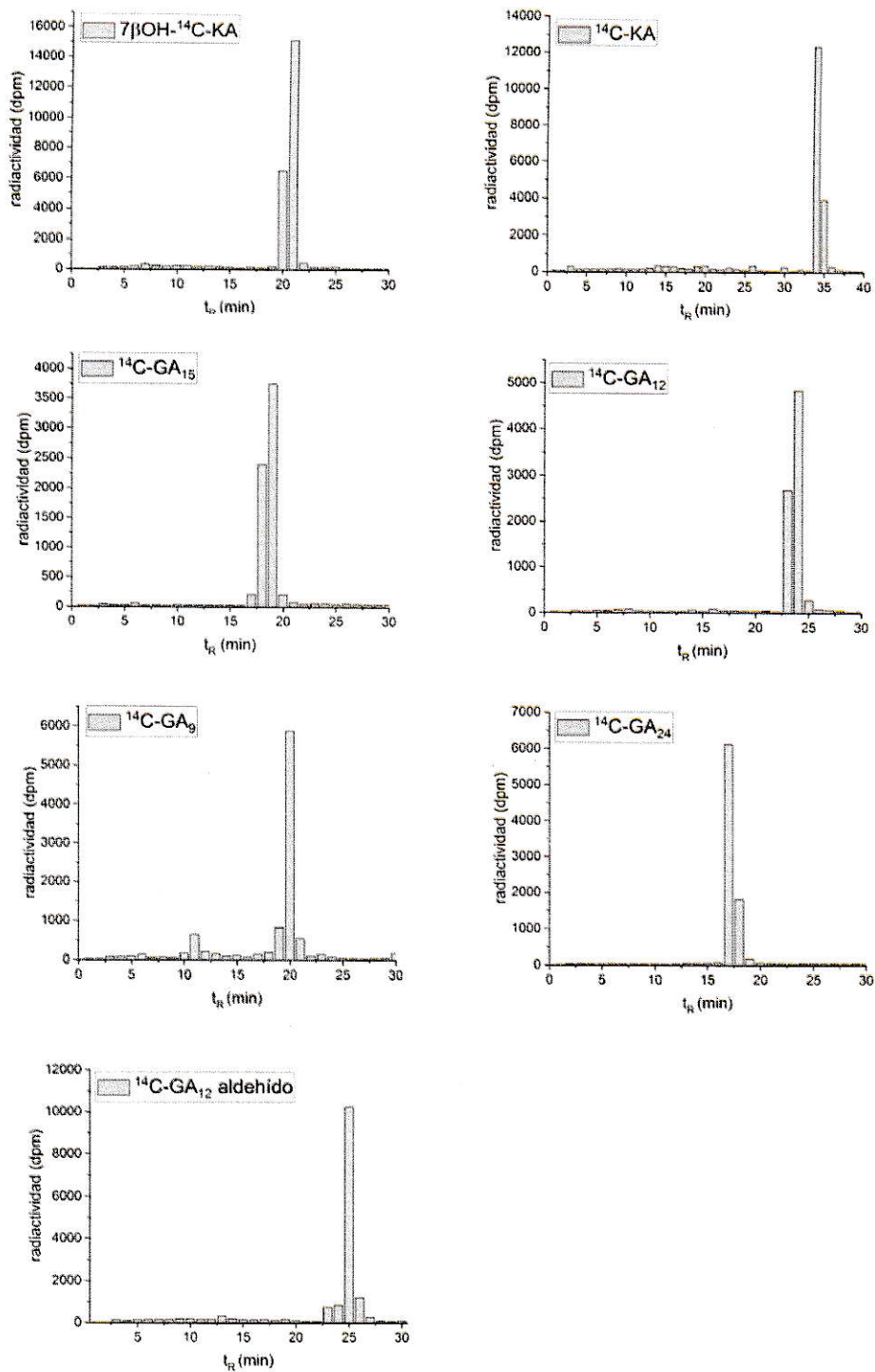


Figura 11 Perfiles de HPLC de estándares de GAs en las mismas condiciones de las Figuras 9 y 10.

En todos los casos se obtuvo conversión de los sustratos en productos más polares cuyos tiempos de retención corresponden a los de algunos intermediarios o productos finales de biosíntesis de GAs, lo que indica que los bacteroides de *R. etli* contienen oxidasas de GAs activas a partir de 11 dpi.

El sustrato ingresa a los bacteroides donde es metabolizado a compuestos más polares que son excretados hacia el medio de incubación. Al término del tiempo de incubación (2 días) se observó una distribución de los productos y/o del sustrato residual entre el medio extracelular (sobrenadante) y las células; representado por la radiactividad encontrada en ambas fracciones (Tablas 4 y 5).

Tabla 4 Actividad de la *ent*-kaurenoico oxidasa en bacteroides de *R. etli* aislados en distintas etapas de desarrollo de *P. vulgaris*.

Tiempo (dpi)	Radiactividad sobrenadante (%) ²	radiactividad en las células (%) (¹⁴ C-KA) ³	¹⁴ C-KA en sobrenadante (%) ⁴
11	92	8	2
14	90	10	4
21	86	14	1
25	73	27	12
28	90	10	1
35	83	17	3
42	85	15	1

Tabla 5 Actividad de la C20 oxidasa de GAs en bacteroides de *R. etli* aislados en distintas etapas de desarrollo de *P. vulgaris*.

Tiempo (dpi)	Radiactividad sobrenadante (%)	radiactividad en las células (%) (¹⁴ C-GA ₁₂)	¹⁴ C-GA ₁₂ en sobrenadante (%)
11	99	1	77
14	99	1	65
21	92	8	10
25	97	3	4
28	98	2	39
35	98	2	37
42	100	0	20
49	100	0	5
56	99	1	8

² Corresponde principalmente a productos de metabolización.

³ Corresponde a ¹⁴C-KA residual.

⁴ Obtenido de perfil de HPLC.

La distribución de los sustratos se relaciona con su polaridad. El ácido *ent*-kaurenoico posee una baja polaridad por lo cual principalmente se encuentra en el interior de la célula, a diferencia de sus productos de metabolización y del sustrato $^{14}\text{C-GA}_{12}$, los que se encuentran básicamente en el sobrenadante.

El ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico originó por lo menos 3 productos. Los productos mayoritarios presentaron un t_R de 20 y 25 minutos respectivamente y podrían corresponder al ácido 7β hidroxí- ^{14}C -kaurenoico ($7\beta\text{OH-}^{14}\text{C-KA}$) y al intermediario $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído que se forma por la oxidación sucesiva del C7 y contracción del anillo B. Aunque el producto 19,10- γ lactona ($^{14}\text{C-GA}_9$) presenta un t_R similar al de $7\beta\text{OH-}^{14}\text{C-KA}$ probablemente no se forma en este experimento desde este precursor temprano ya que este producto se formó con un alto rendimiento como se espera para un intermediario cercano en la secuencia biosintética. Además de los productos anteriores, se encontró el intermediario C20 aldehído ($^{14}\text{C-GA}_{24}$, t_R : 17') en todas las incubaciones. Este producto es un precursor del producto final lactónico GA_9 . No se detectaron GAs hidroxiladas en C3 o C13 (biológicamente activas) que presentarían t_R menores a 15 minutos, sugiriendo que *R. etli* presenta sólo la vía no hidroxilada de biosíntesis de GAs.

En las incubaciones con $^{14}\text{C-GA}_{12}$ se formaron varios productos con t_R 17-19 minutos que corresponderían a los intermediarios $^{14}\text{C-GA}_{24}$ (C20 aldehído) y/o $^{14}\text{C-GA}_{15}$ (C20 alcohol). En varias incubaciones se detectó un porcentaje importante de sustrato residual, lo que junto con la reducida cantidad de producto final $^{14}\text{C-GA}_9$ (t_R : 20'), indica que la C20 oxidasa de *R. etli* presenta una actividad moderada, menor a la descrita para bacteroides de *B. japonicum* (Mendez y col., 2014).

El producto final de la ruta biosintética de GAs en *R. etli* es la GA no hidroxilada GA_9 que carece de actividad biológica. Aunque este producto no se detectó en un porcentaje significativo en los experimentos con bacteroides aislados de *R. etli*, el GA_9 podría ser transportado desde el bacteroide hacia la planta para su posterior transformación a GAs bioactivas. Ya sea en el nódulo o en otros tejidos como tallos y brotes. Las GAs GA_4 y GA_1 (hidroxiladas en C3 y/o C13) promueven la elongación de los tallos y la floración por lo que generarían un efecto

biofertilizante de *R. etli* sobre las plantas de *P. vulgaris*, lo cual se observó en las condiciones experimentales descritas en este trabajo (Tabla 3).

3.4 Efecto del Cu(II) sobre plantas de *P. vulgaris* cultivadas en presencia de *R. etli*.

Se estudió el efecto de la presencia de Cu(II) en el crecimiento de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* y cómo este metal afecta el proceso de nodulación. Para esto se inocularon semillas germinadas de *P. vulgaris* con un cultivo líquido de *R. etli* y las plantas se crecieron en condiciones controladas con concentraciones variables de CuSO₄ en la solución de riego. Las plantas se cosecharon a los 25 dpi y se midieron sus parámetros de crecimiento y nodulación (Tabla 6).

Las plantas tratadas con CuSO₄ presentaron un aspecto saludable (Figura 12A) y leves síntomas de toxicidad en la parte aérea como necrosis en el borde externo de las hojas más antiguas (este síntoma no fue representativo; encontrándose sólo en pocas plantas de manera aleatoria (Figura 12B)). La raíz no presentó síntomas de necrosis; sin embargo se observó un aumento de su grosor en comparación con las plantas cultivadas con concentraciones de Cu(II) como micronutriente en la solución de riego (Figura 12C).

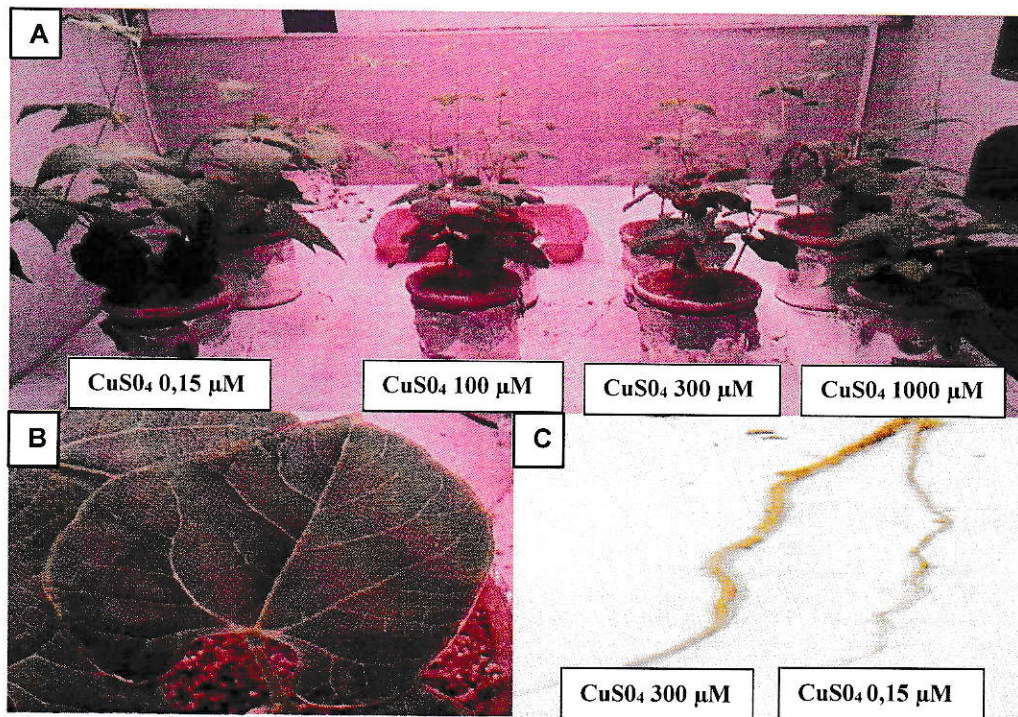


Figura 12 Plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* en presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 . A: Plantas de 25 dpi. B: Síntomas de toxicidad en hojas. C: raíces de 25 dpi.

Tabla 6 Parámetros de crecimiento en plantas de *P. vulgaris* tratadas con *R. etli* y CuSO_4 .

[CuSO_4] (μM)	Masa húmeda Parte aérea/planta (g)	Masa húmeda Raíz/planta (g)	Longitud Parte aérea (cm)	Masa seca Parte aérea/planta (g)	Masa seca Raíz/planta (g)
0,15 ⁵	8,57±1,47	4,99±0,97	50,2±3,1	1,06±0,18	0,32±0,12
100	4,25±0,41	5,82±0,02	35,8±3,8	0,71±0,05	0,42±0,03
300	3,80±0,04	5,85±0,07	27,6±7,6	0,59±0,03	0,41±0,05
1000	4,22±0,59	3,98±1,29	36,0±5,7	0,65±0,15	0,32±0,12

En los tratamientos con CuSO_4 se observó una disminución de la longitud de la sección aérea de la planta en un 30% para el tratamiento con CuSO_4 1000 μM (Figura 13). Además, se observó una disminución del 38% en la biomasa de la sección aérea para las plantas crecidas bajo la misma concentración de CuSO_4 . La raíz en cambio, aumentó su biomasa en presencia de Cu(II) hasta en un 28% (Figura 13).

⁵ CuSO_4 como micronutriente en la solución de riego.

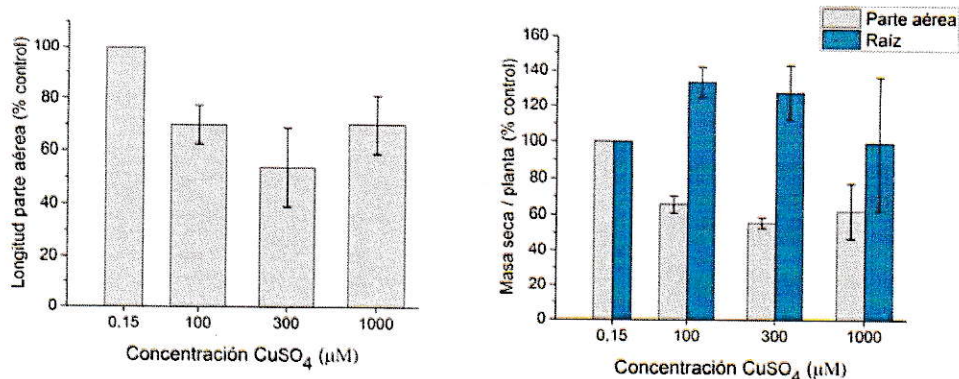


Figura 13 Variación de parámetros de crecimiento de *P. vulgaris* inoculada con *R. etli* en presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 .

Con la finalidad de determinar el efecto del Cu(II) en la nodulación se aislaron y cuantificaron los nódulos radiculares (Tabla 7). Estos presentaron una coloración más oscura que los nódulos de plantas cultivadas sin CuSO_4 adicional y se encontraron en las mismas secciones de la raíz (Figura 14).

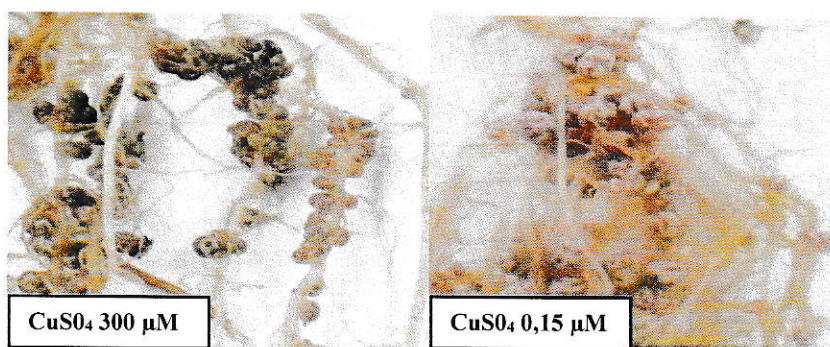


Figura 14 Nódulos extraídos en plantas de *P. vulgaris* de 25 dpi inoculadas con *R. etli* en presencia de CuSO_4 .

El Cu(II) afectó el número y masa de los nódulos; específicamente se obtuvo una disminución del 45% en el número de nódulos formados con CuSO_4 1000 μM y una disminución del 69% en la masa (Figura 15). Además el Cu(II) disminuyó en un 43% el peso promedio de cada nódulo (Figura 15), en comparación con los de plantas no tratadas con concentraciones adicionales de CuSO_4 .

Tabla 7 Parámetros de nodulación de *P. vulgaris* inoculado con *R. etli*. Efecto del CuSO_4 .

$[\text{CuSO}_4]$ (μM)	N° nódulos/ planta	Masa nódulos/ planta (g)	Masa promedio/ Nódulo (mg)
0,15 ⁶	347±46	1,71±0,32	4,90±0,26
100	263±33	0,68±0,15	2,55±0,25
300	213±28	0,56±0,05	2,65±0,11
1000	190±14	0,53±0,13	2,76±0,47

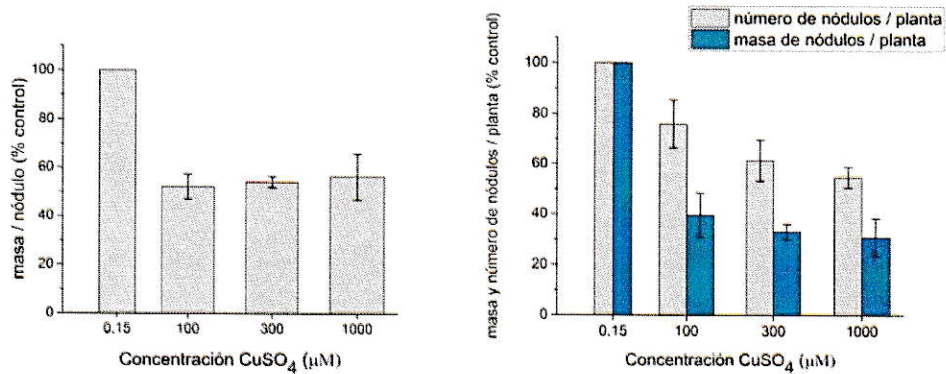


Figura 15 Variación de los parámetros de nodulación en presencia de CuSO_4 .

Además de utilizar los parámetros de nodulación para determinar la eficiencia de la simbiosis; se comparó de manera cualitativa la expresión de la leghemoglobina como indicador de la actividad nitrogenasa de los bacteroides. La coloración interna rojiza de los nódulos indica la presencia de leghemoglobina, una proteína hemínica que mantiene una baja concentración de O_2 en el nódulo. Los nódulos de plantas cultivadas sin CuSO_4 mostraron esta coloración; a diferencia de los tratados con concentraciones de CuSO_4 adicional cuya coloración fue más oscura (Figura 16). Estos resultados sugieren un metabolismo alterado con respecto a la fijación de N_2 en los bacteroides expuestos a Cu(II) , lo que es consistente con la menor biomasa aérea de las plantas tratadas.

⁶ CuSO_4 como micronutriente en la solución de riego.

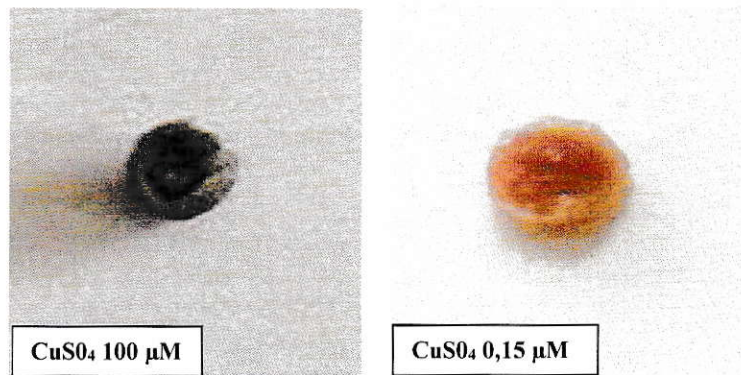


Figura 16 Corte transversal de un nódulo radicular aislado de *P. vulgaris* de 25 dpi crecida en ausencia y presencia de CuSO_4 .

En conjunto, los resultados indican que aunque el Cu(II) afectó el crecimiento de las plantas inoculadas con *R. etli*, estas desarrollaron un crecimiento vegetativo sin síntomas significativos de toxicidad; lo que sugiere un efecto protector por la bacteria. El menor crecimiento se debería más bien a un menor aporte de nitrógeno (menor fijación de N_2) por la bacteria y no a un efecto directo del Cu(II) sobre el desarrollo del tejido aéreo de la planta.

Por otra parte, el aumento en masa y grosor de las raíces sugiere que el Cu(II) se acumularía en este tejido, al igual que en otras leguminosas como la soya (Sanchez-Pardo & Zornoza 2014), como un mecanismo de protección del tejido aéreo. La nodulación se vio disminuida de forma considerable, posiblemente por la acumulación de Cu(II) en las raíces, afectando la tasa de fijación de nitrógeno por los rizobios. El efecto sobre la nodulación podría evitarse utilizando una cepa de *R. etli* tolerante al Cu(II) (por ejemplo, aislada de suelos contaminados con Cu(II)) para inocular las plantas. El efecto del Cu(II) sobre el crecimiento del rizobio se analizará más adelante (ver sección 3.6).

3.5 Efecto del Cu(II) sobre plantas de *P. vulgaris* cultivadas en presencia de NH_4NO_3 .

Con el objeto de investigar el efecto del Cu(II), se cultivaron plantas de *P. vulgaris* en presencia de NH_4NO_3 6 mM y concentraciones variables de CuSO_4 en la solución de riego. Esto sirvió como comparación frente a las plantas cultivadas en presencia de *R. etli* para determinar la tolerancia intrínseca de *P. vulgaris* al Cu(II) y para estimar la capacidad de fijación de N_2 por *R. etli* en presencia de Cu(II) (Figura 17). Las plantas se cosecharon a los 25 días y se registraron sus parámetros de crecimiento (masa húmeda, longitud parte aérea y masa seca) (Tabla 8).

Tabla 8 Parámetros de crecimiento en plantas de *P. vulgaris*⁷ tratadas con distintas concentraciones de CuSO_4 .

[CuSO_4] (μM)	Masa húmeda Parte aérea/planta (g)	Masa húmeda Raíz/planta (g)	Longitud Parte aérea (cm)	Masa seca Parte aérea/planta (g)	Masa seca Raíz/planta (g)
0,15 ⁸	23,6±4,4	8,48±2,43	39,1±2,8	2,72±0,31	0,68±0,01
300	12,8±0,9	10,7±0,10	31,9±5,8	1,62±0,13	0,81±0,07
1000	10,7±0,9	11,1±0,10	35,4±1,9	1,49±0,21	0,83±0,04

Las plantas cultivadas en presencia de CuSO_4 no presentaron síntomas de toxicidad como hojas marchitas, clorosis o necrosis de raíces (Figura 17). En presencia de CuSO_4 1000 μM las plantas presentaron una disminución del 45% y 9% en la biomasa y longitud del tejido aéreo respectivamente (Figura 18).

La raíz en cambio, presentó un aumento del 20% y del 22% en su biomasa en los tratamientos con CuSO_4 300 y 1000 μM respectivamente (Figura 18). Se observó que las raíces presentaron un mayor grosor en comparación a las plantas cultivadas sin CuSO_4 .

Estos resultados demuestran que el cobre afecta el crecimiento de *P. vulgaris*; ya que se observó un menor crecimiento de la parte aérea que fue similar entre concentraciones de 300 y 1000 μM . El mayor desarrollo de la raíz en presencia de Cu(II) formaría parte del sistema de defensa de *P. vulgaris*, que probablemente

⁷ Cultivadas en presencia de NH_4NO_3 6 mM.

⁸ CuSO_4 como micronutriente en la solución de riego.

evitaría el ingreso del cobre a las hojas y tallos responsables de la fotosíntesis, floración y formación de frutos. Podría proponerse a partir de este resultado, que el nitrógeno en forma de NO_3^- o NH_4^+ tendría un efecto protector frente a la toxicidad del Cu(II) , induciendo en la planta una respuesta a nivel de la raíz.

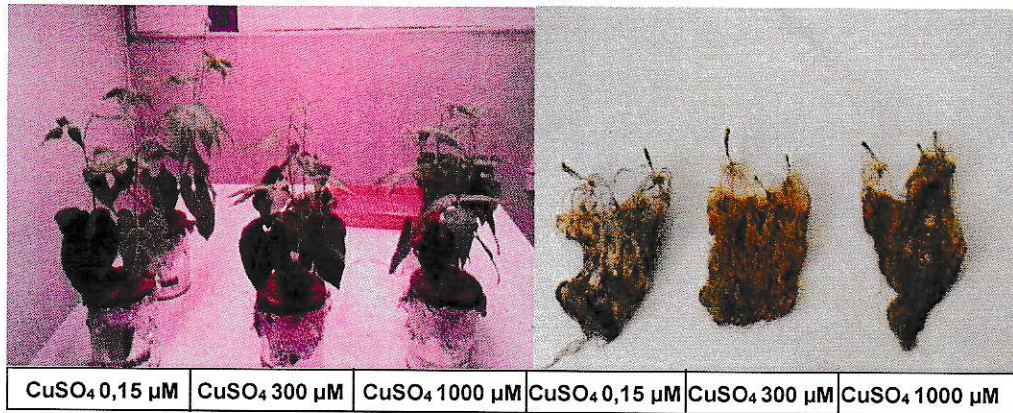


Figura 17 Plantas de *P. vulgaris* tratadas con NH_4NO_3 y distintas concentraciones de CuSO_4 . Izquierda: plantas de 14 días. Derecha: Raíces plantas de 25 días.

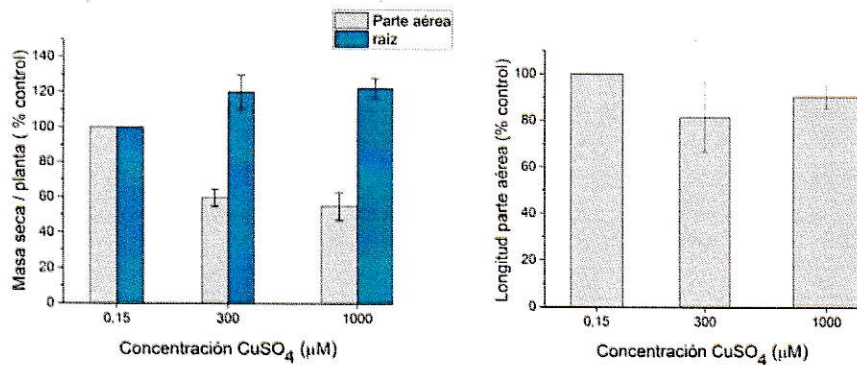


Figura 18 Variación de los parámetros de crecimiento de *P. vulgaris* bajo tratamiento con NH_4NO_3 y distintas concentraciones de CuSO_4 .

Un efecto similar se logró con la simbiosis con *R. etli*, que aporta principalmente nitrógeno en forma de NH_4^+ a partir de N_2 atmosférico y además GAs. Por otra parte, el uso de *R. etli* como biofertilizante presenta la ventaja de no generar contaminación en el suelo y otros efectos nocivos asociados al uso de NH_4NO_3 como fertilizante nitrogenado (Bohloul y col., 1992; Bremer, 1995).

3.6 Efecto del Cu(II) sobre el crecimiento de *R. etli* en cultivos líquidos.

Ya que el Cu(II) influyó en la nodulación de *P. vulgaris* por *R. etli*, se investigó el efecto de este metal sobre su crecimiento en cultivos líquidos. El crecimiento en cultivos líquidos en medio YEM en ausencia de Cu(II) y en presencia de distintas concentraciones (10-100 μM), se muestra en la Figura 19. Las curvas indicaron una etapa de crecimiento exponencial entre 2 y 6 días, tiempo en que se inició la etapa estacionaria del cultivo (Figura 19).

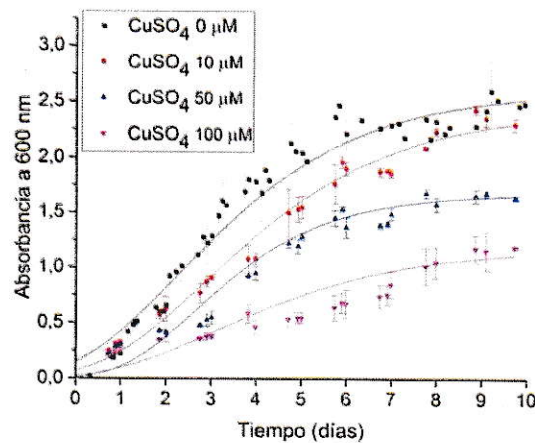


Figura 19 Curvas de crecimiento de *R. etli* en medio YEM con distintas concentraciones de CuSO_4 .

El CuSO_4 disminuyó el crecimiento de *R. etli* hasta en un 54% para concentraciones de CuSO_4 100 μM ; encontrando que el crecimiento en la fase estacionaria es inversamente proporcional a la concentración de Cu(II). Esto demuestra que el Cu(II) ejerce un efecto tóxico sobre *R. etli*, aunque este rizobio presenta una cierta tolerancia a este metal, que le permite crecer aunque en forma limitada. Este efecto podría explicar en parte la nodulación reducida encontrada en presencia de Cu(II) sobre las plantas de *P. vulgaris*, ya que después de ingresar a las células de la raíz, la bacteria se reproduce para generar nódulos simbióticos. Se esperaría que el efecto del Cu(II) sobre el crecimiento fuera menor en cepas tolerantes de *R. etli* aisladas de suelos contaminados con Cu(II), las que podrán ser más efectivas también en la nodulación.

IV. DISCUSIÓN

Las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*, crecieron y se desarrollaron normalmente en presencia de Cu(II), generando nódulos simbióticos. Aunque la masa del tejido aéreo fue un 38% menor que en ausencia de Cu(II) (Figura 13), no se observaron síntomas importantes de toxicidad como clorosis o crecimiento anómalo de las hojas. Para otras especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *L. Albus* y *V. faba*, también se ha descrito una reducción en la biomasa aérea entre 10-81% en presencia de Cu(II) (Drazkiewicz y col., 2004; Sanchez-Pardo & Zornoza 2014; Fatnassi y col., 2015) lo que podría deberse a una disminución de la fotosíntesis y alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares (Drazkiewicz y col., 2004; Sanchez-Pardo & Zornoza 2014).

Uno de los elementos fundamentales en el crecimiento vegetal es la disponibilidad de nitrógeno por lo que el empleo de fertilizantes nitrogenados para aumentar la calidad de los suelos se basa en este requerimiento. Parte del amonio contenido en los fertilizantes se encuentra fijado en la fracción coloidal del suelo, siendo menos disponible para las plantas. Se desconoce el grado de fijación de amonio por la vermiculita y es necesario realizar a futuro isoterma de adsorción de este compuesto. En este trabajo se demostró que el inóculo con *R. etli* permite el crecimiento de *P. vulgaris* en presencia de Cu(II) alcanzando un crecimiento en longitud del tallo similar al que se obtiene en presencia de nitrato de amonio (20% menor en promedio), sin un cambio significativo en la masa del tejido aéreo en las dos condiciones (Figura 20). Esto sugiere que el efecto protector de *R. etli* frente al cobre se debe principalmente al aporte de NH_4^+ a la planta por la nitrogenasa bacteriana.

A diferencia de lo que se encontró para el tejido aéreo de *P. vulgaris*, las raíces de las plantas tratadas con Cu(II) mostraron un significativo aumento de su masa y grosor. La masa seca aumentó hasta en un 28% (Figura 13) y el engrosamiento encontrado en la raíz primaria, cerca del tallo podría deberse a un aumento en la producción de lignina en este tejido. Este resultado fue novedoso ya que difiere del descrito para otras especies de plantas como *Robinia pseudoacacia*

(acacia blanca), *Glycine max*, *L. albus* y *V. faba*. que no presentan un aumento de masa de la raíz cuando son cultivadas en presencia de Cu(II) (Hao y col., 2015; Sanchez-Pardo & Zornoza 2014; Fatnassi y col., 2015).

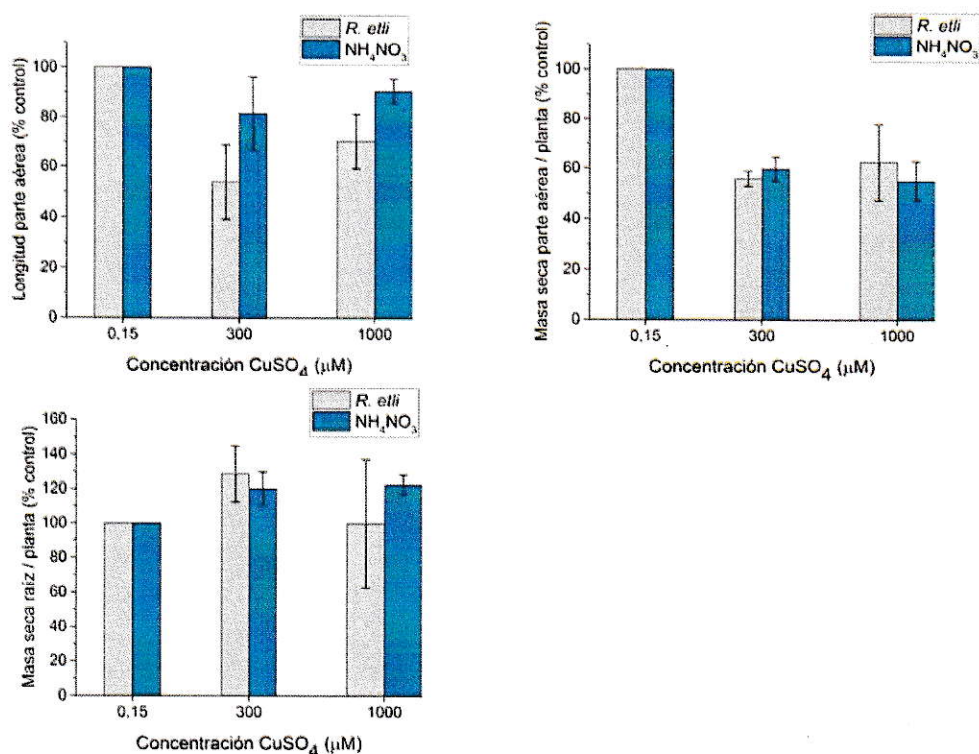


Figura 20 Crecimiento de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* o NH_4NO_3 en presencia de CuSO_4 .

Por otra parte, en los arbustos *Bruguiera gymnorrhiza*, *kandelia obovata* y *Rhizophora stylosa* se encontró un aumento de lignina y suberina en la raíz en respuesta a la presencia de Cu(II), sustancias que reducen el ingreso de este metal a la planta actuando como una barrera a nivel de la raíz (Cheng y col., 2014). Más aun, en plantas de *Ricinus communis* (higuerilla) se demostró que el 66% del Cu(II) que ingresa a la planta se une a la lignina, celulosa y otros componentes de la pared celular en la raíz (Kang y col., 2015). En conjunto, estos antecedentes sugieren que la lignificación de la raíz sería un factor fundamental en la tolerancia a Cu(II) que presentaron las plantas de *P. vulgaris*.

Además del efecto de aumento de masa, se observó en la raíz de las plantas inoculadas una reducción importante de la nodulación en presencia de cobre. Los nódulos se vieron disminuidos en 69% y 43% de su masa y número respectivamente (Figura 15). Para otros rizobios, como *R. leguminosarum* y *M. amorphae* simbiosites de *Vicia Sativa* (arvejilla) y *R. pseudoacacia* respectivamente, que crecen en suelos contaminados con cobre se ha descrito también una reducción en la nodulación (Laguerre y col., 2006; Hao y col., 2015). Este efecto podría deberse a una inhibición del crecimiento bacteriano, como se vio en los experimentos de crecimiento de *R. etli* en cultivos líquidos (Figura 19).

Este efecto puede haber reducido el inoculo efectivo sobre las semillas en germinación de *P. vulgaris* generando una capacidad de fijar nitrógeno reducida. Además, la lignificación de la raíz en presencia de Cu(II) puede haber dificultado el ingreso del rizobio a este tejido como lo sugiere la ausencia de nódulos en las raíces gruesas, posiblemente lignificadas. El crecimiento de las plantas de *P. vulgaris*, que presentaron un aspecto saludable en presencia de Cu(II), sugiere que a pesar de la dificultad en la nodulación el rizobio, logró establecer simbiosis y permitir el crecimiento de las plantas. Debido a esto, el tejido vegetal del nódulo protegería al rizobio con respecto a las condiciones de vida libre una vez que ingresa a la raíz.

La disminución de la biomasa aérea en presencia de cobre con respecto a la condición sin cobre podría deberse a una alteración en la leghemoglobina, ya que los nódulos presentaron cambios en su coloración interna (Figura 16) lo que disminuiría la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Por otra parte, en ausencia de cobre se observó que las plantas inoculadas presentaron una mayor longitud de tallos con respecto a las plantas tratadas con NH_4NO_3 6 mM, aunque, la biomasa del tejido aéreo y de la raíz fue un 50% menor en las plantas en simbiosis (Figura 8). Este resultado puede atribuirse a la producción de GAs por los bacteroides las que estimulan el crecimiento en longitud de las plantas aunque la cantidad de nitrógeno aportado por la bacteria sería menor a la entregada por el NH_4NO_3 6 mM.

A diferencia de nuestros resultados, se ha encontrado un aumento de la masa aérea en cultivos de distintas leguminosas inoculadas con cepas de rizobio tolerantes al cobre y crecidas en presencia de este metal, con respecto a plantas cultivadas con

un fertilizante nitrogenado, lo que sugiere que el uso de rizobios aislados de suelos contaminados o de cepas tolerantes al cobre, es una alternativa interesante y sustentable para el cultivo de leguminosas en terrenos contaminados. Por ejemplo, plantas de soya inoculadas con rizobios tolerantes genera, en presencia de Cu(II), una biomasa aérea 25% mayor a la obtenida con un fertilizante químico y una biomasa de la raíz un 55% mayor (Sanchez-Pardo & Zornoza, 2014). También en plantas de *V. faba* inoculadas con microorganismos resistentes a Cu(II) se encontró un aumento de la biomasa aérea de un 36% en comparación a plantas cultivadas en un medio nitrogenado (Fatnassi y col., 2015).

La cepa de *R. etli* utilizada en este trabajo presentó una baja tolerancia a Cu(II), representado por una disminución de su crecimiento en presencia de este metal en condiciones de cultivo líquido por lo que los resultados obtenidos podrían mejorarse utilizando cepas tolerantes y/o más eficientes en la fijación de nitrógeno. Esto debería incidir principalmente en un aumento de la eficiencia de la nodulación y en el aporte de amonio por la simbiosis.

Además del efecto protector de la toxicidad de Cu(II) de *R. etli* mediante la fijación de N₂, se encontró que los bacteroides presentan oxidasas de GAs activas y pueden sintetizar estas fitohormonas (Figuras 9 y 10). En soya crecida en presencia de Cd(II) se ha reportado que la aplicación exógena de GAs produce un aumento del tamaño de hojas, biomasa aérea y de la raíz, así como mayores niveles de clorofila lo que apoya la contribución de las GAs, al crecimiento de plantas en suelos contaminados con metales (Ghorbanli y col., 1999).

Los bacteroides de *R. etli* metabolizaron efectivamente el ácido *ent*-kaurenoico lo que indica una alta actividad de la oxidasa respectiva, mientras que la C20 oxidasa que utiliza el GA₁₂, presentó una menor actividad (Figuras 9 y 10). Esto podría atribuirse a la presencia de un gen de ferredoxina fusionado a uno de los genes de monooxigenasa P450 en *R. etli* (Hershey y col., 2014), probablemente la *ent*-kaurenoico oxidasa, lo que dejaría a la ferredoxina menos disponible para la C20 oxidasa. En conjunto, las actividades enzimáticas detectadas en *R. etli* serían suficientes para aportar GAs a la planta que favorezcan su crecimiento en altura.

V. CONCLUSIONES

- La simbiosis con *R. etli* proporciona a las plantas de *P. vulgaris* una cantidad de nitrógeno en forma de amonio suficiente para que crezcan y se desarrollen. Sin embargo, este aporte es menor a lo proporcionado por la solución de riego con NH_4NO_3 6 mM.
- Los bacteroides de *R. etli* presentaron actividad de oxidasas de GAs lo que indica que son capaces de sintetizar estas fitohormonas. Las GAs bacterianas contribuirían al efecto promotor del crecimiento y biofertilizante de *R. etli* principalmente con respecto al crecimiento en longitud de *P. vulgaris*.
- En presencia de amonio, ya sea aportado por la simbiosis con *R. etli* o bien agregado a las plantas como NH_4NO_3 , se redujo el crecimiento de la parte aérea de las plantas por efecto del Cu(II) , aunque sin síntomas de necrosis o clorosis en las hojas.
- La raíz de las plantas aumentó en masa y grosor en presencia de Cu(II) lo que constituiría un mecanismo de defensa de la planta para evitar el ingreso y la toxicidad de este metal a nivel del tejido aéreo.
- El número y masa de los nódulos radiculares obtenidos con la cepa de *R. etli* utilizada disminuyó en presencia del Cu(II) , probablemente debido a toxicidad que presenta este metal sobre la bacteria inhibiendo su crecimiento. Este efecto podría evitarse utilizando una cepa de *R. etli* tolerante al Cu(II) y/o un inóculo mayor.
- La biomasa aérea similar, en presencia de Cu(II) , de las plantas inoculadas con *R. etli* o crecidas con NH_4NO_3 indica que esta bacteria simbiótica podría utilizarse como un biofertilizante que proteja de la fitotoxicidad del Cu^{+2} en ambientes contaminados, evitando el uso de fertilizantes nitrogenados (por ejemplo: urea, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

VI. REFERENCIAS

- Aguilar, R., Hormazabal, C., Gaete, H., Neaman, A. 2011. Spatial distribution of copper, organic matter and pH in agricultural soils affected by mining activities. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 11:125–145.
- Arora, N.K., Khare, E., Singh, S., Maheswari, D.K. 2010. Effect of Al and heavy metals on enzymes of nitrogen metabolism of fast and slow growing rhizobia under explanta conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 811–816.
- Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., George, T. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil.* 141: 1-11
- Bremer, J.M. 1995. Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Fert. Res.* 42: 321–329.
- Caetano-anollés, G., Gresshoff, P.M. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 345-382.
- CCME, 1999. Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Copper. En: Canadian Environmental Quality Guidelines, Canadian Council of Ministers of the Environment. CCME. pp 1-7. Documents, Winnipeg.
- Chaudhary, S.K. Inouhe, M., Rai, U.N., Mishra, K., Gupta, D.K. 2011. Inoculation of *Rhizobium* (VR-1 and VA-1) induces an increasing growth and metal accumulation potential in *Vigna radiata* and *Vigna angularis* L. growing under fly-ash. *Ecol Eng.* 37: 1254–1257.
- Cheng, H., Jiang, Z.Y., Liu, Y., Ye, Z.H., Wu, M.L., Sun, C.C., Sun, F.L., Fei, J., Wang, Y.S. 2014. Metal (Pb , Zn and Cu) uptake and tolerance by mangroves in relation to root anatomy and lignification/suberization. *Tree Physiol.* 34: 646–656.
- Comisión Chilena del Cobre (COCHILCO). Estadísticas producción cobre de mina mundial y Chile, año 2014. Ministerio de Minería, Gobierno de Chile.
- Das, A.J., Kumar, M., Kumar, R. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): An Alternative of Chemical Fertilizer for Sustainable, Environment Friendly Agriculture. *Res. J. Agriculture and Forestry Sci.* 1: 21–23.
- Drazkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals.* 17: 379–387.
- Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Saadani, O., Jebara, M., Jebara, S.H. 2015. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *C. R. Biol.* 338: 241–254.

- Ghorbanli, M., Kaveh, S.H., Sepehr, M.F. 1999. Effects of cadmium and gibberellin on growth and photosynthesis of *Glycine max*. *Photosynthetica*. 37: 627–631.
- Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012.
- Gomare, K.S., Mese, M., Shetkar, Y. 2013. Isolation of *rhizobium* and cost effective production of biofertilizer. *Indian J.L.Sci.* 2: 49–53.
- Gomez, M., Silva, N., Hartmann, A., Sagardoy, M., Catroux, G. 1997. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 167–173.
- González, I., Neaman, A., Rubio, P., Cortés, A. 2014. Spatial distribution of copper and pH in soils affected by intensive industrial activities in Puchuncaví and Quintero, central Chile. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14: 943–953.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C. L.L., Krishnamurthy, L. 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 5: 355-377.
- Hao, X., Xie, P., Zhu, Y.G., Taghavi, S., Wei, G., Rensing, C. 2015. Copper tolerance mechanisms of *Mesorhizobium amorphae* and its role in aiding phytostabilization by *Robinia pseudoacacia* in copper contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 49: 2328–2340.
- Hassen, A.I., Bopape, F.L., Rong, I.H., Seane, G. 2014. Inoculant strain WB74 on soybean (*Glycine max* L.Merrill) is affected by several limiting factors. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8: 2069–2076.
- Hedden, P., Proebsting, W.M. 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* 119: 365-370.
- Hedden, P., Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., Tudzynski, B. 2002. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J. Plant Growth Regul.* 20: 317-331.
- Hershey, D.M., Lu, X., Zi, J., Peters, R., 2014. Functional conservation of the capacity for *ent*-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *J. Bacteriol.* 196: 100-106
- Kabata-Pendias, A. 2011. Copper, Elements of group 11. En Kabata-Pendias, A Trace elements in soils and plants 4th ed, Chapter 16, pp 253-266. CRC Press by Taylor and Francis Group, Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton.
- Kang, W., Bao, J., Zheng, J., Hu, H., Du, J. 2015. Distribution and chemical forms of copper in the root cells of castor seedlings and their tolerance to copper phytotoxicity in hydroponic culture. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 7726–7734.
- Keyser, H.H., Li, F. 1992. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. *Plant Soil.* 141: 119–135.

- Laguerre, G., Courde, L., Noiaim, R., Lamy, I., Revellin, C., Breuil, M.C., Chaussod, R. 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb. Ecol.* 52: 426–435.
- Lightbody, J.J., Krogmann, D.W. 1967. Isolation and properties of plastocyanin from *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 131:508-515.
- Mackie, K.A., Müller, T., Kandeler, E. 2012. Remediation of copper in vineyards- a mini review. *Environ Pollut.* 167: 16-26.
- MacMillan, J. 1997. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat. Prod. Rep.* 14: 221–243.
- MacMillan, J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20: 387-442.
- Méndez, C., Baginsky, C., Hedden, P., Gong, F., Carú, M., Rojas, M.C. 2014. Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Phytochemistry.* 98: 101–109.
- Meschini, E.P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., Beker, M.P., Küster, H., Pühler, A., Aguilar, O.M. 2008. Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 459–468.
- Moris, M., Braeken, K., Schoeters, E., Verreth, C., Beullens, S., Vanderleyden, J., Michiels, J. 2005. Effective symbiosis between *Rhizobium etli* and *Phaseolus vulgaris* requires the Alarmonne ppGpp. *J. Bacteriol.* 187: 5460–5469.
- Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA), estadísticas de cultivos: información nacional y regional de superficie sembrada, producción y rendimientos anuales. Años 2014-2015. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.
- Pagan, J.D., Chil, J.J., Scowcroft, W.R., Gibson, A.H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* culture on a defined médium. *Nature.* 256: 406-407.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Gogolin, K.A., Ye, H. 2006. Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:256-263.
- Ramos, J.J. 2009. Estudio de la contaminación por metals pesados y otros procesos de degradación química en los suelos en los invernaderos del poniente almeriense. Tesis doctoral. Editorial Universidad de Almería. Página 29
- Sanchez-Pardo, B., Zornoza, P. 2014. Mitigation of Cu stress by legume-*Rhizobium* symbiosis in white lupin and soybean plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102: 1–5.
- Sánchez, E., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L. 2004. Yield and biosynthesis of nitrogenous compounds in fruits of green bean (*Phaseolus vulgaris* L cv Strike) in response to increasing N fertilisation. *J. Sci. Food Agric.* 84: 575–580.
- Seneviratne, G., Van Holm, L.H.J., Ekanayake, E.M.H.G.S. 2000. Agronomic benefits of rhizobial inoculant use over nitrogen fertilizer application in tropical soybean. *Field Crops Res.* 68: 199–203.

- Sponsel, V.M. 2003. Gibberellins. In: Encyclopedia of hormones, Norman A.W. (eds) vol 2. pp 29-40. Academic Press.
- Tully, R.E., Van Berkum, P., Lovins, K.W., Keister, D.L. 1998. Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1398: 243–255.
- Uriu-Adams, J.Y., Keen, C.L. 2005. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* 26: 268-298.
- Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). XI u. 164 S., 10 Abb., 17 Tab., 7 Taf. Oxford-Edinburgh 1970: Blackwell Scientific Publ., 45 s.
- Yruela, I. 2009. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biol.* 36: 409–430.

VII. ANEXOS

7.1 Cromatogramas de HPLC obtenidos por cuantificación de la radiactividad de cada fracción mediante centelleo líquido

Tabla 9 Cromatogramas estándares de GAs

tr (minutos)	Cuentas por minuto (cpm) para los distintos estándares de GAs						
	¹⁴ C-KA	7B OH- ¹⁴ C-KA	¹⁴ C-GA ₁₅	¹⁴ C-GA ₂₄	¹⁴ C-GA ₁₂	¹⁴ C-GA ₁₂ aldehido	¹⁴ C-GA ₉
1	35	26	16	12	25	14	20
2	33	15	15	26	15	10	19
3	271	108	40	29	38	116	74
4	125	102	27	22	26	69	81
5	146	128	27	18	45	134	93
6	138	195	55	34	47	140	134
7	147	316	23	21	67	141	59
8	153	264	30	29	79	137	68
9	168	178	20	27	41	176	58
10	135	243	32	30	39	168	161
11	136	228	31	20	34	137	636
12	152	152	29	30	38	141	209
13	208	173	31	44	33	288	149
14	351	151	24	39	59	176	93
15	304	102	28	49	37	127	109
15	279	76	23	60	79	110	74
17	207	127	209	6001	53	132	143
18	171	86	2351	1788	55	101	185
19	304	158	3675	165	42	135	820
20	313	6372	201	59	39	93	5766
21	171	14871	74	51	52	52	534
22	123	421	44	36	27	54	104
23	231	109	52	34	2629	715	143
24	163	116	51	47	4747	815	83
25	93	153	36	48	271	10030	44
26	338	72	53	39	78	1173	40
27	80	70	44	40	62	243	33
28	62	51	38	38	45	77	40
29	53	61	36	45	22	56	45
30	265	59	41	35	37	70	170
31	54						
32	117						
33	69						
34	12145						
35	3835						
36	276						
37	118						
38	72						
39	46						
40	58						

Tabla 10 Cromatogramas de los productos formados a partir de ^{14}C -KA por bacteroides de *R. etli* en distintas etapas de crecimiento de la planta

tr (minutos)	Cuentas por minuto (cpm)						
	11 dpi	14 dpi	21 dpi	25 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
1	17	9	138	24	12	18	10
2	17	16	29	21	11	13	16
3	48	42	120	31	49	82	90
4	37	27	45	37	33	39	37
5	47	37	73	65	82	44	44
6	71	46	91	100	68	57	46
7	53	103	99	89	85	51	53
8	65	67	94	82	101	68	61
9	71	54	106	116	94	64	65
10	99	52	105	105	125	91	86
11	72	59	172	74	122	74	82
12	77	63	230	92	102	80	71
13	118	100	209	127	42	102	86
14	192	144	279	114	173	131	121
15	258	209	328	128	284	292	266
16	344	373	1543	894	551	303	402
17	392	467	2162	520	338	444	404
18	298	370	1303	714	591	321	356
19	307	265	1216	247	329	351	392
20	2401	2071	3254	929	3150	4583	2236
21	1919	1927	1304	1927	4230	2895	1966
22	154	168	270	120	279	160	146
23	401	318	1121	127	326	255	189
24	363	320	577	240	399	348	317
25	2425	1453	219	1581	5725	5367	3432
26	955	705	150	597	2153	1426	1597
27	108	110	277	88	215	215	194
28	196	140	231	116	269	261	183
29	56	50	155	32	76	86	47
30	61	49	91	46	56	89	28
31	39	51	71	30	48	40	44
32	37	39	70	27	57	37	50
33	83	74	85	33	110	141	62
34	186	386	119	1041	257	634	127
35	61	110	59	72	51	72	57
36	32	34	48	21	24	31	33
37	28	21	59	17	21	24	16
38	23	25	33	28	26	29	17
39	23	16	22	74	26	24	11
40	27	37	33	16	18	28	21

Tabla 11 Cromatogramas de los productos formados a partir de $^{14}\text{C-GA}_{12}$ por bacteroides de *R. etli* en distintas etapas de crecimiento de la planta.

t_R (minutos)	Cuentas por minuto (cpm)								
	11 dpi	14 dpi	21 dpi	25 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi	49 dpi	56 dpi
1	14	26	19	18	9	14	12	12	27
2	17	15	18	15	20	10	30	16	12
3	41	36	53	58	31	55	34	57	38
4	30	30	37	76	23	29	36	33	41
5	51	42	45	79	34	34	51	52	79
6	73	82	84	108	67	83	88	98	120
7	108	110	106	111	84	95	67	114	168
8	118	84	132	100	124	85	97	89	144
9	83	60	67	83	70	37	71	71	101
10	52	43	77	101	31	39	41	48	84
11	48	44	153	91	40	55	39	75	66
12	62	44	229	85	47	30	40	68	64
13	57	33	99	211	34	47	50	75	41
14	56	30	119	958	33	47	32	458	129
15	48	50	183	1894	29	100	56	1607	1124
16	71	246	2909	2508	66	554	338	3068	3406
17	314	1524	3470	2408	540	3808	1924	3544	4423
18	1807	1870	2105	1735	3725	2102	4281	2218	3281
19	888	1129	2142	276	2426	996	2286	1360	1140
20	89	82	944	194	382	71	159	346	148
21	60	45	170	63	88	89	67	151	64
22	43	26	231	57	46	121	69	328	190
23	4077	3459	1081	253	1025	2578	742	244	768
24	5900	5266	318	182	3447	1796	1517	407	496
25	274	224	140	63	290	104	59	210	76
26	79	79	59	49	83	43	34	104	45
27	53	35	54	47	31	46	35	45	77
28	45	30	71	41	37	72	19	47	44
29	45	37	82	26	37	243	39	35	15
30	34	20	43	40	20	83	32	39	41

7.2 Calidad y procedencia de los reactivos

Los reactivos empleados en este trabajo poseen grado pro-análisis (P.A). Los solventes empleados en cromatografía líquida de alta resolución corresponden a metanol grado HPLC y agua Mili-Q.

Tabla 12 Procedencia de los reactivos

Reactivo	Procedencia
etanol	HES
K_2HPO_4	LAB SYNTH
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	SCHARLAB
KCl	M&B
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	M&B
citrato de hierro	MERCK
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	MALLINCKROBT
H_3BO_3	SIGMA
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	MERCK
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	RIEDEL-DE HAENAG
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	MERCK
NH_4NO_3	SIGMA
extracto de levadura	B&D
manitol	SIGMA
NaCl	MERCK
ascorbato de sodio	SIGMA
PVPP	SIGMA
TES	SIGMA
$MgCl_2$	MERCK
HCL	CALEDON
acetato de etilo	BIOS LAB CHILE
metanol	JT BAKER
POPOP	SIGMA
PPO	SIGMA
agar	SUDELAB