



INFORME BREVE

La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Arthrobacter agilis* UMCV2 coloniza endofíticamente a *Medicago truncatula*



Maria Elizabeth Aviles-Garcia, Idolina Flores-Cortez, Christian Hernández-Soberano, Gustavo Santoyo y Eduardo Valencia-Cantero*

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edificio B5, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México

Recibido el 5 de noviembre de 2015; aceptado el 7 de julio de 2016
Disponible en Internet el 2 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Arthrobacter agilis;
Leguminosas;
Bacterias endófitas

KEYWORDS

Arthrobacter agilis;
Legumes;
Endophytic bacterium

Resumen *Arthrobacter agilis* UMCV2 es una bacteria rizosférica que promueve el crecimiento vegetal de plantas leguminosas proveyéndoles hierro soluble. Un segundo mecanismo de promoción se da a través de la producción de compuestos volátiles que estimulan los mecanismos de absorción de hierro. Adicionalmente, *A. agilis* UMCV2 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos. En el presente trabajo se emplea una combinación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa e hibridación *in situ* con fluorescencia para detectar y cuantificar la presencia de la bacteria en los tejidos internos de la planta leguminosa *Medicago truncatula*. Nuestros resultados demuestran que *A. agilis* UMCV2 se comporta como una bacteria endófitas de *M. truncatula* especialmente en medios donde el hierro está disponible.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The plant growth-promoting rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 endophytically colonizes *Medicago truncatula*

Abstract *Arthrobacter agilis* UMCV2 is a rhizosphere bacterium that promotes legume growth by solubilization of iron, which is supplied to the plant. A second growth promotion mechanism produces volatile compounds that stimulate iron uptake activities. Additionally, *A. agilis* UMCV2 is capable of inhibiting the growth of phytopathogens. A combination of quantitative polymerase chain reaction and fluorescence *in situ* hybridization techniques were used here to detect

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vcantero@umich.mx (E. Valencia-Cantero).

and quantify the presence of the bacterium in the internal tissues of the legume *Medicago truncatula*. Our results demonstrate that *A. agilis* UMCV2 behaves as an endophytic bacterium of *M. truncatula*, particularly in environments where iron is available.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La rizosfera es un ambiente único formado por la interfaz de las raíces de las plantas y el suelo circundante. Miríadas de microorganismos viven, compiten y prosperan en este ambiente. Dichos microorganismos pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, de manera perjudicial o benéfica. Un subconjunto de las bacterias rizosféricas son capaces de colonizar y prosperar en el interior de los tejidos vegetales (raíz y tejidos aéreos), a estas bacterias se les denomina endófitas, a condición de que no tengan un efecto negativo en el crecimiento de la planta, y se asume que su efecto en la planta es más bien de simbiosis o de cooperación³.

Las poblaciones endofíticas, al igual que las poblaciones rizosféricas, están condicionadas por factores bióticos y abióticos, pero en todo caso el entorno endofítico es mejor controlado por las plantas que el entorno rizosférico, y de este modo las plantas ejercen una mayor selección sobre las poblaciones endofíticas que sobre las poblaciones rizosféricas⁶.

Las bacterias con efectos promotores del crecimiento vegetal han sido ampliamente empleadas como bioinoculantes, con diferentes resultados. Mientras que en algunas ocasiones los bioinoculantes han tenido un impacto significativo en el aumento de la producción vegetal, en otras ocasiones su impacto ha sido más bien discreto o nulo³. Una de las razones que explican estas variaciones en los resultados es la diferente habilidad de las bacterias inoculadas para competir y sobrevivir dentro de las comunidades bacterianas autóctonas de las rizosferas donde son introducidas³.

Las plantas leguminosas (orden Fabales) son el segundo grupo más importante de plantas cultivadas para la alimentación humana y de ganado, solamente superada por las gramíneas⁴, de allí la importancia de su estudio.

En un trabajo previo se aisló la cepa *Arthrobacter agilis* UMCV2 de la rizosfera de plantas de *Zea mays* (maíz)¹¹. *A. agilis* UMCV2 es una actinobacteria rizosférica capaz de promover el crecimiento vegetal por distintos mecanismos, que incluyen el suministro de hierro (Fe) soluble a las plantas¹¹ y la emisión de dimetilhexadecilamina, un compuesto orgánico volátil que estimula el crecimiento de la raíz y de los tejidos aéreos de *Medicago sativa*¹², además de estimular los mecanismos de absorción de Fe de la planta⁹. Este mismo compuesto tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los organismos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*¹³.

Las capacidades como promotores del crecimiento vegetal antes descritas hacen de *A. agilis* UMCV2 un agente microbiano con potencial para ser usado como bioinoculante. Una cuestión relevante para este propósito es determinar el nivel de asociación de *A. agilis* UMCV2 con la planta inoculada, como un modo de inferir sus

posibilidades de sobrevivencia dentro de la comunidad bacteriana asociada a la planta, independientemente del tipo de suelo y de sus condiciones nutricionales.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar los tejidos internos de la planta leguminosa modelo *Medicago truncatula*, cultivar Jemalong A17 en diferentes condiciones de disponibilidad de Fe, y empleamos para ello una combinación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa e hibridación *in situ* con fluorescencia.

A. agilis fue crecida en agar nutritivo a 25 °C durante 48 h antes de su utilización. Las semillas de *M. truncatula* fueron desinfectadas, germinadas e incubadas según se ha descrito previamente⁹. Plántulas de *M. truncatula*, a 3 d de su germinación, fueron colocadas en frascos de 170 ml de capacidad, con 30 ml de medio basal Hoagland solidificado con 6 g/l de agar de micropropagación y sin Fe, con 100 µM de Fe insoluble adicionado como ferrihidrita, o bien con 100 µM de FeSO₄. Algunas plantas se mantuvieron axénicas (controles axénicos), mientras que otras fueron inoculadas por goteo de 10 µl de una suspensión bacteriana de *A. agilis* UMCV2 con DO₅₉₀ de 0,1 (equivalente a $1,1 \times 10^6$ UFC medidas por cuenta viable) sobre la raíz. Todos los tratamientos, incluidos los controles, tuvieron entre 3 y 8 réplicas independientes. Después de 3 semanas de incubación, se colectaron por separado la hoja cero (unifoliada), la hoja 1, la hoja 2, la raíz proximal (desde el hipocótilo hasta el punto de surgimiento de la primera raíz lateral, a aproximadamente 1,5 cm del hipocótilo) y la raíz distal (el resto de la raíz de aproximadamente 3,5 cm) (fig. 1A).

Tanto las hojas como las raíces de las plantas fueron desinfectadas superficialmente y la ausencia de bacterias viables fue corroborada como se ha descrito previamente⁸. Se extrajo el ADN de las muestras de tejido vegetal y de las bacterias empleando un método adecuado para estos 2 tipos de materiales biológicos⁷. La concentración de ADN fue determinada empleando un espectrómetro para micromuestras NanoDrop 2000c (Termo Scientific Nanodrop, Wilmington Delaware, EE. UU.).

Considerando la secuencia del segmento de ADN del espaciador intergénico existente entre los genes del ARNr del 16S y 23S de *A. agilis* UMCV2 (número de acceso GenBank EF101871.1), se diseñaron los oligonucleótidos 2CV2F (5'-GTCCTGGTGGCATTTC-3') y 2CV2R (5'-ACGCAGAACAAGAGC-3') utilizando el programa Beacon Designer 4.02 (Primer Biosoft International, 3786 Corina Way, Palo Alto California, EE. UU.).

Para la detección de *A. agilis* UMCV2 y la cuantificación de su ADN dentro de los tejidos de *M. truncatula*, se realizaron pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando un termociclador StepOne (Applied Biosystems).

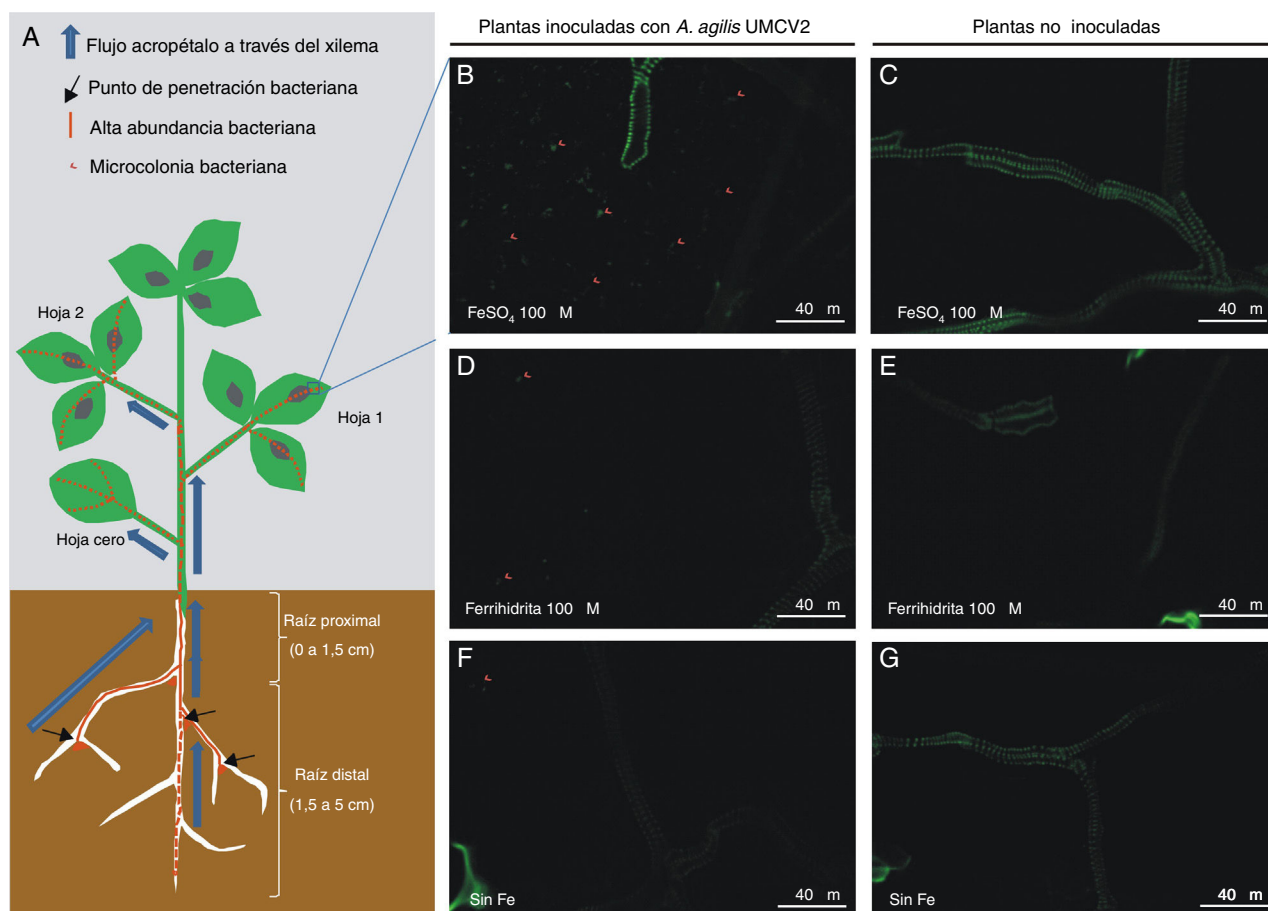


Figura 1 (A) Presencia y distribución de *A. agilis* UMCV2 en plantas de *M. truncatula*. El panel A muestra un esquema del sistema experimental, señalando las secciones de la planta analizadas y en las que se encontró *A. agilis* UMCV2 21 días después de la inoculación sobre la raíz. Los paneles B a G muestran fotografías representativas tomadas bajo un haz de luz de excitación de 488 nm y una ventana de emisión de 505 a 550 nm de longitud de onda, en un plano de 60 μ m por debajo de la superficie de la hoja 1 de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *A. agilis* UMCV2 y crecidas en medio adicionado con FeSO_4 (B), ferrihidrita (D) o sin Fe en el medio (F), o bien no inoculadas y crecidas en medio adicionado con FeSO_4 (C), ferrihidrita (E) o sin Fe en el medio (G). Las fotografías muestran la fluorescencia esperada de los elementos del xilema, pero solo las plantas inoculadas muestran microcolonias bacterianas señaladas con puntas de flecha.

Foster City, California, EE. UU.). Las curvas de calibración cubrieron un intervalo de 20 ng a 51,2 fg de ADN de *A. agilis* UMCV2 como templado, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0,997, y fueron seguidas de una curva de disociación con un solo máximo a los 83 °C, lo cual muestra un patrón de amplificación lineal con un solo amplicón. La cuantificación del ADN de *A. agilis* UMCV2 en tejidos de *M. truncatula* con base en las curvas de calibración se hizo de manera similar, utilizando como templado 20 ng de ADN proveniente de las muestras de tejidos vegetales.

De esta forma se detectó a *A. agilis* UMCV2 en cada una de las secciones de las plantas inoculadas en donde se buscó (tabla 1), si bien no siempre se detectó en todas las réplicas. En plantas que fueron crecidas en un medio suplementado con Fe disponible (FeSO_4) se encontraron las mayores cantidades de ADN bacteriano, en todos los órganos muestreados y en todas las réplicas, mientras que en las plantas crecidas en medio carente de Fe se registraron las menores cantidades de ADN bacteriano y no en todas las muestras (tabla 1). Un caso intermedio sucedió con las plantas crecidas en

medios con Fe adicionado en forma insoluble (100 μ M de ferrihidrita), que tuvieron cantidades de ADN bacteriano numéricamente mayores aunque estadísticamente similares a las encontradas en plantas crecidas en medios sin Fe. En ninguna de las secciones de las plantas control, de ninguno de los tratamientos, se detectó ADN bacteriano (tabla 1).

Para corroborar que el ADN bacteriano detectado provenía de bacterias con crecimiento endofítico y no de restos de bacterias adheridas a las superficies de las diferentes secciones vegetales, se realizaron fotografías de las superficies y planos interiores de los tejidos clarificados utilizando un microscopio confocal (FV1200, Olympus Corporation, Tokio, Japón). Las bacterias inoculadas fueron localizadas utilizando hibridación *in situ* con fluorescencia, de acuerdo al protocolo descrito por Lo Piccolo et al. (2010)⁵ empleando la sonda fluorescente HGC dirigida específicamente contra el ARNr de 23S de actinobacterias¹⁰ y unida al fluoróforo verde de rodanina (Uniparts SA de C.V., Galileo 92, México D.F, México). De esta manera fue evidente la presencia de la bacteria dentro de los tejidos de las plantas inoculadas, pero

Tabla 1 Cantidad de ADN de *A. agilis* UMCV2 (pg) encontrada en 20 ng de ADN extraídos de tejidos de *M. truncatula*^a

Origen de la muestra	Medios sin Fe			Medio con 100 μM de ferrihidrita			Medio con 100 μM de Fe(SO ₄)		
Plantas inoculadas con <i>A. agilis</i> UMCV2 ^a									
Hoja 2	+ < 0,05	B	(0,14)	0	B	(0,00)	3,70	AB	(1,00)
Hoja 1	+ < 0,05	B	(0,29)	0,33	AB	(0,25)	21,89	A	(1,00)
Hoja cero	+ < 0,05	B	(0,43)	0,05	AB	(0,50)	2,13	AB	(1,00)
Raíz proximal	0,17	B	(0,71)	1,12	AB	(0,88)	66,09	A	(1,00)
Raíz distal	0,05	B	(0,86)	0,05	AB	(0,75)	17,74	A	(1,00)
Plantas no inoculadas									
Hoja 2	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)
Hoja 1	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)
Hoja cero	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)
Raíz proximal	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)
Raíz distal	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)	0	B	(0,00)

^a Se muestran valores promedio.
 La notación + < 0,05 indica muestras positivas para la prueba de detección de ADN bacteriano pero en una cantidad inferior al límite de cuantificación (0,05 pg).
 Los valores entre paréntesis expresan la proporción de muestras positivas. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) según un análisis de varianza en rangos de Kruskal-Wallis seguido de una comparación múltiple por método de Dunns.

en ningún caso pudieron detectarse bacterias ni en la superficie de los tejidos ni en los tejidos internos de las plantas control (fig. 1).

Por otro lado, la sección de la planta con mayor cantidad de ADN bacteriano en todos los tratamientos fue la raíz proximal, que fue la parte de la planta sobre la cual se goteó la suspensión bacteriana al momento de la inoculación y su probable punto de penetración, seguida de la raíz distal y la hoja 1, y al final estuvieron la hoja cero y la hoja 2.

El anterior patrón de distribución del ADN bacteriano es compatible con la hipótesis de que las bacterias pudieron haberse distribuido por los tejidos aéreos de *M. truncatula* pasivamente a través del tejido vascular, más probablemente por el xilema, con un movimiento acropétalo (a favor de la corriente de transpiración), según ha sido descrito para el caso de *Burkholderia phytofirmans* y partículas de látex en *Vitis vinicola*². Los vasos xilemáticos se comunican unos con otros en sus extremos a través de perforaciones con diámetros inferiores al diámetro bacteriano, lo que supone un obstáculo al paso de las bacterias de un vaso a otro^{2,14}. En un estudio realizado en *M. sativa*¹⁴, se mostró que la mayoría de los vasos xilemáticos terminan en los nodos del tallo y solo una proporción muy pequeña ramifica desde los elementos vasculares del tallo hasta los pecíolos. De acuerdo a lo anterior, es explicable que las bacterias se encuentren impedidas de entrar pasivamente por el xilema hasta las hojas y que solo una pequeña fracción de la cantidad de ADN de *A. agilis* UMCV2 que encontramos en la raíz proximal fuera encontrada en la hoja 2, y solo en algunas réplicas.

Por otro lado, la presencia de ADN bacteriano en las raíces distales, teniendo en cuenta la escasa probabilidad de que las bacterias puedan penetrar pasivamente en el floema y ser llevadas por este en un flujo basipétalo (contra la corriente de transpiración), sugiere que la bacteria fue capaz de colonizar activamente los tejidos de la raíz y no que simplemente fue llevada por la corriente de transpiración, si bien en virtud de la cantidad de ADN hallada se concluye que la cantidad de bacterias que se movieron contra la corriente

de transpiración fue entre 3 y 20 veces menor que las que se encontraron en la raíz proximal (tabla 1).

Fue muy interesante observar que la mayor cantidad de bacterias fue encontrada en los tejidos de plantas que crecieron en medios con Fe disponible, seguida de la observada en plantas crecidas con Fe insoluble y finalmente en plantas crecidas en medios sin Fe.

Se conoce que *A. agilis* UMCV2 es capaz de reducir Fe en la rizosfera, haciéndolo más soluble y por tanto más accesible a las plantas¹¹, y que estimula los mecanismos de absorción y movilización de Fe en las plantas de *M. truncatula*⁹. Con base en estos antecedentes es posible hipotetizar que *A. agilis* UMCV2 y *M. truncatula* establecen una interacción positiva basada en la economía del Fe, donde la planta se vería beneficiada con la presencia de la bacteria en la rizosfera si el Fe estuviera en forma insoluble en el medio externo¹¹, y se beneficiaría con la colonización endofítica si el Fe estuviera disponible en el interior de la planta. Ya en el interior de las raíces, parte del Fe debe ser movilizado a los tejidos aéreos, donde se conoce que *A. agilis* UMCV2 puede coadyuvar a la homeostasis de dicho metal¹. En tales circunstancias es posible que las plantas favorezcan su colonización endofítica.

En conclusión, este trabajo muestra que *A. agilis* UMCV2 es capaz de colonizar y prosperar como bacteria endofita en *M. truncatula*, y que esta capacidad es mayor cuando el Fe se encuentra más disponible para la planta.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al fondo SEP-Conacyt-231585 (México) por el financiamiento de este trabajo y al Dr. León Ruíz-Herrera por haber tomado las fotografías en el microscopio confocal.

Bibliografía

1. Castulo-Rubio DY, Alejandro-Ramírez N, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *J Plant Growth Regul.* 2015;34:611–23.
2. Chatelet D, Matthews M, Rost TL. Xylem structure and connectivity in grapevine (*Vitis vinifera*) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants. *Ann Bot.* 2006;98:483–94.
3. Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am J Bot.* 2013;100:1738–50.
4. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131:872–7.
5. Lo Piccolo S, Ferraro V, Alfonzo A, Settanni L, Ercolini D, Burruano S, Moschetti G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Ann Microbiol.* 2010;60:161–7.
6. Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature.* 2012;488:86–90.
7. Mahuku SG. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol Biol Rep.* 2004;22:71–81.
8. Marquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I, Santoyo G. Diversity of bacterial endophytes in roots of mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genet Mol Res.* 2010;9:2372–80.
9. Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil.* 2013;362:51–66.
10. Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* 1994;140:2849–58.
11. Valencia-Cantero E, Hernandez-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, Lopez-Bucio J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 2007;291:263–73.
12. Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant Soil.* 2011;339:329–40.
13. Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C, Valencia-Cantero E. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma.* 2013;250:1251–62.
14. Wiebe HH, Greer RL, van Alfen NK. Frequency and grouping of vessel endings in alfalfa (*Medicago sativa*) shoots. *New Phytol.* 1984;97:583–90.