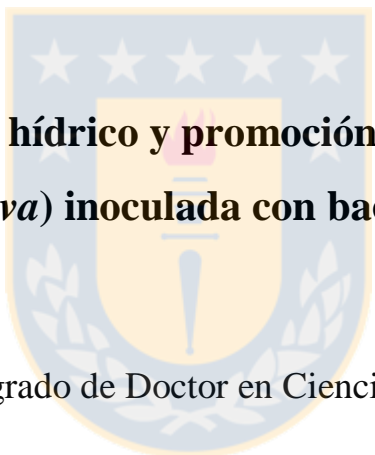




Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Agronomía - Programa de Doctorado en Ciencias de la Agronomía



**Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en
alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Agronomía

GEORGE ALEXANDER CEDEÑO GARCÍA

CHILLAN - CHILE

2018

Profesor Guía: Macarena Gerding González

Dpto. Producción Vegetal, Facultad de Agronomía

Universidad de Concepción

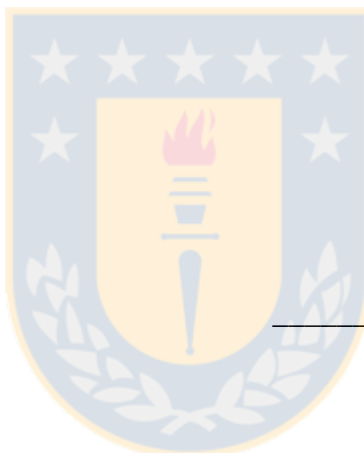


**Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en alfalfa
(*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera**

Aprobada por la Comisión:

Macarena Gerding González

Ingeniero Agrónomo, Ph.D.



Profesora guía

Susana Fischer Ganzoni

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Profesora co-guía

Luis Inostroza Fuentealba

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Comisión evaluación

Gonzalo Silva Aguayo

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Director de Programa



**EL ÉXITO EN LA VIDA
NO SE MIDE POR LO QUE LOGRAS,
SINO POR LOS OBSTÁCULOS QUE SUPERAS**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por darme salud, vida y fortaleza durante en el emprendimiento de este nuevo reto en mi vida profesional.

Mis sinceros agradecimientos a la Universidad de Concepción de Chile por permitirme ser parte de este prestigioso Templo del Saber. A la SENESCYT por el financiamiento de mis estudios y estancia doctoral en Chile. Fraternalmente agradecimientos al **Dr. Marco Sandoval** por ser la persona que me dió la oportunidad de ingresar al Programa Doctoral en Ciencias de la Agronomía. A todos los docentes que brindaron sus conocimientos en mi formación durante estos años de estudios.

A las personas que durante mi etapa Doctoral me han apoyado en el desarrollo del presente trabajo: Dr. Luis Inostroza asesor del trabajo y responsable del laboratorio de Fisiología de Praderas del INIA, por permitir desarrollar importantes etapas de investigación mediante la prestación de instalaciones, equipos, materiales y las valiosas recomendaciones científicas en beneficio de la investigación. Dra. Susana Fischer por sus aportes técnicos y facilidad de equipo en las mediciones de fluorescencia en el desarrollo de la investigación.

Agradezco enormemente a mis compañeros y amigos Hector Olivares, Jorge Retamal, Lizardo Reina, Leonardo Albán, Franco Weisser, Pablo Undurraga, Maurine Sepúlveda, Altagracia Reyes por ese constante apoyo y respaldo en el día a día.

Quiero agradecer de la manera más especial a la **Dra. Macarena Gerding**, tutora, profesora guía y directora de tesis, por su paciencia, dedicación, orientación y sobre todo por la confianza depositada en mí en estos casi 5 años de camino hacia un objetivo por lograr, compartiendo habilidades y conocimientos dentro de mi formación profesional, y comprendiendo las dificultades personales que retrasaron el ritmo de trabajo trazado dentro del Programa de estudio.

DEDICATORIA

El presente esta dedicado a mis Padres Galo y Elisa por ese apoyo y guía constante en el desarrollo de mi vida como persona y profesional.

A mi esposa Auxi por la paciencia y sacrificio realizado en todos estos años junto a mí, que me ha permitido superar todas las etapas y dificultades del caminar diario en los proyectos y objetivos planteados.

A mis hijos Justiny y Piero, motores principales en mi existencia y por los cuales me esfuerzo y parto el lomo de sol a sol, con la esperanza que todo el sacrificio realizado por Papá y Mamá sea un ejemplo de superación a seguir para un futuro exitoso y responsable en sus vidas.

A mis hermanos Shirley y Alex, por ese aliento de apoyo en cumplir las metas trazadas en especial El Doctorado.

A todas las personas que siempre vieron con buenos ojos estas locuras trazadas y echaron ánimos para poderlas cumplir.

ESTE ESFUERZO ES DE USTEDES Y ES PARA USTEDES

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Estrés por sequía, efecto y respuesta fisiológicos	1
1.2. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	3
1.3. Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	5
1.4. HIPÓTESIS	6
1.5. OBJETIVOS	6
1.5.1. GENERAL.....	6
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
2. Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas of Chile: effects on early nodulation in alfalfa	14
2.1. ABSTRACT	14
2.2. INTRODUCTION.....	15
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	16
2.3.1. Collection and isolation of bacteria	16
2.3.2. PGPR compatibility with <i>Ensifer meliloti</i>	17

2.3.3.	ACC deaminase activity of PGPR selected.....	17
2.3.4.	Phosphate solubilization of PGPR selected	18
2.3.5.	IAA production of PGPR selected	18
2.3.6.	Evaluation of nodulation rate in alfalfa plants	19
2.3.7.	Endophytic capacity of bacterial strains	19
2.3.8.	Identification of bacterial isolates	20
2.3.9.	Greenhouse experiment	21
2.4.	RESULTS AND DISCUSSION	21
2.4.1.	Characterization of bacterial strains	21
2.4.2.	Identification of PGPR strains	24
2.4.3.	Endophytic capacity.....	26
2.4.4.	Effect of co-inoculation <i>E. meliloti</i> + PGPR on early nodulation	26
2.4.5.	Greenhouse trial	27
2.5.	CONCLUSIONS	29
2.6.	AKNOWLEDGEMENTS	29
2.7.	REFERENCES	30
3.	Efecto promotor de crecimiento de bacterias con actividad ACC deaminasa en plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) bajo déficit hídrico	34
3.1.	Resumen.....	34
3.2.	INTRODUCCIÓN	35
3.3.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.3.1.	Material Bacteriano.....	37
3.3.2.	Material vegetal y establecimiento de ensayo en invernadero	37
3.3.3.	Mediciones de crecimiento	38
3.3.4.	Evaluaciones fisiológicas.....	39

3.4.	RESULTADOS	40
3.5.	DISCUSIÓN	47
3.6.	CONCLUSIONES.....	50
3.7.	AGRADECIMIENTOS	50
3.8.	BIBLIOGRAFÍA	51
4.	CONCLUSION GENERAL.....	55



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM RHIZOSPHERE OF ALFALFA: COMPATIBILITY WITH ENSIFER MELIOTI, INDOL ACETIC ACID IAA PRODUCTION, PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) DEAMINASE ACTIVITY.	22
TABLA 2 EFFECT OF INOCULATION THE ENSIFER MELILOTI AG-06 AND PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) ON NODULE SCORE AND ROOT LENGTH IN ALFALFA IN PHYTOTRON CHAMBERS.....	27
TABLA 3 EFFECT OF INOCULATION OF ENSIFER MELILOTI AND PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) WITH 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) DEAMINASE ACTIVITY IN ALFALFA NODULE NUMBER, NODULE DRY WEIGHT, ROOT LENGTH AND CROWN DIAMETER UNDER GREENHOUSE CONDITIONS.	28
TABLA 4 PESO SECO DE MATERIA SECA, LONGITUD DE RAÍCES, DIÁMETRO DE CORONA DEL TALLO Y NUMERO DE NÓDULOS RADICULARES, EN BASE AL EFECTO DE LAS CO-INOCULACIONES CON PGPR CON ACTIVIDAD ACC DEAMINASA, EN PLANTAS DE ALFALFA SOMETIDAS A UN CICLO DE 12 DÍAS DE DÉFICIT	41
TABLA 5 PRESIÓN OSMÓTICA, CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA), ÍNDICE DE CLOROFILA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA, EN BASE AL EFECTO DE LAS CO-INOCULACIONES CON PGPR CON ACTIVIDAD ACC DEAMINASA, EN PLANTAS DE ALFALFA SOMETIDAS A UN CICLO DE 12 DÍAS DE DÉFICIT HÍDRICO Y UN CICLO DE 20 DÍAS DE DÉFICIT HÍDRICO	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 NEIGHBOR JOINING PHYLOGENETIC TREE BASED ON 16S rRNA SEQUENCING OF BACTERIAL ISOLATES GN-2, GN-4, AND GN-8. BOOTSTRAP VALUES ARE INDICATED ON BRANCHES ONLY WHEN HIGHER THAN 70. THE TYPE STRAINS SEQUENCES IN THE PHYLOGRAM WERE OBTAINED FROM GENBANK (ACCESSION NUMBER IN PARENTHESES).	25
FIGURA 2 DIAGRAMA DE TRATAMIENTOS DE SEQUÍA DENTRO DEL EXPERIMENTO.....	38
FIGURA 3 RELACIÓN DE ÁREA FOLIAR (LAR) Y ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA (SLA) EN DOS CICLOS DE DÉFICIT HÍDRICO.....	42
FIGURA 4 RENDIMIENTO CUÁNTICO MÁXIMO F_v/F_m ($F_m - F_0/F_m$); RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL FOTOSISTEMA II (Φ_{PSII}) ($(F'_m - F_t)/F'_m$) Y TASA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES (ETR) DURANTE UN PERIODO DE 12 DÍAS DE SEQUÍA.....	46
FIGURA 5 RENDIMIENTO CUÁNTICO MÁXIMO F_v/F_m ($F_m - F_0/F_m$); RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL FOTOSISTEMA II (Φ_{PSII}) ($(F'_m - F_t)/F'_m$) Y TASA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES (ETR) DURANTE UN PERIODO DE 20 DÍAS DE SEQUÍA.....	48

RESUMEN

Los problemas ambientales actuales generados por el cambio climático afectan gravemente al área agrícola mundial a través de sequías prolongadas, lluvias excesivas, aumento de la temperatura, etc. El efecto de la sequía en los cultivos especialmente en las leguminosas como la alfalfa, provoca reducción de la producción de biomasa y bajas tasas de nodulación, afectando directamente la fijación biológica del nitrógeno por efecto de los rizobios asociados al sistema radicular. Las plantas sometidas a estrés hídrico presentan cambios en su anatomía y fisiología, a través de la reducción del área foliar, cambios en la estructura radicular, incremento en la concentración de osmoprotectantes, aumento en la concentración del etileno en los tejidos. El etileno es considerado un regulador del crecimiento vegetal, que bajo condiciones de estrés activa mecanismos de defensa en las plantas, sin embargo, el déficit hídrico induce un aumento excesivo de los niveles de Etileno, generando clorosis, senescencia de hojas y nódulos, incluso ocasionando la muerte a las plantas. La inoculación con Bacterias promotoras de crecimiento vegetal con actividad 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC deaminasa), permiten reducir los niveles del etileno en plantas estresadas, favoreciendo la tolerancia a la sequía. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar e identificar bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a la alfalfa capaces de producir ACC deaminasa, ácido indol acético (AIA) y de solubilizar fósforo, que en co-inoculación con *Ensifer meliloti*, rizobio específico de la alfalfa, promuevan la nodulación temprana y crecimiento de la alfalfa, así como tolerancia al estrés hídrico. Se aislaron cepas bacterianas desde la rizosfera de la alfalfa cultivada en suelos de secano en áreas mediterráneas de Chile. En las cepas aisladas se evaluó, la actividad de la enzima ACC deaminasa, la producción de AIA, solubilización de fósforo y la compatibilidad de éstas con *Ensifer meliloti*. Cepas seleccionadas por la actividad ACC deaminasa y por la alta producción de AIA y solubilización de fósforo fueron identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA. En un experimento en fitorón, se evaluó la nodulación temprana en alfalfa por efecto de la co-inoculación con cepas bacterianas con actividad ACC deaminasa. Un segundo ensayo fue realizado en invernadero, utilizando macetas de tubos PVC de 11 L, donde plantulas de alfalfa fueron inoculadas con cepas de

Bacillus sp. y *Pseudomonas* sp. con actividad ACC deaminasa junto con una cepa efectiva de *Ensifer meliloti*. A los 45 días de crecimiento con riego controlado, fueron sometidas a dos periodos de 12 y 20 días de sequía. Se evaluó el número de nódulos, conductancia estomática, área específica de hojas y fluorescencia de la clorofila. De los 32 aislados bacterianos obtenidos, 12 cepas mostraron compatibilidad con *Ensifer meliloti*. De éstas, ocho cepas fueron capaces de solubilizar el Fosforo, y las doce cepas produjeron AIA en rangos desde los 13.71 a 26.22 mg L⁻¹. Sin embargo, solo una cepa aislada GN-8 mostró actividad ACC deaminasa, reportando significativamente (P<0.05) mayor nodulación en condiciones de laboratorio e invernadero. Las cepas productoras de AIA y solubilizadoras de fósforo no tuvieron un efecto significativo en el desarrollo radicular, aéreo ni en la nodulación. La cepa con actividad ACC deaminasa fue identificada como *Bacillus* sp. En el ensayo en invernadero la nodulación fue mejorada en un 20% en condiciones de sequía. La conductancia estomática fue mayor (P<0.05) con 142 mmol m² s⁻¹ al co-inocular con *Bacillus* sp. El área foliar específica fue mayor en un 20% en los tratamientos co-inoculados con PGPR. El efecto ACC deaminasa bacteriano reflejó mayor rendimiento cuántico del fotosistema II durante las horas de mayor intensidad luminosa. En conclusión, cepas colectadas de la rizosfera de la alfalfa del área mediterránea de Chile, muestran actividad ACC deaminasa, producción de AIA y solubilización de fsoforo. La co-inoculación de alfalfa con bacterias productoras de ACC-deaminasa y *Ensifer meliloti*, induce la nodulación temprana y mejora las características morfológicas y fisiológicas del cultivo en condiciones de sequía.

SUMMARY

The current environmental problems derived from climate change are severely hitting the world's agricultural area through prolonged droughts, excessive rains, an increase in temperature, etc. The effect of drought on crops, especially legumes such as alfalfa, causes a reduction in biomass production and low nodulation rates, directly affecting biological nitrogen fixation produced by root nodule bacteria or rhizobia. Plants subjected to water stress show anatomical and physiological changes, through the reduction of leaf area, changes in root structure, increased concentration of osmoprotectants, increased concentration of ethylene in tissues, etc. Ethylene is considered a plant growth regulator, which under stress conditions, activates defense mechanisms in plants. However, water stress increases excessively the levels of Ethylene, generating chlorosis, leaves and nodules senescence, and even plant death. Inoculation with plant growth promoting bacteria with ACC deaminase activity, reduce the levels of ethylene in stressed plants, favoring tolerance to drought. The objective of the present work was to select and identify alfalfa-associated plant growth promoting bacteria with ACC deaminase activity and able to produce Indole Acetic Acid (IAA) and to solubilize phosphorous, which in co-inoculation with *Ensifer meliloti*, alfalfa specific rhizobia, promote early nodulation and growth of alfalfa, as well as tolerance to water stress. Bacterial strains were isolated from the rhizosphere of alfalfa grown in rainfed soils in Mediterranean areas of Chile. Bacterial ACC deaminase activity, IAA production, Phosphorus solubilization and compatibility with *Ensifer meliloti* were evaluated. Strains selected for the ACC deaminase activity and for the high production of IAA and phosphorous solubilization of were identified by the amplification of the 16S rRNA gene. In a pot experiment in a phytotron chamber, alfalfa seeds were sown and inoculated bacterial strains with ACC activity deaminase plus the specific rhizobia to evaluate the effect in early nodulation. A second experiment was carried out in the greenhouse, using 11 L PVC tubes as pots where alfalfa seeds were inoculated with *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp., strains with ACC deaminase activity, together with an effective strain of *Ensifer meliloti*. After 45 days of growth under controlled irrigation, they

were subjected to two periods of 12 and 20 days of drought. The number of nodules, stomatal conductance, specific leaf area and fluorescence of chlorophyll were evaluated. From the 32 bacterial strains, 12 b strains showed compatibility with *Ensifer meliloti*. From these, eight strains were able to solubilize phosphorus, and all twelve were IAA producers, ranging from 13.71 to 26.22 mg L⁻¹ IAA. However, only one isolate, GN-8 showed ACC deaminase activity, reporting significantly (P <0.05) greater nodulation in laboratory and greenhouse conditions. The IAA producing strains and the phosphorous solubilizers did not show a significant effect in aerial and root growth nor in alfalfa nodulation. The strain with ACC deaminase activity was identified as *Bacillus* spp. In the greenhouse experiment the nodulation was improved by 20% under drought conditions. The stomatal conductance was greater (P <0.05) with 142 mmol m² s⁻¹ when co-inoculated with *Bacillus* sp. The specific leaf area was greater by 20% in the treatments co-inoculated with PGPR. The bacterial ACC deaminase effect reflected greater quantum performance of photosystem II during the hours of higher luminous intensity. In conclusion, strains collected from the rhizosphere of alfalfa growing in the Mediterranean area of Chile, show ACC deaminase activity, produce IAA and solubilize phosphorous. Co-inoculation of alfalfa with ACC deaminase producing bacteria and *Ensifer meliloti*, induces earlier nodulation and improves nodulation as well as morphological and physiological characteristics of the crop under drought conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés por sequía, efecto y respuesta fisiológicos

El cambio climático está basado en la alteración de factores ambientales, ocasionando grandes daños al mundo especialmente en la agricultura, reduciendo la producción de los cultivos, sobre todo en zonas áridas y semiáridas donde el suministro de agua a través de riegos aún es escaso (Qaderi 2014). El déficit hídrico acarrea importantes consecuencias para la fisiología y la morfología de las plantas provocando a corto, y mediano plazo un descenso del potencial hídrico, del contenido relativo de agua y de la conductividad estomática (Medrano *et al.* 2007), resultando en impactos negativos en el crecimiento y producción de las plantas, cambios anatómicos por modificaciones en el tamaño de las células, senescencia y hasta la muerte en muchas especies (Morales *et al.* 2013). El estrés hídrico reduce el intercambio gaseoso limitando la fotosíntesis y producción de biomasa (Erice *et al.* 2007; Erice *et al.* 2006), bajo condiciones de déficit hídrico en periodos prolongados se presenta modificación del área específica de las hojas (Erice *et al.* 2010), provocando menor área foliar expuesta a radiación solar (Álvarez *et al.* 2009).

Investigaciones en varios cultivos hacen referencia a que el primer proceso fisiológico afectado por los distintos niveles de sequía, es la fotosíntesis la cual declina a medida que el déficit hídrico vaya en aumento (Erice *et al.* 2011). Álvarez *et al.* (2009) estudió las respuestas morfológicas y fisiológicas en plantas de *Dianthus sp* sometidas a déficit hídrico moderado y severo, mostrando una relación directa entre baja conductancia estomática y disminución de la tasa fotosintética.

Las plantas en crecimiento desarrollan varias estrategias al déficit hídrico para aliviar, tolerar y adaptarse a las tensiones que pueda provocar (Whitmore y Whalley 2009). Incluso algunas plantas anuales son capaces de mostrar estrategias de escapar a la sequía (Valladares *et al.* 2004), completando su ciclo de vida en la primavera y produciendo semillas que pueden soportar la falta de agua por periodos prolongados (Lelièvre *et al.* 2011). Los metabolismos fotosintéticos C4 y CAM permiten una mayor concentración de CO₂ en las células especializadas, estando en equilibrio con la atmosfera (Moreno 2009). En líneas de trigo se ha reportado resultados de actividad de enzimas PEPcase, PPDK, NADP-MDH y NADP-ME, el cual siendo claves para la

fijación de CO₂ en las plantas C4, también permite mayor eficiencia fotosintética en plantas C3 (Yang *et al.* 2006).

Para mantener la hidratación de los tejidos y la fotosíntesis, las plantas deben reemplazar el agua perdida en la transpiración (Mcdowell *et al.* 2008) desarrollando modificaciones anatómicas, aumentando la expansión radical, disminuyendo el área foliar (Moreno 2009), la conductancia estomática y los cambios de las propiedades hidráulicas del xilema (Bacelar *et al.* 2007). Además la senescencia de las hojas es el mayor regulador en la actividad endógena de los procesos asociados, contribuyendo a reducir la pérdida de agua e induciendo la dormancia de las plantas para su sobrevivencia (Lelièvre *et al.* 2011).

Señales químicas mediante el incremento de ácido abscísico (ABA), pH, precursor de etileno y malato, son enviados desde las raíces hacia las hojas en respuesta inmediata al estrés hídrico induciendo el cierre estomático (Schachtman y Goodger 2008). Además, respuestas bioquímicas generadas debido a la disminución del potencial osmótico a través de acumulaciones de solutos Inorgánicos (K⁺, Ca₂⁺, Mg₂⁺) y orgánicos (prolina, ácido aspártico, proteínas y azúcares) (Yu *et al.* 2014), flujos de salidas de K⁺ y Ca₂⁺ en el mesófilo de la hoja regula la respuesta a la sequía (Mak *et al.* 2014). A pesar que el ABA está enrolado generalmente en el cierre estomático como respuesta directa a tolerar el estrés hídrico, reportes descritos por Sharp y LeNoble (2002), demuestran la importancia del ABA sobre el crecimiento de raíces bajo condiciones de sequía, regulando el efecto negativo del etileno sobre el desarrollo radical.

A pesar de los roles fisiológicos en los diferentes estados de desarrollo, el etileno fue reportado originalmente como una hormona de estrés (Wang *et al.* 2002). La síntesis de etileno es afectada por factores como temperatura, luz, gravedad, nutrición, interacciones hormonales y ataques de plagas y enfermedades que las plantas están sometidas (Glick 2014), induciendo la producción y acumulación en los tejidos vegetales provocando la senescencia, clorosis, abscisión de los procesos hasta causar la muerte de las plantas (Nascimento *et al.* 2012). La producción de etileno en respuesta al marchitamiento generado por efecto de sequía está dado principalmente por el incremento en la síntesis de 1-Aminociclopropano-1-Carboxílico (ACC) en los tejidos que luego se convierte en etileno (Yang y Hoffman 1984). Los resultados en un estudio

generado por Apelbaum y Yang (1981) para determinar en qué etapa durante la biosíntesis de etileno era el responsable del aumento de la producción de etileno causada por el déficit hídrico, indican que en un periodo de cuatro horas de sequía los niveles de ACC en los tejidos aumentan considerablemente, estando directamente relacionado con el aumento proporcional en la síntesis de etileno.

En leguminosas bajo déficit hídrico aún no está claro qué etapa de la nodulación es afectada negativamente por el etileno, sin embargo estudios realizados por Oldroyd *et al.* (2001) demuestran que el etileno inhibe múltiples respuestas, tanto la iniciación del hilo de infección, bloqueo del hilo de infección, inhibición del rápido aumento de calcio en la señalización de los Nod Factor y regulando la expresión de genes RIP1 y ENOD11 (Oldroyd *et al.*, 2001)

1.2. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Los microorganismos del suelo como bacterias, hongos y actinobacterias, relacionados con los vegetales se encuentran tanto en la endorizósfera y rizósfera de las plantas, alimentándose de los exudados que las raíces secretan constantemente (Starkey 1958), atribuyéndoseles funciones específicas en la promoción de crecimiento y desarrollo, especialmente en los cultivos bajo condiciones de suelos con niveles nutricionales limitados o con propiedades físico químicas muy pobres (Egamberdiyeva 2007). Entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés *Plant growth promoting rhizobacteria*), se encuentran aquellas que viven en la exorizósfera de las plantas y otras que se encuentran en los tejidos de raíces y tallos (Nascimento *et al.* 2014). Aplicaciones de bacterias promotoras del crecimiento vegetal se presentan como una alternativa para el uso de agroquímicos mejoradores del crecimiento de las plantas (Lucy *et al.* 2004), demostrando un importante rol en la productividad de los cultivos, especialmente desarrollados en condiciones de suelo, y factores climáticos adversos (Glick 2014).

Las PGPR afectan positivamente el desarrollo de las plantas mediante mecanismos indirectos como la producción de antibióticos contra bacterias patógenas, reducción del Hierro para los fitopatógenos de la rizósfera, síntesis de enzimas y competencia contra organismos perjudiciales en las raíces de las plantas (Khan 2005; Lucy *et al.* 2004). Sin embargo, dentro de los mecanismos directos más efectivos en la

promoción del crecimiento de los vegetales se encuentra: la solubilización del fósforo, fijación del Nitrógeno atmosférico, el secuestro del Hierro a través de los sideróforos, la producción de hormonas vegetales como auxinas, giberelinas y citoquinas (Khan 2005; Gray y Smith 2005), además del mecanismo de producción de enzimas ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC deaminasa) bajando los niveles de etileno en las plantas bajo estrés bióticos y abióticos (Glick 2014).

Presencia de bacterias productoras de ACC deaminasa en el sistema radical origina cambios en la arquitectura de las raíces, promoviendo el desarrollo de raíces laterales (Shahzad *et al.*, 2010). Varias cepas bacterianas como *Pseudomonas fluorescens* YsS6, *Pseudomonas migulae* 8R6 (Rashid *et al.* 2012) *Pseudomonas putida* UW4 (Nascimento *et al.* 2011) *Agrobacterium genomovars*, *Azospirillum lipoferum*, *Alcaligenes*, *Bacillus* *Enterobacter* (Singh *et al.* 2011), *Burkholderia* (Pandey *et al.* 2005), *Rhizobium* (Wenbo *et al.* 2003), *Rhodococcus*, *Variovorax paradoxus* (Belimov *et al.* 2005) *Methylobacterium* sp (Yim *et al.* 2013) y *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 al que se le incorporó el gen *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 (Nascimento *et al.* 2011) han sido aisladas y caracterizadas por la producción de la enzima ACC deaminasa (Glick 2014),

La enzima ACC deaminasa degrada y consume el precursor de etileno aminociclopropano carboxylic acid (ACC) (Yang *et al.* 2009; Zhuang *et al.* 2007), o inhibe a la enzima ACC sintasa (Hardoim *et al.* 2008). Al romperse el ACC precursor de etileno por efecto de la enzima ACC deaminasa, es transformado a alfa-ketobutyrate y amonio, proporcionando a las bacterias una fuente de Nitrógeno (Penrose y Glick 2003). La actividad de esta enzima es un factor clave en la habilidad de las PGPR para estimular el crecimiento de las raíces de las plantas (Glick *et al.* 1998) confiriendo una tolerancia sistémica inducida bajo déficit hídrico (Yang *et al.* 2009). Por lo general cepas de rizobios que expresan ACC deaminasa son hasta 40% más eficientes en la formación de nódulos que las cepas que carecen de esta actividad, pero su nivel de actividad del 2 al 4% para expresar ACC deaminasa (Glick 2014).

Aplicaciones en plántulas de pimiento (*Capicum annum L.*) de *Bacillus licheniformes*, *Brevibacterium iodinum* y *Zhihengliuella alba* productoras de ACC deaminasa, mejoraron el desarrollo radicular y acumulación de materia seca bajo condiciones de estrés por salinidad 150nM NaCl (Siddikee *et al.*, 2011). En tomate bajo

estrés salino, bacterias endófitas *Pseudomonas fluorescens* con producción de ACC deaminasa, presentan mayor contenido de clorofila y mayor número de flores (Ali *et al.*, 2014). En arveja se estudió el efecto de una bacteria *Arthrobacter protophomiae* (ACC deaminasa) sobre la nodulación en condiciones de salinidad, reportando hasta un 50% adicional de nódulos frente a plantas sin inoculación (Barnawal *et al.*, 2014).

1.3. Alfalfa (*Medicago sativa*)

El cultivo de alfalfa es una forrajera con altos niveles de proteínas, adaptada a condiciones edafoclimáticas variadas, cultivada principalmente en los Estados Unidos y varios países Europeos (Erice *et al.* 2010), fundamental por el uso en la alimentación de animales de granjas. En Chile la producción de alfalfa se extiende desde las regiones Centro-Norte hasta regiones Centro-Sur, aunque la acidez de los suelos derivados de cenizas volcánicas perjudican la simbiosis con rizobios (Guiñazù *et al.*, 2013). La alfalfa establece simbiosis específicamente con cepas de *Ensifer* (*Sinorizobium*) *meliloti*, bacteria responsable de la nodulación y fijación de Nitrógeno (Pini *et al.*, 2012).

La nodulación en las leguminosas es un proceso dado por señales bioquímicas tanto desde las plantas a través de compuestos aromáticos flavonoides, así como de los compuestos bacterianos denominados Nod Factors (Jones *et al.*, 2007). Se ha reportado mejoras importante en el incremento de la nodulación, a través de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento, mediante la solubilización de fosforo, producción de AIA entre otras características (Masciarelli *et al.*, 2014). No obstante la nodulación es inhibida por el aumento del etileno (Shahzad *et al.*, 2010) en respuesta a señales de defensa a interacciones de las plantas con otros microorganismos (Jones *et al.*, 2007).

Mediante el efecto del cambio climático muchas de las áreas destinadas a leguminosas forrajeras como la alfalfa está siendo muy afectadas por el déficit hídrico que causa estrés en las plantas y que muy a menudo repercute negativamente en el desarrollo y crecimiento (Erice *et al.* 2010), llegando a reducir hasta en un 43% la materia seca de los órganos superficiales como tallos y hojas, y un 23% en los órganos subterráneos como materia seca de raíces y nódulos (Erice *et al.* 2006), además de provocar la caída de los nódulos relacionado directamente con la fijación del nitrógeno atmosférico a través de simbiosis con *Ensifer meliloti* (Antolín *et al.* 1995), incrementando los niveles de etileno en el sistema radicular (Bernawal *et al.*, 2014)

En un trabajo realizado por Shahzad *et al.*, (2010) con el uso de bacterias de vida libre con habilidad de producir ACC deaminasa co-inoculadas con rizobios y a través de los avances biotecnológicos mediante la inserción de genes de ACC deaminasa desde bacterias productoras en rizobios se han logrado mejorar los niveles de nodulación, crecimiento radicular y mejoras en la fijación de nitrógeno en leguminosas (Wenbo *et al.*, 2003; Tittabutr *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de los avances de mejoramiento genético, a través de variedades de alfalfa tolerantes a condiciones adversas como déficit hídrico y altas temperaturas (Ovalle *et al.*, 2015), se desconoce el efecto de la co-inoculación del *Ensifer meliloti* con bacterias de vida libres productoras de enzimas ACC deaminasa, sobre la tolerancia al estrés por sequía, promoción del crecimiento y su efecto en la nodulación en el cultivo de alfalfa.

1.4. HIPÓTESIS

Bacterias PGPR inductoras del ACC deaminasa aisladas de la rizósfera de alfalfa son capaces de proporcionar tolerancia al estrés hídrico e inducir una mayor nodulación temprana

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. GENERAL

Seleccionar bacterias asociadas a la rizósfera de la alfalfa (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) capaces de promover tolerancia a sequía y promover la nodulación

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar e identificar bacterias PGPR asociadas a alfalfa capaces de producir ACC deaminasa, ácido indol acético y de solubilizar fósforo
- Determinar el efecto de co-inoculación *Ensifer meliloti*-PGPR en la nodulación y crecimiento en la alfalfa

- Evaluar el efecto de la co-inoculación *Ensifer meliloti*-PGPR en alfalfa en la tolerancia al estrés hídrico

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, S., Navarro, A., Bañón, S., Sanchez, M. (2009). Regulated deficit irrigation in potted *Dianthus* plants: Effects of severe and moderate water stress on growth and physiological responses. *Scientia Horticulturae*, 122(4), pp.579–585.
- Ali, S., Charles, T., Glick, B. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, pp. 160-167.
- Antolín, M., Yoller, J., Sánchez, M. (1995). Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Plant Science*, 107(2), pp.159–165.
- Apelbaum, A., Fa Yang, S. (1981). Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. *Plant physiology*, 68(3), pp.594–6.
- Bacelar, E., Moutinho, J., Goncalves, B., Ferreira, H., Correia, C. (2007). Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), pp.183–192.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Singh, C., Kalra, A. (2014). ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*, 171, pp. 884-894.
- Belimov, A., Hontzeas, N., Safronova, V., Demchinskaya, S., Piluzza, G., Bullitta, S., Glick, B. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), pp.241–250.
- Carillo, P., Gibon, Y. (2011). PROTOCOL : Extraction and determination of proline. PrometheusWiki.

- Dworkin, M., Foster, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of bacteriology*, 75(5), pp.592–603.
- Egamberdiyeva, D., (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), pp.184–189.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J., Sanchez, M., Avice, J.(2010). Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of plant physiology*, 167(2), pp.114–20.
- Erice, G., Irigoyen, J., Sanchez, M., Avice, J., Ourry, A. (2007). Effect of drought, elevated CO₂ and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins (VSP) in taproot of nodulated alfalfa before and after cutting. *Plant Science*, 172(5), pp.903–912.
- Erice, G., Irigoyen, J., Pérez, P., Carrasco, R., Sánchez, M. (2006). Effect of elevated CO₂, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Science*, 170(6), pp.1059–1067.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J., Sanchez, M., Thami, I., Avice, J. (2011). Water use efficiency, transpiration and net CO₂ exchange of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), pp.123–130.
- Gerding, M., Moraga, G., Cedeño, G., Oyarzúa, P., Sepúlveda, M. (2016). Bacterias de la rizósfera productoras de ACC-deaminasa y auxinas promueven mayor nodulación temprana en alfalfa (*Medicago sativa*). Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Londrina, Brasil. 6-9 de junio, 2016.
- Glick, B., Penrose, D., Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190(1), pp.63–8.
- Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), pp.30–9.
- Gray, E., Smith, D. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), pp.395–412.

- Guang, S., Na, L., Zhan, Z., Shuang, Y., Chang, C. (2010). Growth, yield and water use efficiency response of greenhouse-grown hot pepper under Time-Space deficit irrigation. *Scientia Horticulturae*, 126(2), pp.172–179.
- Guinazú, L., Andrés, J., Rovera, M., Balzarini, M., Rosas, S. (2013). Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. in vitro. *European Journal of Soil Biology*, 54, pp. 69-77.
- Hardoim, P., van Overbeek, L., van Elsas, J. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), pp.463–71.
- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, M., Walker, G. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature review*, 5, pp.619-633.
- Kakani, V., Vu, J., Hartwell, I., Boote, K. (2011). Leaf photosynthesis and carbohydrates of CO₂-enriched maize and grain sorghum exposed to a short period of soil water deficit during vegetative development. *Journal of plant physiology*, 168(18), pp.2169–76.
- Khan, A. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 18(4), pp.355–64.
- Lelièvre, F., Seddaiu, G., Ledda, L., Porqueddu, C., Volaire, F. (2011). Water use efficiency and drought survival in Mediterranean perennial forage grasses. *Field Crops Research*, 121(3), pp.333–342.
- Li, Z., Chang, S., Lin, L., Li, Y., An, Q. (2011). A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in Applied Microbiology*, 53, pp. 178-185.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), pp.1–25.
- Mak, M., Babla, M., Xu, S., O’Carrigan, A., Liu, X., Gong, Y., Holford, P., Chen, Z. (2014). Leaf mesophyll K⁺, H⁺ and Ca²⁺ fluxes are involved in drought-induced

- decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. *Environmental and Experimental Botany*, 98, pp.1–12.
- McDowell, N., Pockman, W., Allen, C., Breshears, D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D., Yezzer, E. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought : why do some plants survive while others succumb to drought?. *New Phytologist*, 178, pp. 719-739.
- Masciarelli, O., Llanes, A., Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169, pp. 609-615.
- Medrano, H., Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas, M., Guals, J. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, 43, pp.63–84.
- Morales, C., Pino, M., del Pozo, A. (2013). Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 162, pp.234–241.
- Moreno, L., 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico . Una revisión Plant responses to water deficit stress . A review. *Agronomía Colombiana*, 27(2), pp.179–191.
- Nascimento, F., Brígido, C., Alho, L., Glick, B., Oliveira, S. (2011). Enhanced chickpea growth-promotion ability of a *Mesorhizobium* strain expressing an exogenous ACC deaminase gene. *Plant and Soil*, 353(1-2), pp.221–230.
- Nascimento, F., Brígido, C., Glick, B., Oliveira, S., Alho, L. (2012). *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. *Letters in applied microbiology*, 55(1), pp.15–21.
- Nascimento, F., Rossi, M., Soares, C., McConkey, B., Glick, B. (2014). New insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *PLoS ONE*, 9(6).
- Oldroyd, G., Engstrom, E., Long, S. (2001). Ethylene Inhibits the Nod Factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant cell*, Vol. 13, pp. 1835-1949.
- Ovalle, C., Espinoza, S., Barahona, V., Gerding, M., Humphries, A., del Pozo, A. (2015). Lucerne and other perennial legumes provide new options for rain fed

- livestock production in the Mediterranean-climate region of Chile. *Ciencia e investigación Agraria*, 42 (3), pp. 461-474.
- Pandey, P., Kang, S., Maheshwari, D. (2005). Isolation of endophytic plant growth promoting Burkholderia sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science*, 89(1), pp.177–180.
- Parsa, S., Ortiz, V., Vega, F. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of visualized experiments. JoVE*, (74), pp.1–5.
- Penrose, D., Glick, B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology Plant*, 118(1), pp.10–15.
- Pini, F., Frascella, A., Santopolo, L., Bazzicalupo, M., Biondi, E., Scotti C. (2012). Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BMC Microbiol* 12:78.
- Qaderi, M., Kurepin, L., Reid, D. (2012). Effects of temperature and watering regime on growth, gas exchange and abscisic acid content of canola (*Brassica napus*) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 75, pp.107–113.
- Rashid, S., Charles, T., Glick, B. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, pp.217–224.
- Schachtman, D., Goodger, J. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13(6), pp. 1360-1385.
- Shahzad, S., Khalid, A., Arshad, M., Tahir, J., Mahmood, T. (2010). Improving nodulation, growth and yield of *Cicer arietinum* L. through bacterial ACC-deaminase induced changes in root architecture. *European Journal of Soil Biology*, 46, pp. 342-347.
- Sharp, R., LeNoble, M. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of experimental Botany*, 53 (366), pp. 33-37.
- Siddikee, A., Glick, B., Chauhan, P., Yim, W., Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-

- carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, pp.427-434.
- Singh, J., Pandey, V., Singh, D. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3-4), pp.339–353.
- Starkey, R. (1958). Interrelations between microorganisms and plant roots in the rhizosphere. *Bacteriological reviews*, 22(3), pp.154–72.
- Tittabutr, P., Awaya, J., Li, Q., Borthakur, D. (2008). The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, pp. 141-150.
- Wang, K., Li, H., Ecker, J. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, pp.131–152.
- Wenbo, M., Sebestionova, S., Jiri, S., Burd, G., Guinel, F., Glick, B. (2003). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 83(3), pp.285–291.
- Whitmore, A., Whalley, W. (2009). Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of experimental botany*, 60(10), pp.2845–57.
- Yactayo, W., Ramírez, D., Gutiérrez, R., Mares, V., Posadas, A., Quiroz, R. (2013). Effect of partial root-zone drying irrigation timing on potato tuber yield and water use efficiency. *Agricultural Water Management*, 123, pp.65–70.
- Yang, J., Kloepper, J., Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), pp.1–4.
- Yang, S., Hoffman, N. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Plant Physiology*, 35, pp. 155-189.
- Yang, X., Chen, X., Ge, X., Li, B., Tong, Y., Zhang, A., Li, Z., Kuang, T., Lu, C. (2006). Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 171(3), pp.389–397.

- Yim, W., Seshadri, S., Kim, K., Lee, G., Sa, T. (2013). Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 67, pp.95–104.
- Yu, Z., Chen, W., Zhang, Q., Yang, H., Tang, J., Weiner, j., Chen, X. (2014). Salt tolerance and stress level affect plant biomass–density relationships and neighbor effects. *Acta Oecologica*, 58, pp.1–4.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international*, 33(3), pp.406–13.



2. Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas of Chile: effects on early nodulation in alfalfa

George A. Cedeño-García^{1,4}, Macarena Gerding^{2*}, Gary Moraga², Luis Inostroza³, Susana Fischer², Maurine Sepúlveda-Caamaño², and Pía Oyarzúa²

Artículo Publicado en la revista Chilean Journal of Agricultural Research

¹Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ingeniería Agronómica, km 13.5 vía Portoviejo-Santa Ana, Ecuador.

²Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

*Corresponding author (mgerding@udec.cl).

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), INIA Quilamapu, Av. Vicente Méndez 515, Chillán, Chile.

⁴Universidad de Concepción, Programa de Doctorado en Ciencias de la Agronomía, Av. Vicente Mendez 595, Chillán, Chile.

2.1. ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) has emerged as an alternative crop for Mediterranean dryland areas in Chile. These soils show deficient nutritional levels affecting legume nodulation and N fixation through symbiosis with *Ensifer meliloti*. The objective of this work was to select plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) associated with alfalfa and to evaluate their effects in plant growth and nodulation. Bacterial strains were isolated from the rhizosphere of alfalfa cultivated in dryland soil in Mediterranean areas of Chile. The ACC deaminase activity, production of indole acetic acid (IAA), phosphate solubilization and the compatibility with *E. meliloti* was assessed for each strain. The selected bacterial strains were identified by the amplification of the 16S rRNA gene. Twelve of the 32 isolated strains were compatible with *E. meliloti* as they did not show signs of antagonism. Eight strains solubilized phosphate, 12 produced IAA ranging from 13.71 to 26.22 mg L⁻¹ and only the GN-8 isolate reported ACC deaminase activity. In the plants, the nodulation was greater when the strain with ACC deaminase and *E. meliloti* were co-inoculated both in laboratory

and greenhouse conditions ($P < 0.05$). The selected bacteria GN-2 and GN-8 belonged to the genus *Bacillus*, while GN-4 to *Pseudomonas*. In conclusion, PGPR collected in marginal soils of mediterranean areas of Chile showed ACC deaminase activity, IAA production and phosphate solubilization. The co-inoculation with *E. meliloti* and *Bacillus* sp. GN-8 allowed earlier nodulation in alfalfa.

Key words: ACC deaminase, alfalfa, *Medicago sativa*, nodulation, PGPR, phosphate solubilization, indole acetic acid.

2.2. INTRODUCTION

Alfalfa (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) is the most important and widely grown forage legume in the world (Bouton, 2012). Alfalfa establishes a symbiotic mutualistic relationship with the bacteria *Ensifer* (*Sinorizobium*) *meliloti*, through the formation of a root structure called nodule where N fixation occurs (Pini *et al.*, 2012). Nodulation in legumes is a process regulated by biochemical signals between plant and bacteria through flavonoid aromatic compounds secreted by the plant, and bacterial compounds known as Nod Factors (Ji *et al.*, 2017). Early nodulation is the key for a better establishment of this symbiotic relationship to ensure increased N fixation and plant biomass production (Pini *et al.*, 2012). Alfalfa can achieve fixation levels of 120-800 kg N ha⁻¹. However, in environments with adverse conditions for the rhizobia such as the Mediterranean dryland area of Chile, nodulation and symbiotic effectiveness in alfalfa may be drastically reduced (del Pozo *et al.*, 2017). Nodulation is inhibited by the increase of ethylene in response to defense signals from interactions of plants with other microorganisms and very often by periods of droughts and soil salinity (Shahzad *et al.*, 2010; Barnawal *et al.*, 2014).

Significant improvements in nodulation have been reported through inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) able to produce indole acetic acid (IAA) and with ACC deaminase activity (Rashid *et al.*, 2012; Sepúlveda-Caamaño *et al.*, 2018). The presence of ACC deaminase-producing bacteria in the root system reduces ethylene biosynthesis and increases the number of nodules, and produces changes in root architecture by promoting the development of lateral roots (Shahzad *et*

al., 2010). This is because ACC deaminase enzyme degrades and consumes the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) or inhibits the enzyme ACC synthase (Hardoim *et al.*, 2008). When the ethylene precursor ACC is broken by the enzyme ACC deaminase, it is converted to alpha-ketobutyrate and ammonium, providing the bacteria with a source of N (Penrose and Glick, 2003). Co-inoculating legumes with bacteria with ACC deaminase activity and rhizobia, can improve nodulation by up to 40%, therefore enhancing N fixation (Ma *et al.*, 2004; Shahzad *et al.*, 2010; Glick, 2014).

The objectives of this research were to select PGPR from alfalfa rhizosphere with ACC deaminase activity, capable of producing IAA and solubilizing phosphate and to evaluate the effect of the co-inoculation *Ensifer meliloti*-PGPR on early nodulation in alfalfa plants.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Collection and isolation of bacteria

Soil and alfalfa plants (10 samples) were collected from a rainfed area in Mediterranean central Chile Cauquenes (35°57'20.63" S, 72°17'9.14" W) an area characterized by granitic soils (ultic palexeralf), a soil pH of 7.0, 1.6% organic matter content, 2.3 mg kg⁻¹ of available mineral N, 12 mg kg⁻¹ of P and 185 mg kg⁻¹ K in the top 20 cm. To isolate bacteria from the endorhizosphere, the protocol described by Sepulveda-Caamaño *et al.* (2018) was used, where 1 g root was disinfected by immersion in 70% (v/v) ethanol for 30 s and rinsed in sterile distilled water for 1 min. To isolate bacteria from the exorhizosphere, 1 g soil firmly attached to the root was used. Samples of disinfected roots and soil were separately macerated in sterile mortars in 100 mL phosphate-buffered saline (PBS) solution (0.9% NaCl (v/v), 2.9 mM KH₂PO₄, 7.1 mM K₂HPO₄, pH 7.2) and stirred for 2 h at 150 rpm. The suspensions were diluted to concentrations of 10⁻³; from each dilution, 0.1 mL was inoculated in Petri dishes with standard nutrient agar medium (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA) and incubated at 25 °C for 48 h. Isolated colonies with distinctive morphological characteristics were selected and re-isolated on standard nutrient agar to obtain pure cultures. The isolates were cryopreserved at -80 °C in 20% glycerol (Oskouei *et al.*, 2010).

2.3.2. PGPR compatibility with *Ensifer meliloti*

The capacity of the PGPR isolates to grow together with the alfalfa specific inoculant *E. meliloti* strain AG-06 was tested. For this purpose, the rhizobacterial strains, in addition to AG-06 were placed in 5 mL of sterile saline solution (0.98% w/v) and the optical density was adjusted to 600 nm wavelength (OD_{600}) at 0.1. The suspensions were inoculated into nutrient agar plates and superficially distributed with a glass rod and were incubated at 25 °C. An agar disc showing bacterial growth was placed on the plates inoculated with *E. meliloti*, kept in incubation at 25 °C for 24 h prior to evaluation. When *E. meliloti* was not able to grow around the bacterial disc, the strain was discarded from future experiments. Only the isolates that were compatible with *E. meliloti* strain AG-06 were selected for the following experiments.

2.3.3. ACC deaminase activity of PGPR selected

An aliquot of 100 μ L of suspended cells (10^7 CFU mL^{-1}) of the selected strains, were inoculated onto 3 mL nutrient broth and incubated for 24 h at 200 rpm at a constant temperature of 25 °C. Then 1 mL of cell suspension was transferred to microtubes and centrifuged at 8000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was extracted and washed twice in Dworkin-Foster (DF) minimal salts medium (Dworkin and Foster, 1958) and centrifuged at 8000 rpm for 10 min at 4 °C. The cell pellet was then suspended in 500 μ L DF minimal media and incubated in a rotary shaker at 200 rpm and 25 °C for 24 h. Bacterial strains were inoculated onto three different media: Plates with 30 mL DF agar; DF agar with 1.5% ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), and DF agar with $(NH_4)_2SO_4$ as N source (Penrose and Glick, 2003). A droplet of 5 μ L of each strain was placed on each media. Strains with ACC deaminase activity: *Pseudomonas* sp. 8R6 wild type (WT) and *Pseudomonas fluorescens* YsS6 WT were included as positive controls; and two ACC deaminase mutant (acds) mutant strains, 8R6 acds and YsS6 acds, were included as negative controls (Rashid *et al.*, 2012). Colony growth was observed daily for 5 d.

2.3.4. Phosphate solubilization of PGPR selected

Phosphate solubilization was evaluated according to Chaiharn and Lumyong (2011). The isolates were grown in standard nutrient broth (Merck), shaken for 48 h at 150 rpm at 25 °C. Plates with Pikovskaya agar (glucose 10 g, Ca₃(PO₄) 25 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, yeast extract 0.5 g, MnSO₄ traces, FeSO₄ traces, 15 g agar, 1000 mL distilled water, pH 7-7.5) were inoculated with 4 µL pure bacterial culture. They were incubated at 25 °C for 48 h and the formation of the transparent halo was observed in each colony.

To quantify the solubilized phosphate, bacterial isolates capable of solubilizing phosphate were inoculated in sterile Falcon tubes with 10 mL Pikovskaya liquid medium (glucose 10 g, Ca₃(PO₄) 25g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ 7H₂ 0.1 g, yeast extract 0.5 g, MnSO₄ traces, FeSO₄ traces, distilled water 1000 mL, pH 7.3). In addition, a sample of Pikovskaya liquid medium without inoculation was used as control. Samples were incubated for 3 d in an orbital shaker at 150 rpm and 25 °C. Samples were then centrifuged (5804R centrifuge, Eppendorf International, Hamburg, Germany) at 11000 rpm for 2 min at 26 °C, and 4 mL supernatant was removed and transferred to new tubes. To quantify the solubilized P-PO₄, for method of Sadzawka et al. (2004) was applied with modifications. On 0.5 mL of supernatant, 1.5 mL distilled water were added plus 8 mL of the color development reagent.

2.3.5. IAA production of PGPR selected

Production of IAA was evaluated for the 12 selected bacterial strains. A 100 µL cell suspension was inoculated into 30 mL capacity glass test tubes with 5 mL nutrient broth (Merck), which were shaken for 24 h at 150 rpm at 25 °C. From the bacterial suspension, 1 mL was transferred into 2 mL eppendorf tubes, which were centrifuged at 10000 rpm for 10 min, then 600 µL supernatant were transferred to an eppendorf tube and 400 µL modified Salkowski reagent (0.5 M FeCl₃ and 35% perchloric acid) were added. After 30 min of standing at room temperature, absorbance was measured in a spectrophotometer (MRC, POP Optizen Bio, Korea) at a wavelength of 535 nm. The calibration curve was determined using IAA at concentrations from 0 to 50 mg L⁻¹. The absorbance data and IAA concentrations were adjusted to a linear regression (R = 0.999; P = <0.001).

2.3.6. Evaluation of nodulation rate in alfalfa plants

The strains GN-2, selected for higher IAA production and phosphate solubilization, GN-4 selected for phosphate solubilization, and GN-8 for ACC deaminase activity, were co-inoculated with *E. meliloti* (AG-06) on alfalfa seedlings. Inoculation vials 500 cm³, were filled to half volume with a sterilized substrate consisting of rock mineral wool and vermiculite 1:1 (v/v). Alfalfa seeds 'Alta Sierra Illapata' were disinfected by immersion in separate solutions of 70% (v/v) ethanol for 1 min, 3% (v/v) sodium hypochlorite 3 min, and then washed six times in sterile distilled water. Six seeds were sown per vial, and after emergence they were thinned to three. Once emerged, seedlings were inoculated with 1 mL bacterial suspension in 1% (w/v) sucrose at a DO₆₀₀ nm of 0.1, additionally 20 mL N-free nutrient solution was added [0.31 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0.21 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0.44 g L⁻¹ K₂SO₄; 0.06 g L⁻¹ FeEDTA; 0.05 g L⁻¹ CaSO₄; 0.116 mg L⁻¹ H₃BO₃ 0.116; 0.0045 mg L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O; 0.134 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0.01 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O and 0.06 mg L⁻¹ CoSO₄·7H₂O]. An uninoculated control was also included. The pots were kept in a phytotron with high pressure sodium lamps (400 W Gro-lux, Osram Sylvania Ltd., Danvers, Massachusetts, USA) with a minimum photosynthetic photon flux density (PPFD) of 400-500 mol m⁻² s⁻¹. Nodulation was assessed at 15, 25, and 35 d after inoculation. Four replicates were used per treatment applied.

2.3.7. Endophytic capacity of bacterial strains

Using the plants from the previous assay the endophytic capacity of the bacterial strains was determined according to the protocol by Parsa *et al.* (2013). Root and shoot fragments 3 cm long were washed in distilled water and disinfected superficially in 70% ethanol for 2 min, followed by immersion in 1% hypochlorite for 30 s, and finally four washes in sterile distilled water. The fragments were cut into 1 cm segments and sowed in standard nutrient agar plates, incubated for 48 h at 25 °C. The bacterial colonies developed from the ends of the cuts were re-isolated on standard nutrient agar and subject to the same growth conditions mentioned above. The same procedure was also performed with the nodules.

The obtained isolates were characterized by BOX-PCR genomic fingerprint using the primer BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Guiñazú *et al.*, 2013) in order to verify if they corresponded to the same strain applied in the inoculation treatments. The cell template was prepared by suspending three loops full of bacterial cells in sterile saline solution, which were washed 3 times via centrifugation at 5000 g for 5 min, and suspension in nuclease-free water, adjusted to OD₆₀₀ = 1.5. The sample was then subjected to a heat shock of 65 °C for 5 min and -20 °C for 5 min. The BOX-PCR reaction mixture consisted of 5.0 µL cell suspension, 0.3 µL GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 5.0 µL primer BOXA1R (10 µM), 1.5 µL MgCl₂ (25 mM), 5.0 µL 5x GoTaq Buffer (Promega), 0.5 µL dNTPs (10 mM) and 7.7 µL ultra pure water (Fisher Biotech, Wembley, Western Australia, Australia) to complete 25 µL (Marques *et al.*, 2008). The PCR conditions were 95 °C for 7 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, 52 °C for 1 min and 72 °C for 8 min, with a final extension at 72 °C for 16 min (Guiñazú *et al.*, 2013). PCR products were analyzed by pre-stained 2% (w/v) agarose gel electrophoresis with 1:10000 GelRed DNA gel stain (Biotium, Fremont, California, USA). Electrophoresis was carried out in the 1 × TAE buffered electrophoresis chamber (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 100 V for 3 h, then the bands were visualized in a UV transilluminator.

2.3.8. Identification of bacterial isolates

To identify the bacterial strains selected for the plant assay, partial amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA gene was performed, using the primers 8 F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 1492R (GGCTACCTTGTTACGACTT) (Sepúlveda-Caamaño *et al.*, 2018). A reaction mixture was prepared with 2 µL cell preparation, 0.5 µL Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 1 µL primers 8F and 1492R, 6.0 µL 25 mM MgCl₂, 20.0 µL 5x Fisher-Biotech polymerization Buffer and 69.5 µL ultra pure water to complete 100 µL per reaction. The PCR cycles were: 7 min at 95 °C followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, finally 72 °C for 5 min. Amplification of the genes was verified by electrophoresis. The PCR products were purified and sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Partial sequences of the 16S rRNA genes were analyzed with GeneTool Lite 1.0 software (2000, Doubletwest, Inc., Oakland, CA, USA). Sequence alignment and phylogenetic analyzes were carried out in MEGA 5.2

(Tamura *et al.*, 2011). The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-joining test with 1000 replicates. Type strains included in the phylogenetic tree were obtained from GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA).

2.3.9. Greenhouse experiment

The experiment was carried out in a polycarbonate greenhouse at the Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Quilamapu facilities, Chillán, Chile. Pots consisted in PVC plastic tubes of 11 cm in diameter × 100 cm high (11 L volume). The substrate was a mixture of perlite and vermiculite 1:1 (v/v), with a water retention capacity on a dry weight basis of 172%. The substrate was autoclaved at 90 °C for 15 min. Alfalfa seeds were disinfected as described before. Six seeds were sown in each pot, and 10 d after sowing were thinned to two. Plants were irrigated with 20 mL of the N free nutrient solution at a weekly basis.

The strains used in this trial were GN-8 isolated from alfalfa and AG-30 (YsS6 WT) as a positive control (Rashid *et al.*, 2012), both with ACC deaminase activity, in co-inoculation with *E. meliloti* AG-06. The inoculation was carried out at plant emergence with 1 mL bacterial suspension at a DO₆₀₀ of 0.06. In addition, 1 mL *E. meliloti* AG-06 inoculum at DO₆₀₀ of 0.1 was added. The inoculation was repeated after 8 d. Nodulation, root development, and aerial dry weight evaluations were performed 60 d after sowing. The root was carefully harvested, cleaned and washed free of soil. The root length was measured and the number of nodules per plant was determined. The nodules were placed in Eppendorf tubes and dried for 48 h at 70 °C, to determine their dry weight. Data were analyzed through an ANOVA and the comparison of means through the LSD test ($P \leq 0.05$).

2.4. RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1. Characterization of bacterial strains

A total of 32 bacterial strains were isolated from alfalfa rhizosphere from Cauquenes, a dryland area marked by water deficit (del Pozo *et al.*, 2017). Among plant growth promoting bacteria, there are those that live in the exorhizosphere of plants and others that are found in the tissues of roots and stems (Nascimento *et al.*, 2012), showing different specific functions that promote plant growth and development, especially in

soils with limited nutritional levels or with adverse physical and chemical properties for plant growth and development (Egamberdiyeva, 2007). Since the rhizobacteria isolates were intended to be used as co-inoculants to improve the symbiotic performance of *E. meliloti* strain AG-06, 20 of the 32 isolates were discarded as they were incompatible with AG-06 showing antagonistic activity towards the rhizobial inoculant. Thus, the remaining 12 strains are shown in Table 1. The selection of PGPR strains compatible with the specific rhizobia has enabled successful inoculation and improvements in many aspects of growth in some legume crops such as soybeans, beans and chickpeas (Masciarelli *et al.*, 2014), nodulation rates being the most favored in both, optimal growth conditions and under abiotic stress (Yadav and Prakash, 2014).

Tabla 1 Bacterial strains isolated from rhizosphere of alfalfa: compatibility with *Ensifer meliloti*, indol acetic acid IAA production, phosphate solubilization and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity.

Strain	Origin	Phosphate		ACC
		solubilization PO ₂	IAA production	deaminase activity
		mg L ⁻¹		
GN-1	Endorhizosphere	14.70 d	18.14 bc	-
GN-2	Endorhizosphere	90.73 ab	26.22 a	-
GN-4	Endorhizosphere	15.13 c	15.13 c	-
GN-7	Endorhizosphere	93.77 a	22.47 ab	-
GN-8	Endorhizosphere	-	14.03 c	+
GN-9	Endorhizosphere	93.37 a	19.07 bc	-
GN-15	Endorhizosphere	-	15.70 bc	-
GN-18	Endorhizosphere	-	13.71 c	-
GE-4	Exorhizosphere	80.50 b	19.70 abc	-
GE-5	Exorhizosphere	-	20.13 abc	-
GE-6	Exorhizosphere	88.40 ab	16.79 bc	-
GE-11	Exorhizosphere	87.05 ab	17.18 bc	-

Fuente: Elaboración Propia

Different letters represent significant differences according to LSD test (P < 0.05).

GN: Isolated from the endorhizosphere; GE: isolated from the exorhizosphere.

The 12 selected strains produced IAA at varying concentrations, ranging from 13.71 to 26.22 mg IAA L⁻¹ (Table 1). Among bacterial strains, GN-2, GN-7, GE-4 and GE-5 outstood for producing significantly higher amounts of IAA compared to other strains. IAA is a key regulator of plant growth, as it participates in metabolic processes such as elongation and cell division, apical dominance, tropism and vascular differentiation (Glick, 2014). The synthesis of bacterial IAA is generated from tryptophan as a direct precursor through three synthesis pathways (Duca *et al.*, 2014), and its concentration is regulated by the ability of each bacterial strain and not by the concentration of tryptophan (Rashid *et al.*, 2012). The effect of bacterial IAA production on plants has been widely reported in different crops (Ali *et al.*, 2004), significantly improving physiological and agronomic parameters (Barrucha *et al.*, 2013). IAA compounds play an important role in the formation of lateral and adventitious roots (Kisiel and Kepczynska, 2016), and in the proliferation of cortical cells at the time of nodulation and expression of ligated genes in early nodulation (Suzaki *et al.*, 2013).

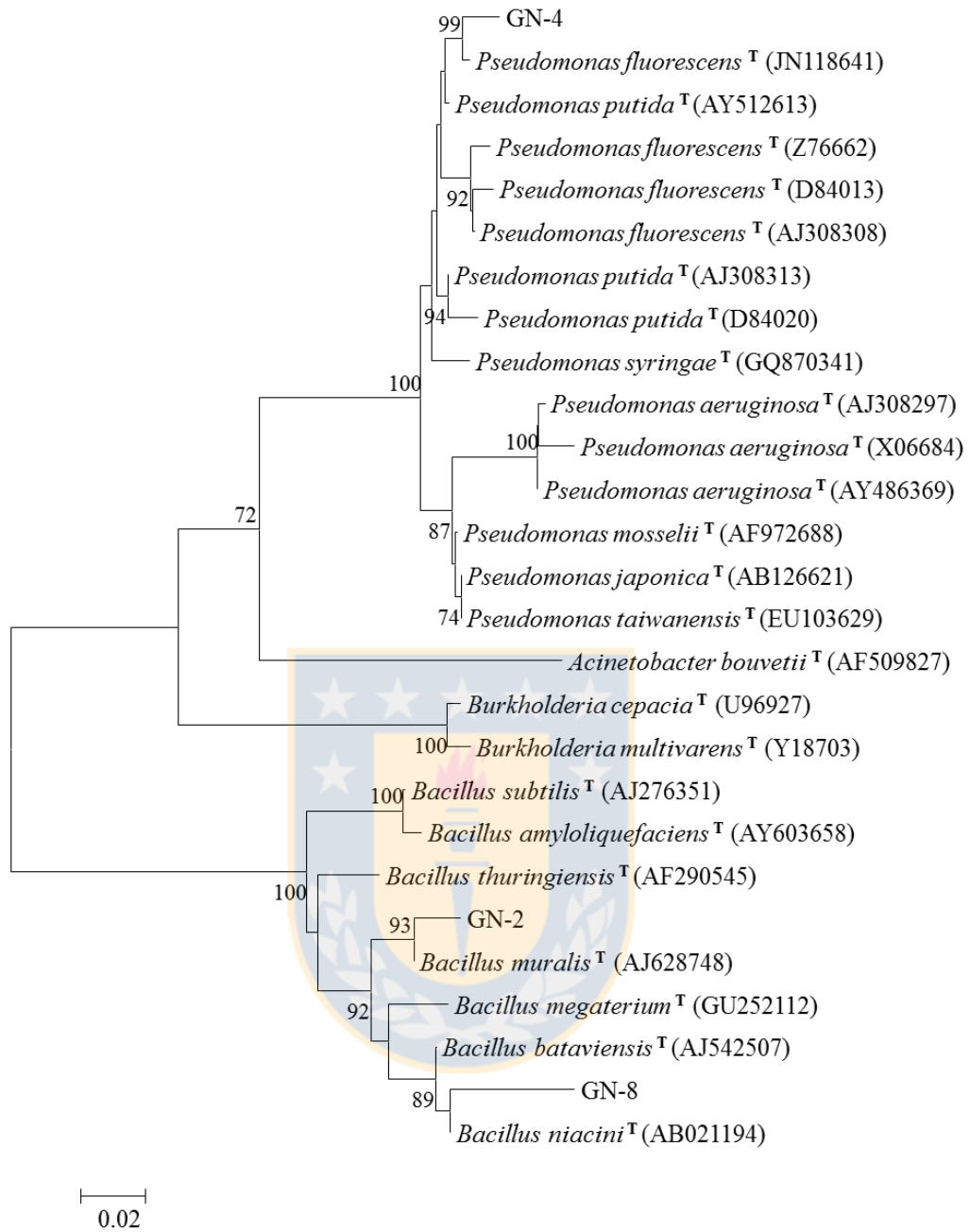
Of the 12 bacterial strains evaluated for phosphate solubilization, eight formed solubilization halos on Pikovskaya agar. The eight strains showed solubilization rates between 14.7 and 93.8 mg P-PO₄ L⁻¹ solubilization according to the P-Olsen test, with GN-7 and GN-9 strains being superior, although statistically similar to GN-2 and GN-11 (Table 1). Phosphorus is the second most important nutrient for crops, but many soils worldwide are deficient in this mineral (Oufdou *et al.*, 2016). The importance of phosphate-solubilizing bacteria in agriculture is well grounded as biofertilizers (Sharma *et al.*, 2013; Oufdou *et al.*, 2016), because of the ability of bacteria to solubilize the inorganic P of the soil through diverse processes into phosphate that is available to plants, increasing crop production (Chaiharn and Lumyong, 2011).

Of the evaluated strains only the bacterial strain GN-8 showed ACC deaminase activity (Table 1). The enzyme ACC deaminase degrades and consumes the precursor of ethylene 1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ACC) (Glick, 2014), or inhibits the enzyme ACC synthase (Hardoim *et al.*, 2008). Upon breaking the ethylene precursor ACC, it is converted to alpha-ketobutyrate and ammonium, providing the bacteria with a source of N (Penrose and Glick, 2003). The ACC deaminase activity has been reported to improve nodulation in legumes by counteracting inhibition in the elongation

of infection threads and decreasing the senescence rate of nodules caused by ethylene (Hardoim *et al.*, 2008; Zafar *et al.*, 2012; Glick, 2014).

2.4.2. Identification of PGPR strains

Bacterial strains GN-2, GN-4, and GN-8 were identified at the species level by amplification and sequencing of the partial 16S rRNA gene. The amplified fragment was 1200 bp. The phylogenetic tree of the 16S rRNA shows that the strain GN-4 is grouped in the *Pseudomonas* clade, with a sequence similarity of 99% to *Pseudomonas fluorescens* (Figure 1). However, the GN-2 and GN-8 strains were grouped in the *Bacillus* clade, specifically GN-2 was close to *Bacillus muralis* with 99% sequence similarity and GN-8 to *Bacillus niacini* (Figure 1). Bacterial strains of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* have been reported as plant growth promoters in alfalfa (Guiñazú *et al.*, 2013; Kisiel and Kepczynska, 2016), with ability to synthesize IAA, to solubilize phosphorus and showing ACC deaminase activity (Rashid *et al.*, 2012; Kisiel and Kepczynska, 2016). Since the sequencing of the 16S rRNA gene is not always sufficient to determine a species, because it is a slowly evolving gene compared to other housekeeping genes (Sepúlveda-Caamaño *et al.*, 2018), sequencing of other conserved genes will be necessary to obtain the definitive identification.



Fuente: Elaboración Propia

Figura 1 Neighbor joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequencing of bacterial isolates GN-2, GN-4, and GN-8. Bootstrap values are indicated on branches only when higher than 70. The type strains sequences in the phylogram were obtained from GenBank (accession number in parentheses).

2.4.3. Endophytic capacity

From the plant tissue samples of alfalfa plants inoculated with PGPR under controlled conditions, 44 bacterial isolates were obtained. However, the BOX-PCR fingerprints showed that only the strain GN-4 could be recovered from plant tissues being able to colonize upper tissues such as stem. Bacterial endophytes can enter seeds through vascular connections, or directly through gametes colonizing the embryo (Truyens *et al.*, 2015). All strains used for the plant trial were initially isolated from the alfalfa endorhizosphere. However, according to these results, the colonization of the endorhizosphere does not necessarily ensure its establishment as an endophyte in other tissues of the plant. The endophytic capacity of a bacterium is based on genomic differences in relation to soil rhizospheric bacteria (Ali *et al.*, 2014), and also on the production of metabolic compounds necessary to overcome the microbiological competition in the rhizosphere, which endophytes need to colonize before invading plant tissue (Brader *et al.*, 2014).

2.4.4. Effect of co-inoculation *E. meliloti* + PGPR on early nodulation

All the alfalfa plants were nodulated 15 d after inoculation, but plants inoculated with PGPR plus *E. meliloti* (AG-06) outstood in nodulation compared to treatment with only AG-06 although no significant differences were found at this point (Table 2). Twenty-five days after inoculation the nodulation was significantly higher ($P < 0.05$) when co-inoculated with GN-8 (ACC deaminase producer) compared to treatments co-inoculated with the other PGPR and to the control treatment inoculated only with *E. meliloti* (AG-06) (Table 2). After 35 d, nodulation was similar for all inoculation treatments (Table 2). In legumes, where N nutrition depends on the biological fixation of atmospheric N, the number of nodules in the roots is indispensable for this process (Masciarelli *et al.*, 2014). The strain GN-8 with ACC deaminase activity had a greater effect on nodulation compared to the IAA-producing strain GN-2 (Table 2). The presence of ACC-deaminase improves auxin response factor synthesis and reduces ethylene levels in the nodules (Ghosh *et al.*, 2015). This allows the accumulation of IAA favoring the formation of nodules and other mechanisms of growth promotion (Ghosh *et al.*, 2015). Also the reduction of ethylene levels by ACC-deaminase, promotes the elongation of infection thread in nodule formation and decreases the senescence rate of nodules

(Glick, 2014). In this trial, *Sinorhizobium*-PGPR co-inoculation had no effect on root growth on alfalfa (Table 2).

Tabla 2 Effect of inoculation the Ensifer meliloti AG-06 and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on nodule score and root length in alfalfa in phytotron chambers.

Inoculants	Root length		Nodule score	
	cm	15 d	25 d	35 d
AG-06	3.60ns	1.5ns	5.50c	10.5ns
AG-06+GN-2	4.55	3.0	13.25b	13.0
AG-06+GN-4	4.30	2.5	5.25c	10.5
AG-06+GN-8	4.23	4.0	15.50a	13.5

Fuente: Elaboración Propia

Different letters in column represent significant differences according to LSD test ($P < 0.05$).

ns: Nonsignificant.

2.4.5. Greenhouse trial

The effect of the bacterial strain with ACC deaminase activity GN-8 on nodulation on alfalfa was evaluated under greenhouse conditions and compared to the effect of AG-30 (YsS6 WT) (Rashid *et al.*, 2012). The nodulation was higher in both inoculated treatments, resulting in an increase in the number of nodules of 18% with GN-8 and 118% with AG-30 in relation to the control inoculated with *E. meliloti* only. However, this improvement was significant only in the case of AG-30 ($P < 0.05$) (Table 3). Exogenous expression of an ACC deaminase gene in *Mesorhizobium ciceri* has increased nodulation in chickpea significantly up to 200% (Nascimento *et al.*, 2012). A study by Guiñazú *et al.* (2013) shows similar results of the effect of bacterial strains of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas* on nodulation in alfalfa. The use of endophytic bacteria with enzymatic activity, in addition to rhizobia with genetic expressions of ACC deaminase, rapidly reduce ethylene levels during the nodulation process (Sarma and Saikia, 2014; Kisiel and Kepczynska, 2016). Ethylene in plants reacts rapidly to environmental and biological stress conditions through transcription of genes encoding a defense response in plants (Glick, 2014). In legume nodulation ethylene blocks the

initiation of the infection thread and modulation of the Nod factor, especially under conditions of environmental stress where the concentration of ethylene is induced at levels unfavorable for the development of the plants (Glick, 2014). The dry weight of the nodules and the diameter of the crown obtained for the treatments *E. meliloti*-PGPR was higher than the treatment inoculated only with *E. meliloti* (Table 3). There were no differences between treatments in root length and in the crown diameter (Table 3). In this experiment, plants were regularly watered and fertilized and were under controlled climatic conditions. Yet, the activity of ACC deaminase strains is known to increase when plants are exposed to stress (Sarma and Saikia, 2014) due to the increase of ethylene, significantly improving growth and symbiotic efficiency during nodulation (Kisiel and Kepczynska, 2016). Therefore, improved plant growth promoting results could be expected from these strains under field or stressful conditions.

Tabla 3 Effect of inoculation of *Ensifer meliloti* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity in alfalfa nodule number, nodule dry weight, root length and crown diameter under greenhouse conditions.

Inoculants	Nodule number	Nodule dry weight	Root length	Crown diameter
		mg	cm	mm
AG-06	11 b	0.0033 ^{ns}	30.23 ^{ns}	1.63 ^{ns}
AG-06+GN-8	13 b	0.005	36.83	1.96
AG-06+AG-30	24 a	0.0052	27.6	1.91
CV	25.55	43.85	15.14	25.65

Fuente: Elaboración Propia

Different letters in columns represent significant differences according LSD test ($P < 0.05$).

ns: Nonsignificant; CV: coefficient of variation.

2.5. CONCLUSIONS

Plant growth promoting bacterial strains were isolated from the alfalfa rhizosphere in a Chilean dryland soil, showing different growth promoting properties such as indole acetic acid production, phosphate solubilization and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity. The ACC deaminase activity of bacteria associated with the rhizosphere significantly improves early nodulation in alfalfa plants under greenhouse conditions.

2.6. AKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out thanks by the financial support Project FONDECYT N° 11130479. The authors thank Dr. Bernard Glick, for kindly providing strains with ACC-deaminase activity and mutants.



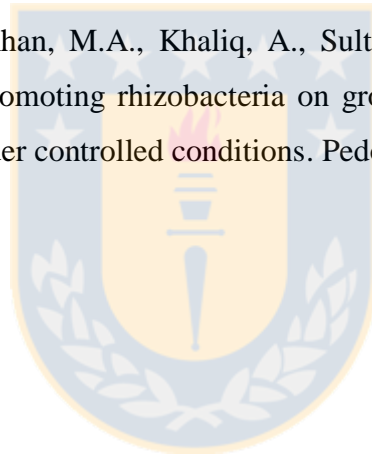
2.7. REFERENCES

- Ali, S., Charles, T., and Glick, B. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:160-167.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Singh, C., and Kalra, A. 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 171:884-894.
- Barrucha, U., Patel, K., and Trivedi, U. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UBI and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research* 2(3):215-221.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., and Sessitscha, A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27:30-37.
- Bouton, J.H. 2012. Breeding lucerne for persistence. *Crop and Pasture Science* 63:95-106. doi:10.1071/cp12009.
- Chaiharn, M., and Lumyong, S. 2011. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current Microbiology* 62:173-181.
- del Pozo, A., Ovalle, C., Espinoza, S., Barahona, V., Gerding, M., and Humphries, A. 2017. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 84:16-22.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C., Rose, D., and Glick, B. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, pp. 85-125.
- Dworkin, M., and Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology* 75(5):592-603.
- Egamberdiyeva, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36:184-189.

- Ghosh, P., Sen, S., and Maiti, T. 2015. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:296-303.
- Glick, B. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30-39.
- Guiñazú, L., Andrés, J., Rovera, M., Balzarini, M., and Rosas, S. 2013. Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. in vitro. *European Journal of Soil Biology* 54:69-77.
- Hardoim, P., Overbeek, L., and van Elsas, J. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16(10):463-471.
- Ji, Z., Yan, H., Guo, Q., Tao, E., Feng, W., and Xin, W. 2017 Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. *Systematic and Applied Microbiology* 40:114-119.
- Kisiel, A., and Kepczynska, E. 2016. *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa. *Planta* 243:1169-1189.
- Ma, W., Charles, T., and Glick, B. 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental* 70(10):5891-5897.
- Marques, A., Marchaisson, A., Gardan, L., and Samson, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*-*P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology* 31(1):106-115.
- Masciarelli, O., Llanes, A., and Luna, V. 2014. A new PGPR co-inoculate with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research* 169:609-615.
- Nascimento, F., Brígido, C., Glick, B., Oliveira, S., and Alho, L. 2012. *Mesorhizobium cicero* LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. *Letters in Applied Microbiology* 55:15-21.

- Oskouei, D., Bekmen, N., Ellidokuz, H., and Yilmaz, Ö. 2010. Evaluation of different cryoprotective in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in Stock culture media. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:1038-1046.
- Oufdou, K., Bechtaoui, N., Alaoui, A., Benidire, L., Daoui, K., Göttferdt, M. 2016. Symbiotic rhizobacteria for improving of the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. *Procedia Engineering* 138:325-331.
- Parsa, S., Ortiz, V., and Vega, F. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiment* 74:e50360. doi:10.3791/50360.
- Penrose, D., and Glick, B. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118:10-15.
- Pini, F., Frascella, A., Santopolo, L., Bazzicalupo, M., Biondi, E., Scotti, C., et al. 2012. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BMC Microbiology* 12:78.
- Sarma, R., Saikia, R. 2014. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil* 377:111–126
- Rashid, S., Charles, T., and Glick, B. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology* 61:217-224.
- Sadzawka, A., Carrasco, M.A., Grez, R., y Mora, M. 2004. Métodos de análisis recomendados para suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. 113 p.
- Sepúlveda-Caamaño, M., Gerding, M., Vargas, M., Moya-Elizondo, E., Oyarzúa, P., Campos, J. 2018. Lentil (*Lens culinaris* L.) growth promoting rhizobacteria and their effect on nodulation in coinoculation with rhizobia. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64:2, 244-256.
- Shahzad, S., Khalid, A., Arshad, M., Tahir, J., and Mahmood, T. 2010. Improving nodulation, growth and yield of *Cicer arietinum* L. through bacterial ACC-deaminase induced changes in root architecture. *European Journal of Soil Biology* 46:342-347.

- Suzaki, T., Ito, M., and Kawaguchi, M. 2013. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Frontiers in Plant Science* 4:42.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., and Vangrosveld, J. 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports* 7(1):40-50.
- Yadav, J., and Prakash, J. 2014. Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *European Journal of Soil Biology* 63:70-77.
- Zafar, M., Abbasi, M.K., Khan, M.A., Khaliq, A., Sultan, T., and Aslam, M. 2012. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions. *Pedosphere* 22:848-859.



3. Efecto promotor de crecimiento de bacterias con actividad ACC deaminasa en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) bajo déficit hídrico

George Alexander Cedeño-García^{1,4}, Susana Fischer², Luis Inostroza³, Macarena Gerding² *.

Enviado a la Revista Ciencia Agronómica de Brasil

3.1. Resumen

El efecto de la sequía, conlleva a grandes pérdidas a través de la reducción del crecimiento de los cultivos, sin embargo, a través de co-inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) con actividad ACC deaminasa, se han logrado mejoras importantes en tolerancia a ambientes estresantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto promotor del crecimiento de bacterias con actividad ACC deaminasa en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L. subsp. *Sativa*) bajo déficit hídrico. En macetas de tubos PVC de 11 L de capacidad con un sustrato de mezcla perlita vermiculita 1:1 v/v se sembraron semillas de alfalfa. Fueron inoculadas cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. con actividad ACC deaminasa. A los 45 días de crecimiento con riego controlado, fueron sometidas a dos periodos de 12 y 20 días de sequía. Se evaluó el número de nódulos, conductancia estomática, área específica de hojas y fluorescencia de la clorofila. La nodulación fue mejorada en un 20% en condiciones de sequía. La conductancia estomática fue mayor ($P < 0.05$) con 142 mmol m² s⁻¹ con co-inoculaciones de *Bacillus* sp. El área foliar específica fue mayor en un 20% en los tratamientos co-inoculados con PGPR. El efecto ACC deaminasa bacteriano reflejó mayor rendimiento cuántico del fotosistema II durante las horas de mayor intensidad luminosa. En conclusión, de acuerdo a resultados obtenidos en esta investigación, la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad ACC deaminasa mejora características fisiológicas y agronómicas, claves en la tolerancia al déficit hídrico en el cultivo de alfalfa.

Palabras claves: 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa. Etileno. Estrés hídrico. Leguminosa. PGPR.

Abstract.- The effect of drought carry to great losses through the reduction of crop growth, however, through co-inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPR) with ACC deaminase activity, important improvements have been achieved in tolerance to stressful environments. The aim of this study was to evaluate the growth promoting

effect of bacteria with ACC deaminase activity in plants alfalfa (*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*) under water deficit. In pots of PVC tubes of 11 L of capacity with a substrate of mixing vermiculite vermiculite 1:1 v / v seeds of alfalfa (Alta Sierra Illapata) were sown. Strains of *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp with ACC deaminase activity were inoculated. After 45 days of growth with controlled irrigation, they were subjected to two periods of 12 and 20 days of drought. The number of nodules, stomatal conductance, specific area of leaves and the chlorophyll fluorescence were evaluated. The nodulation was improved by 20% under drought conditions. The stomatal conductance was higher ($P < 0.05$) with $142 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with co-inoculations of *Bacillus* sp. The specific leaf area was greater by 20% in the treatments co-inoculated with PGPR. The ACC deaminase bacterial effect reflected greater quantum performance of photosystem II during the hours of higher luminous intensity. In conclusion, according to results obtained in this research, inoculation with plant growth promoting bacteria with ACC deaminase activity improves physiological and agronomic characteristics, key in the tolerance to water deficit in alfalfa culture.

Keywords: 1-aminocyclopropani-1-carboxylic acid deaminase. Ethylene. Water stress. Legume. PGPR.

3.2. INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico ocasiona importantes consecuencias para la fisiología y la morfología de las plantas provocando a corto y mediano plazo un descenso en el contenido relativo de agua, la conductividad estomática, reduce el intercambio gaseoso limitando la fotosíntesis, pérdida de producción de biomasa y modificación del área foliar (MEDRANO *et al.* 2007; ERICE *et al.* 2007; ERICE *et al.* 2010), resultando en impactos negativos en el crecimiento y producción de las plantas, senescencia y muerte en muchas especies (MORALES *et al.* 2013). El Efecto del déficit hídrico también conlleva a la producción y acumulación de etileno en los tejidos vegetales provocando clorosis y senescencia de hojas y flores, hasta causar la muerte de las plantas (NASCIMENTO *et al.* 2012).

A pesar del rol que juega el etileno en diferentes estados de desarrollo de las plantas, este ha sido reportado como una hormona de estrés (WANG *et al.* 2002). La síntesis de etileno es afectada por factores como temperatura, luz, gravedad, nutrición, interacciones hormonales y ataques de plagas y enfermedades (GLICK, 2014). En

condiciones de déficit hídrico, las raíces pueden detectar pequeñas señales hídricas del suelo, activando señales químicas que desencadenan respuestas bioquímicas con el aumento del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) precursor del Etileno (GALAMERO; GLICK, 2015; ZHANG *et al.* 2018). Sin embargo, como el oxígeno es requerido para la conversión del ACC en etileno, la mayor cantidad de ACC producida por las raíces es transportado hacia las hojas a través del flujo de agua generado por la transpiración, para ser convertido fácilmente en Etileno en contacto con el Oxígeno (ZHANG *et al.* 2018).

Las leguminosas forrajeras como la alfalfa se ven afectadas por el déficit hídrico lo que repercute negativamente en el desarrollo y crecimiento, llegando a reducir hasta en un 43% la producción de materia seca de tallos y hojas, inhibiendo la iniciación y bloqueo del hilo de infección por parte del rizobio (ERICE *et al.* 2010). Además, modifica el contenido de calcio celular en las rutas de señalización de factores Nod que regulan la expresión de genes RIP1 y ENOD11 (OLDROYD *et al.* 2001). La consecuencia final de la disminución del número de nódulos es la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno (GLICK, 2014).

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas o PGPR (Plants Grow Promoting Rizobacteria) con actividad ACC deaminasa rompen el ACC, inmediato precursor del Etileno, al transformarlo en alfa-ketobutyrate y amonio (GLICK, 2014), además de inhibir la enzima ACC syntasa (HARDOIM *et al.* 2008). Las PGPR-ACC deaminasa, confieren tolerancia sistémica de las plantas a condiciones de déficit hídrico (GLICK, 2014), y asociadas a la rizosfera de la alfalfa mejora la nodulación temprana (CEDEÑO-GARCÍA *et al.* 2018). Sin embargo, se desconoce el efecto de la co-inoculación de *Ensifer meliloti* con PGPR-ACC deaminasa que puedan tener sobre la nodulación y promoción del crecimiento en plantas de alfalfa bajo déficit hídrico.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la promoción de crecimiento de bacterias con actividad ACC deaminasa co-inoculadas con *Ensifer meliloti* en el cultivo de alfalfa bajo condiciones de déficit hídrico.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material Bacteriano

Se utilizaron las cepas PGPR *Bacillus* sp. (GN-8) y *Pseudomonas* sp. (AG-30), provenientes de la colección de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción y de la Universidad de Waterloo; Canadá respectivamente. Ambas previamente caracterizadas por su actividad ACC deaminasa (CEDEÑO-GARCÍA *et al.* 2018; RASHID *et al.* 2012). Se utilizó la cepa de *Ensifer. meliloti* (AG-06) de la colección Western Soil Microbiology, de Australia.

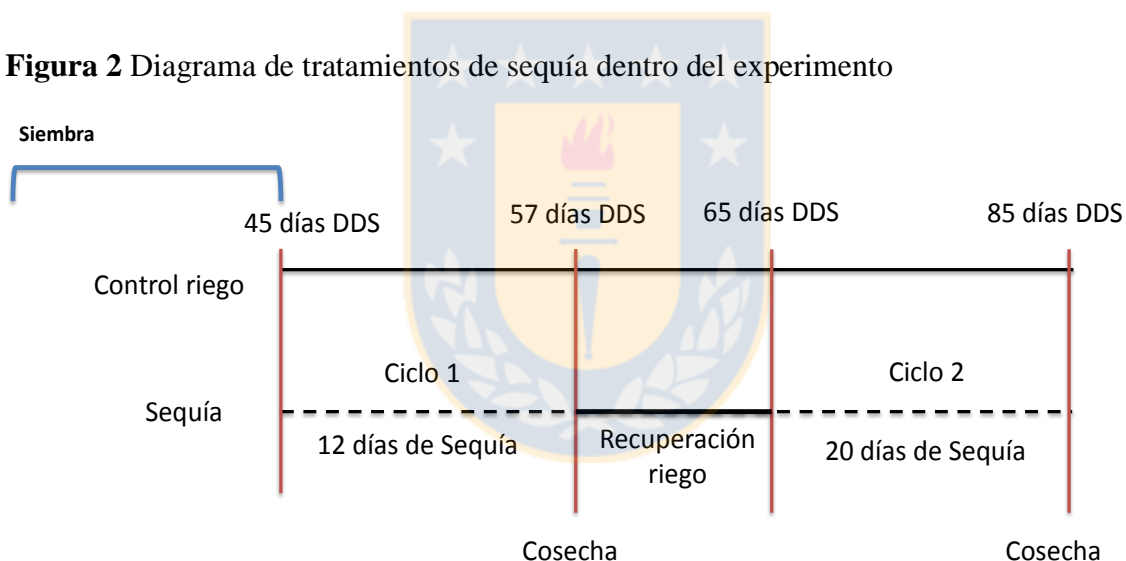
Las cepas fueron reactivadas desde criopreservación a -80°C , inoculando 100 μL de suspensión de células criopreservadas en tubos con 5 ml de caldo nutritivo (Merck), los que fueron incubados en agitación por 24 horas a 150 rpm a 25°C . La cepa AG-06 de *E. meliloti* fue reactivada en agar manitol levadura bajo los mismos parámetros de crecimiento mencionados anteriormente. Los cultivos bacterianos desarrollados se suspendieron en solución salina para estandarizar las concentraciones a una densidad óptica de 0.01 para las PGPR y 0.06 a 600nm de longitud de onda (DO_{600}) para *E. meliloti* en un espectrofotómetro (MRC, POP Optizen Bio, Korea).

3.3.2. Material vegetal y establecimiento de ensayo en invernadero

Para el presente estudio fue usada una población naturalizada de alfalfa, colectada áreas del altiplano de Chile y corresponde a una población dormante en época de verano. Las semillas fueron desinfectadas a través de inmersión en etanol 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio 3 minutos y seis enjuagues en agua destilada estéril. Se sembraron seis semillas en macetas de PVC de 11 cm de diámetro y 100 cm de altura (11 L Volumen). El sustrato fue una mezcla de perlita y vermiculita 1:1 (v/v), tinalizado en autoclave a 90°C durante 15 minutos. La capacidad de retención de agua del sustrato en base de peso seco fue de 172% a capacidad de campo. Se realizó un raleo a los diez días después de la siembra dejando 2 plantas por maceta. Se aplicó semanalmente y hasta los 45 días después de la siembra, un suplemento nutritivo de un stock compuesto por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , Fe EDTA, elementos trazas (H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , CoSO_4 , CuSO_4), CaSO_4 , libre de Nitrógeno. Los tratamientos de inoculación fueron: 1.- cepa AG-06 a $0.01 \text{ DO}_{600} \text{ 1 ml planta}^{-1}$; 2.- AG-06 a $0.01 \text{ DO}_{600} \text{ 1 ml planta}^{-1}$ + GN-8 a $0.06 \text{ DO}_{600} \text{ 1 ml planta}^{-1}$; 3.- AG-06 a $0.01 \text{ DO}_{600} \text{ 1 ml planta}^{-1}$ + AG-30 a $0.06 \text{ DO}_{600} \text{ 1 ml planta}^{-1}$. Se repitió la dosis de inoculación ocho días después de la primera aplicación.

Los tratamientos hídricos fueron impuestos por periodos de sequía de 10 y 20 días basados en el protocolo de Erice *et al.* (2011) con modificaciones, los cuales a los 45 después de la siembra (DDS) a las plantas de alfalfa se le suspendió el suministro de agua en un primer ciclo durante 12 días, luego fueron sometidas a un período de recuperación de 8 días de reposición de agua. Finalmente fue aplicado el segundo ciclo de sequía suspendiendo la reposición de agua durante 20 días (Fig 2). Las mediciones fisiológicas, bioquímicas y agronómicas se realizaron al finalizar cada periodo de sequía. Cabe recalcar que los tratamientos biológicos aplicados también se desarrollaron en condiciones de crecimiento sin aplicaciones de tratamiento de sequía. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo de parcelas divididas con tres repeticiones. Donde las parcelas principales se establecieron en función del factor hídrico (Con riego y sin riego), y las sub-parcelas se definieron por los tratamientos bacterianos inoculados.

Figura 2 Diagrama de tratamientos de sequía dentro del experimento



Fuente: Elaboración Propia

3.3.3. Mediciones de crecimiento

A los 57 DDS para el primer periodo de sequía, y 85 DDS en el segundo periodo de restricción hídrica, las plantas fueron extraídas de la maceta. Luego, fueron separadas en hojas, tallos y raíz. La producción de MS total se obtuvo secando todos los tejidos en horno con ventilación forzada durante 48 horas a 65 °C. Las raíces fueron separadas del sustrato mediante lavado con agua. Se determinó la longitud del sistema radical y el diámetro de la corona. Los nódulos de cada planta fueron cosechados y contabilizados

manualmente por separado. El área foliar total se determinó mediante el método destructivo y aplicando la fórmula $AF = (\text{cm}^2 \text{ tejido foliar} \times \text{peso seco total de hojas}) / \text{peso seco cm}^2 \text{ de tejido foliar}$, el cual a dos hojas trifoliadas se calculó el área foliar con un medidor MK2 (Delta T Devices, Cambridge, UK). Posteriormente se determinó a las dos hojas y al total de hojas de cada planta la materia seca secando en horno con ventilación forzada durante 48 horas a 65 °C. Se calculó el leaf area ratio (LAR=Área foliar/Producción de MS) y el specific leaf area (SLA=área foliar/MS de hojas).

3.3.4. Evaluaciones fisiológicas

La conductancia estomática se midió al finalizar cada periodo de restricción hídrica con un porómetro (Porometer SC-1 Decagon Devices, USA), las lecturas fueron tomadas a las 09h00 y 16h00 con la finalidad de determinar el cierre estomatal durante el transcurso de la actividad de la planta. Las lecturas se realizaron en el foliolo central de 3 hojas al azar (1 hoja en el tercio superior, tercio medio y tercio inferior) en cada planta expuestas a luminosidad.

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó extrayendo dos hojas trifoliadas de cada planta. Siguiendo la metodología propuesta por Yactayo *et al.* (2013), el muestreo se realizó por la mañana 06h00 – 07h00. Se tomó el peso fresco (PF) de las hojas cosechadas utilizando una balanza analítica, posteriormente fueron sumergidos en agua destilada durante 24 horas. Fue tomado el peso túrgido (PT) de las hojas, luego se llevó a estufa durante 48 horas a 65°C para obtener el peso seco (PS). Finalmente, con los pesos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula: $CRA = (PF - PS) / (PT - PS) * 100$

La osmolaridad fue determinada en muestras de 10 hojas trifoliadas de similar características de estado de desarrollo en cada maceta. Las hojas que fueron extraídas desde las plantas, fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -40°C antes de la evaluación. Una alícuota de 10 µL de líquido de células fue extraída usando presión. La osmolaridad de la solución fue determinada con un Osmómetro (VAPRO 5600, Wescor, Logan, UT USA)

La fluorescencia de la clorofila se determinó con un fluorómetro OS5p+ (Opti-Sciences New Hampshire, E.E.U.U.), seleccionando hojas al azar del tercio superior de las plantas procurando que estuvieran expuestas a la luz. Los parámetros que se determinaron fueron: el rendimiento cuántico máximo F_v/F_m ($F_m - F_0/F_m$); rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) ($(F'_m - F_t)/F'_m$); y la tasa transportadora de

electrones (ETR) (Lawson y Murchie, 2013). Se realizaron mediciones a las 09h00, 13h00 y 18h00. El contenido de clorofilas se estimó con un medidor Spad-502 (Konica Minolta, Tokyo, Japan). Fueron muestreadas el foliolo central de 3 hojas, tanto en el estrato superior, medio y bajo de la planta.

3.4. RESULTADOS

Durante el primer ciclo de sequía (Fig 2), la producción de MS aérea y longitud de raíz no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos de inoculación (Tabla 4). Sin embargo, luego de un periodo de recuperación con riego durante 8 días y sometidas a un segundo ciclo de sequía, la producción de MS disminuyó en más de un 35% por el efecto de la sequía, mientras que la longitud de la raíz no fue afectada (Tabla 4). La inoculación de alfalfa con *E. meliloti* y *Bacillus* permitió alcanzar mayor peso seco aéreo y longitud de raíces en comparación con las plantas expuestas a un segundo ciclo de sequía. No obstante, este efecto positivo no se apreció al comparar entre tratamientos de inoculación sometidos a sequía (Tabla4).



Tabla 4 Peso seco de materia seca, longitud de raíces, diámetro de corona del tallo y numero de nódulos radiculares, en base al efecto de las co-inoculaciones con PGPR con actividad ACC deaminasa, en plantas de alfalfa sometidas a un ciclo de 12 días de déficit

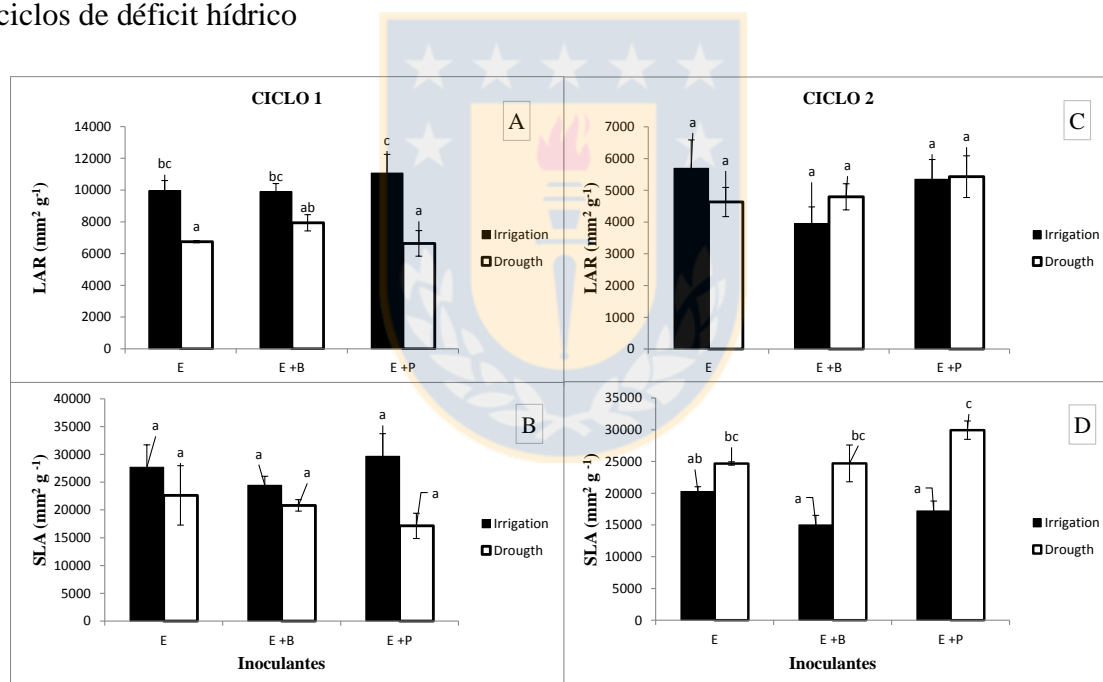
	Peso seco (g)		Longitud de Raíz (cm)		Diametro de corona (mm)		Numero de nodulos		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	
Irrigation	<i>Ensifer meliloti</i>	0.156 ± 0.01 a	0.53 ± 0.17 ab	30.23 ± 2.89 a	41.47 ± 4.56 ab	1.63 ± 0.20 abc	2.52 ± 0.34ab	11 ± 1.00 b	25 ± 3.78 ab
	<i>Ensifer + Bacillus</i> sp.	0.155 ± 0.01 a	0.67 ± 0.05 a	36.83 ± 5.32 a	53.83 ± 3.68 a	1.96 ± 0.04 a	3.06 ± 0.21a	13.33 ± 1.66 b	41.33 ± 2.6 a
	<i>Ensifer + Pseudomonas</i> sp.	0.140 ± 0.02 a	0.49 ± 0.02 ab	27.6 ± 3.91 a	39.87 ± 6.66 ab	1.91 ± 0.23 ab	2.67 ± 0.04ab	24 ± 4.58 a	29.33 ± 5.7ab
Drough	<i>Ensifer meliloti</i>	0.159 ± 0.01 a	0.34 ± 0.09 b	31.07 ± 0.75 a	45.57 ± 7.65 ab	1.68 ± 0.19 abc	2.33 ± 0.24ab	15.67 ± 1.33 ab	20.66 ± 6.1b
	<i>Ensifer + Bacillus</i> sp.	0.153 ± 0.02 a	0.26 ± 0.02 b	32.67 ± 4.37 a	39.1 ± 2.91 b	1.39 ± 0.19 c	1.95 ± 0.28b	19 ± 6.92 ab	25.67 ± 4.3ab
	<i>Ensifer + Pseudomonas</i> sp.	0.177 ± 0.02 a	0.31 ± 0.07 b	33.57 ± 4.94 a	38.77 ± 6.27 b	1.56 ± 0.15 bc	1.99 ± 0.12b	14 ± 3.21 ab	26 ± 12.50 ab
C.V.	20,66	35,46	21,9	17,25	12,19	17,82	33,23	36,32	

Fuente: Elaboración Propia

La comparación de medias entre los tratamientos está determinados por cada columna.

La co-inoculación con PGPR benefició la nodulación en alfalfa tanto en condiciones de riego y sin riego, aunque este aumento sólo fue significativamente superior en el tratamiento de co-inoculación de *E. meliloti* con *Pseudomonas* sp. en el primer ciclo de deficiencia hídrica (Tabla 4). La co-inoculación con *Pseudomonas* sp promovió una mayor nodulación y diámetro de la corona radical en las plantas de alfalfa bajo condiciones de riego (Tabla 4). La cantidad de nódulos en plantas de un mismo tratamiento de inoculación creciendo con riego y sin riego fue similar a excepción del tratamiento con *Bacillus* sp. el cual mostró una reducción en la nodulación de un 40% en el segundo ciclo de sequía (Tabla 4).

Figura 3 Relación de área foliar (LAR) y área foliar específica (SLA) en dos ciclos de déficit hídrico



Fuente: Elaboración Propia

Ciclo 1 = 12 días de déficit hídrico

Ciclo 2 = 20 días de déficit hídrico

Durante el primer período de déficit hídrico, la LAR disminuyó significativamente ($P < 0.05$) con la sequía. Sin embargo, los tratamientos inoculados con PGPR no reportaron efectos significativos en LAR tanto con riego y sin riego ($P > 0.05$) (Fig 3 A). En el segundo ciclo con 20 días de sequía después del periodo de recuperación de 8 días

con riego (Fig 2), LAR no reportó variación ($P>0.05$) entre los tratamientos sometidos a sequía y riego constantes (Fig 3 C). El SLA no mostró variación entre los tratamientos con riego y sin riego. La co-inoculación con PGPR no reportó diferencia significativa ($p>0.05$) para SLA tanto en condiciones de riego y para los tratamientos con 12 días de sequía (Fig 3 B). Sin embargo, la co-inoculación de PGPR y el *E. meliloti* en ciclos de 20 días de sequía, tiende a aumentar el SLA, en particular en la co-inoculación con *Pseudomonas* sp. (Fig. 3 D).

En el ciclo de 12 días de sequía la conductancia estomática (gs) fue reducida ($P<0.05$) en todos los tratamientos evaluados. La conductancia estomática fue mayor ($P<0.05$) en los tratamientos co-inoculados con PGPR comparado a la inoculación con *Ensifer meliloti* durante el crecimiento de la alfalfa con riego (Tabla 5). La conductancia estomática durante el segundo ciclo de 20 días de sequía, fue reducida en todos los tratamientos, sin embargo, se observó mayor conductancia estomática con diferencias significativas ($P<0.05$) en los tratamientos co-inoculados con PGPR tanto en plantas creciendo en condiciones de riego y déficit hídrico (Tabla 5). En cuanto al Contenido Relativo de Agua (CRA) el Índice de clorofila y Presión Osmótica evaluados con 12 días y 20 días de sequía, no se observaron diferencias entre tratamientos co-inoculados ($P>0.05$), tampoco entre los tratamientos hídricos (Tabla 5).

Tabla 5 Presión Osmótica, Contenido relativo de agua (CRA), Índice de clorofila y Conductancia estomática, en base al efecto de las co-inoculaciones con PGPR con actividad ACC deaminasa, en plantas de alfalfa sometidas a un ciclo de 12 días de déficit hídrico y un ciclo de 20 días de déficit hídrico

	P.Os mmol/kg		CRA %		I. Clorofila (unidades SPAD)		Cond. Estomática mmol m ² s ⁻¹		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 1	Ciclo 2	
Irrigation	<i>Ensifer meliloti</i>	552.00 ± 27.00 a	569 ± 20.23 ab	80 ± 5 a	91 ± 3 a	38.96 ± 0.39 a	47.22 ± 2.80 a	218.97 ± 25.64 b	99.38 ± 12.37 cd
	<i>Ensifer + Bacillus</i> sp.	555.67 ± 20.07 a	613.67 ± 10.47 ab	86 ± 3 a	83 ± 12 a	38.7 ± 0.12 a	47.87 ± 4.46 a	305.65 ± 31.61 a	139.67 ± 13.06 abc
	<i>Ensifer + Pseudomonas</i> sp.	607.33 ± 72.34 a	557.33 ± 15.37 b	83 ± 1 a	82 ± 5 a	41.78 ± 1.87 a	45.22 ± 2.28 a	293.4 ± 14.95 a	161.38 ± 23.00 a
Drought	<i>Ensifer meliloti</i>	520.67 ± 10.34 a	608 ± 40.14 ab	90 ± 3 a	94 ± 1 a	41.29 ± 2.61 a	41.85 ± 0.47 ab	180.13 ± 6.94 b	86.48 ± 17.62 d
	<i>Ensifer + Bacillus</i> sp.	569.76 ± 30.76 a	594.67 ± 22.70 ab	85 ± 3 a	85 ± 8 a	41.04 ± 0.54 a	43.69 ± 2.25 ab	197.65 ± 7.37 b	142.2 ± 16.19 ab
	<i>Ensifer + Pseudomonas</i> sp.	541.33 ± 11.60 a	619.33 ± 13.16 a	87 ± 1 a	90 ± 2 a	44.05 ± 2.32 a	37.44 ± 2.12 b	156.7 ± 9.03 b	112.73 ± 10.18 bcd
C.V.	11,66	5,07	6,43	14,13	7,28	8,23	16,14	17,8	

Fuente: Elaboración Propia

La comparación de medias entre los tratamientos está determinados por cada columna.

La máxima eficiencia cuántica fotoquímica (F_v/F_m), el rendimiento cuántico del PSII ($Y(II)$) y la tasa transportadora de electrones (ETR) no fueron reducidas significativamente ($P>0.05$) por el efecto de 12 días de sequía. Tampoco existió un efecto significativo en los tratamientos co-inoculados con PGPR durante los tres periodos de evaluación en el transcurso del día (Fig. 4 A, B y C). Durante el segundo ciclo con 20 días de déficit hídrico al que fueron sometidas las plantas de alfalfa luego de un periodo de 8 días de recuperación con disponibilidad de agua óptima, la F_v/F_m no varió significativamente entre los tratamientos inoculados con PGPR en condiciones de riego.

No obstante con sequía se encuentra diferencia significativa ($P<0.05$) en cuanto los tratamientos co-inoculados, mostrando a las 18h00 que el tratamiento el cual solo se inoculado solo con *E. meliloti* hubo mayor foto-inhibición (Fig 5 D). El efecto de las aplicaciones de PGPR en condiciones de sequía, permitió mantener estable el $Y(II)$ y en niveles similares en relación a las plantas que no fueron sometidas a déficit hídrico. Además, la tasa transportadora de electrones (ETR) también se vio favorecida por la co-inoculación con PGPR (Fig 5 E y F).

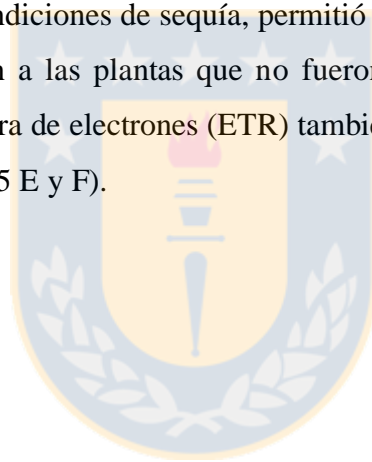
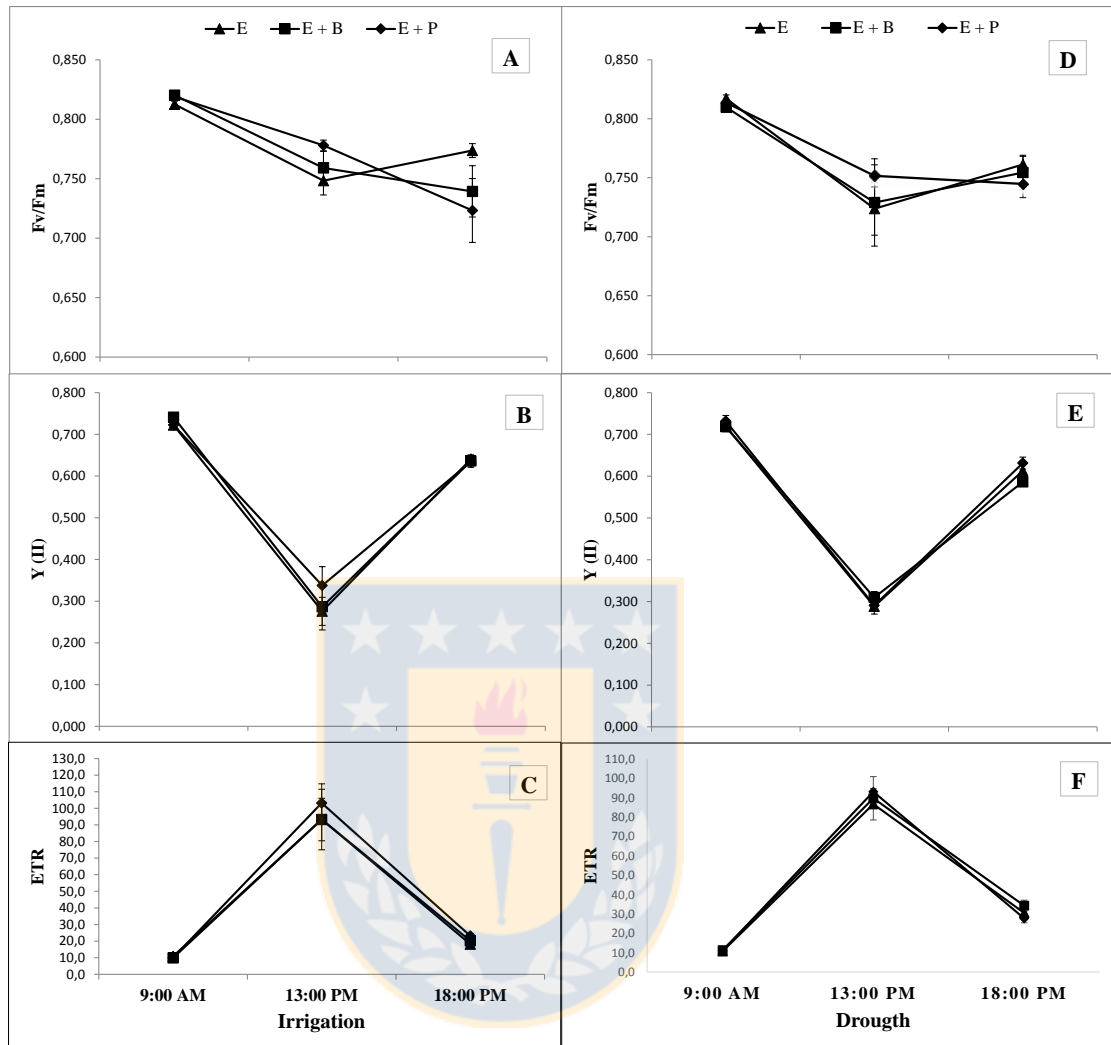


Figura 4 Rendimiento cuántico máximo F_v/F_m ($F_m - F_0/F_m$); Rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) ($F'_m - F_t/F'_m$) y Tasa transportadora de electrones (ETR) durante un periodo de 12 días de sequía



Fuente: Elaboración Propia

E = *Ensifer meliloti*

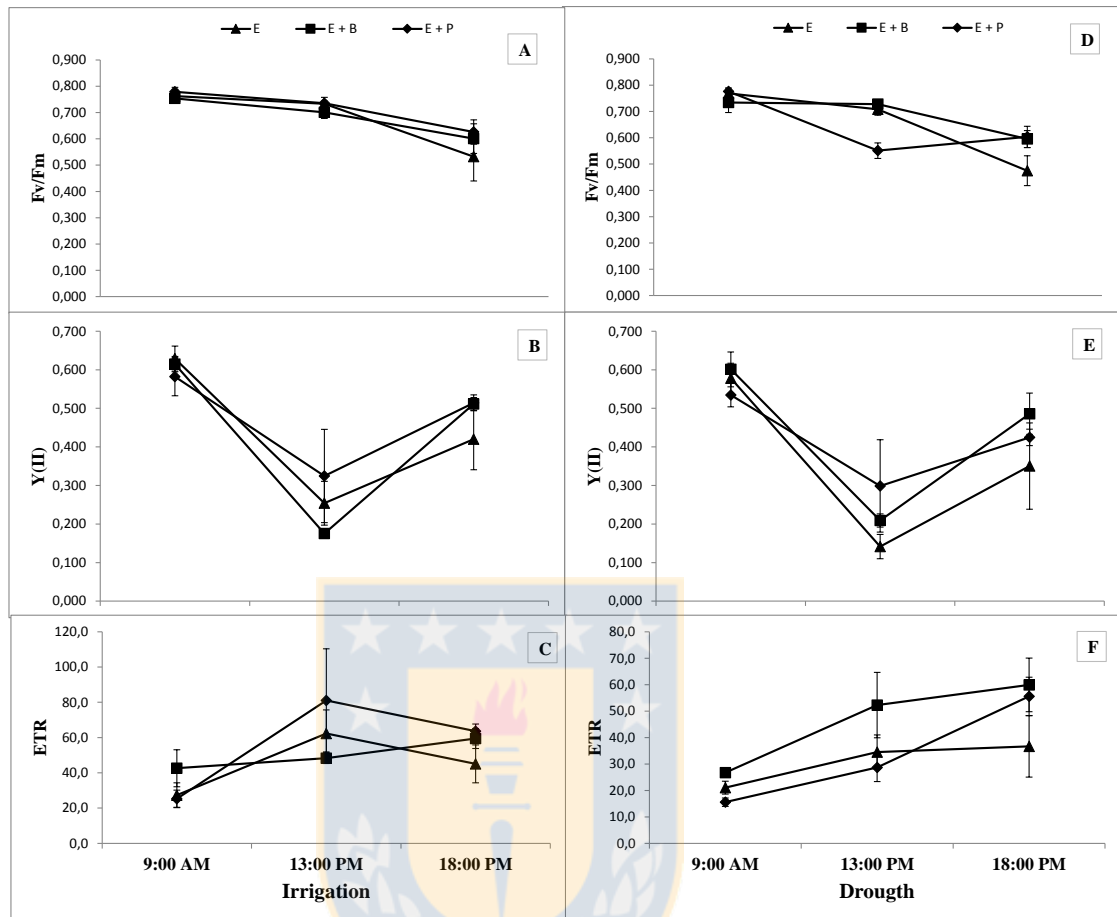
E + B = *Ensifer meliloti* + *Bacillus* sp.

E + P = *Ensifer meliloti* + *Pseudomonas* sp.

3.5. DISCUSIÓN

En Chile la alfalfa es la forrajera más producida en condiciones de riego, y en los últimos años también en condiciones de secano en clima Mediterráneo (OVALLE *et al.* 2015), sin embargo, la producción de forraje bajo condiciones de sequía varía entre los cultivares de alfalfa (DEL POZO *et al.* 2017). Las bacterias promotoras del crecimiento con actividad ACC deaminasa co-inoculadas con *Ensifer meliloti* fueron evaluadas sobre alfalfa cv. Altasierra Illapata bajo dos periodos de déficit hídrico. Cepas del género *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp con actividad ACC deaminasa han sido reportadas en trabajos previos por promover el crecimiento vegetal (RASHID *et al.* 2012; KISIEL; KĘPCZYŃSKA, 2016) y mejorar la tolerancia a estrés por sequía (SARMA; SAIKIA, 2014), heladas (SUBRAMANIAN *et al.* 2015) y salinidad (BARNAWAL *et al.* 2014; ALI *et al.* 2014). Los resultados aquí mostrados indican que en general los periodos de sequía cortos no afectan parámetros fisiológicos (Fig. 3) y crecimiento en las plantas (Tabla 4 y 5), dado la capacidad de tolerancia a sequía de la alfalfa (ERICE *et al.* 2010; ERICE *et al.* 2011). Sin embargo, periodos prolongados de déficit hídrico determinan una reducción en materia seca, nodulación, conductancia estomática y actividad fotosintética (Tabla 4 y 5). La baja tasa de nodulación y la senescencia de los nódulos en leguminosas son mayormente reportadas por efecto del etileno en estrés hídrico, inhibiendo la infección rizobial y la elongación de los hilos de infección en la corteza interna (STAUDINGER *et al.* 2016; GLICK, 2014). La reducción en la nodulación (Tabla 4), ha sido reportada en trabajos anteriores como consecuencia directa del déficit hídrico y salinidad en leguminosas (MOURADI *et al.* 2016; BARNAWAL *et al.* 2014).

Figura 5 Rendimiento cuántico máximo F_v/F_m ($F_m - F_0/F_m$); Rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) ($F'_m - F_t/F'_m$) y Tasa transportadora de electrones (ETR) durante un periodo de 20 días de sequía



Fuente: Elaboración Propia

E = *Ensifer meliloti*

E + B = *Ensifer meliloti* + *Bacillus* sp.

E + P = *Ensifer meliloti* + *Pseudomonas* sp.

El efecto de la co-inoculación de bacterias con actividad ACC deaminasa, logró aumentar la nodulación temprana (CEDEÑO-GARCÍA *et al.* 2018), el cual durante el primer ciclo de sequía a los 57 DDS la nodulación fue mayor. mientras la senescencia de los nódulos a los 85 días DDS sometidos al segundo ciclo de sequía de 20 días de restricción hídrica fue controlada con la presencia de las cepas bacterianas con actividad ACC deaminasa reportada (Tabla 4) (RASHID *et al.* 2012; CEDEÑO-GARCÍA *et al.* 2018). La presencia de la actividad ACC deaminasa en las cepas bacterianas durante la inoculación de leguminosas retarda la senescencia de los nódulos, aunque no influye el periodo de vida (TITTABUTR *et al.* 2015). Las células bacterianas con actividad ACC

deaminasa secuestran el ACC aminasa inmediato precursor de etileno y lo degradan en amonio y ketobutarato (GLICK, 2014) para suplir sus necesidades de nitrógeno y energía sin causar desbalance nutricional en las plantas (HARDOIM *et al.* 2008).

La co-inoculación *E. meliloti* - PGPR con actividad ACC deaminasa redujo significativamente la conductancia estomática en sequía severa como se reporta en la presente investigación durante el segundo ciclo de sequía con 20 días de restricción hídrica (Table 2). El cierre estomático en el cultivo de alfalfa es una respuesta del déficit hídrico (MOURADI *et al.* 2016; DEL POZO *et al.* 2017). Sin embargo, en déficit hídrico el ajuste osmótico a través de concentración de solutos celulares han sido reportados como mecanismo de tolerancia (SARMA; SAIKIA, 2014) a través de acumulación de fructosa, glucosa, galactinol (STAUDINGER *et al.* 2016; BERTRAND *et al.* 2015) y glicina betaina y prolina en *Vigna radiata* L. inoculada con *Pseudomonas aeruginosa* con actividad ACC deaminasa (SARMA; SAIKIA, 2014). La concentración de solutos en las células es comúnmente ligada al contenido relativo de agua de las plantas sometidas a estrés hídrico, sin embargo, en muchas investigaciones este contenido puede variar dependiendo del cultivar de la alfalfa o el origen de la misma (ERICE *et al.* 2011; ARANJUELO *et al.* 2011).

Modificaciones morfológicas del área foliar bajo déficit hídrico son algunas de las estrategias manifestadas por las plantas (LIU *et al.* 2004), a través de reducción de la relación del área foliar (LAR) la expansión de hojas jóvenes es reducida (ANYIA; HERZOG, 2004) lo que genera menor pérdida de agua (MENG *et al.* 2010). Probablemente el efecto inhibitor del etileno marcado por la actividad ACC deaminasa bacteriana esté evitando cambios morfológicos en las hojas manteniendo estructuras foliares óptimas y mejorando la expansión de las hojas jóvenes reducidas por la sequía. El incremento del área específica de las hojas (SLA) en déficit hídrico, es otro factor de respuesta al estrés, mejorando la captación luminosa durante el proceso fotosintético (ERICE *et al.* 2011). En este trabajo la co-inoculación con *Pseudomonas* sp con actividad ACC deaminasa logró aumentar el área específica de las hojas en las plantas estresadas (Fig. 3).

La tasa fotosintética es también afectado en condiciones de sequía, ligado generalmente al cierre estomático y la baja actividad de la Rubisco (ARANJUELO *et al.* 2011). En los resultados mostrados en esta investigación, la sequía severa (determinada por el segundo periodo de déficit de agua) redujo significativamente el rendimiento cuántico

del fotosistema dos Y(II), generando en las plantas una mayor tasa de foto-inhibición en horas de mayor intensidad luminosa (MOURADI *et al.* 2016). La variación de la fluorescencia de clorofila Fv/Fm está ligada generalmente a características de adaptabilidad de la alfalfa a la sequía, sin embargo, en el cultivar Alta Sierra Illapata aquí evaluado el Fv/Fm fue menor al término del día. Resultados similares en alfalfa bajo condiciones de sequía fueron presentados por Aranjuelo *et al.* (2011), reportando la reducción general de parámetros relacionados con el proceso fotosintético. A través de la actividad ACC deaminasa de las cepas de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp evaluadas, se reporta mayor rendimiento Y(II) y Fv/Fm en horarios de alta luminosidad, además al finalizar el día las plantas quedan menos fotoinhibidas, lo que estaría ligado a la mayor conductancia estomática en los tratamientos con inoculación de PGPR en comparación al inoculado solo con *Ensifer meliloti*, además de la mayor tasa de nodulación lo que estaría aumentando la fijación de Nitrógeno fundamental en la actividad fotosintética de las leguminosas (NOORI *et al.* 2018).

3.6. CONCLUSIONES

El déficit hídrico en el cultivo de alfalfa disminuye parámetros de crecimiento a niveles morfológicos, fisiológicos y productivos, sin embargo, mediante la co-inoculación de *Ensifer meliloti* - PGPR con actividad ACC deaminasa, se logró aumentar el número de nódulos, evitando la senescencia de los mismos por efecto de la sequía, y el conductancia estomática fue reducido significativamente permitiendo mantener una mejor tasa fotosintética durante periodos de estrés.

3.7. AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al financiamiento del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Project FONDECYT N° 11130479. Se agradece también al laboratorio de Fisiología de praderas del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) por los equipos e invernadero facilitados para el desarrollo de esta investigación.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- ALI, S.; CHARLES, T.; GLICK, B. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 80, p. 160-167, 2014.
- ANYIA, A.O.; HERZOG, H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas Exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, vol. 20, p. 327 – 339, 2004.
- ARANJUELO, I.; MOLERO, G.; ERICE, G.; AVICE, J.C.; NOGUÉS, S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, vol. 62, p. 111–123, 2011.
- BARNAWAL, D.; BHARTI, N.; MAJI, D.; SINGH, C.; KALRA, A. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*, vol. 171, p. 884-894, 2014.
- BERTRAND, A.; DHONT, C.; BIPFUBUSA, M.; CHALIFOUR, F.; DROUIN, P.; BEAUCHAMP, C. Improving salt stress responses of the symbiosis in alfalfa using salt-tolerant cultivar and rhizobial strain. *Applied Soil Ecology*, vol. 87, p. 108-117, 2015.
- CEDEÑO-GARCÍA, G.; GERDING, M.; MORAGA, G.; INOSTROZA, L.; FISCHER, S.; SEPÚLVEDA-CAAMAÑO, M.; PYARZÚA, P. Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas in Chile: Effects on early nodulation in alfalfa. *Chilean Journal of Agricultural Research*, vol. 78, n. 3, p. 360-369, 2018.
- DEL POZO, A.; OVALLE, C.; ESPINOZA, S.; BARAHONA, V.; GERDING, M.; HUMPHRIES, A. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*, vol. 84, p.16-22, 2017.
- ERICE, G.; IRIGOYEN, J.; SANCHEZ, M.; AVICE, J.; OURRY, A. Effect of drought, elevated CO₂ and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins

- (VSP) in taproot of nodulated alfalfa before and after cutting. *Plant Science*, vol. 172, n. 5, p. 903–912, 2007.
- ERICE, G.; LOUAHLIA, S.; IRIGOYEN, J.; SANCHEZ, M.; AVICE, J. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of plant physiology*, vol. 167, n. 2, p.114–20, 2010.
- ERICE, G.; LOUAHLIA, S.; IRIGOYEN, J.; SANCHEZ, M.; THAMI, I.; AVICE, J. Water use efficiency, transpiration and net CO₂ exchange of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 72; n. 2, p.123–130, 2011.
- GALAMERO, E.; GLICK, B. Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology*, vol. 169, p. 13-22, 2015.
- GLICK B. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, vol. 169, p. 30-39, 2014.
- HARDOIM, P.; OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, vol. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.
- KISIEL, A.; KEPCZYŃSKA, E. *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa. *Planta*, vol. 243, p. 1169-1189, 2016.
- Lawson, T.; Murchie, E. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental botany*, Vol. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013.
- LIU, F.; STÜTZEL, H. Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*, vol. 102, p. 15-27, 2004.
- MEDRANO, H.; BOTA, J.; CIFRE, J.; FLEXAS, J.; RIBAS, M.; GUILAS, J. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, vol. 43, p. 63–84, 2007.
- MENG, WANG.; JIE, CHANG.; YING, GE.; SCOTT, X.; CHANG, C. H.; SIYU, WANG. Ecophysiological Differentiation of Two Mosla Species in Response to

- Nitrogen and Water Levels, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 41, n. 22, p. 2699-2712, 2010.
- MORALES, C.; PINO, M.; DEL POZO, A. Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, vol. 162, p. 234–241, 2013.
- MOURADI, M.; BOUIZGAREN, A.; FARISSI, M.; LATRACH, L.; QADDOURY, A.; GHOULAM, C. Seed osmopriming improves plant growth, nodulation, chlorophyll fluorescence and nutrient uptake in alfalfa (*Medicago sativa* L.) rhizobia symbiosis under drought stress. *Scientia Horticulturae*, vol. 213, p. 232-242, 2016.
- NASCIMENTO, F.; BRÍGIDO, C.; GLICK, B.; OLIVEIRA, S.; ALHO, L. *Nesorhizobium cicero* LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 55, p. 15-21, 2012.
- NOORI, F.; ETESAMI, H.; NAJAFI, H.; KHOSHKHOLGH-SIMA, N.; HOSSEINI, G.; ALISHAHI, F. Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 162, p. 129-138, 2018.
- OLDROYD, G.; ENGSTROM, E.; LONG, S. Ethylene Inhibits the Nod Factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant cell*, vol. 13, p. 1835-1949, 2001.
- OVALLE, C.; ESPINOZA, S.; BARAHONA, V.; GERDING, M.; HUMPHRIES, A.; DEL POZO, A. Lucerne and other perennial legumes provide new options for rain fed livestock production in the Mediterranean-climate region of Chile. *Ciencia e investigación Agraria*, vol. 42, n. 3, p. 461-474, 2015.
- RASHID, S.; CHARLES, T.; GLICK, B. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, vol. 61, p.217-224, 2012.
- SARMA, R.; SAIKIA, R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil*, vol. 377, p. 111-126, 2014.

- SUBRAMANIAN, P.; KRISHNAMOORTHY, R.; CHANRATANA, M.; KIM, K.; SA, T. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in psychrotolerant bacteria modulates ethylene metabolism and cold induced genes in tomato under chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 89, p. 18-23, 2015.
- STAUDINGER, C.; MEHMETI-TERSHANI, V.; GIL-QUINTANA, E.; GONZALES, E.M.; HOFHANSI, F.; BACHMANN, G.; WIENKOOOP, S. Evidence for a rhizobia-induced drought stress response strategy in *Medicago truncatula*. *Journal of Proteomics*, vol. 136, p. 202-213, 2016.
- TITTABUTR, P.; SRIPAKDI, S.; BOONKERD, N.; TANTHANUCH, W.; MINAMISAWA, K.; TEAUMROONG, N. Possible role of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Activity of *Sinorhizobium* sp. BL3 on Symbiosis with Mung Bean and Determinate Nodule Senescence. *Microbes and Environments*, vol. 30, n. 4, p. 310-320, 2015.
- WANG, K.; LI, H.; ECKER, J. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, p.131–152, 2002.
- YACTAYO, W.; RAMÍREZ, D.; GUTIÉRREZ, R.; MARES, V.; POSADAS, A.; QUIROZ, R. Effect of partial root-zone drying irrigation timing on potato tuber yield and water use efficiency. *Agricultural Water Management*, vol. 123, p. 65–70, 2013.
- ZHANG, G.; SUN, Y.; SHENG, H.; LI, H.; LIU, X. Effects of the inoculations using bacteria producing ACC deaminase on ethylene metabolism and growth of wheat grown under different soil water contents. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 125, p. 178-184, 2018.

4. CONCLUSION GENERAL

Cepas de bacterias aisladas desde las rizosfera de plantas de alfalfa cultivadas en suelos de secano interior de Chile, mostraron diferentes propiedades promotoras del crecimiento en las plantas como producción de AIA, solubilización de Fosforo y actividad de ACC deaminasa. Sin embargo solo treinta y dos cepas mostraron compatibilidad con el rizobio asociado a alfalfa, *Ensifer meliloti*.

La co-inoculación de bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y *Ensifer meliloti* en plantas de alfalfa, promueve la nodulación temprana y aumenta la tasa de nodulación bajo condiciones de crecimiento sin estrés, además evita la senescencia de los nódulos en plantas sometidas a estrés por déficit hídrico.

La co-inoculación de *Ensifer meliloti* - PGPR con actividad ACC deaminasa, logró mejorar parámetros de crecimiento en las plantas sometidas a sequía permitiendo mantener una mejor tasa fotosintética, conductancia estomática y parámetros de área foliar.

