



Participación de las citocininas en la estimulación del crecimiento vegetal por *Bacillus megaterium*

Randy Ortíz-Castro, Eduardo Valencia-Cantero, y José López-Bucio

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B5; Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia; Michoacán, México

PALABRAS CLAVE

Arabidopsis;
estimulación del
crecimiento vegetal;
desarrollo de la raíz;
rizobacterias

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante, entre otros mecanismos, la producción de fitohormonas como las auxinas, giberelinas y citocininas. Se conoce poco sobre las rutas de señalización que median los efectos benéficos de las PGPRs en las plantas. Recientemente reportamos la identificación de una cepa de *Bacillus megaterium* que promueve el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*. En este trabajo se investigó el papel de la ruta de señalización de las citocininas en las respuestas de las plantas a la inoculación con *B. megaterium*, utilizando plantas silvestres de *A. thaliana* y mutantes carentes de uno, dos o los tres receptores probables de citocininas *CRE1*, *AHK2* y *AHK3*, y el gene *RPN12* que codifica para una subunidad del proteosoma, involucrado en la ruta de señalización de las citocininas. Se encontró que la promoción del crecimiento vegetal provocado por *B. megaterium* coincide con un efecto prolífico en la formación de las raíces laterales y que ambos efectos se reducen en las mutantes afectadas en el receptor de citocininas *AHK2-2*, en las combinaciones de dobles mutantes que incluyen este gen y en la mutante afectada en el gene *RPN12*. La triple mutante *CRE1-12/AHK2-2/AHK3* fue la más resistente a la inoculación en términos de promoción del crecimiento y modificación del desarrollo de la raíz. El uso de la línea reportera de citocininas *ARR5:GUS* confirma que *B. megaterium* activa la señalización por citocininas. Nuestros resultados indican que los receptores de citocininas tienen un papel fundamental en la estimulación del crecimiento ejercido por *B. megaterium* en *A. thaliana*.

ABSTRACT

Accumulating evidence indicates that plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) influence plant growth and development by the production of phytohormones such as auxins, gibberellins, and cytokinins. Little is known about the genetic basis and signal transduction components that mediate the beneficial effects of PGPRs in plants. We recently reported the identification of a *Bacillus megaterium* strain that stimulated growth of *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris* seedlings. In this report, the role of cytokinin signaling in mediating plant responses to bacterial inoculation was investigated using *A. thaliana* mutants lacking one, two or three of the putative cytokinin receptors *CRE1*, *AHK2* and *AHK3*, and *RPN12* a gene codifying a subunit of the proteasome involved in cytokinin signaling. We show that plant growth promotion by *B. megaterium* is reduced in *AHK2* single and double mutant combinations and in *RPN12*. Furthermore, the triple cytokinin receptor *CRE1-12/AHK2-2/AHK3-3* knockout was the most resistant to inoculation in terms of growth promotion and root developmental responses. The use of the cytokinin reporter line *ARR5:GUS* confirms that *B. megaterium* activates cytokinin signaling. Our results indicate that cytokinin receptors play an important role in plant growth promotion by *B. megaterium*.

KEYWORDS

Arabidopsis;
plant growth
stimulation;
root development;
rhizobacteria

INTRODUCCIÓN

Existen diversas especies de rizobacterias que se asocian con las plantas y promueven el crecimiento vegetal. Estas se han denominado PGPRs por sus siglas en inglés *plant growth promoting rhizobacteria* y son organismos de vida libre, habitantes de la rizósfera con una influencia positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Persello-Cartieaux et al., 2003).

Las PGPR pertenecen a diversos géneros tales como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, y *Bacillus* y han sido aislados de una amplia gama de especies vegetales tales como la cebada, el arroz, la canola, el frijol y *Arabidopsis* (Alström 1991; Alexandre et al., 1996; Persello-Cartieaux et al., 2001). La contribución de las PGPRs al crecimiento de las plantas puede ser ejercido mediante mecanismos que incluyen la competencia con microorganismos deletéreos (Ongena et al., 1999), la activación de los sistemas de defensa de las plantas (Pieterse et al., 1996; Schuhegger et al., 2006) y la producción de sustancias que regulan el crecimiento vegetal como las auxinas, las citocininas y diversos compuestos volátiles bacterianos (Selvadurai et al., 1991; Lebuhn et al., 1997; Arkhipova et al., 2005; Kai et al., 2009).

Las fitohormonas están involucradas en el control del crecimiento y en casi todos los procesos importantes para el desarrollo de las plantas. La secreción bacteriana de fitohormonas puede impactar la arquitectura de la raíz mediante la inducción de pelos radiculares y raíces laterales que participan en la absorción de agua y nutrientes, contribuyendo así al crecimiento vegetal (Persello-Cartieaux et al., 2003).

Para dilucidar los mecanismos de señalización mediante los cuales las PGPRs promueven el crecimiento y modifican el desarrollo vegetal, se ha utilizado a *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para identificar cepas bacterianas con capacidad de promover el crecimiento. De esta forma, en trabajos previos, identificamos una nueva cepa de *Bacillus megaterium* (UMCV1), que promueve el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris* tanto en condiciones *in vitro* como crecidas en el suelo (Valencia-Cantero et al., 2007; López-Bucio et al., 2007). La inoculación con *B. megaterium* afecta el sistema radicular de las plantas silvestres de *A. thaliana*

en una forma que sugiere que el efecto está mediado por fitohormonas, incluyendo la inhibición en el crecimiento primario de la raíz, seguido por un incremento en el número de raíces laterales y la longitud de los pelos radiculares (López-Bucio et al., 2007). También se reportó que los efectos de la inoculación bacteriana en el crecimiento de las plántulas son independientes a las rutas de señalización de auxinas y etileno, como queda de manifiesto por un incremento en la producción de biomasa y la estimulación de las raíces laterales de las mutantes resistentes a auxinas *aux1-7*, *axr4-1* y *eir1-1* y las mutantes afectadas en la respuesta a etileno *etr1-1* y *ein2-1*. En este mismo trabajo, la inoculación de *B. megaterium* no incrementó la expresión del gen reportero inducible por auxinas *DR5:GUS*, indicando que esta bacteria no activa la vía de señalización de las auxinas (López-Bucio et al., 2007). Estas observaciones indican que las rutas de señalización involucradas en la estimulación del crecimiento en respuesta a la inoculación con *B. megaterium* están aún por ser identificadas en las plantas, siendo la ruta de señalización de las citocininas una clara candidata.

Las citocininas son una clase de fitohormonas producidas tanto por plantas como por microorganismos (Aloni et al., 2006), su producción por bacterias asociadas a plantas ha sido bien documentada (Salamone et al., 2001; Nieto y Frankenberger, 1990). Por lo anterior, puede esperarse que la inoculación de plantas con bacterias capaces de producir citocininas conduzca a un incremento en la concentración de citocininas en los tejidos radiculares y que esto tenga un impacto en el crecimiento de la planta. A la fecha se han identificada tres receptores de citocininas, *CRE1*, *AHK2* y *AHK3* (Kakimoto, 2003; Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Mähönen et al., 2006). Las plantas con una sola mutación o mutantes doblemente afectadas en cualquiera de las combinaciones de los genes *CRE1*, *AHK2* y *AHK3* tienen un desarrollo normal de la raíz. Sin embargo la mutante triple *cre1-12/ahk2-2/ahk3-3* muestra un crecimiento menor de la raíz primaria y un arresto en el crecimiento de los

Direcciones de correspondencia y e-mail del autor principal:

Instituto Investigaciones Químico Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B5; Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia; Michoacán, México; Tel.: 5.443.3265788; Fax: 5.443.3265788. Email: vcantero@umich.mx

tallos indicando que la percepción de las citocininas es importante para el desarrollo normal de las plantas (Kakimoto, 2003; Higuchi et al., 2004).

Para determinar una posible participación de la vía de señalización de las citocininas en la estimulación del crecimiento vegetal por *B. megaterium*, en este trabajo se utilizó *Arabidopsis thaliana* como planta modelo y mutantes afectadas en cada uno de los tres receptores conocidos de citocininas *CRE1*, *AHK2* y *AHK3*, así como en el gen *RPN12*. Adicionalmente, se analizaron los efectos de la inoculación con esta bacteria sobre la expresión del marcador inducible por citocininas *ARR5:GUS* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan este gen reportero. Con estas herramientas, en el presente estudio se presenta evidencia que indica que la ruta de señalización de las citocininas desempeña un papel importante en la estimulación del crecimiento y la regulación de la arquitectura de la raíz por *B. megaterium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

Se emplearon plantas de *A. thaliana* ecotipos Col-0 y C24 (silvestres) y las plantas mutantes sencillas *cre1-12*, *abh2-2tk*, *abh3-3*; las mutantes dobles *cre1-12/abh2-2tk*, *cre1-12/abh3-3*, y *abh2-2tk/abh3-3*, y la triple mutante *cre1-12/abh2-2/abh3-3*. Estas mutantes han sido descritas previamente en Kakimoto (2003), Higuchi et al. (2004), Nishimura et al. (2004) y Mähönen et al., (2006).

La triple mutante *cre1-12/abh2-2/abh3-3* fue obtenida a partir de una población heterocigota de *cre1-12/cre1-12*, *abh2-2tk/abh2-2tk* y *abh3-3/AHK3*. En cajas de Petri con medio de Murashige y Skoog (Sigma) 0.2x solidificado con 8 g/L⁻¹ de agar de micropropagación (medio MS). Las mutantes triples desarrollan una raíz primaria corta y pueden distinguirse fácilmente de las plantas heterocigotas *cre1-12/cre1-12*, *abh2-2tk/abh2-2tk* y *abh3-3/AHK3*. Para seleccionar las triples mutantes, se seleccionó un conjunto de semillas producido por las plantas heterocigotas *cre1-12/cre1-12*, *abh2-2tk/abh2-2tk* y

abh3-3/AHK3, se desinfectaron superficialmente y se sembraron en cajas con medio MS. Después de 10 días las plántulas con la raíz primaria corta, fueron transferidas a cajas con medio MS fresco para realizar el experimento correspondiente.

También se empleó la mutante *rpn12a-1*, mutante con el fondo genético del ecotipo C-24 que es deficiente en una subunidad del proteosoma de *Arabidopsis* S26, que es importante para numerosas respuestas del crecimiento reguladas por citocininas (Smalle et al., 2002).

La bacteria empleada fue *B. megaterium* UMCV1 descrita en López-Bucio et al. (2007). *Bacillus megaterium* fue aislada en una búsqueda de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de maíz crecidas en suelo ligeramente ácido de una localidad de la Ciudad de Uruapan Michoacán, México (19° 23' 56.69" N, 102° 02' 41.17" O), en condiciones de invernadero y fue identificada como *B. megaterium* con base en un análisis de su gene ribosomal de 16S.

Las semillas de las plantas fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 95% (vol/vol) por 5 min y blanqueador comercial al 20% (vol/vol) por 7 min. Después de 5 lavados con agua destilada esterilizada, las semillas fueron geminadas y crecidas en cajas de Petri con medio MS.

Las cajas con las semillas y/o plantas se colocaron verticalmente en un ángulo de 65° para propiciar que la raíz de las plantas creciera sobre la superficie del agar y permitir el crecimiento de los tallos. Las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento Percival con fotoperiodo controlado de 16 h luz y 8 h obscuridad a una intensidad de 200 μmol m² s⁻¹ y una temperatura de 24 °C.

Efecto de la inoculación de *B. megaterium* en el crecimiento y el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

Para investigar si la inoculación de *B. megaterium* estimula a la ruta de señalización de citocininas, se evaluó el efecto de la inoculación bacteriana a 5 cm del meristemo de la raíz primaria de plantas silvestres y mutantes de 5 días de edad (5 días después de la germinación). En el caso de los experimentos con las triples mutantes la inoculación de *B. megaterium* se hizo tanto a 2 como a 5 cm del meristemo de las raíces

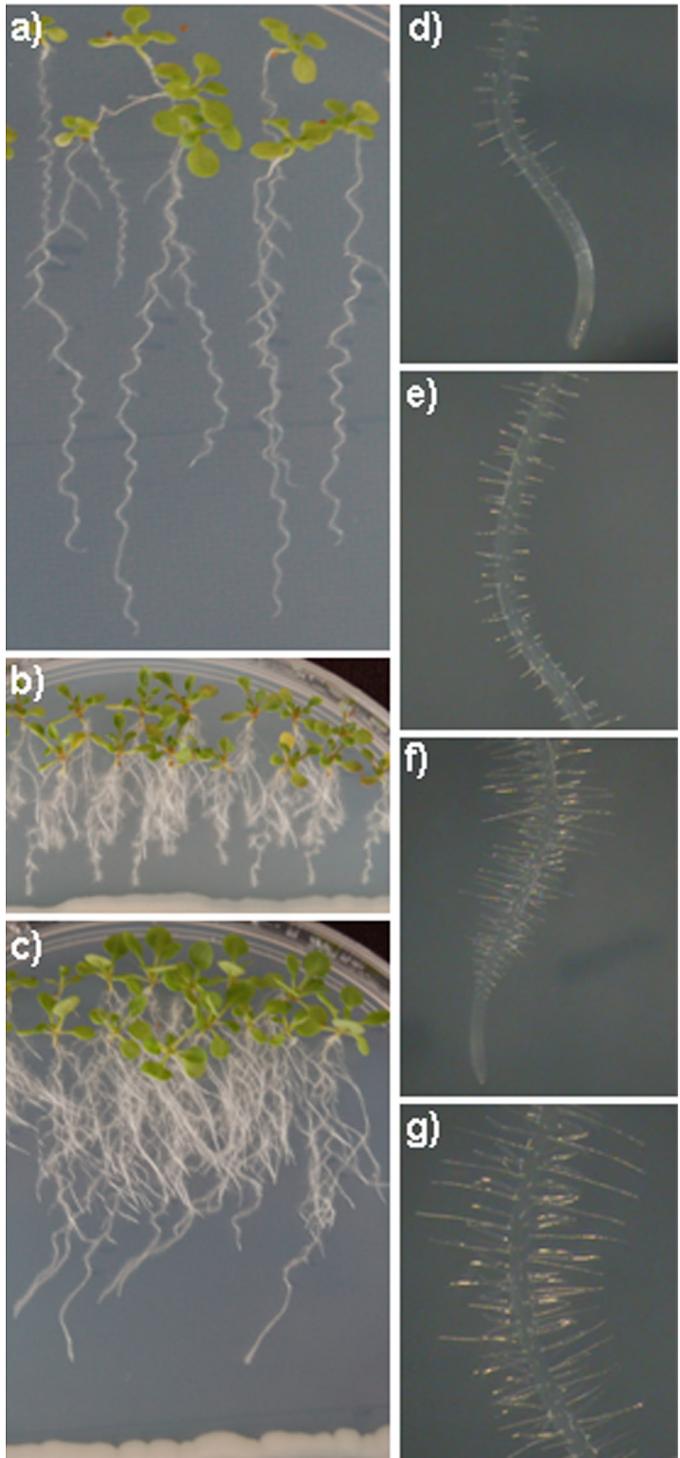
primarias y las plantas empleadas tuvieron 10 días al momento de ser inoculadas. En todos los casos se incluyeron controles consistentes de plantas no inoculadas.

Después de 6 días de crecimiento en presencia de *B. megaterium*, se cuantificó la biomasa de los tallos y las raíces de 4 grupos de 20 plantas por cada genotipo y cada distancia de inoculación. La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Determinación de la actividad de la β -glucuronidasa (GUS)

Las plantas transgénicas que expresan el gene reportero *ARR:uidA* (De Agostino et al., 2000) se procesaron con X-Gluc 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil, β -D-glucurónido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1M, pH 7) con 2 mM ferrocianuro de potasio y 2 mM ferricianuro de potasio, durante 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron con 0.24 N HCl en metanol 20% (v/v) durante 60 min a 62 °C. La solución se sustituyó por NaOH 7% (v/v) en etanol 60% (v/v) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Las plantas se deshidrataron con

FIGURA 1. Efecto de *Bacillus megaterium* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas silvestres de *Arabidopsis* (ecotipo Col-0). Se presentan fotografías representativas de a) plantas no inoculadas, b) plantas inoculadas a 2 cm de la punta de la raíz, c) plantas inoculadas a 5 cm. Los paneles d y e muestran el fenotipo de los pelos radiculares en plantas no inoculadas, en tanto que e y f presentan los efectos de la inoculación a 5 cm.



tratamientos de etanol a 40, 20 y 10% (v/v) por 24 horas en cada periodo. Finalmente se substituyó el etanol por glicerol 50% (v/v). Las raíces procesadas se incluyeron en portaobjetos para su análisis en un microscopio estereoscópico Leica L2.

RESULTADOS

***Bacillus megaterium* promueve la formación de raíces laterales y pelos radiculares en plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) fueron germinadas y crecidas durante 5 días en medio de Murashige y Skoog (MS) al 0.2x. Este medio incluye todos los nutrientes necesarios para

el crecimiento vegetal en concentraciones adecuadas (López-Bucio et al., 2007). En esta etapa, las plantas fueron inoculadas mediante un estriado con *B. megaterium* a 2 o 5 cm de distancia de las puntas de las raíces. Después de 6 días adicionales de crecimiento, las plantas no inoculadas formaron una raíz primaria con crecimiento indeterminado (pivotante o continuo) con raíces laterales en la región proximal a la base del tallo (Fig. 1a). Las plantas inoculadas a 2 o 5 cm se caracterizaron por la formación de sistemas radiculares altamente ramificados con una gran proliferación de raíces laterales (Fig. 1b-c). Para investigar con mayor detalle las alteraciones morfogenéticas inducidas por *B. megaterium*, también se evaluaron los efectos de la inoculación con esta bacteria en el desarrollo de los pelos radiculares, los cuáles son células epidérmicas especializadas en la captación de agua y de nutrientes.

En plantas no inoculadas se observaron pelos radiculares en la zona de diferenciación próxima al meristemo de la raíz (Fig. 1d), alcanzando éstos su mayor tamaño en la zona media de la raíz (Fig. 1e). La inoculación bacteriana estimuló el crecimiento de los

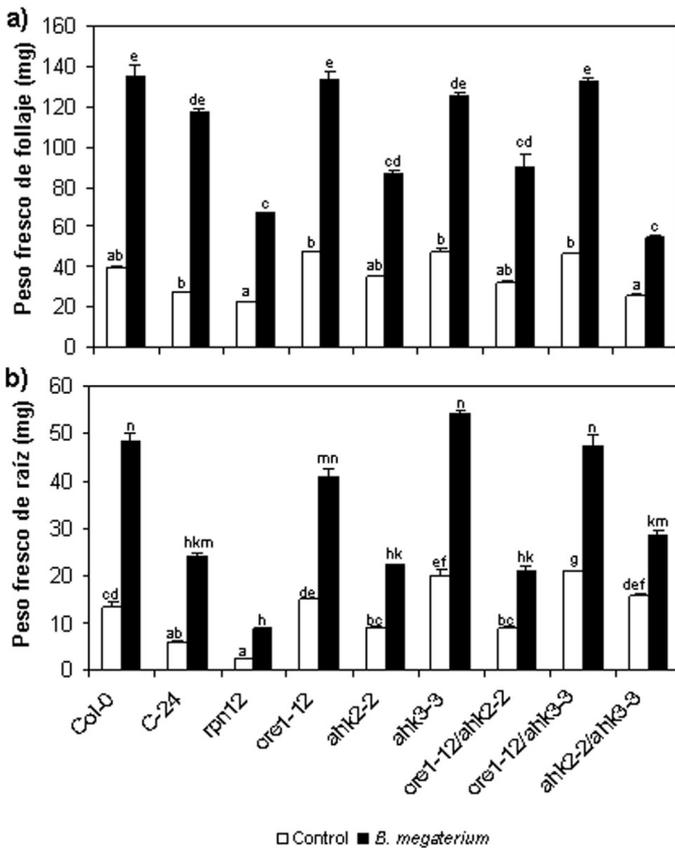


FIGURA 2. Efecto de *Bacillus megaterium* sobre la producción de biomasa de plantas silvestres de *Arabidopsis* (ecotipo Col-0) y de diferentes líneas mutantes afectadas en la ruta de señalización de citocininas. El material vegetal fue cosechado seis días después de la inoculación bacteriana a 5 cm de la punta de la raíz, cuantificándose por separado el peso fresco de la raíz y del follaje. Los pesos frescos de cada parte de la planta se cuantificaron en una balanza analítica. a) Peso fresco del follaje. b) Peso fresco de la raíz. Los valores representan las medias de cuatro grupos de 20 plántulas. Se usan diferentes letras para indicar medias que difieren significativamente ($p < 0.05$).

pelos radiculares tanto en la zona de diferenciación como en la región media de la raíz primaria (Fig. 1f-g), indicando un efecto positivo sobre la elongación celular.

Efecto de la inoculación con *Bacillus megaterium* en la producción de biomasa en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* y en mutantes afectadas en la respuesta a citocininas.

Para investigar los efectos de *B. megaterium* en el crecimiento vegetal y el papel de las citocininas en este proceso, se comparó la producción de biomasa en plantas silvestres de los ecotipos Col-0 y C-24 con mutantes afectadas en la respuesta a citocininas reportadas previamente en la literatura. Estas mutantes incluyeron pérdidas de función para los receptores de citocininas CRE1, AHK2-2 y AHK3-3 y para el gen RPN12. Las plantas silvestres y las mutantes individuales o dobles fueron inoculadas a 5 cm de la punta de la raíz con *B. megaterium* y 7 días después

se comparó el peso fresco del follaje y de la raíz con plantas no inoculadas. Como se aprecia en la Figura 2, la inoculación bacteriana causó un incremento de tres veces en el peso fresco de tallos y raíces en plantas silvestres de los ecotipos Col-0 y C24. En contraste los efectos en la promoción del crecimiento debido a la inoculación se redujeron en la mutante *rpn12a-1* (con el fondo genético C-24), en las mutantes en el receptor *AHK2-2* y en sus combinaciones en mutantes dobles (Fig. 2a-b).

Posteriormente se probaron los efectos de la inoculación de *B. megaterium* en el crecimiento y el desarrollo radicular de plantas de la línea triple mutante *cre1-12/abh2-2/abh3-3*, carente de los tres receptores de citocininas. En este experimento la inoculación bacteriana se realizó a 2 y a 5 cm de las puntas de las raíces ya que la mutante forma raíces muy cortas en condiciones normales de crecimiento, evaluando a los 6 días después de la inoculación de la bacteria el crecimiento general de las plantas y la arquitectura de la raíz. En los controles de plantas silvestres (Col-

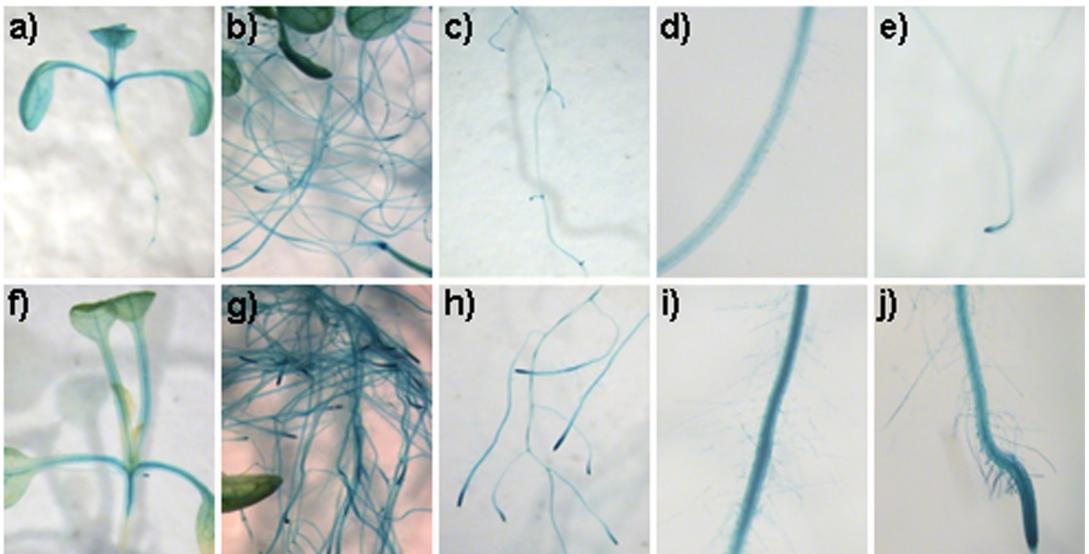


FIGURA 3. Efecto de *Bacillus megaterium* sobre la expresión del marcador de citocininas *ARR5:uidA*. Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan *ARR5:uidA* se germinaron y crecieron durante 5 días en medio MS 0.2x e inoculadas posteriormente con *B. megaterium* a una distancia de 5 cm de las puntas de las raíces. El análisis de la expresión de *GUS* se realizó a los 6 días después de la inoculación. Se presentan fotografías representativas de la expresión de *GUS* en diferentes regiones de la planta. a-e) plantas no inoculadas, f-j) plantas inoculadas con *B. megaterium*. Notar el incremento de la expresión del marcador de citocininas en las raíces de las plantas inoculadas.

0), la inoculación bacteriana estimuló el crecimiento y el desarrollo. En particular, las plantas inoculadas desarrollaron su sistema radicular robusto con gran proliferación de raíces laterales (Fig. 3a-b). En triples mutantes *cre1-12/abk2-2/abk3-3* no inoculadas, el crecimiento general de las plantas está afectado, dando lugar a plantas enanas con raíces pequeñas (Fig. 3c). En estas plantas la inoculación bacteriana a 2 o 5 cm falló en estimular el crecimiento y el desarrollo de la raíz (Fig. 3d-e).

Bacillus megaterium induce la expresión de un marcador de respuesta a citocininas

La respuesta alterada a *B. megaterium* observada en las mutantes de citocininas sugiere fuertemente que esta ruta de señalización podría participar mediando las respuestas del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* durante la inoculación. Este resultado nos motivó a estudiar los efectos de la bacteria sobre la

expresión de un marcador inducible por citocininas denominado *ARR5:GUS* en plantas transgénicas que expresan este marcador (De agostino et al., 2000). En las plantas no inoculadas, el marcador se expresa preferentemente en la zona meristemática del follaje y en las puntas de las raíces (Fig. 4a-e). La inoculación con *B. megaterium* incrementó claramente la expresión del marcador en las raíces, lo cual correlaciona con un crecimiento abundante de estas estructuras (Fig. 4f-j).

DISCUSIÓN

Los efectos observados de la inoculación con *B. megaterium* en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* sugieren que esta bacteria ejerce efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. El análisis de las respuestas de un grupo de mutantes afectadas en la señalización por citocininas muestra que los genes *AHK2* y *RPN12* juegan un papel preponderante

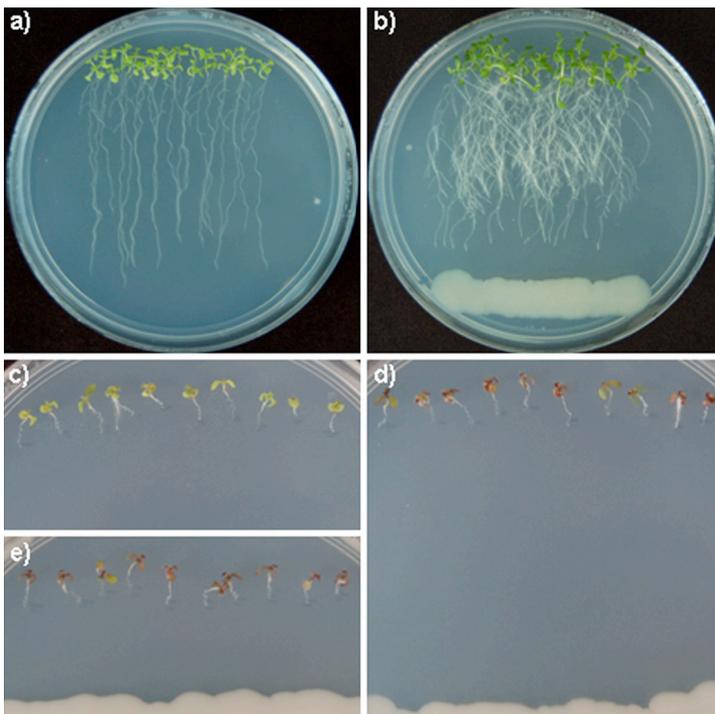


FIGURA 4. Efecto de *Bacillus megaterium* sobre el crecimiento y el desarrollo del ecotipo silvestre de *Arabidopsis* (Col-0) y su triple mutante en los receptores de citocininas *cre1-12/abk2-2/abk3-3*. (a) Plantas de *Arabidopsis* (Col-0) crecidas en la superficie de placas de agar suplementado con medio de Murashige y Skoog (MS). b) Plantas de *Arabidopsis* que fueron inoculadas con *B. megaterium* a una distancia de 5 cm de las puntas de las raíces a los 5 días después de la germinación y posteriormente crecidas durante un periodo de 6 días en presencia de la bacteria. c) Plantas de la triple mutante *cre1-12/abk2-2/abk3-3* no inoculadas, d) inoculadas a 5 cm o e) a 2 cm de la punta de la raíz primaria. Notar el efecto de la estimulación del crecimiento por inoculación bacteriana y la formación extensiva de raíces laterales en las plantas silvestres. Estos efectos estuvieron ausentes en la triple mutante de los receptores de citocininas. Las fotografías muestran unidades representativas de cuatro cajas por tratamiento.

en la estimulación del crecimiento y el desarrollo ejercida por *B. megaterium*, y que los tres receptores de citocininas (*CRE1*, *AHK2* y *AHK3*) son requeridos para que la planta efectúe una respuesta normal a la estimulación producida por la inoculación bacteriana.

No obstante que la red de señalización entre plantas y rizobacterias ha sido estudiada exhaustivamente durante los últimos 20 años, se han reportado hasta ahora muy pocos componentes moleculares involucrados en la interacción entre las bacterias y las plantas (Persello-Cartieaux et al., 2003). Nuestro trabajo aporta nuevos conocimientos mostrando que la estimulación del crecimiento vegetal por *B. megaterium* requiere de una vía de señalización de citocininas en *A. thaliana*. Esto es interesante, ya que reportes previos habían sugerido que diferentes PGPRs provenientes de la rizósfera pueden producir citocininas que ejercen un pronunciado efecto estimulador del crecimiento vegetal en cultivos de interés agrícola (Selvadurai et al., 1991; Arkhipova et al., 2005). Este efecto puede ser mediado por diferentes homólogos de receptores de citocininas.

El análisis de la expresión del marcador de respuesta a citocininas *ARR5::GUS* indica que *B. megaterium* activa mecanismos genéticos relacionados con la vía de señalización de las citocininas, esto podría ser explicado por una capacidad potencial de producción de citocininas por la bacteria. La difusión de los compuestos hacia la planta activaría directamente los receptores responsables de traducir la respuesta en patrones de crecimiento estimulando la producción de raíces laterales y pelos radiculares y en consecuencia aumentando la producción de biomasa foliar y radicular.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Doctores Tatsuo Kakimoto y Richard D. Vierstra por su muy amable donación de semillas de mutantes de *A. thaliana*.

REFERENCIAS

- Alexandre G, Jacoud C, Faure D, Bally R. (1996) Population dynamics of a motile and a nonmotile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 19: 271-278.
- Aloni, R., Aloni, E., Laghans, M. y Ullrich, C.I. (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 97: 883-893.
- Alström, S. (1991) Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J Genet App Microbiol.* 37: 495-501.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Mertynenko, E.V. y Kudoyarova, G.R. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272 :201-209.
- Bloemberg, G.V. y Lugtenberg, B.J.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Op Plant Biol.* 4: 343-450.
- De Agostino, I.B., de Ruere J. y Kieber, J.J. (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124:1706-1717.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R. y Kakimoto, T. (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 8821-8826.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., and Piechulla, B. (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81: 1001-1012.
- Kakimoto, T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 605-627.

- Lebuhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecol.* 22: 325-234.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderon, E., Velázquez-Becerra, C., Farias-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I. y Valencia-Cantero, E. (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 207-217.
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. y Helariutta, Y. (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 311: 94-98.
- Nieto, K.F. y Frankenberger, W.T. (1990) Microbial production of cytokinins. *Soil Biochem* 6:191-248.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. y Ueguchi, C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1365-1377.
- Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T.C., Cornelis, P., Koedam, N. y Belanger, R.R. (1999) Protection of cucumber against *Phytophthora* root rot by fluorescent pseudomonads: Predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* 48: 66-76.
- Persello-Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C., Thibaud, M.C., Achouack, W., Robaglia, C. y Nussaume, L. (2001) Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* 212: 190-198.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. y Robaglia, C. (2003) Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189-199.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A. y van Loon, L.C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is dependent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- Salamone, G.I.E, Hynes, R.K. y Nelson, L.M. (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol.* 47: 404-11.
- Schuegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmidt, M., van Breusegem, F. y Eberl, L. Induction of systemic plant resistance by *N*-acylhomoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 29: 909-918.
- Selvadurai, E.L., Brown, A.E. y Hamilton, J.T.G. (1991) Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biol Biochem.* 23: 401-403.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babychuk, E., Kushnir, S., Durski, A. y Vierstra, R.D. (2002) Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* 14: 17-32.
- Valencia-Cantero, E., Hernandez-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J.E., Ruth Alfaro-Cuevas y Lopez-Bucio, J. (2007) Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* 291: 263-273.