

Capítulo 4

PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS POR *AZOSPIRILLUM* SP. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y TECNOLÓGICOS DE LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Cassán¹, Fabricio; Sgroy, Verónica; Perrig, Diego; Masciarelli, Oscar & Luna, Virginia

Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la interacción planta-microorganismo.
Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 8. Km 601. Río Cuarto. CP 5800.

E-mail: fcassan@exa.unrc.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La bibliografía en general considera a *Azospirillum* como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola (Bashan et al. 2004). Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum sp.*, se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon and Labandera González 1994). En tal sentido, sabemos que cerca del 80% de las bacterias aisladas de rizosfera son capaces de producir compuestos del tipo ácido indole-3-acético (Cheryl and Glick 1996). Desde una perspectiva revisionista, sabemos que numerosos trabajos detallan los efectos benéficos de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, del inglés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y mencionan los importantes cambios morfoló-fisiológicos que ocurren en una planta inoculada; sin embargo, en muchos casos no se han identificado los compuestos responsables de generar esta respuesta y normalmente se consideran dentro de un modelo de «caja negra» en el que solo trasciende como resultado, la promoción del crecimiento debida a la presencia del microorganismo o de alguno de sus metabolitos en el medio de cultivo. Como punto de partida a esta breve revisión, consideramos que la producción de fitohormonas y otros compuestos reguladores del crecimiento ha sido estudiada en las últimas tres décadas en diferentes microorganismos y que una parte importante de este flujo de conocimiento ha sido focalizado en el género *Azospirillum* para el que: (a) se han identificado un considerable número de compuestos reguladores que serían potencialmente responsables de modificar la arquitectura y crecimiento vegetal: (b) se han identificado los genes responsables de la síntesis de estos compuestos y su regulación en determinadas

condiciones ambientales; (c) se ha correlacionado la respuesta de crecimiento de plantas inoculadas con los niveles de determinadas fitohormonas producidas por el microorganismo en el medio de cultivo, en la rizósfera o en los tejidos colonizados, en los que adicionalmente se ha probado que la inoculación reproduce la respuesta de la aplicación exógena de alguno de estos compuestos y finalmente (d) existe evidencia de que mutantes hiperproductores de hormonas, determinan efectos más significativos que las cepas isogénicas, a nivel balance hormonal de la planta y su crecimiento en diferentes condiciones experimentales. Tien et al. (1979) fueron los primeros en sugerir que bacterias rizoféricas del género *Azospirillum* podrían mejorar el crecimiento vegetal por la producción de fitohormonas, tales como auxinas, especialmente ácido indol acético (AIA) y citocinas (Cit); sin embargo trabajos posteriores determinaron la capacidad de este microorganismo para producir compuestos del tipo giberelinas (GAs), etileno (E), en incluso ácido abscísico (ABA), entre otras moléculas.

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en *Azospirillum*

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de *vida libre* o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas, pero han tenido una menor significancia agronómica respecto de lo que se esperaba inicialmente. En contrapartida, uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal, estaría relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tales como ácido indol acético; citocininas (Tien et al. 1979); giberelinas (Bottini et al. 1989) y etileno (Strzelczyk et al. 1994), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) (Perrig et al. 2007) y la diamina cadaverina (CAD) (Cassán et al. 2003).

Auxinas

Es el nombre genérico que representa a un grupo de compuestos químicos fitoreguladores que se caracterizan por su capacidad de inducir la elongación de las células del tallo en la región subapical y que logran reproducir el efecto fisiológico del ácido indol 3-acético (AIA). Estos compuestos han sido vinculados a procesos de orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz y gravedad, diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallos y raíces (Ross et al. 2000). La producción y metabolismo bacteriano de auxinas ha captado la atención de los investigadores desde dos puntos de vista: a nivel metabólico, por la capacidad del microorganismo para producir estos compuestos y regular su producción en diferentes condiciones ambientales (Costacurta and Vanderleyden 1995) y a nivel morfofisiológico por el efecto que ocasiona su producción en asociación con distintas especies vegetales (Falik et al. 1989). Así, los miembros de este género han proporcionado un excelente modelo experimental para investigar y comprender fisiológica y molecularmente el rol de esta fitohormona sobre el crecimiento microbiano y vegetal. Varias auxinas de ocurrencia natural han sido descritas en la literatura como producto del metabolismo bacteriano. En cultivos puros de *Azospirillum* sp., además de la forma principal, el ácido indol-3-acético (AIA), se han identificado otros compuestos indólicos de interés, tales como el ácido indol-butírico (IBA) (Costacurta et al. 1994), indol láctico (Crozier et al. 1988), indol acetamida (Hartmann et al. 1983), indol acetaldehído (Costacurta et al. 1994), indol etanol e indol metanol (Crozier et al. 1988), triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no caracterizados aún (Hartmann et al. 1983).

Biosíntesis bacteriana de auxinas

En microorganismos se han propuesto, al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del ácido indol acético (AIA) a partir de triptofano (Trp), denominadas vía del indol 3-piruvico (AIP), ácido 3-acetamida (AIM) y la vía de la triptamina (Tam) (Cheryl and Glick 1996). Adicionalmente se ha descrito una vía que no requiere de este precursor para la biosíntesis del AIA y que se denomina vía independiente del Trp. A pesar de esta diversidad, en el metabolismo procarótico la biosíntesis parece seguir dos rutas predominantes: la ruta de la indol 3-acetamida (IAM) y la del ácido indol 3-piruvico (IPA) por encima de la vía de la triptamina (Tam) y de la vía independiente de triptofano. Lambrecht et al. (2000) han encontrado un patrón de biosíntesis de AIA característico de la interacción planta-microorganismo que depende específicamente de rol ecofisiológico de la especie bacteriana que interactúa, siendo estas fitopatogénicas o promotoras del crecimiento. Tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas savastanoi* y *Erwinia herbicola*, todas especies fitopatogénicas que sintetizan el AIA de manera inducible por la vía de la indol 3-acetamida (IAM) y de manera constitutiva por la vía del indol 3-piruvico (IPA). La expresión del gen clave de la vía de la indol acetamida (*iaaM*), es predominante cuando la bacteria se encuentra en el apoplasto vegetal en forma invasiva, mientras que la expresión del gen clave de la vía del indol 3-piruvico (*ipdC*) es predominante cuando la bacteria se encuentra en la superficie de la hoja de manera saprofítica. En contrapartida, la mayor parte de las bacterias promotoras del crecimiento, tales como *Azospirillum* sp. o *Bacillus* sp. sintetizan AIA de manera inducible a través de la vía del IPA (Patten and Glick 1996). Abdel-Salam and Klingmüller (1987) lograron aislar once mutantes (Tn-5) de *Azospirillum lipoferum* capaces de producir entre el 45-90% menos de AIA, comparados con sus cepas isogénicas salvajes. La capacidad residual de estos mutantes, sugirió en ese momento dos explicaciones posibles: la existencia de varias rutas de síntesis de AIA o la presencia de múltiples copias de genes codificantes de transferasas de aminoácidos aromáticos con baja especificidad por el sustrato. En la actualidad sabemos que al menos cuatro vías de síntesis diferentes han sido descritas para el género *Azospirillum* (Prinsen et al. 1993), tres dependientes del Trp: Indol 3-piruvato (AIP), Indol 3-acetamida (AIM) y Triptamina (Tam) y una que no utilizaría a este aminoácido como precursor (Costacurta and Vanderleyden 1995). La magnitud de expresión de cada vía depende fundamentalmente de las condiciones de crecimiento bacteriano y en general se considera que la síntesis mayoritaria depende de la disponibilidad del Trp en el sustrato. En este sentido, la evidencia establece que si el aminoácido se encuentra disponible, la vía predominante es la del ácido indol-3-piruvico (IPA) y de manera secundaria la vía de la indol 3-acetamida (IAM). La vía del **ácido indol 3-piruvico (AIP)** parece tener gran homología a la descrita en plantas superiores (Nonhebel 1993) y su secuencia comienza con la conversión del Trp a AIP por una transferasa de aminoácidos aromáticos, seguida por decarboxilación del producto a indol 3-acetaldehído, a cargo de una indol piruvato decarboxilasa y posterior oxidación a AIA por una indolacetaldehído dehidrogenasa (Costacurta et al. 1994). La vía del IPA fue confirmada inicialmente en *A. brasilense* Sp245 cuando se clonó por primera vez el gen *ipdC* que codifica para una IPyA decarboxilasa (Costacurta et al. 1994). La posterior caracterización molecular descrita por Van de Broek et al. (1999), determinó que la expresión de este gen era regulada corriente arriba por el mismo IAA, lo cual representó la primera descripción de un gen bacteriano específicamente regulado por auxinas. El promotor del gen *ipdC* contiene un elemento de respuesta a auxinas (*AuxRE*), el cual es similar al *AuxRE* encontrado en los promotores de los genes inducibles por auxinas de plantas superiores (Lambrecht et al. 1999). Por su parte, la vía de la **indol 3-acetamida (IAM)** ha sido una de las más estudiadas en bacterias fundamentalmente fitopatogénicas e involucra la acción consecutiva de dos grupos de enzimas: Trp-monooxigenasas responsables de la oxidación del Trp a indol 3-acetamida y AIM-hidrolasas responsables de la subsecuente hidrólisis del precursor a AIA, y para las que sendos genes ya han sido clonados en *Pseudomonas syringae* (Yamada et al. 1985) y *Agrobacterium*

tumefaciens (Klee et al. 1984). La existencia de esta vía en *A. brasilense* fue sugerida en los trabajos de Prinsen et al. (1993) y en los ensayos de Bar and Okon (1993). Posteriormente, en ensayos realizados con varias cepas de *A. brasilense* y mutantes con reducida capacidad de sintetizar AIA, en medio de cultivo químicamente definido, Prinsen et al. (1993), determinaron la existencia de Indol 3-acetamida en la fracción sobrenadante del medio de crecimiento, con lo que se presentaba evidencia directa de la capacidad bacteriana de sintetizar este precursor. Una tercera vía de menor importancia ha sido descripta para este género, la vía de la **Triptamina**, en la que los eventos bioquímicos involucran la conversión inicial del Trp a triptamina, catalizada por enzimas tipo Trp-decarboxilasas dependientes del piroxidal fosfato, seguida de la conversión a indolacetaldéhidó por aminaoxidases. Aunque esta vía está presente en plantas (Conney and Nonhebel 1991) y hongos (Frankenberger and Arshad 1995) se ha puesto muy poca atención en bacterias y solo fue sugerida para dos especies en particular. *Bacillus cereus* (Perley and Stowe 1996) y *Azospirillum brasilense* (Hartman et al. 1983), quienes comprobaron la capacidad bacteriana de producir AIA a partir de triptamina en medio de cultivo químicamente definido. Posteriormente, Ruckdäschel and Klingmüller (1992) detectaron compuestos intermediarios y confirmaron esta vía de síntesis en sobrenadantes de cultivos de *Azospirillum lipoferum*. Desde el punto de vista molecular, ni las enzimas, ni los genes de la vía han sido caracterizados para este género. Finalmente se ha descripto una vía **independiente del Trp** en la que trabajando con precursores metabólicos marcados, Prinsen et al. (1993) sugirieron que la conversión de AIA (en ausencia de Trp) en diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* seguía una distribución del 0,1; 10; y 90% para las vías de la IAM, AIP y la Independiente del Trp respectivamente; sin embargo, esta vía habría sido desestimada recientemente para este microorganismo y solo se considerarían aquellas dependientes del Trp (Yaacov Okon, *comunicación personal*).

Rol fisiológico de las auxinas producidas por *Azospirillum* sp.

La fuente primaria de auxinas exógenas en plantas superiores, proviene de la flora microbiana rizosférica, donde casi el 80% de los grupos de bacterias establecidos serían capaces de producir *in vitro* compuestos tipo ácido indole-3-acético (IAA) (Cheryl and Glick 1996). La respuesta de la planta al AIA exógeno puede variar de benéfica a deletérea, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos de la planta. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del contenido endógeno de la hormona por la actividad microbiana del suelo ó sobre la planta, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador y modificar parcialmente el metabolismo celular con la consecuente promoción del crecimiento. Este es el caso de bacterias del género *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, para las que ha sido descripta la producción de auxinas como parte de la capacidad promotora del crecimiento, fundamentalmente en el desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos. Un aumento excesivo del contenido de auxinas, pondrá en marcha un mecanismo homeostático para reducir la concentración endógena de la hormona. Este mecanismo involucraría la translocación xilemática de conjugados desde la raíz a la parte aérea (Martens and Frankenberger 1992) y un rápido catabolismo de auxinas mediado por AIA oxidases. (Scott 1972). Este es el caso de las infecciones ocasionadas por *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* y algunos patovares de *Pseudomonas syringae*, relacionados con procesos de patogénesis que no serán abordados en esta revisión. La interacción comienza en la rizósfera, donde la mayoría de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano y síntesis de AIA son producidos Ej: aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, nucleótidos y otros metabolitos con actividad biológica como las auxinas (Rovira, 1970). La presencia de AIA y compuestos derivados en los exudados vegetales, es suficiente para que *Azospirillum* incremente la expresión del gen *ipdC* con el consecuente aumento de

la síntesis de AIA, siempre que las cantidades de precursores (como el triptofano) sean suficientes (Vande Broek et al. 1999). El resultado, se traducirá en un incremento del contenido endógeno de la hormona que dará inicio a la respuesta celular por la interacción de esta, con sus receptores en la membrana celular, mismos que desencadenarán una cascada de señalización que tendrá como sitio primario de actividad la pared celular y el núcleo (Clealand 1987). Desde el punto de vista fisiológico, la capacidad de *Azospirillum* sp. para sintetizar auxinas y transferirlas al tejido vegetal determinaría dos tipos de respuesta, dependiendo del tipo de planta inoculada. En leguminosas, determinará una modificación a nivel de la fijación biológica de nitrógeno sobre la formación y funcionalidad de nódulos. La mayoría de los miembros del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* inducen la formación de nódulos en raíces de leguminosas y estas estructuras proveen a la planta de nitrógeno tomado y fijado desde la atmósfera. Hace más de 70 años desde que Thiman, (1936) propuso que las auxinas jugarían un importante rol en la formación y desarrollo del nódulo y en la actualidad muchos estudios indican que cambios en el balance de esta hormona son un pre-requisito para la organogénesis del nódulo (Mathesius et al. 1997). En tal sentido, Prinsen et al. (1991) sugieren que la síntesis de factores *nod* y AIA en *Rhizobium* es disparada por flavonoides *nod*-derivados de la planta. Si bien *Azospirillum* sp. es incapaz de inducir la formación de nódulos propiamente dichos en leguminosas, se ha probado que la aplicación exógena de ciertas auxinas sintéticas en concentraciones superfisiológicas en raíces de gramíneas, induce la formación de estructuras tumorales denominadas paranódulos que serían efectivamente colonizadas por *Azospirillum* y en ellas, la bacteria fijaría nitrógeno de manera más eficiente (Christiansen-Weniger 1998). Otros trabajos han demostrado la respuesta benéfica de la co-inoculación con *Rhizobium* y *Azospirillum* en leguminosas, a nivel de la respuesta de la fijación biológica del nitrógeno (Yahalom et al. 1990) no solo como un aumento en el número de nódulos, sino que adicionalmente como una mayor actividad nitrogenasa de los simbiosomas. En otros trabajos, Schmidt et al. (1988) demostraron que la co-inoculación con *Rhizobium mellotti* (productor ineficiente de AIA) y *Azospirillum brasilense* (productor eficiente de AIA) en semillas de *Medicago sativa*: (a) incrementaba significativamente el número de nódulos en la raíz del huésped (b) que este aumento estaba en relación directa al número de azospirilos presentes en el medio y (c) que esta respuesta era imitada por la adición de AIA en forma exógena. Por otro lado, en gramíneas, el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar y seleccionar una cepa promotora del crecimiento vegetal. El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la elongación de la raíz principal ó por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en un estadio crítico del desarrollo vegetal. Para comprender este mecanismo bacteriano y su efecto sobre la planta se han establecido dos estrategias de estudio. La primera compara el efecto del crecimiento radical en plantas inoculadas con mutantes alterados en los niveles de síntesis de AIA, la segunda resulta de la modificación del tamaño del inóculo de una cepa bacteriana sobre la idea de que un mayor tamaño de inóculo de una cepa productora de AIA incrementará en forma proporcional el contenido endógeno de esta hormona en la planta, lo cual podrá ser visualizado por modificaciones en la morfología del órgano específico y por el contenido endógeno de la hormona en el tejido vegetal (Baca et al. 1994). En este sentido, Kolb and Martin (1985) comprobaron que la inoculación de *Beta vulgaris* sp. con *Azospirillum. brasilense*, causaba un incremento del número de raíces laterales que las plantas control y esto se correlacionó con la identificación de altos niveles de AIA en cultivos puros bacterianos. Adicionalmente, la aplicación exógena de AIA, causó un efecto similar al de las plántulas inoculadas. En otros trabajos, Fallik et al. (1989), inocularon plántulas de maíz (*Zea mays* L.) con la misma cepa bacteriana y comprobaron por análisis de GC-MS, que los niveles de AIA e IBA, libres y conjugados en raíz de plantas inoculadas, eran superiores al de los controles sin inocular después de dos semanas desde la siembra. En forma simultánea, Tien et al. (1979) y Hubbell et al. (1979) probaron que la aplicación exógena de

AIA, GA₃ y Cinetina en *Pearl millet* y sorgo respectivamente, producía cambios en la morfología de raíz similares a los obtenidos en las plántulas inoculadas con *A. brasilense*. Kucey (1988) comprobó que la inoculación de trigo con *A. brasilense* simulaba el efecto del tratamiento exógeno con AIA y GA₃ a nivel del patrón de crecimiento de tallo y raíz. Zimmer et al. (1988), también en plantas de trigo, probaron que la adición exógena de AIA (completamente) y NO₂⁻ (parcialmente) eran sustituidas por la inoculación con *A. brasilense*. En otro interesante trabajo, Barbieri et al. (1988) probaron que la inoculación con una cepa salvaje de *A. brasilense* (activa productora de AIA) causaba un aumento del número y longitud de raíces laterales en plantas de trigo y que la inoculación con una mutante *nif* (pobre productora de AIA) no conseguía modificar el desarrollo radical. Posteriormente, Barbieri et al. (1991) mostraron que plántulas de trigo inoculadas con *A. brasilense* SpM7918, pobre productora de AIA, mostraban una reducida capacidad de promover el crecimiento del sistema radical y que esto se traducía en una menor capacidad de las plántulas, para tomar nutrientes del medio de cultivo. Bothe et al. (1992) probaron que la inoculación de plantas de trigo con *A. brasilense* incrementaba dramáticamente la formación de raíces laterales y levemente el peso seco de la raíz y la formación de pelos radicales, mientras que la aplicación exógena de AIA aumentaba sustancialmente el peso seco radical, pero no tenía efecto sobre la formación de raíces laterales. Dubrovsky et al. (1994), demostraron que la inoculación con *A. brasilense* Cd en *Arabidopsis thaliana* incrementaba significativamente la longitud de los pelos radicales hasta en 2 órdenes, comparado con el control. Estos resultados revelan que las auxinas de origen microbiano y en particular, las producidas por *Azospirillum* sp. podrían tener un interés significativo para la industria agrícola. Estos compuestos producidos en forma continua y en baja concentración en el exterior de raíces ó en el interior de la planta proveen de una dosis hormonal constante que resulta suplementaria y beneficiosa para el crecimiento vegetal y un sistema mejorador a la aplicación exógena de formas sintéticas en el suelo cultivado.

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos) que regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación (Davies 1995). El uso de métodos fisicoquímicos de alta sensibilidad, para el análisis de fitohormonas, que combinan principalmente el uso de CG-MS ha revelado que las giberelinas son un amplio grupo de productos naturales, constituido al menos por 130 compuestos esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de todas las plantas superiores (Mander 1991), producidos tanto por plantas, hongos y bacterias (Hedden and Phillips 2000). Desde el punto de vista estructural, las giberelinas libres se dividen en dos grandes grupos: aquellas que poseen un complemento completo de átomos de carbono, (GAs-C₂₀) y aquellas en las que el C₂₀ se pierde (GAs-C₁₉). Todas las GAs están carboxiladas en el C₇, con la excepción de GA₁₂-aldehído y pueden tener presentes una (GA₄), dos (GA₇), tres (GA₈) ó cuatro (GA₃₂) funciones hidroxilo. La posición en la molécula que presenta hidroxilación (OH), representa unos de los puntos más importantes en la determinación de la actividad biológica. Así, la hidroxilación de los C₃ y C₁₃ en sus posiciones β y α respectivamente, produce la activación de la molécula, mientras que la hidroxilación del C₂ en su posición β tiene efecto fuertemente negativo sobre su actividad biológica (Pearce et al. 1994). Además de las formas libres, se han identificado formas conjugadas endógenas que incluyen: éter glucosídicos (GA-G), donde la glucosa se une a la estructura de la GA por un grupo hidroxilo, y los ésteres glucosídicos (GA-GE), donde la glucosa se une a la molécula de la hormona por medio de un grupo carboxilo del C₇ (Sembder et al. 1968). La mayoría de las moléculas que se encuentran conjugadas, lo hacen con glucosa (Schneider and Schliemann 1994); sin embargo, también se han identificado conjugados giberélicos de aminoácidos unidos al grupo carboxilo del C₇ por medio de una unión peptídica (Sembder et al. 1980). Los

aspectos bioquímicos y fisiológicos de los conjugados de GAs han sido extensamente discutidos por Rood y Pharis (1987), donde señalan que la característica más importante es su falta de actividad biológica y su posible reversibilidad mediada por enzimas del tipo hidrolasas.

Biosíntesis y Metabolismo

Las GAs pueden definirse como productos de la vía de los diterpenos y su síntesis, en plantas superiores se inicia con la ciclización de un precursor común de 20 moléculas de carbono, el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Este intermediario es sintetizado en plástidos a partir de ácido mevalónico (AM), isopentenil difosfato proveniente de gliceraldehído 3-fosfato ó bien como se comprobó recientemente por piruvato proveniente de la vía de las deoxixulosas 5-fosfato (Litchenthaler, 1999). En tejidos de crecimiento vegetativo, ocurre la *primera fase de síntesis*, con la ciclización del GGPP en protoplástidos y resulta en la formación definitiva del *ent*-kaureno, en dos pasos sucesivos que requieren de la actividad de dos enzimas claves: la *copalil difosfato sintasa* (CPS), la cual produce el intermediario copalil difosfato y la *ent*-kaureno *sintasa*, que sintetiza el producto final *ent*-kaureno. En una *segunda fase de síntesis*, el *ent*-kaureno es convertido en GAs biológicamente activas por una serie de reacciones de oxidación, catalizadas por dos tipos de enzimas. Las primeras reacciones ocurren en membranas extraplásticas y resultan en una contracción del anillo B de C₆ a C₅, tomando así la molécula la forma giberelica característica. Estas reacciones son catalizadas por las Citocromo P-450 dependientes monooxigenasas y culminan con la formación de GA₁₂, la que se considera la primera GA, como tal, de la vía. Posteriormente y en una *tercera fase de síntesis*, este intermediario o bien GA₅₃ (producto de la 13 α -hidroxilación de GA₁₂) es metabolizado por enzimas solubles, llamadas dioxigenasas 2-oxoglutarato dependientes, las que utilizan el 2-oxoglutarato como co-sustrato. Dos tipos de dioxigenasas son requeridas para convertir GA₁₂ ó GA₅₃ por vías paralelas en GAs activas. Las *C 20-oxidasas* y las *3 β -hidroxilasas*. Un tercer grupo de dioxigenasas 2-oxoglutarato dependientes, las *2 β -hidroxilasas*, producen la hidroxilación de la posición 2 β de la molécula, produciendo con ello la pérdida de actividad biológica (Mac Millan 1997).

Biosíntesis y metabolismo de GAs por Azospirillum sp. en medio de cultivo

Bottini et al. (1989) determinaron la capacidad de *Azospirillum lipoferum* Op33 de producir compuestos tipo GA₁, GA₃ e iso-GA₃ en medio de cultivo químicamente definido. La identificación de estas formas endógenas de GAs se realizó por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa con Monitoreo Selectivo de Iones (GC-MS-SIM), mientras que la cuantificación se realizó por medio de test biológicos en arroz (Murakami et al. 1972) y determinó una concentración equivalente a GA₃ de 20 y 40 pg.ml⁻¹ de GA₁ y GA₃ respectivamente. Janzen et al. (1992) analizaron la producción de GAs en medios de cultivos puros de *Azospirillum brasilense* Cd y en co-cultivos entre la bacteria y el hongo *Thricoderma harzianum* (controlador biológico de fitopatógenos). La identificación y cuantificación de GA₁, GA₃ e iso-GA₃ se realizó por GC-MS, a partir de cultivos puros y determinó que el patrón de producción era de GA₃>iso-GA₃>GA₁. En co-cultivos solo se pudo confirmar la presencia de GA₁ sin poder establecer la naturaleza del incremento y de la interacción que determinó solo la producción de una sola especie molecular. Piccoli and Bottini (1996) pusieron de manifiesto la capacidad de *Azospirillum lipoferum* para producir los precursores inmediatos GA₉ y GA₁₉, lo cual permitió especular sobre la existencia de por lo menos dos vías de síntesis en la bacteria. La primera mediada por reacciones de 13 α -hidroxilación temprana y que involucraría el metabolismo de GA₁₉ a un precursor inmediato GA₂₀ y la segunda mediada por reacciones de 3 β y 13 α -hidroxilación tardía y que involucraría la conversión de GA₉ a formas activas sobre el crecimiento

vegetal. Piccoli et al (1996) y Piccoli et al. (1998) confirmaron la capacidad de *Azospirillum lipoferum* Op 33 de producir GA₉, GA₂₀ y GA₅ en medio de cultivo químicamente definido, lo cual aporta nuevos elementos para el complejo esquema de síntesis bacteriana. En otros ensayos, Piccoli and Botiini (1994) demostraron la capacidad de *A. lipoferum* Op33 de metabolizar GA₂₀ a GA₁, una molécula biológicamente activa sobre el crecimiento vegetal en medio de cultivo químicamente definido. En este trabajo, no se caracterizó otro metabolito y esto permitió especular sobre la capacidad bacteriana de 3β-hidroxilar este precursor inmediato solo a esta forma activa por medio de una vía de 13α-hidroxilación temprana que finalizaría con la producción de GA₁. Adicionalmente, Piccoli et al (1996) confirmaron la capacidad de la misma cepa bacteriana para metabolizar GA₉ a GA₃ (otra molécula con actividad biológica). Estos resultados permitirían suponer que la promoción del crecimiento de plantas inoculadas, se debería al menos en parte, a la capacidad bacteriana de metabolizar precursores inmediatos de GAs, a formas biológicamente activas para el crecimiento de la planta. En otros ensayos, Piccoli et al. (1998), evaluaron exitosamente la capacidad bacteriana de hidrolizar glucosil conjugados de GAs, en medio de cultivo químicamente definido, modificado por la adición de un glucosil ester de GA₂₀ ó de 13-*O*-glucósido de GA₂₀, lo que confirmó la capacidad del microorganismo de aumentar en la planta el pool endógeno de formas activas de giberelinas por la hidrólisis de glucosa a partir de conjugados sin actividad biológica.

Biosíntesis y metabolismo rizosférico de GAs por *Azospirillum* sp.

Las experiencias que se detallarán a continuación, se desarrollaron en sistemas de cultivo hidropónico similares a los descritos por Murakami (1968) y Kobayashi et al. (1989) para evaluar el efecto de la producción o metabolismo de giberelinas en plantas tratadas exógenamente. En tales condiciones, se utilizó como modelo experimental plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) o maíz (*Zea mays* L.) mutantes enanas deficientes en la biosíntesis de GAs, que en estos casos resultaron de incalculable valor para el estudio de la fisiología y metabolismo bacteriano de estas fitohormonas. En el caso de maíz, los 4 mutantes propuestos por Phinney and Spray (1988) involucrados en la biosíntesis de GAs son *dwarf-1* (*d1*), *dwarf-2* (*d2*), *dwarf-3* (*d3*) y *dwarf-5* (*d5*), recesivos simples y no alélicos, que fenotípicamente presentan entrenudos acortados y porte achaparrado (Phinney 1956) que se revierte por la aplicación de formas activas de GAs (bacterianas o sintéticas) en forma exógena. En el caso de arroz, se reconocen varios cultivares mutantes característicos para la biosíntesis de GAs, siendo los mas importantes el cv. Waito C ó *dwarf-y* (*dy*) y el cv Tan-ginbozu ó mutante *dwarf-x* (*dx*) (Murakami, 1972). Tales cultivares poseen inhibida la síntesis de GAs en diferentes pasos metabólicos reconocidos y esto los convierte en una inmejorable herramienta para el estudio in vivo del metabolismo bacteriano de GAs. Algunas variaciones en los ensayos originales para cada especie, se relacionaron con la adición de distintos precursores de GAs ó formas conjugadas con glucosa de estas fitohormonas marcados con moléculas de deuterio o tritio (para facilitar su identificación y cuantificación) a plántulas mutantes previamente inoculadas con el objetivo de evaluar la capacidad bacteriana de accionar sobre estos compuestos por medio de reacciones metabólicas específicas dentro del sistema vegetal. Otros ensayos ponderaban la posibilidad de suplementar el medio de cultivo con retardantes del crecimiento vegetal, definidos como compuestos sintéticos, utilizados para reducir la longitud del tallo de plantas sin modificar patrones de desarrollo por la inhibición de la biosíntesis de giberelinas activas. En tal sentido, Rademacher (2000) considera cuatro grupos de retardantes: «compuestos tipo «cebolla», compuestos con un N-heterociclo, simuladores estructurales del 2-oxoglutarato y las 16,17-dihidro-GAs. Cada uno inhibe el metabolismo de GAs en diferentes pasos de la síntesis. Como resultado de estos ensayos Lucangeli and Bottini (1996) presentaron evidencia directa relacionada a la capacidad de *Azospirillum* sp. de revertir el enanismo genético de plántulas mutantes *d1* (*dwarf-1*) de maíz y *dx* (*dwarf-x*) arroz por la inoculación con *Azospirillum lipoferum* USA 5b y *Azospirillum brasiliense* Cd respectivamente. Las mutantes *d1*, incapaces de sintetizar formas activas de GAs, en el

estadio de primera hoja fueron inoculadas con *Azospirillum lipoferum* a nivel radical ó tratadas con 0,1; 1 ó 10 μg de GA_3 en la primera hoja, mientras que las mutantes *dx* con 48 h de crecimiento (pregerminadas en una solución de Uniconazol S-3370) fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd ó tratadas con dosis de 10 a 3000 fmol.planta^{-1} de GA_3 respectivamente. En todos los casos *A. lipoferum* incrementó el crecimiento del primer entrenudo y lámina foliar de las plántulas. Tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* revertieron el enanismo genético en ambos mutantes, con un fenotipo similar al observado al adicionar formas libres de GA_3 , lo cual se correlacionó con la capacidad bacteriana de producir formas activas de GAs y con la presencia del microorganismo en raíces, tallos y hojas de plantas inoculadas. Posteriormente, Lucangeli and Bottini (1997) observaron que plántulas de maíz (*Zea mays* L.) tratadas con Uniconazol S-3370 (retardante con un N-heterociclo) mostraban una fuerte reversión del enanismo luego de siete días de haber sido inoculadas con 2 cepas de *Azospirillum* sp. (*A. lipoferum* USA 5b y *A. brasilense* Cd) ó tratadas en forma exógena con GA_3 . En todos los tratamientos la reversión fue mayor a nivel de la parte aérea comparada con el sistema radical, sin embargo la inoculación con ambas cepas bacterianas determinó un fenotipo similar al presentado por la aplicación exógena de 0,1 $\mu\text{g.planta}^{-1}$ de GA_3 y esto se correlacionó con la identificación de GA_3 por GC-MS-SIM en la fracción ácida libre del extracto vegetal y con la presencia del microorganismo en la parte aérea y radical de las plántulas inoculadas. Cassan et al. (2001)⁽¹⁾ determinaron que la inoculación de *A. lipoferum* USA 5b y *A. brasilense* Cd en plántulas mutantes *dy* de arroz (*Oryza sativa* L) incubadas con 1 μg de $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_{20}$ determinaba la reversión del enanismo genético, correlacionado este fenotipo con la identificación por GC-MS-SIM de $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_1$ y con la presencia de la bacteria tanto en parte aérea como radical. Estos resultados permitieron especular sobre la capacidad *in vivo* de *Azospirillum* sp. de metabolizar precursores inmediatos de GAs a formas biológicamente activas sobre el crecimiento vegetal, por medio de reacciones de 3 β -hidroxilación. En este sentido, cuando se adicionó Prohexadiona-Ca, un retardante de crecimiento que actúa sobre la síntesis de GAs a nivel de la 3 β -hidroxilación, no se observó complementación y no se identificó $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_1$ por GC-MS-SIM, lo que sugirió fuertemente que la enzima que mediaría este paso metabólico en *Azospirillum* sp. podría ser una 3 β -hidroxilasa (dioxigenasa 2-oxoglutarato dependiente) similar a las identificadas en plantas superiores. Posteriormente Cassan et al. 2001⁽²⁾, determinaron la capacidad de *Azospirillum* sp. para 3 β -hidroxilar $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_9$ a $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_3$ un sistema experimental similar al descrito anteriormente. Con el objetivo de evaluar la capacidad bacteriana de metabolizar precursores primarios de formas activas de giberelinas, Cassan et al. (2002) determinaron que la inoculación con *Azospirillum* sp. en mutantes de arroz (*Oryza sativa* L) tratados exógenamente con 1 μg de $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_{12}$ determinaba una reversión del enanismo genético en las plantas inoculadas. Tal respuesta se explicaría por la capacidad bacteriana de metabolizar $^2\text{H}_2\text{-GA}_{12}$ a una forma giberélica con actividad biológica. Con el agregado de Uniconazol-p al medio de cultivo se observó un efecto inhibitorio de tal reversión, que se debería a la acción del retardante sobre el metabolismo bacteriano. Esto supondría que, parte del metabolismo de GAs en la bacteria estaría regulado por monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Chapple 1998), sensibles al Uniconazol (Rademacher 2000). En lo que se refiere al metabolismo de conjugados, Cassan et al. (2001) determinaron que *Azospirillum* sp. revertía el enanismo genético de mutantes simples de arroz (*Oryza sativa* L.) previamente alimentadas con $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_{20}$ -glucosil ester ó $[17,17\text{-}^2\text{H}_2]\text{-GA}_{20}$ -glucosil eter. En estos mutantes, se observó complementación genética y el fenotipo se correlacionó con la capacidad bacteriana de hidrolizar conjugados de GAs y metabolizarlos a formas 3 β -hidroxiladas, activas sobre el crecimiento vegetal.

Rol Fisiológico de las GAs producidas por *Azospirillum* sp.

Sobre las más de 130 GAs conocidas en la actualidad (Crozier et. al 2000), 13 son específicas de hongos, 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas. A pesar de esta amplia distribución y de la cantidad de formas conocidas, solo algunas pocas tienen actividad biológica *per se*. (Hedden

and Phillips 2000). La evidencia sugiere que en el caso de los microorganismos, que la producción de GAs y auxinas incrementa rápidamente al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento sugiriendo un reordenamiento celular disparado por la disminución de la fuente de C (Omay et al. 1993) o N (Piccoli and Bottini 1994⁽¹⁾) en el medio de cultivo. Resulta difícil hipotetizar el rol fisiológico de las GAs producidas por el microorganismo a nivel rizosférico y parece lógico pensar que la promoción del crecimiento general de las plantas colonizadas podría ser beneficioso para la bacteria desde el punto de vista de la disponibilidad de nutrientes a nivel rizosférico (Rademacher 1994), sin embargo atribuir este fenómeno promotor solo a la producción de una sustancia por parte del microorganismo, resulta un tanto simplista, sobre todo considerando la variabilidad de la respuesta y las numerosas especies que responden positivamente a la inoculación. La mayor parte de la investigación realizada en condiciones *a campo* se ha concentrado en cuantificar el aumento de la producción por la inoculación, fundamentalmente desde la incorporación de nitrógeno, y la producción de materia seca. Fulchieri and Frioni (1994) observaron que plantas de maíz inoculadas con una mezcla de tres cepas de *Azospirillum sp.* en un suelo Hapludol en el centro de Argentina mostraban un significativo incremento en el peso seco de raíces, parte aérea y semillas con respecto a sus controles sin inocular y en una combinación planta-bacteria que presupuso la existencia de una interacción específica entre ambas. Un fenómeno similar fue presentado para variedades Nepalesas de trigo inoculadas con cepas indígenas de *Azospirillum sp.* (Bhattarai and Hess 1993). En los primeros, la respuesta de crecimiento fue atribuida por lo menos a tres mecanismos bacterianos de promoción: la fijación de nitrógeno atmosférico, la producción de fitohormonas tipo auxinas y giberelinas y el efecto indirecto de la interacción de *Azospirillum sp.* con la comunidad rizosférica. Similares resultados fueron observados en plantas inoculadas de trigo y sorgo por Pozzo-Ardizzi (1982) y en varias especies de interés comercial (Paredes-Cardona et al. 1988, Sarig et al. 1990). Veinte años de evaluación de ensayos de inoculación *a campo*, muestran que un 60-70 % de las experiencias realizadas fueron exitosas, con un incremento significativo de la producción entre un 5-30% en cultivos de interés agronómico (Bashan and Olguin 1997). Los autores atribuyen como factor limitante del éxito, la utilización de células viables, extraídas de una fase exponencial de crecimiento en cultivos puros para la inoculación (Vandenhobe et al. 1993). Si bien estos resultados son contundentes desde la producción agrícola, desde el punto de vista ecofisiológico son insuficientes ya que todavía no se ha profundizado *a campo* sobre los mecanismos bacterianos responsables de la promoción del crecimiento vegetal así como el efecto de la producción de GAs por *Azospirillum sp.* Para una evaluación fisiológica de la importancia de las fitohormonas bacterianas en general y de GAs en particular en la promoción vegetal, sería necesario obtener un mutante de *Azospirillum sp.* totalmente deficiente en la síntesis de estos compuestos; sin embargo, no están disponibles todavía, lo cual representa un punto clave en el avance de la comprensión de los mecanismos de promoción vegetal de esta bacteria.

Citocininas

Son un grupo de compuestos naturales que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Químicamente son purinas, en su mayoría derivadas de la adenina, sustituidas en el N^6 , que incluyen sus respectivos ribótidos, ribósidos y glucósidos. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos y celulares entre los que se detallan el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas. Por definición, son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales. El primer regulador con actividad específica del tipo citocinina, fue descubierto por

Miller et al. (1955) y se denominó *cinetina* (K) la cual fue considerada como una forma no natural de la hormona. En 1963, Letham, identificó una forma natural que denominó *zeatina* (Z) y desde entonces más de 40 moléculas y sus metabolitos han sido clasificados. La bioactividad no es uniforme en las formas identificadas y en la mayoría de los casos depende del tipo de anillo aminopurina presente en la molécula; de la sustitución del N⁶ con una cadena simple derivada de una unidad isopurina; de la sustitución de las posiciones 2 y 9 del anillo, por grupos H, CH₃-S ó ribosil y de la presencia de una cadena insaturada lateral con un óptimo de 5 carbonos. Las formas con mayor actividad biológica descrita sobre tejidos o cultivos vegetales son la Zeatina (Z), isopentenil-adenina (iP), cinetina (K) y benziladenina (BAP) y todas poseen un doble puente alquilico en la posición N⁶.

Producción microbiana de citocininas

Muchos microorganismos de la rizósfera, entre los que se detallan bacterias y hongos, son capaces de sintetizar citocininas en cultivos químicamente definidos. Barea et al. (1976) encontraron que al menos el 90 % de las bacterias aisladas de la rizósfera de cultivos de interés agronómico, fueron capaces de producir compuestos tipo-citocinas. Como resultado de la íntima relación entre estos organismos y la superficie de la raíz, la producción exógena de esta hormona, puede tener un profundo efecto sobre el crecimiento de la planta. Al igual que lo reportado para las auxinas, la producción microbiana de esta hormona, podría el suplementar el contenido endógeno de la planta y en ciertos casos promover el crecimiento vegetal o resultar fitotóxica. En la actualidad sabemos que las plantas, responden a la adición exógena de citocininas, lo cual representa un punto de gran interés, debido a que no se conoce la significancia ecológica de la síntesis microbiana en los tejidos vegetales. A pesar de que la producción microbiana de citocininas en plantas superiores comenzó con modelos de microorganismos fitopatógenos, en la actualidad los investigadores se han volcado a la comprensión de este proceso en grupos de bacterias promotoras del crecimiento. El modelo mas estudiado en este sentido ha sido el de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se ha investigado tanto la producción de la hormona en el microsimbionte como en la planta. En este sentido, Nandwal et al. (1981) estudiaron el efecto de la adición exógena de K, promovía la iniciación del nódulo e incrementaba el contenido de *leg* hemoglobina en porortos. En otros ensayos (Yahalom et al. 1990), probaron que la adición exógena de BAP como la co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum* sp. incrementaba el número de nódulos formados en *Medicago polymorpha*. En otros ensayos, la aplicación exógena de citocininas incrementó la actividad nitrogenasa en nódulos de *Pisum sativum* en 66 % y 57 % respectivamente (Jaiswal et al. 1982). En otros trabajos, se ha probado que la citocininas han sido capaces de acumular transcriptos de los genes *ENOD2* y *ENOD40* en raíces de alfalfa y otras leguminosas (Hirsch et al. 1997). Otros trabajos, destacaron el rol de estas moléculas en la formación de nodulos de *Phaseolus vulgaris* (Puppo et al. 1974) y *Vicia faba* (Henson and Wheeler, 1976). Recientemente, un trabajo publicado en la revista Science publicado por Giraud et al. (2007), los autores probaron que los factores *nod* no serían necesarios, en ciertas leguminosas para el inicio de la nodulación y que esto se debería a que ciertas estirpes de *Bradyrhizobium* usarían una vía de activación alternativa, en la que un derivado de una purina (citosina) sería la responsable de disparar la respuesta de la formación del nódulo. En particular, la producción de citocininas por *Azospirillum* ha sido mayormente estudiada en *A. brasilense* y en medio de cultivo químicamente definido. En este sentido, Tien et al. (1979) probaron por diferentes tipo de cromatografía (HPLC y TLC) y bioensayos de inoculación en pear millet (*Pennisetum americanun* L.), la capacidad de *A. brasilense* para producir moléculas tipo-citocininas. Similares resultados fueron obtenidos por Cacciari et al. (1989) y al igual que en el trabajo anterior no se caracterizaron los compuestos parcialmente purificados. Horemans et al. (1986), modificaron la extracción cromatográfica (Sephadex LH-20) e incluyeron la técnica de radio inmunoanálisis (RIA) para probar que *A. brasilense* producía iP, (9R)iP y Z en medio de cultivo químicamente definido. La caren-

cia de información a nivel de la síntesis de citocininas en cultivos de *Azospirillum* se debió a la complejidad del análisis de estas hormonas, lo cual ha sido determinante en la discontinuidad de esta temática. La última referencia relacionada con la producción de citoquininas por *Azospirillum*, fué realizada por Strzelczyk et. al. (1994), en medio de cultivo modificado con diferentes fuentes carbonadas. Desde el punto de vista fisiológico, existe poca información que pueda relacionar en forma directa el efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp., la promoción del crecimiento vegetal y la producción de citocininas. En este sentido Tien et al. (1979) mostraron que la inoculación con *A. brasilense* provocaba cambios significativos a nivel de la morfología de raíz de plántulas de pearl millet, observando incremento en el número de raíces laterales y en la densidad de los pelos radicales de cada raíz. La aplicación exógena de auxinas, citocininas y giberelinas produjo cambios en la morfología de la raíz comparables a los obtenidos por la inoculación con la inoculación. En otros ensayos, Cacciari et al. (1989) determinaron que el cultivo mixto de *A. brasilense* y *Arthrobacter giacomelloi* mostraba una gran producción de giberelinas y citocininas, comparado con sus respectivos monocultivos, lo cual tendría gran importancia fisiológica, debido a que la presencia de distintas especies microbianas en la rizósfera, induciría la producción de citocininas y otras fitohormonas en bacterias PGPR.

Etileno

Junto con auxinas, giberelinas y citocininas, el etileno es una hormona muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Burg 1962). Debido a su composición gaseosa en condiciones fisiológicas, por mucho tiempo, no se quiso aceptar como una fitohormona; sin embargo diferentes trabajos, demostraron que su síntesis y acción sobre la planta, era crítica para determinados procesos fisiológicos. A pesar de que existen numerosas publicaciones relacionadas a la síntesis de esta hormona en plantas superiores (Mattoo and Suttle 1991), muy pocos trabajos han sido publicados sobre la biosíntesis microbiana (Arshad y Frankenberger 1993) y menos aún en *Azospirillum* sp. El etileno es una molécula muy simple y simétrica, compuesta por 2 átomos de C (unidos en doble ligadura) y 4 átomos de H, soluble en agua en aproximadamente 140 ppm, 25 C y 760 mm Hg (15 veces mas que el oxígeno). Es muy activo y puede ejercer sus efectos fisiológicos a concentraciones muy bajas en el tejido vegetal (0.1 ppm). En plantas superiores, todos los tejidos tienen capacidad de sintetizar esta hormona, pero en general la magnitud de la expresión, se asocia al estado de crecimiento y desarrollo de los mismos, siendo mas activa en aquellos tejidos en activa división celular, que se encuentran bajo condiciones de estrés ó en estado de senescencia (Burg and Burg 1968). Desde que Gane (1934) reportó por primera vez la capacidad de las plantas de sintetizar etileno, una gran variedad de compuestos, que incluyen metionina, ácido linolénico, propanol, β -alanina, etionina, etanol, glicerol, ácidos orgánicos y hasta glucosa y sacarosa (Yang 1974), han sido propuestos como posibles precursores de la hormona; sin embargo, en un trabajo *in vitro* de modelaje no-enzimático, Abeles and Rubistein (1964), revelaron que la metionina era el precursor natural por excelencia. En el caso de la síntesis microbiana, los precursores propuestos fueron muy variados (Fukuda and Ogawa 1991) pero la L-metionina ha sido el sustrato mayormente descrito en los cultivos bacterianos. La regulación de la producción de etileno en plantas superiores depende mayoritariamente de las enzimas consideradas «clave» de la biosíntesis de esta hormona: S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetasa, 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) sintetasa y ACC oxidasa. Tanto los genes que codifican para estas enzimas como sus elementos reguladores han sido caracterizados, modificados y re-introducidos en plantas de interés agrícola con fines agronómicos (Fluhr and Mattoo 1996). La SAM sintasa cataliza la primera reacción de la biosíntesis a partir de metionina, aumentando el contenido de S-adenosil-L-metionina (SAM) para diversas rutas metabólicas, dentro de las que se detallan la biosíntesis de Etileno (Fluhr and Mattoo 1996) y poliaminas (Even-Chen et al. 1982). La segunda reacción es catalizada por la ACC sintasa y

determina la hidrólisis de la SAM para formar ACC y 5'-metiltioadenosina (MTA) (Kende, 1989). Finalmente la ACC oxidasa comanda la conversión de ACC a Etileno, CO₂ y cianuro (John, 1991). Dentro de los factores que inducen la producción de Etileno, el estadio de un órgano influye en la tasa de síntesis de esta hormona, siendo mayor en etapas donde las células están en división, maduración ó senescencia (Burg y Burg 1968). En general hay una asociación directa entre una alta tasa de respiración y la presencia de etileno; así, tejidos senescentes ó dañados existe un alto contenido de la hormona. La aplicación de altas dosis de auxinas, puede estimular la síntesis de etileno. Morgan y Hall (1964) han probado que la adición exógena de auxinas induce la síntesis de etileno en tejidos vegetativos, pero no en frutos. Por otra parte la formación de etileno está directamente relacionada con una condición de estrés de los tejidos (Beyer et al. 1984); bajas temperaturas, exceso de calor, inundación, sequía, estimulan este proceso y forman una interesante red de respuesta con otros reguladores, como ácido absísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y auxinas (AIA). Diversos trabajos han presentado evidencia de que esta hormona tendría un rol decisivo en el establecimiento de las relaciones simbióticas, tales como la formación de nódulos y micorrización. En la interacción con *Rhizobium*, la aplicación exógena de etileno ha mostrado un efecto negativo sobre la formación y funcionalidad de los nódulos. En este sentido, Grobbelar et al. (1971) demostraron que la nodulación se reducía en un 90 % en explantos de cebada tratados en forma exógena con 0,4 ppm de etileno.

Producción de etileno por *Azospirillum*

Existe muy poca información disponible, relacionada a la producción de etileno por *Azospirillum* y su efecto sobre el crecimiento vegetal. Trabajos de Primrose and Dilworth (1976) determinaron la capacidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre, *Azotobacter* y *Bacillus* de producir etileno en medio de cultivo químicamente definido y esto fue un catalizador para que Strzelczyk et al. (1994) testearan la capacidad de *Azospirillum* de producir este compuesto *in vitro* sobre diferentes fuentes carbonadas. Sus resultados determinaron que la bacteria podía sintetizar etileno y que la producción dependía de la presencia de metionina en el medio de cultivo. Recientemente, Krumpholz et al. (2006) evaluaron la respuesta de crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con *Azospirillum brasilense* FT326 (superproductora de IAA), correlacionando el aumento significativo en el número y longitud de raíces, con la producción vegetal de etileno de hasta 10 veces superiores a los controles. Los cambios morfológicos fueron acompañados de un aumento de actividad de la ACC-sintasa, una de las enzimas clave de la ruta de síntesis de esta hormona. Según Peck and Kende (1995), el paso limitante para la biosíntesis de etileno es la conversión de la S-adenosilmetionina (SAM) a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), catalizada por la ACC sintasa. La expresión y la actividad de esta enzima, así como la producción de etileno, incrementan por la adición de AIA exógeno. Estos antecedentes indicarían que el aumento de etileno, al menos en parte de debería a un cross-talk entre el AIA producido por la bacteria en la vía de síntesis del etileno como sugieren Rahman et al. (2002). En contraposición, algunos investigadores proponen un modelo en el que la capacidad de algunas bacterias para promover el crecimiento vegetal sería indirecta y estaría en relación directa a la expresión bacteriana de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC deaminasa). Esta enzima clave en metabolismo del etileno, hidroliza el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) que es inmediato de la hormona activa (Glick, 1995). Bacterias que poseen esta enzima pueden clivar el ACC a amonio y alfa-cetobutirato y prevenir la acumulación de etileno y sus efectos tóxicos (Glick et al. 1998). A pesar de que *Azospirillum* estimula el crecimiento de plantas, los miembros de este género no producen ACC deaminasa, por lo que no pueden regular los niveles de etileno en tejido vegetales. En este sentido Holguín and Glick (2001) comprobaron que la transferencia del gen de la ACC deaminasa de *Enterobacter cloacae* en *Azospirillum brasilense* resultó en una mejora considerable del crecimiento de la planta inoculada.

Acido Abscísico

Es una hormona vegetal, involucrada diferentes procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta, como la dormición de yemas y semillas, la maduración de frutos y en situaciones de estrés ambiental desfavorables como déficit hídricos o estrés salinos. El ácido abscísico (ABA) se forma en plastidios, tanto de hoja como de raíz y su biosíntesis comienza a partir del ácido mevalónico, vía farnesil farnesil pirofosfato (FFPP), dentro de lo que se conoce globalmente como síntesis de los terpenos. La alternativa más aceptada de continuación de la ruta metabólica es la síntesis de carotenoides y su posterior clivaje para dar xantoxina y ABA. Este secuenciamiento opera en plantas superiores, especialmente bajo condiciones de estrés hídrico y salino. El ABA está relacionado con la capacidad de plantas superiores para adaptarse a condiciones de estrés, a través de distintos procesos fisiológicos y moleculares que incluyen: alteraciones en la expresión de genes relacionados con estrés hídrico y cierre de estomas. Desde el punto de vista fisiológico, el ABA favorece la economía del agua dentro de la planta, por su efecto regulador sobre la apertura y cierre de estomas a nivel de las hojas (Davies, 1995); además participa en la dormición de yemas y semillas; en la acumulación de proteínas de reserva en semillas (soja); en la inhibición del crecimiento y germinación inducido por auxinas y GAs; en la inhibición del crecimiento foliar en situaciones de estrés y en la regulación de la síntesis proteica en respuestas de aclimatación a diferentes tipo de estrés; sin embargo, todas estas funciones están relacionadas a un objetivo común, la defensa del sistema vegetal en condiciones ambientales desfavorables. Su valor fisiológico más importante ha sido relacionado con la sobrevivencia de la planta y el control de la economía del agua, más que con incrementos de la producción agrícola en sí (Davies and Jones, 1991). La respuesta central de la planta a un déficit hídrico, tiene como resultado un incremento en la síntesis de ABA endógeno, que provoca los efectos fisiológicos y bioquímicos antes mencionados, que son indefectiblemente acompañados de cambios en la expresión de genes, muchos de los cuales son regulados por esta hormona (Bray, 1993). Estas respuestas son complejas e involucran la coordinación e integración de múltiples vías metabólicas que llevan a la expresión de genes codificantes para proteínas que contribuyen a la adaptación. Además, de limitar la pérdida de agua a través de la transpiración por la reducción en la apertura estomática. Bajo estas condiciones, las plantas requieren menos agua para su funcionamiento y así sufren menor daño. Un aspecto de sumo interés en la fisiología de esta hormona es que la apertura y cierre estomático en plantas superiores, puede ser regulada a distancia por medio de señales químicas provenientes de la raíz y el tallo, constituyendo la evidencia en tiempo real de la disponibilidad hídrica del suelo. La naturaleza de la señalización ha sido extensamente estudiada y originariamente recayó en el ABA.; sin embargo, en la actualidad algunos autores consideran que este mecanismo, depende de las variaciones del potencial químico del xilema, que modificarían la capacidad de la hormona de unirse a sus receptores en las células blanco de la hoja. Quizás el parámetro más importante que varía como resultado de la diferencia en el potencial químico del xilema es el pH, ya que la alcalinización del xilema o del microcompartimento apoplástico de las hojas, impide el ingreso o salida de la hormona del simplasto, donde se encuentran los receptores específicos de las células guarda del estoma. Este modelo, denominado «trampa aniónica» permitiría explicar en condiciones de estrés, que la baja disponibilidad hídrica del suelo determina la un aumento del pH del xilema por la modificación la actividad NO_3^- reductasa de la raíz que tiene como consecuencia la descompartimentalización del ABA producido en los cloroplastos de las células oclusivas y con ello el cierre estomático. Considerada la verdadera *señal proveniente de la raíz* en condiciones de estrés hídrico.

Producción de Ácido Abscísico por *Azospirillum*

Es muy escasa la información documentada sobre la identificación de ABA en cultivos químicamente definidos de *Azospirillum* y su correlación al crecimiento de la planta. La mayor parte de los

ensayos fueron realizados en sistemas de cultivos e inoculaciones de hongos y bacterias fitopatogénicas ó en asociaciones simbióticas por bacterias nodulantes. Solo un trabajo reportó la producción de ABA por *A. brasilense* Ft326 en medio de cultivo definido (Kolb and Martin, 1985), sin embargo la identificación se realizó por RIA técnica poco sensible, comparada con la de espectrometría de masas, que se utiliza en la actualidad.

Interacción de fitohormonas producidas por *Azospirillum* sp. y su efecto sobre el crecimiento del sistema vegetal

El estudio de las interacciones entre las diferentes hormonas en los sistemas vegetales ha emergido en la actualidad y en este caso, las fitohormonas producidas por microorganismos endofíticos no quedan exceptuadas del análisis. Los «cross-talk» descritos en la bibliografía podrían dar una nueva interpretación al modelo de crecimiento de promoción hormonal simple descrito para *Azospirillum* sp. hasta el momento. En lo que se refiere específicamente a *Azospirillum* sp. existe evidencia circunstancial de la interacción de fitohormonas producidas por el microorganismo con el *background* hormonal de las plantas inoculadas; sin embargo, un detallado análisis de esta interacción podría revelar interacciones específicas que tendrían como resultado la promoción del crecimiento vegetal. En tal sentido, Fulchieri et al. (1993) encontraron que plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con las 3 cepas de *Azospirillum lipoferum* mejoraron significativamente el crecimiento de la raíz y de la parte aérea. En estos ensayos GA₃ fue identificada en la fracción ácida libre del extracto vegetal y estos resultados permitieron especular sobre la capacidad bacteriana de incrementar *in vivo* el pool de giberelinas con actividad biológica sobre el crecimiento vegetal en las raíces de plantas inoculadas. Ross and O'Neill (2001) sugieren que las auxinas podrían promover, al menos en parte, la elongación del tallo por incrementar los niveles de endógenos de giberelinas 3β-hidroxiladas, lo cual podría tener relación directa con los resultados obtenidos por Fulchieri et al. (1993) ya que ni el contenido endógeno de IAA ni la expresión de los genes que codifican para 3β-hidroxilasas fueron cuantificados en las fracciones correspondientes. Otro factor a considerar sería que por lo menos dos de las cepas utilizadas para la inoculación (*A. lipoferum* Op 33, *A. lipoferum* iaa 320) eran productoras de AIA lo que permitiría especular, que al menos en parte, el aumento en el contenido endógeno de GA₃ en la raíz podría deberse al cross-talk del AIA sobre el pool de GAs de la raíz y que parte de la respuesta del crecimiento observado en parte aérea y subterránea se debería al efecto de las GAs producidas por las diferentes cepas de *Azospirillum lipoferum* ó por las GAs producidas por las plántulas inducidas por el AIA bacteriano, como describen Yaxley et al (2001); Ford et al. (2002) e Inada and Shimmen (2000) para otras especies vegetales. Como mencionamos anteriormente, Krumpholz et al. (2006) han evaluado la respuesta de crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con *Azospirillum brasilense* FT326 (superproductora de IAA), correlacionando el fenotipo vegetal con la producción vegetal de etileno. El aumento en la producción de etileno fue significativamente superior a los controles y los cambios morfológicos fueron acompañados de un aumento de actividad de la ACC-sintasa tisular. De acuerdo con Peck and Kende (1995), el paso limitante para la biosíntesis de etileno es la conversión de la S-adenosilmetionina (SAM) a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), catalizada por la ACC sintasa y la expresión como la actividad de esta enzima, así como la producción de etileno, incrementa por la adición de AIA exógeno. Estos antecedentes indicarían que el aumento de etileno, al menos en parte de debería a un cross-talk entre el AIA producido por la bacteria en la vía de síntesis del etileno como sugieren Rahman et al. (2002).

Inoculantes a base de *Azospirillum* sp. y la complejidad de la respuesta vegetal

Desde 1981 hasta 1996, se realizó en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA)

dependiente del INTA-Castelar, un intenso programa cuyos objetivos más importantes fueron: 1- Seleccionar e identificar en el laboratorio, cepas de *Azospirillum* sp. potencialmente aplicables en agricultura y 2-Evaluar la capacidad de todas las cepas seleccionadas de promover el crecimiento en especies cultivables blanco como trigo y maíz, inoculadas y sembradas en condiciones controladas de laboratorio o en parcelas de diferentes sitios experimentales de la provincia de Buenos Aires. La información obtenida permitió comprobar el efecto positivo de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en ambas especies vegetales y seleccionar las cepas Az 39 y Cd como las de mejor performance dentro del grupo, debido a su capacidad de incrementar los rendimientos de ambos cultivos desde un 13% hasta un 33%. Considerando los antecedentes generados por este programa, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria) postuló, de común acuerdo con las empresas de inoculantes de nuestro país, a la cepa nativa Az39 de *Azospirillum brasilense*, como la estirpe recomendable para la fabricación de inoculantes para maíz y trigo en la República Argentina. Desde el punto de vista fisiológico, los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que operaban en la cepa Az39 de *A. brasilense* y que determinaron, al menos en parte, su efectividad para incrementar la productividad de las especies inoculadas no fueron considerados al momento de su selección y en base a estos antecedentes, el trabajo en el laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción planta-microorganismo de la Universidad Nacional de Río Cuarto se basó en la dilucidación de los mecanismos potencialmente responsables de la promoción del crecimiento vegetal en las cepas de *Azospirillum* inicialmente seleccionadas y mayoritariamente utilizadas para la formulación de inoculantes para gramíneas en la República Argentina. Como parte de estos resultados Perrig et al. (2007) probaron que *A. brasilense*, Az39, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes en la República Argentina, junto con la cepa Cd, una de las más utilizadas para la investigación básica en el mundo, poseen la capacidad de producir y liberar sustancias reguladoras del crecimiento de plantas del tipo fitohormas, tal como AIA, Z, GA₃, ABA y etileno. En tal sentido, la producción de AIA en *A. brasilense* Az39 fue comparable a lo reportado previamente por otros autores para *A. lipoferum* (4.1 µg.ml⁻¹) y para otras cepas de *A. brasilense* (4.5 µg.ml⁻¹) en medio químicamente definido (Crozier et al. 1988). La cepa Cd mostró una producción mayoritaria (10.8 µg.ml⁻¹) comparada con la cepa Az39. En otros ensayos, Dobbelaere et al. (1999) determinaron que la inoculación de trigo cv. Soisson con 10⁸ uf.ml⁻¹ *A. brasilense* Sp 245 era comparable a la aplicación exógena de AIA. La producción de Z fue determinada para las cepas Cd y Az39 en 2.37 y 0.75 µg.ml⁻¹, respectivamente. En tal sentido, Horemans et al. (1986) detectaron cantidades similares de Z y otras citocininas en *A. brasilense* en medio químicamente definido por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). Por otro lado, Tien et al. (1979) utilizaron cromatografía líquida (HPLC) para demostrar que *A. brasilense* producía compuestos similares a citocininas con actividad biológica equivalentes a la de K (kinetina) en medio químicamente definido. Pan et al. (1999) reportaron que la aplicación exógena de 0.2 µg.ml⁻¹ de kinetina en semillas de maíz, en forma conjunta con la inoculación de *Serratia liquefaciens*, incrementaban el tamaño y peso de las raíces. La producción de GA₃ fue significativamente superior en la cepa Cd (0.66 µg.ml⁻¹) que en Az39 (0.30 µg.ml⁻¹). En tal sentido, Bottini et al. (1989) evaluaron la capacidad de *A. lipoferum* de producir GA₁ y GA₃ en medio NFb químicamente definido y la concentración en el sobrenadante de los medios de cultivos fue estimada por pruebas biológicas en 20 y 40 pg.ml⁻¹ equivalentes de GA₃ respectivamente, para un título bacteriano de 10⁹ u.f.c.ml⁻¹. Adicionalmente, Janzen et al. (1992) evaluaron la producción de GA₁ y GA₃ en *A. brasilense* Cd en medio químicamente definido y la producción de GA₃ alcanzó los 5.0 µg.ml⁻¹ para 10⁷ u.f.c.ml⁻¹. La producción de ABA fue significativamente superior para Az39 (7.70 ng.ml⁻¹) que para Cd (0.65 µg.ml⁻¹). Existen muy pocos informes en la identificación de ABA en medio químicamente definido o en plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. Kolb and Martin (1985) reportaron la producción de ABA por *A. brasilense* cepa Ft326, pero el método de detección utilizado resultaba de menor sensibilidad (RIA). El rol

fisiológico del aporte bacteriano de ABA en interacciones planta-microorganismo es incierto y no hay evidencia directa que esta fitohormona promueva o regule el crecimiento vegetal; sin embargo, en suelos restrictivos (Ej. suelos salinos), el ABA podría contribuir considerablemente, junto con otras moléculas bacterianas como cadaverina (Aziz et al. 1997) de la respuesta homeoreguladora de la planta al estrés. Esta es una línea de investigación emergente en nuestro laboratorio y está focalizada particularmente sobre las rizobacterias de *vida libre* que podría re-clasificarse como un tercer grupo de bacterias benéficas para las plantas, denominadas (PSHR) del inglés «Plant Stress Homeo-regulating Rhizobacteria» por Cassán et al. (2003) (Figura 1). La biosíntesis de Etileno en medio de cultivo modificado por la adición de metionina, se comprobó para ambas cepas en presencia o ausencia del precursor, pero la producción mayoritaria se determinó en el medio modificado por la adición del precursor en la cepa Cd ($3.94 \text{ ng.ml.h}^{-1}$). En contraste a nuestros resultados, Strzelczyk et al. (1994) encontraron que la producción de etileno en medio químicamente definido, era completamente dependiente de la presencia de L- metionina. Desde el punto de vista fisiológico, el efecto promotor de *Azospirillum* sp. a nivel del crecimiento radical podría depender de la producción de etileno por la planta (mediada por la biosíntesis bacteriana de auxinas) o por la producción bacteriana de etileno. A modo de resumen, podemos decir que un inoculante a base de *Azospirillum* sp. u otra PGPR no debería solo considerarse como un formulado a base de microorganismos, por lo contrario, debería considerarse como un «complejo biológico» resultante de la biotransformación bacteriana de los componentes adicionados al medio de cultivo en metabolitos con actividad sobre la planta ya que la actividad biológica de mucha de las fitohormonas producidas por este microorganismo tiene influencia directa sobre procesos clave del desarrollo vegetal, tales como la germinación, crecimiento temprano de plántulas, colonización rizosférica y el establecimiento bacteriano en los tejidos. Nuestros resultados indican que las cepas Az39 y Cd de *Azospirillum* tienen la capacidad potencial de promover el crecimiento o desarrollo vegetal por medio de la producción de fitohormonas u otros mecanismos adicionales a la fijación biológica de nitrógeno. Ambas cepas mostraron una capacidad intrínseca de producir y liberar varios compuestos promotores del crecimiento en medio químicamente definido y esto podría tener un alto valor en su consideración como una herramienta de evaluación y selección de cepas para uso agrícola.

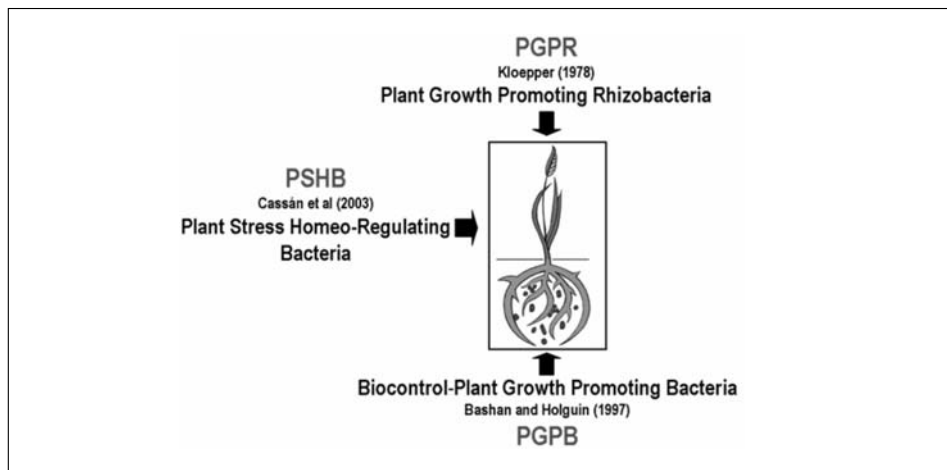


Figura 1.
Clasificación de las rizobacterias benéficas para el crecimiento y desarrollo de plantas de acuerdo a los mecanismos involucrados en la interacción.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Salam, M. and Klingmüller, W. 1987.
Transposon Tn5 mutagenesis in *Azospirillum lipoferum*: isolation of indole acetic acid mutants. Mol. Gen. Genet. 210: 165-170.
- Abeles, F. and Rubinstein, B. 1964.
Cell-free ethylene evolution from etiolated pea seedlings. Biochem. Biophys. Acta 93: 675-677.
- Arshad, M. and Frankenberger, Jr. 1993.
Microbial production of plant growth regulators. In: Meetin, B. (editor). Soil Microbial Ecology. pp. 307-347. Marcel Dekker, New York.
- Baca, B., Soto-Urzua, L., Xochiua-Corona, Y. and Cuervo-García, A. 1994.
Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. Soil Biol. Biochem. 26: 57-63.
- Bar, T., and Y. Okon. 1992.
Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. Can. J. Microbiol. 39:81-86.
- Barbieri P., Zanelli, T., Galli E., Zanetti G. 1986.
Inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiol. Lett. 36: 87-90.
- Barbieri P., Bernardi A., Galli E., Zanetti G. 1988.
Effects of inoculation with different strains of *A. brasilense* on wheat roots development. In: *Azospirillum* IV. Genetics, Physiology, Ecology. Klingmüller W., editor. Springer-Verlag, pp.181-188.
- Barbieri, P., Baggio, C., Bazzicalupo, M., Galli, E., Zanetti, G. and Nuti, M. 1991.
Azospirillum-gramineae interaction: effect on indole-3-acetic acid. Dev. Plant Soil Sci. 48: 161-168.
- Barea, J., Navarro, M. and Montoya, E. 1976.
Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. J. Appl. Bacteriol. 40: 129-134.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1990.
Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997.
Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances. Can. J. Microbiol. 43:103-121.
- Bhattarai T. and Hess. 1993.
Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant Soil 151: 67-76.
- Beyer, E., Morgan, P. and Yang, S. 1984.
Ethylene. In: Wilkins, M. (editor). Advance Plant Physiology. pp. 111-126. Pitman Publishing, London.
- Bothe, H.; Körsgen, H.; Lehmaher, T. and Hundeshagen, B. 1992.
Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis* 13: 167-179.
- Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R. 1989.
Identification of gibberellins A₁, A₃, and Iso-A₃ in cultures of *A. lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.

- Bray, E. 1991.
Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. In: Davies, W. and Jones, H. (Eds.).
Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry. pp. 81-98. Bios. Scientific Publishers, Oxford.
- Burg, S. 1962.
The physiology of ethylene formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13: 265-302.
- Burg, S. and Burg, P. 1968.
Ethylene formation in pea seedlings: its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 43: 1069-1073.
- Cacciari I., Lippi D. and Pietrosanti T. 1989.
Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum spp.* and *Arthrobacter*. *Plant Soil* 115: 151-153.
- Cassan F., Bottini R., Schneider G. and Piccoli P. 2001.
Azospirillum brasiliense and *Azospirillum lipoferum* hidrolize conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol.* 125: 2053-2058.
- Cassan F., Bottini R. and Piccoli P. 2001^{2c}.
In vivo gibberellin A₉ metabolism by *Azospirillum* sp. in *dy* dwarf rice mutants seedlings. *Proc. Plant Growth Regul.* 28: 124-129.
- Cassan F., Lucangeli C., Bottini R. and Piccoli P. 2001¹.
Azospirillum spp. metabolize [17,17-²H₂]gibberellin A₂₀ to [17,17-²H₂]gibberellin A₁ in vivo in *dy* rice mutant seedlings. *Plant Cell Physiol.* 42 (7): 763-767.
- Cassan F. Bottini R. and Piccoli P. 2002.
Metabolismo de GA₁₂-aldehído por *Azospirillum spp.* en mutantes *dy* y *dx* de arroz. *Actas de la XI Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal.* pp-239.
- Cassán F, Piccoli, P. and Bottini R. 2003.
Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. through gibberellin production. An alternative model to increase crop yield?. *Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad.* (2003) pp: 143-158. Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987-99083-5-1
- Chapple C. 1998.
Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450 monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 311-343.
- Christiansen-Weniger, C. 1998.
Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 55-76.
- Cheryl, P. and Glick, B. 1996.
Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Cleland, R. 1987.
Auxin and cell elongation. In: Davies, P. (Ed.). *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development.* pp. 132-148. Martinus, Nijhoff, Dordrecht.
- Conney, T. and Nonhebel, H. 1991.
Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and

incorporation of ^2H from $^2\text{H}_2\text{O}$ into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184: 368-376.

Costacurta, A. and Vanderleyden, J. 1995.
Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 1-18.

Costacurta, A., V. Keijers, and J. Vanderleyden 1994.
Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase. *Mol. Gen. Genet.* 243:463-472.

Crozier A.; Malcom J. and Graebe J. 2000.
In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Chapter 17: 850-864. Academic Press. Cambridge, Londres. UK.

Crozier, A. P. Arruda, J. M. Jasmim, A. M. Monteiro, and G. Sandberg. 1988.
Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2833-2837.

Davies, W. and Jones, H. 1991.
Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry. Bios. Scientific Publishers, Oxford.

Davies P (Ed). 1995.
Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. pp 833. Dordrecht, Kluwer Acad. Press.

Dubrovsky, J., Puente, M. and Bashan, Y. 1994.
Arabidopsis thaliana as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hairs growth. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1657-1664.

Even-Chen, Z., Matoo, A. and Goren. 1982.
Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4- (^{14}C)methionine into spermidine in aged orange peels disc. *Plant Physiol.* 69: 385-388.

Fallik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman, and M. Fischer. 1989.
Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21:147-153.

Fluhr, R. and Mattoo, A. 1996.
Ethylene-biosynthesis and perception. *Crit. Rv. Plant Sci.* 15: 479-523.

Ford Y.; Taylor J.; Blake P. and Marks P. 2002.
Gibberellin A_3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*). *Plant Growth Regulation* 37 (2): 127-133.

Frankenberger, W. and Arshad, M. 1995.
Phytohormones in soil. Marcel Dekker, New York, pp. 1-135.

Fukuda, H. and Ogawa, T. 1991.
Microbial ethylene production. In: Matoo, K. and Suttle, J. (editors). *The Plant Hormone Ethylene*. pp: 279-292. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Fulchieri M., Frioni L. 1994.
Azospirillum inoculation on maize (*Zea mays* L.): Effects on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.

Fulchieri M., Lucangeli C., Bottini R. 1993.
Inoculation with *A. lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedlings roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 1305-1309.

- Gane, R. 1934.
Production of ethylene by some ripening fruit. *Nature* 134: 1008.
- Giraud E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, D., Cytryn, E., et al. 2007.
Legumes Symbioses: Absence of Genes in *Nod* in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science*. 316. pp 1307.
- Glick, B., Karaturovic, D. and Newell, P. 1995.
A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can. J. of Microbiol.* 41: 533-536.
- Glick, B. Shah, S., Li, J., Penrose, D. and Moffatt, B. 1998.
Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44: 833-843.
- Grobbelaar, N., Clarke, B. and Hough, M. 1971.
The modulation and nitrogen fixation of isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil (Spec. Vol.)* pp. 215-223.
- Hartmann, A. Singh M. and Klingmüller, W. 1983.
Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29:916-923.
- Hedden P. and Phillips A. 2000.
Gibberellin metabolism: new insights revealed genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.
- Henson J. and Wheeler H. 1977.
Hormones in plant bearing nitrogen-fixing root nodules: Distribution and seasonal changes in levels of cytokinins in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *J. Exp. Bot.* 28: 205-214.
- Hirsch A., Fang Y., Asad S. and Kapulnik Y. 1997.
The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil.* 194: 171-184.
- Holguín, G. and Glick, B. 2001.
Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol.* 41:281-288.
- Horemans, S., Koninck, K., Neuray, J., Hermans, R. and Vlassak, K. 1986.
Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341-346.
- Hubbell, D., Tien, T., Gaskins, M. and Lee, J. 1979.
Physiological interaction in the *Azospirillum*-grass root association. In: Vose, P. and Ruschel, A. (editors). *Associative N₂-fixation*. pp. 1-6. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Inada S. and Shimmen T. 2000.
Regulation of Elongation Growth by Gibberellin in Root Segments of *Lemna minor*. *Plant Cell Physiol.* 41: 932-939.
- Janzen R., Rood S., Dormar J., McGill W. 1992.
Azospirillum brasilense produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1061-1064.
- Jaiswal V.; Rizvi, H.; Mukerji, D. and Mathur S. 1982.
Nitrogenase activity in root nodules of *Vigna mungo*: The role of nodular cytokinins. *Angew. Bot.* 56: 143-148.
- Kende, H. 1989.
Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* 91:1-4.

- Klee, H., Montoya, A., Horodyski, F., Lichenstein, C., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores C., Peschon, J., Nester, E. and Gordon, M. 1984.
Nucleotide sequence of the tms genes of the pTiANC octopine C plasmid: two genes products involved in plants tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1728-1732.
- Kobayashi M., Sakurai A., Saka A., Takahashi N. 1989.
Quantitative analysis of endogenous gibberellins in normal and dwarf cultivars of rice. *Plant Cell Physiol.* 30: 963-969.
- Kolb, W. and Martin, P. 1985.
Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indoleacetic acid. In: Klingmüller, W. (editor). *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. pp. 215-221. Springer-Verlag. Berlin.
- Krumpholz, E., Ribaud, C., Cassán, F., Bottini, R., Cantore M. and Curá A. 2006.
Azospirillum sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation (2006)*. 25(2):175-185
- Kucey, R. 1988.
Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 34:735-739.
- Lambrecht, M. et al. 1999.
The ipdC promoter auxin-responsive element of *Azospirillum brasilense*, a prokaryotic ancestral form of the plant *AusxRE?*. *Mol. Microbiol.* 32: 889-890.
- Lambrecht, M., Y. Okon, A. Vande Broek, and J. Vanderleyden. 2000.
Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8:298-300.
- Litchenthaler, H. 1999.
The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 47-65.
- Lucangelli C. and Bottini R. 1996.
Reversion of dwarfism in *dwarf-1* Maize (*Zea mays* L.) and *dwarf-x* Rice (*Oryza sativa* L.) mutants by endophytic *Azospirillum* spp. *Biocell* 20(3): 221-226.
- Lucangelli C., and Bottini R. 1997.
Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with Uniconazole. *Symbiosis* 23: 63-72.
- Mac Millan J. 1997.
Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat. Prod. Rep.* 14: 221-243.
- Mander L. 1991.
Recent progress in the chemistry and biology of gibberellins. *Sci. Progress Oxford* 75: 33-50.
- Martens, D. and Frankenberger Jr. 1992.
Assimilation of 3-¹⁴C-indole-3-acetic acid and thryptophan by wheat varieties from nutrient media. In: *Proceedings 19th Annual Meeting Plant Growth Regulator Society of America*, San Francisco, CA, July 17, 1992, pp 99-100.
- Mathesius, U., Shalaman, H., Meijer, D., Lugtenberg, B., Spaink, H., Weinman, J., Rodam, L., Sautter C., Rolfe, B. and Djordjevic, M. 1997.
New tools for investigating nodule initiation and ontogeny: spot inoculation and microtargeting of transgenic

with the clover roots shows auxin involvement and suggest a role for flavonoids. In: Stacey, G, Mullin, B. and Gresshoff, P. (). *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Mattoo, A. and Suttle, J. (editors). 1991.
The Plant Hormone Ethylene. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 337.

Miller, C., Skoog, F., Von Saltza, M. and Strong, F. 1955.
Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392.

Morgan, P. and Hall, W. 1964.
Accelerated release of ethylene by cotton following application of indolyl-3-acetic acid. *Nature*. 201:99.

Murakami Y. 1968.
A new rice seedling bioassay for gibberellins, microdrop method and its use for testing extracts of rice and morning glory. *Bot. Mag. (Tokio)*. 81:3-43.

Murakami Y. 1972.
Dwarfing genes in rice and their relation to gibberellin biosynthesis. En: *Plant Growth Substances 1970*. (Ed.) D. Carr. Springer-Verlag, Berlin pp 164-174.

Nandwall, A., Bharti, S. Garg, O. and Ram P. 1981.
Effects of indole acetic acid and kinetin on nodulation and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 24: 47-52.

Nonhebel, H., Cooney, T. and Simpson, R. 1993.
The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 527-539.

Okon Y. and Labandera-González C. 1994.
Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26:1591-1601.

Omay S., Schmidt W., Martin P. and Bangerth F. 1993.
Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under in vitro conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 187-192.

Pan B., Bai, Y., Leibovitch, S. and Smith D. 1999.
Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11:179-186.

Paredes-Cardona, E., M. G. Carcaño-Montiel, M. A. Mascarúa-Esparza, and J. Caballero-Mellado. 1988.
Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Latinoamericana de Microbiol.* 30:351-355.

Patten C., and Glick B. 1996.
Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.

Pearce, D., Koshioka, M. and Pharis, R. 1994.
Chromatography of gibberellins. *J. of Chromatography A.* 658: 91-122.

Peck, S. and Kende, H. 1995.
Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant. Mol. Biol.* 28: 298-301.

Perley, J. and Stowe, B. 1996.
The production of tryptamine from tryptophan by *Bacillus cereus*. *Biochem J.* 100: 169-174.

- Perrig, D., Boiero, L., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán F. and Luna V. 2007.
Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2007). 75: 1143-1150.
- Phinney B. 1956.
Growth response of single-gene dwarf mutant in maize to gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 42: 185-189.
- Phinney B. and Spray C. 1988.
Dwarf mutants of maize-research tools for the analysis of growth. En: *Plant Growth Substances 1988*. (Eds) R. Pharis, S. Rood, Springer-Verlag, Berlin pp 65-73.
- Piccoli P. and Bottini R. 1994.
Metabolism of 17,17- $^{[2]H_2}$ -gibberellin A₂₀ to 17,17- $^{[2]H_2}$ -gibberellin A₁ by *A. lipoferum* cultures. *AgriScientiae* XI: 13-15.
- Piccoli and Bottini. 1994¹.
Effect of C/N ratio, N content, pH and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis* 21: 263-264.
- Piccoli P. and Bottini R. 1996.
Gibberellins production in *A. lipoferum* cultures y enhanced by lighth. *Biocell* 20:185-190.
- Piccoli P., Lucangeli C., Schneider G., Bottini R. 1998.
Hydrolysis of 17,17- $^{[2]H_2}$ -Gibberellin A₂₀-Glucoside and 17,17- $^{[2]H_2}$ -Gibberellin A₂₀-Glucosyl Ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul.* 23: 179-182.
- Pozzo Ardizzi M. 1982.
Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria from patagonia. In *Technology of Tropical Agriculture* (P. Graham and S. Harris, editoritors) pp: 599-612. Colombia.
- Primrose, S. and Dilworth, M. 1976.
Ethylene production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 93: 177-181.
- Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden and H. Van Onckelen. 1993.
Azospirillum brasilense indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol.Plant Microb Interact.* 6:609-615.
- Puppo A. and Rigaud J. 1978.
Cytokinins and morphological aspects of French-bean roots in presence of *Rhizobium*. *Physiol. Plant.* 42: 202-206.
- Rademacher W. 1994.
Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul.* 15: 303-314.
- Rademacher W. 2000.
Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and other Metabolic Pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 501-531.
- Rahman A.; Hosokawa S.; Oono Y.; Amakawa T.; Goto N. and Tsurumi S. 2002.
Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development diss. *Plant Physiol.* 130 (4):1908-17.
- Rood, S. and Pharis, R. 1987.
Evidence for reversible conjugation of gibberellins in higher plants. En: *Conjugates Plants Hormons. Structure, metabolism and function.* pp 183-190. (editors) Schreiber, H. Schutte, H. and Semder, G.; VEB Deustcher Verlag der Wissenschaften, Berlin, Germany.

- Ross J.; O'Neill D.; Smith J.; Kerckhoffs and Elliot R. 2000.
Evidence that auxin promotes the gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant Journal* 21: 547-552.
- Ross J. and O'Neill D. 2001.
New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci* 6:2-4.
- Ross J.; O'Neill D.; Wolvang C.; Symons G. and Reiss B. 2002.
Auxin-Gibberellin Interactions and Their role in Plant Growth. *J. Plant Growth Regul.*20: 346-353.
- Rovira, A. 1970.
Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Baker, K. and Synder, W. (editors). *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. University of California Press, Berkeley. pp. 170-186.
- Ruckäschel, E. and Klingmüller, W. 1992.
Analysis of IAA biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* and Tn5 induced mutants, *Symbiosis* 13: 123-131.
- Sarig, S., Y. Okon, and A. Blum. 1990.
Promotion of leaf area development and yield in Sorghum bicolor inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 9:235-245.
- Schmidt, W., Martin, P., Omay, H. and Bangerth. 1988.
Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In: Klingmuller, W. (editor). *Azospirillum* IV. Genetics, physiology, ecology. pp. 92-100. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schneider, G. and Schliemann, W. 1994.
Gibberellins conjugates: an overview. *Plant Growth Regul.* 15: 247-260.
- Scott, T. 1972.
Auxins and roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 23: 235-258.
- Sembder G.; Weiland, J.; Aurich, O. and Schreiber, K. 1968.
Isolation structure and metabolism of a gibberellin glucoside. In: *Plant Growth Regulators S.C.I. Monographs*, Vol 31. pp 70-86. (editor) Mac Millan, J.; London, UK.
- Sembder, G.; Gross, D.; Liebisch, H. and Schneider, G. 1980.
Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol 9. pp 281-444. (editor) Mac Millan, J.; Berlin, Heidelberg, New York: Springer. Germany and USA.
- Strzelczyk E., Kamper M. and Li C. 1994.
Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60
- Thimann, K. 1936.
On the physiology of the formation of nodule in legumes roots. *PNAS* 22: 511-514.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell. 1979.
Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1016-1024.
- Vande Broeck, A., Lambrecht, M., Kristel, E. and Vanderleyden, J. 1999.
Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. of Bacteriol.* 181: 1338-1342.
- Vandenhobe H., Merckx R., van Steenberg and Vlassak K. 1993.
Microcalorimetric characterization, physiological satages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 513-519.

Yahalom, E., Okon, Y. and Dovrat, A. 1990.

Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the roots morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). Can. J. Microbiol. 36: 10-14.

Yamada, T., Palm, C., Brooks, B. and Kosuge, T. 1985.

Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82: 6522-6526.

Yang, S. 1974.

The biochemistry of ethylene: Biogenesis and metabolism. In: Sondheimer, C. and Walton, E. (editors). The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones. Recent Adv. Phytochem. Vol. 7. pp. 131-178. Academic Press, New York.

Yaxley J.; Ross J.; Sherriff L. and Reid J. 2001.

Gibberellin Biosynthesis Mutations and Root Development in Pea. Plant Physiology 125: 627-633.

Zimmer, W., Wesche, M. and Timmermans, L. 1998.

Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. Curr. Microbio. 36: 327-331.