



Posgrado en Biotecnología

Tesis para optar por el título de Magíster en Biotecnología

Implicancias de la interacción triple soja- bradyrizobios-*Delftia* sp. JD2 sobre la respuesta vegetal

Lic. Braulio Riviezzi

2022

Tutora: Dra. María A. Morel

Co-tutora: Dra. Cristina Olivaro

Tribunal:

Dra. María Inés Siri

Dra. Cecilia Taulé

Dra. Laura Fariña



Tabla de Contenido

1.	Introducción.....	6
1.1.	La soja: origen y producción	7
1.2.	Usos del cultivo	7
1.3.	Características del cultivo y requerimiento de nitrógeno.....	8
1.4.	Fijación Biológica de Nitrógeno.....	8
1.4.1.	Rizobios y simbiosis	9
1.4.2.	Rol de los flavonoides	10
1.4.3.	Factores de Nodulación	11
1.5.	Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal y mecanismos.....	14
1.6.	Inoculantes microbianos	16
1.8.	Técnicas para el análisis masivo de compuestos: Aproximaciones ómicas	19
1.8.1.	Proteómica.....	20
1.8.2.	Metabolómica.....	21
1.9.	Antecedentes	23
2.	Hipótesis de trabajo	25
3.	Objetivo general	25
3.1.	Objetivos específicos.....	25
4.	Materiales y métodos	27
4.1.	Cepas bacterianas y material vegetal	27
4.2.	Obtención de muestras.....	27
4.2.1.	Obtención de muestras de raíces	27
4.2.2.	Obtención de muestras de exudados	28
4.2.2.1.	Desinfección de semillas y germinación.....	28
4.2.2.2.	Crecimiento en condiciones <i>in vitro</i> e hidroponía.....	28
4.2.2.3.	Colecta de exudados.....	30
4.2.2.4.	Controles de recuperación	30
4.2.3.	Obtención de muestras de nódulos.....	31
4.3.	Análisis proteómico.....	31
4.3.1.	Extracción de proteínas de nódulos	31
4.3.2.	Obtención de proteínas celulares de JD2	32
4.3.3.	Shotgun/Cuantificación relativa de proteínas	32
4.3.4.	Análisis de datos	33

4.4.	Metabolómica	33
4.4.1.	Perfilado metabólico y estudio polifenólico	33
4.4.1.1.	Extracción de compuestos	34
4.4.1.2.	Análisis mediante UHPLC-ESI-HRMS.....	34
4.4.1.3.	Procesamiento y análisis de datos: aproximaciones no dirigida y dirigida	35
4.4.2.	Cuantificación de polifenoles de interés.....	36
4.4.3.	Cuantificación de fitohormonas	37
5.	Resultados.....	39
5.1.	Proteómica.....	39
5.1.1.	Efecto de la co-inoculación de soja con bradyrizobios y <i>Delftia</i> sp. JD2 sobre el proteoma de la fracción nodular enriquecida en simbiosomas	39
5.1.2.	Efecto de la genisteína sobre el proteoma de <i>Delftia</i> sp. JD2	41
5.2.	Metabolómica	43
5.2.1.	Aproximación no dirigida en raíces.....	45
5.2.2.	Aproximación dirigida en raíces y exudados	45
5.2.2.1.	Raíces.....	46
5.2.2.2.	Exudados.....	51
5.3.	Cuantificación de polifenoles	54
5.4.	Composición de fitohormonas en muestras de raíces.....	55
5.5.	Composición de fitohormonas en muestras de exudados rizosféricos	57
6.	Discusión	59
6.1.	Proteómica.....	59
6.1.1.	Cambios en la expresión proteica en simbiosomas.....	59
6.1.2.	Cambios inducidos por la genisteína en la expresión proteica de JD2	62
6.2.	Metabolómica	65
6.2.1.	Cambios en el perfil de metabolitos en muestras de plantas inoculadas con JD2	66
6.2.2.	Efecto de la co-inoculación en el perfil de metabolitos de raíces y exudados	68
7.	Conclusiones	73
8.	Referencias	75
9.	Anexos.....	91
	Anexo 1. Medios de cultivos, buffer y soluciones nutritivas utilizadas	91
	Anexo 2. Lista de compuestos utilizados en el análisis de perfilado metabólico	94
	Anexo 3. Comparación de la intensidad de genisteína en cromatogramas	96

Anexo 4. Facing the communication between soybean plants and microorganisms (Bradyrhizobium and Delftia) by quantitative shotgun proteomics.....	97
Anexo 5. Comparative metabolite analysis of Delftia-Bradyrhizobium co-inoculated soybean plants using UHPLC-HRMS-based	109
Anexo 6. Historieta de divulgación: EL JUEGO DE DELFTIA SP. JD2	126

Índice de tablas

Tabla 1. Principales grupos de hormonas vegetales y sus efectos	23
Tabla 2. Tratamientos de inoculación implementados en los experimentos con plantas	30
Tabla 3. Lista de estándares utilizados para la cuantificación de compuestos fenólicos	37
Tabla 4. Fitohormonas cuantificadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.....	38
Tabla 5. Medidas de peso seco de raíces (PSR), de parte aérea (PSA) y peso fresco de nódulos (PFN) de plantas crecidas en condiciones controladas y cosechadas a los 49 días para la obtención de nódulos.....	39
Tabla 6. Proteínas expresadas diferencialmente en fracciones proteicas obtenidas de simbiosomas de nódulos de soja a los 49 días de crecimiento de las plantas, en condiciones controladas	40
Tabla 7. Proteínas intracelulares de <i>Delftia</i> sp. JD2 expresadas diferencialmente en cultivos bacterianos de 14 h de crecimiento en medio TY diluído al décimo, con el agregado de genisteína.....	41
Tabla 8. Metabolitos con identidad probable, seleccionados en muestras de raíces de plantas en estadios V4 y R2 como discriminantes con un cambio relativo significativo entre los tratamientos COINO y BRADY. 47	
Tabla 9. Metabolitos identificados tentativamente en muestras de raíces de plantas en estadios V4 y R2, seleccionados como discriminantes entre los tratamientos JD2 y Control, con un cambio relativo significativo en el tratamiento JD2 respecto al Control.....	49
Tabla 10. Metabolitos identificados tentativamente en muestras de exudados rizosféricos colectados 7 y 15 dpi, seleccionados como discriminantes en las comparaciones de a pares de tratamientos COINO y BRADY o JD2 y Control, con un cambio relativo significativo entre ambos tratamientos.....	53
Tabla 11. Concentración (ng/g) de algunos polifenoles relevantes en la interacción rizobio-leguminosa en muestras de raíces. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).	55
Tabla 12. Concentración (ng/g) de hormonas vegetales en muestras de raíces. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).	56
Tabla 13. Concentración (ng/g) en muestras de exudados rizosféricos de hormonas vegetales colectados a 5 dpi. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).	58

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de algunos compuestos polifenólicos frecuentemente reportados en soja, incluyendo los flavonoides de mayor relevancia en la interacción <i>Bradyrhizobium</i> -soja.....	10
Figura 2. Esquematación del proceso de nodulación dependiente de factores de nodulación	13
Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal presentes en las BPCV (modificado de Figueiredo y col., 2016).	15
Figura 4. Esquema de la estrategia planteada para llevar a cabo los objetivos del trabajo.....	26
Figura 5. (A) Esquematación de la confección del sistema de crecimiento de plantas en condiciones de hidroponía, para la obtención de exudados rizosféricos.....	29
Figura 6. Control de Calidad en análisis de raíces.	44
Figura 7. Control de Calidad en análisis de exudados	44
Figura 8. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de soja.	45
Figura 9. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de soja	46
Figura 10. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de exudados rizosféricos.	51
Figura 11. Breve descripción de algunos eventos que ocurren durante la interacción entre soja, <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Delftia</i> (Modificado de Riviezzi y col. [182]). Secuencia de eventos.....	65
Figura 12. Representación temporal de los principales cambios observados durante la interacción entre soja, <i>B. elkanii</i> y JD2, en comparación con la inoculación simple de soja con <i>B. elkanii</i> (Modificado de Riviezzi y col. 2021b).....	72

Resumen

Una modalidad en la producción de leguminosas es la utilización de co-inoculantes o formulaciones mixtas con consorcios microbianos que actúan positivamente durante el desarrollo y crecimiento vegetal. Se estima que los cultivos de leguminosas co-inoculados con rizobios y otras bacterias captan en general más nitrógeno (N) que aquellos inoculados con rizobios. En soja, la co-inoculación de bradyrizobios con otras bacterias benéficas para las plantas, puede producir un efecto sinérgico que aumente el rendimiento vegetal final, con mayores volúmenes de producción. Estudios previos con la cepa bacteriana *Delftia* sp. JD2, capaz de producir auxinas, mostraron que JD2 es capaz de promover el crecimiento y una nodulación temprana en alfalfa, trébol y soja en condiciones de co-inoculación con los rizobios correspondientes. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar tanto la respuesta de las plantas de soja durante la asociación soja-bradyrizobios-JD2, como la respuesta de las células bacterianas expuestas a flavonoides, mediante dos aproximaciones ómicas. Mediante un estudio metabolómico, se profundizó en aspectos de la comunicación desarrollada entre JD2 y soja en conjunto con *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302, utilizados en las inoculaciones tradicionales en campo, con foco en los compuestos implicados en esta comunicación. Para ello, se trabajó con muestras obtenidas de plantas de soja que crecieron en condiciones *in vitro* e hidroponía, y en macetas e invernáculo, en distintos estadios de crecimiento. Con una estrategia basada en cromatografía y espectrometría de masa se estudió la composición en metabolitos secundarios presentes en exudados rizosféricos y raíces, principalmente compuestos polifenólicos y fitohormonas. Por otra parte, mediante una aproximación de proteómica (shotgun) se analizaron proteínas de los nódulos obtenidos de plantas crecidas en macetas. El perfilado polifenólico nos permitió obtener descriptores químicos relevantes para la clasificación de muestras de raíces y exudados, en relación con las etapas del desarrollo vegetal y los tratamientos de inoculación. Los resultados apoyan la hipótesis de que la producción de auxinas por JD2 juega un rol crucial en las mejoras registradas sobre las características agronómicas de soja, cuando las semillas son inoculadas juntamente con JD2 y bradyrizobios. A su vez, la presencia de genisteína induce en las células de JD2 cambios en la producción de proteínas involucradas en la movilidad y la formación de biofilms, importantes en la colonización efectiva de la raíz, que les brinda ventajas sobre el modo planctónico de las células.

1. Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad, la agricultura ha sido uno de los principales factores que permitió el surgimiento de la civilización. La posibilidad de contar con un excedente de alimentos habría liberado a un grupo significativo de individuos de tareas relacionadas a la producción, facilitando el desarrollo de otras

actividades necesarias para la consolidación de una sociedad compleja [1]. Si nos remitimos a la actualidad, en términos generales dependemos de la agricultura como fuente de alimento [2]. La actividad agrícola es una de las actividades humanas más extendidas alrededor del planeta, y de mayor impacto económico, social y ambiental, con un 38 % de la superficie terrestre dedicada a la agricultura [3].

El trigo, el maíz, el arroz y la soja son, en ese orden, los mayores cultivos a nivel mundial en cuanto al área cosechada. De estos cuatro cultivos, es la soja (*Glycine max*) el que ha experimentado el mayor crecimiento, casi duplicándose su área cosechada en los últimos 20 años [4].

1.1. La soja: Origen y producción

La soja es una leguminosa anual perteneciente al género *Glycine*. Su origen es China, país que fue el mayor productor hasta la primera mitad del siglo XX, produciéndose posteriormente un rápido crecimiento del cultivo en el continente americano [5].

En el año 2020, se produjeron a nivel mundial 353,5 millones de toneladas de soja, concentrándose el 86,7 % en las Américas. Brasil, Estados Unidos y Argentina fueron los principales países productores en ese año, con 121.8, 112.6 y 48.8 millones de toneladas de soja, respectivamente. A su vez, estos tres países son, en el mismo orden, los mayores exportadores de soja a nivel mundial. China, por otro lado, es el cuarto mayor productor de soja en el mundo, y es también el mayor importador de dicho producto [4].

En Uruguay, el cultivo de soja tuvo un importante crecimiento a partir del 2001 [6], manteniéndose como uno de los principales cultivos del país durante la última década. Esta oleaginosa es actualmente el cultivo más extendido a nivel nacional, con 907.9 mil ha sembradas en la zafra de 2020/2021 [7]. A su vez, el grano de soja es uno de los bienes más exportados por el país, solamente por debajo de la carne bovina y la celulosa, y representó el 8 % de las exportaciones de bienes en el último año (Informe anual de comercio exterior 2021, Uruguay XXI). De acuerdo con la Encuesta Agrícola “Primavera 2021” [8], la intención de siembra de soja para la zafra 2021/2022 fue de 980 mil ha, un 7.9 % mayor en comparación con la zafra anterior.

1.2. Usos del cultivo

La soja posee un alto contenido proteico y valor nutricional, lo que lo convierte en un cultivo altamente demandado, principalmente a nivel alimenticio. Los granos están conformados por un 36.5 % de proteínas, 30.2 % de carbohidratos, 20 % de grasas totales, 5 % de minerales, 9.3 % de fibras y 8.5 % de humedad [9]. A su vez, es uno de los pocos alimentos de origen vegetal que contiene todos los aminoácidos esenciales para el humano.

Dentro de los principales destinos de uso de los granos de soja se encuentran la alimentación (tanto humana como animal) y la producción de aceite, ambos con un elevado retorno económico. Existe en el

mercado una enorme diversidad de productos para consumo humano a base de soja, tanto fermentados como no fermentados, como la leche de soja, salsa de soja y el tofu [10]. A su vez, la proteína de soja es frecuentemente utilizada como sustituto o análogo de productos de origen animal [10]. El aceite, luego de procesado, puede ser utilizado para alimentación humana, producción de biodiesel, y para la elaboración de otros productos industriales menores, como tintas, pinturas y poliéster [11,12]. Los restos obtenidos del procesamiento para la producción de aceite se caracterizan por un elevado contenido proteico y son mayormente utilizados para alimentación animal.

Una característica de la soja, común a las leguminosas, es su alto contenido en fitoquímicos o metabolitos secundarios vegetales de alto y bajo peso molecular, y muchos de ellos polifenólicos [10,13]. Para las plantas los compuestos polifenólicos aportan a la supervivencia, aseguran la polinización, protegen de radiación UV y actúan como antioxidantes [14]. Algunas de estas propiedades también se transfieren a la salud humana, donde promueven la longevidad celular disminuyendo la incidencia de enfermedades crónicas [15]. Un grupo de compuestos presentes en la soja son las isoflavonas, cuyas propiedades anticancerígenas han sido ampliamente reportadas [15]. En general, los granos de soja contienen una gran variedad de compuestos con efectos benéficos en la salud, relacionados con la prevención de algunos tipos de cáncer, riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares, protección ante osteoporosis y actividad antioxidante, entre otros [16–18].

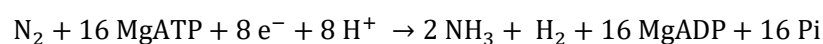
1.3. Características del cultivo y requerimiento de nitrógeno

El cultivo tiene un hábito de crecimiento vertical y frondoso, con flores de color en varios tonos de violeta o blanco dependiendo de la variedad [19,20]. La floración es controlada por el fotoperíodo, la temperatura y el genotipo [21]. Sus granos se cosechan al final de la madurez reproductiva del cultivo, cuando las hojas caen de la planta y el contenido de humedad en las semillas se encuentra entre el 13 y 15 %, lo que permite su correcto almacenamiento y evita pérdidas debidas a la ruptura de las semillas [22].

Como cultivo de grano, posee un alto requerimiento de nitrógeno (N), el cual obtiene mediante la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) realizada por microorganismos que se asocian simbióticamente con las plantas, y mediante la absorción del nitrógeno inorgánico desde el suelo.

1.4. Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN es el proceso mediante el cual el N atmosférico (N₂) es transformado a N inorgánico en la forma de amoníaco (NH₃) por ciertos microorganismos fijadores, llamados diazótrofos. Esta transformación tiene un elevado costo energético. Se consumen 16 moléculas de ATP por cada 2 de NH₃ generadas. El proceso puede resumirse en la siguiente ecuación:



De esta forma, el N_2 gaseoso (el cual es poco reactivo debido a la fortaleza de su triple enlace) se vuelve biológicamente disponible y puede ser asimilado por las plantas en compuestos orgánicos, como aminoácidos y nucleótidos.

La reacción es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas: la dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa [23,24]. Una característica importante de este complejo es su alta sensibilidad al oxígeno (O_2), en presencia del cual se inactiva. Por ejemplo, Kuzma y col.[25] reportaron una reducción en la actividad de la enzima nitrogenasa a concentraciones de O_2 tan bajas como 57 nM. Debido a ello, los diazotrofos han desarrollado diferentes mecanismos de protección de la nitrogenasa frente al O_2 [26]. Además, la actividad del complejo se afecta frente a la presencia de N combinado (amonio o nitrato) [27].

En suelos y aguas, la FBN es la principal fuente de N asimilable de origen no antropogénico. Se estima que aporta 107 Tg N por año a los ecosistemas terrestres de forma natural, y entre 33 y 43 Tg N por año por medio de sistemas agrícolas de cultivo, donde el principal aporte corresponde a la FBN realizada por las simbiosis rizobio-leguminosa [28–30].

1.4.1. Rizobios y simbiosis

Los diazotrofos pueden realizar la FBN en vida libre o en asociación con otros organismos. Entre los últimos se encuentran los rizobios, bacterias del suelo que conforman un grupo filogenéticamente diverso, con representantes de varios géneros dentro de las clases alfa- y beta-proteobacteria [31]. Todos ellos son capaces de fijar N_2 en asociación endosimbiótica generalmente con plantas leguminosas (*Fabaceae*). Esta asociación tiene como resultado la formación de nuevas estructuras en las raíces, y en algunos casos los tallos. En estas estructuras, llamadas nódulos, se alojan los rizobios en forma de bacteroides, tal como se describe más adelante [32].

Los nódulos, formados por tejido vegetal y células bacterianas, presentan en su interior las condiciones adecuadas para llevar a cabo la FBN. En ellos, la leghemoglobina, una proteína capaz de unir O_2 y facilitar su difusión a los bacteroides, permite mantener las condiciones de microaerobiosis necesarias para el correcto funcionamiento de la nitrogenasa, sin comprometer la producción del ATP necesario para impulsar el proceso [33].

Durante la asociación rizobio-leguminosa, la planta brinda a las bacterias fotosintatos que permiten su crecimiento y proveen la energía necesaria para llevar a cabo la FBN, mientras las bacterias otorgan a la planta el N necesario para su desarrollo [34]. El establecimiento de esta asociación simbiótica resulta de un proceso precisamente regulado y de alta especificidad, donde se intercambian señales químicas entre

ambos simbioses que desencadenan respuestas a nivel molecular y celular, con consecuencias a nivel fisiológico y estructural.

La especificidad entre los simbioses determina que no cualquier rizobio nodula cualquier leguminosa, ni viceversa. Las plantas de soja se asocian generalmente a algunas especies del género *Bradyrhizobium*, aunque no es el único género capaz de nodularlas. Se estima que las plantas de soja pueden obtener entre un 50 y 60 % del N necesario para su crecimiento de la FBN realizada por estas bacterias [35].

1.4.2. Rol de los flavonoides

Una de las primeras señales intercambiadas entre los simbioses la conforman los flavonoides, compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, de tipo polifenoles, formados por un esqueleto de C6-C3-C6 con diferentes sustituciones y grupos funcionales (Figura 1). Estos compuestos son un producto de la vía de los fenilpropanoides y surgen de la transformación de fenilalanina en 4-cumaroil-CoA, el cual ingresa finalmente en la vía de biosíntesis de flavonoides [36].

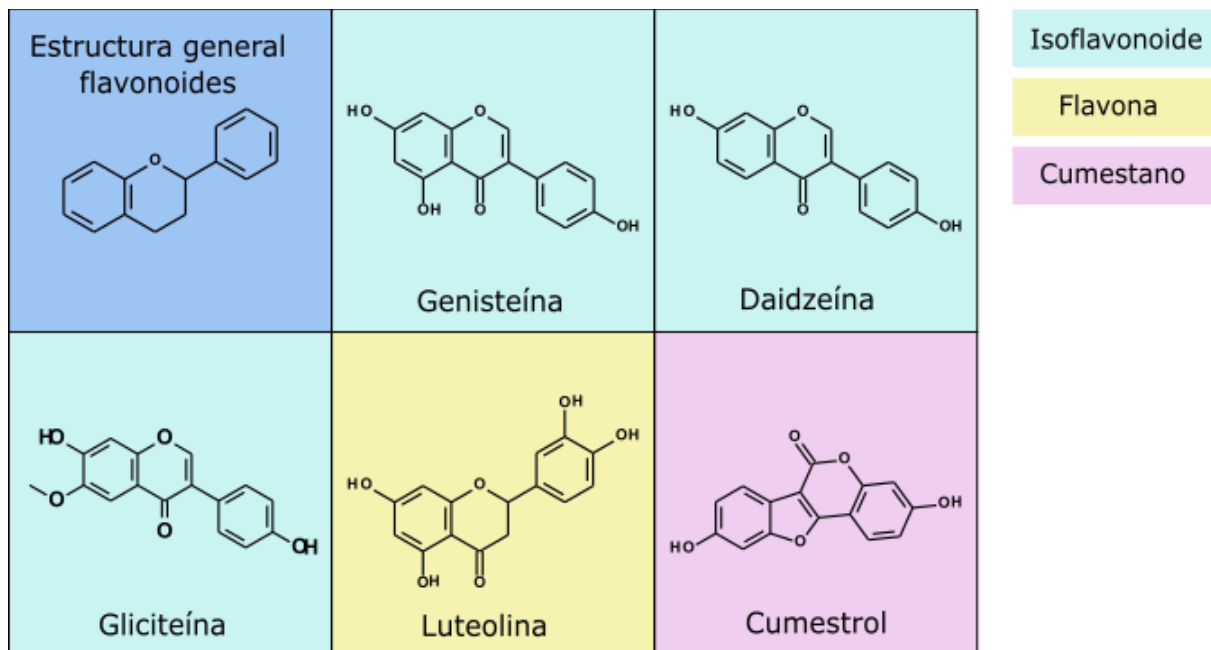


Figura 1. Estructura química de algunos compuestos polifenólicos frecuentemente reportados en soja, incluyendo los flavonoides de mayor relevancia en la interacción *Bradyrhizobium*-soja.

Los flavonoides están involucrados en la mayoría de las interacciones planta-microorganismo conocidas [37]. Se han encontrado más de 10000 variantes estructurales de flavonoides en plantas vasculares y una gran parte de ellos se han detectado en leguminosas [38,39]. Existen varias sub clases, entre ellas, las

flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas son las más estudiadas [40]. Las isoflavonas son casi exclusivas de las leguminosas. En el caso de la soja, en sus granos, raíces y hojas se encuentran frecuentemente las isoflavonas genisteína y daidzeína y el flavonol quercetina [41]. En la Figura 1 se presenta la estructura general de los flavonoides y aquellos de mayor relevancia para la interacción *Bradyrhizobium-soja*.

En la simbiosis entre rizobios y leguminosas, los flavonoides son exudados por las raíces hacia la rizósfera, donde la combinación de los flavonoides secretados contribuye a la especificidad del reconocimiento entre los simbioses. Al mismo tiempo, actúan como quimioatrayentes del microsimbionte y de otras rizobacterias hacia la planta, iniciando el proceso de colonización de las raíces [34,42].

Una vez en la rizósfera, los flavonoides son captados por los rizobios mediante la unión a factores transcripcionales denominados NodD e inducen en las bacterias la expresión de los genes de nodulación, o genes *nod* (Figura 2a). Se cree que el dominio de unión al ligando de NodD funciona como un receptor de flavonoides que responde a la presencia de un hospedador compatible. El reconocimiento entre la proteína NodD y el o los flavonoides inductores secretados por las raíces es específico y responsable, en parte, de la especificidad estricta que existe entre los miembros de las simbiosis rizobios-leguminosa [43]. Aún con esta especificidad estricta cumplida, la presencia de NH₃ puede reprimir la expresión de los genes *nod* [44].

1.4.3. Factores de Nodulación

La expresión de los genes *nod* en los rizobios deriva en la producción de un grupo de enzimas encargadas de sintetizar los Factores de Nodulación (FN, Figura 2a). Los FN son compuestos del tipo lipoquitooligosacárido (LCO) que constan de un esqueleto de tres a cinco N-acetil glucosaminas unidas por enlaces β1,4. Poseen en su extremo no reductor un ácido graso de saturación y longitud variables, además de diversas decoraciones o sustituciones en los extremos reductor y no reductor. La compatibilidad entre un par rizobio-leguminosa dado está determinada, en gran medida, por la estructura molecular del FN: por la longitud del esqueleto de residuos de N-acetilglucosamina y, principalmente, por la combinación de sustituciones que existen en la estructura del FN [45].

Los FN liberados por los rizobios son posteriormente captados por las plantas, desencadenando diferentes eventos importantes de señalización [32]. Por un lado, se da la unión en las raíces de los FN a receptores de tipo quinasas con dominios de unión a N-acetilglucosaminas de la familia LysM [32,46]. Luego, se produce una transducción de la señal que deriva en la expresión en la planta, de genes tempranos de nodulación (ENOD, del inglés *Early Nodulin genes*). Estos genes codifican para nodulinas tempranas en las células de la epidermis radicular, involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo [32].

La proliferación de los rizobios adheridos a la raíz tiene como consecuencia la acumulación de FNs, produciéndose importantes cambios en las células de los pelos radicales (Figura 2b). Con la inducción, ocurre la reorganización de filamentos de actina y microtúbulos que deriva en la deformación de los pelos radicales, atrapando de esta forma a los rizobios adheridos. Estos cambios resultan en la invaginación de la pared vegetal con la formación de una estructura tubular llamada hilo de infección (HI) [46]. En el interior de estos canales o hilos se ubican los rizobios, los cuales se dividen de forma activa en el extremo del HI. El HI atraviesa el pelo radicular y células adyacentes hasta alcanzar el cortex.

La respuesta a nivel del cortex se encuentra mediada principalmente por cambios en la concentración de citoquininas y auxinas, y deviene en la división de las células corticales y formación de un primordio de nódulo, o “nódulo en proceso de formación” [32]. Las bacterias llegan a la capa cortical de la raíz y son liberadas al interior de las células del nódulo por medio de un proceso similar a la endocitosis [32,47]. De esta forma, los rizobios quedan encapsulados en una membrana vegetal (peribacteroidea) formando una estructura similar a un organelo, llamada simbiosoma (Figura 2b).

Dentro del simbiosoma, los rizobios se diferencian en bacteroides mediante una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen la inducción del complejo nitrogenasa que les otorga la capacidad para fijar N_2 [32,48](Figura 2c). Adicionalmente, la mayoría de los procesos metabólicos en el bacteroide se reducen, y en el nódulo se produce y activa la leghemoglobina, de origen vegetal, para secuestrar el oxígeno (impidiendo la inactivación de la nitrogenasa). Estos procesos se resumen de forma esquemática en la Figura 2.

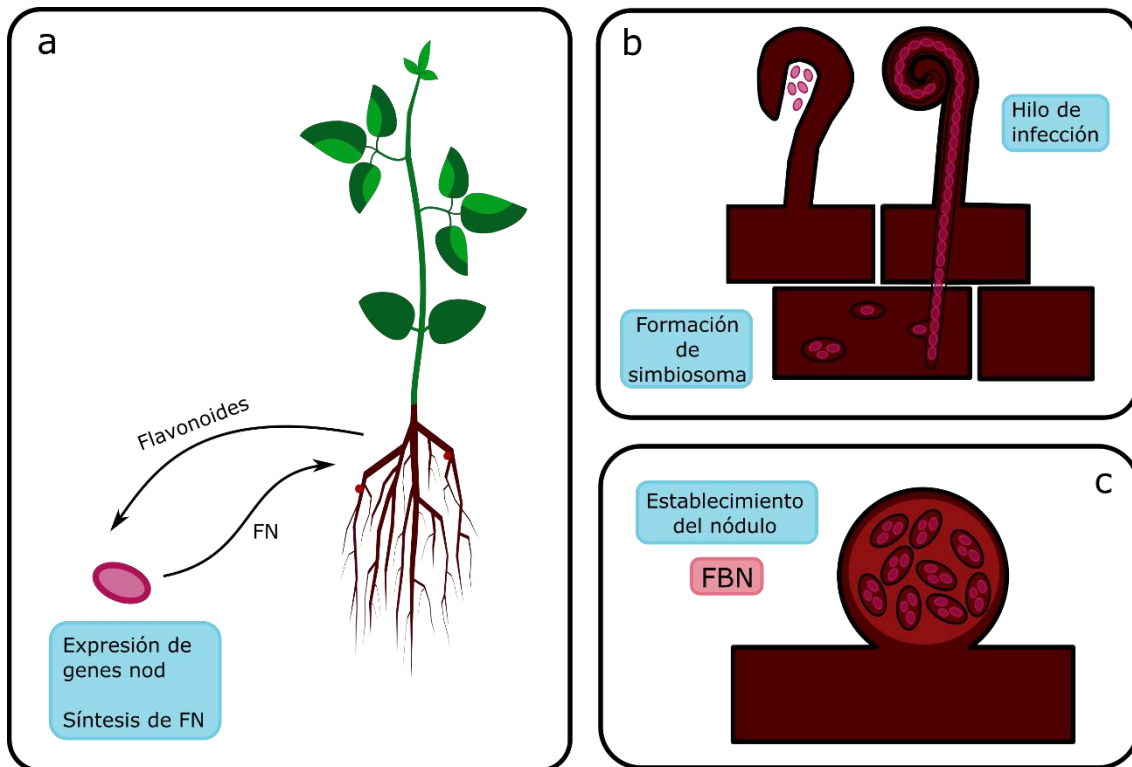


Figura 2. Esquematación del proceso de nodulación dependiente de factores de nodulación; a) liberación de flavonoides a la rizósfera por parte de la planta, con la consecuente inducción de la expresión de genes de nodulación y síntesis de FN por parte del rizobio; b) deformación de los pelos radicales y formación del hilo de infección que culmina con la formación de los simbiosomas; y c) nódulo establecido, en su interior se alojan los bacteroides dentro de los simbiosomas, donde se lleva a cabo la FBN.

Los nódulos inducidos por los rizobios pueden ser de dos tipos: indeterminados o determinados. La diferencia entre ambos nódulos es la persistencia o no, de un meristemo, que le otorga la característica forma alargada o esférica, respectivamente. En soja encontramos nódulos determinados sin meristemo permanente por lo que su crecimiento se realiza por expansión celular [49].

Una vez establecida la simbiosis, se da un intercambio de nutrientes entre los simbiosomas, en el que el amonio producido por la FBN es asimilado rápidamente por las plantas como glutamina y transportado a los diferentes órganos vegetales [50], en soja principalmente como ureidos [51].

El mecanismo aquí descrito de infección, mediante la deformación de los pelos radiculares y la formación de un hilo de infección, es el que ocurre en soja, es dependiente de FN y es el más habitual y estudiado en leguminosas, pero no es el único. Existen otras leguminosas capaces de infectarse con rizobios que ingresan a la raíz a través de un mecanismo particular conocido como “crack entry”, a través de heridas o frecuentemente mediante penetración intercelular en los puntos de emergencia de las raíces laterales [52].

Asimismo, entre ellas se han descrito mecanismos de infección de sus raíces que son independientes de FN [53].

1.5. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal y mecanismos

Además de los rizobios, existe en el suelo una enorme diversidad de bacterias con diferentes características que resultan beneficiosas para el desarrollo de las plantas. Estas Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), que están presentes en la rizósfera, la filósfera y también en el interior de las plantas (endófitas), presentan mecanismos muy variados que resultan en la promoción del crecimiento vegetal. Los mecanismos a los que se hace referencia pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- i) directos, que suministran o facilitan de algún modo la adquisición de nutrientes por las plantas, o que modulan los niveles de fitohormonas;
- ii) indirectos, aquellos que disminuyen los efectos adversos de agentes patogénicos sobre el desarrollo vegetal [54] (Figura 3).

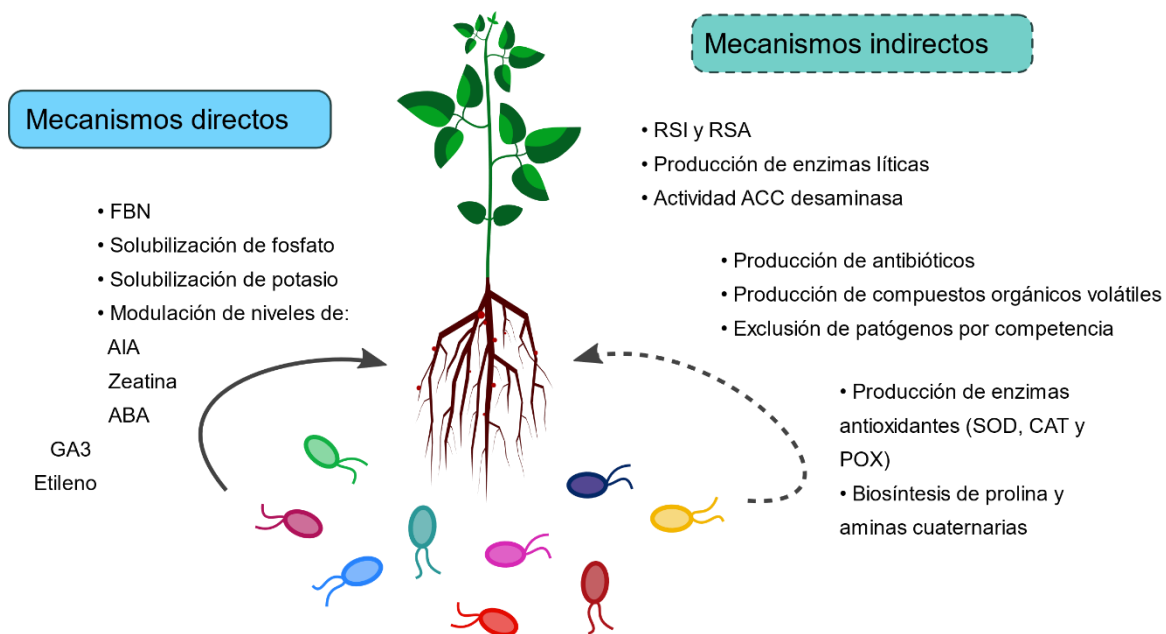


Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal presentes en las BPCV (modificado de Figueiredo y col., 2016). ACC desaminasa, enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; POX, peroxidasa; RSI, Resistencia Sistémica Inducida; RSA, Resistencia Sistémica Adquirida; FBN, Fijación Biológica de N₂; AIA, Ácido indol 3-acético; ABA, Ácido abscísico; GA3, Ácido giberélico.

Entre los mecanismos directos destacan la solubilización de nutrientes como formas inorgánicas de fósforo, la FBN por microorganismos diazótrofos (libres o en asociación), la producción de fitohormonas, como las auxinas (ej. Ácido 3-indolacético, AIA) o las citoquininas (ej. Trans-zeatina, tZ), y la regulación de los niveles de etileno mediante la actividad ACC desaminasa. Algunos de los microorganismos más estudiados que presentan algunos de estos mecanismos pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, entre otros [55].

Por otro lado, la exclusión de patógenos por competencia, la producción de antibióticos y sideróforos, y la remoción de compuestos tóxicos, son los principales mecanismos indirectos de promoción del crecimiento presentes en las BPCV. Este tipo de mecanismos, también conocidos como de biocontrol, han sido ampliamente reportados en cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* [56,57].

Algunas BPCV incrementan la tolerancia a diferentes tipos de estrés, por ejemplo, potenciando la resistencia sistémica inducida (RSI). La RSI es mediada por microorganismos benéficos de la rizósfera, y otorga resistencia a enfermedades al activar mecanismos de defensa inducidos en la planta similares a la respuesta que ocurre en interacciones con patógenos [58–62]. A diferencia de la resistencia sistémica adquirida (RSA), que es inducida por patógenos, se postula que la RSI no involucra la síntesis de proteínas

relacionadas con la patogenicidad, y podría ser independiente del ácido salicílico, aunque requiere del ácido jasmónico y del etileno [60–62]. Los géneros de BPCV más reportados como mediadores de RSI son *Pseudomonas* y *Bacillus*. Varias cepas de ambos géneros son capaces tanto de inducir el sistema de respuesta de defensa en plantas como de actuar directamente sobre el patógeno [63].

Las BPCV pueden también incrementar la tolerancia a estrés abiótico por sequía, salinidad, metales tóxicos, exceso de plaguicidas, entre otros [64]. La mejoría en la respuesta de las plantas en condiciones de estrés abiótico en presencia de BPCV se relaciona con ciertas capacidades propias de las BPCV que incrementan el crecimiento vegetal contrarrestando el efecto negativo del estrés sobre el desarrollo vegetal [65]. Algunas BPCV son capaces de reducir la concentración de metales tóxicos (por acumulación o cambios redox en sus compuestos) o de biodegradar compuestos orgánicos tóxicos; otras pueden inducir la lignificación de las paredes celulares aumentando su resistencia, o afectar la absorción de iones y agua [66].

Varias BPCV son explotadas a nivel biotecnológico mediante su incorporación en formulaciones comerciales que se utilizan para mejorar el rendimiento de los cultivos. En este contexto, las BPCV pueden clasificarse en tres grupos: biofertilizantes, fitoestimulantes y biopesticidas. De forma resumida, los biofertilizantes comprenden a los microorganismos capaces de colonizar la rizósfera y facilitar nutrientes a las plantas, los fitoestimulantes basan su acción en la producción de fitohormonas, y los biopesticidas promueven el crecimiento vegetal mediante el control de fitopatógenos [67].

Indefectiblemente, la naturaleza no repara en los criterios de clasificación establecidos por los seres humanos, y una BPCV puede presentar, al mismo tiempo, diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

1.6. Inoculantes microbianos

La expansión del área agrícola ha sido históricamente una de las soluciones al problema de la creciente demanda de alimentos debida al aumento de la población. En las últimas décadas, esta realidad se ha ido modificando con el apoyo de nuevas tecnologías que permiten mejoras en el rendimiento de los cultivos y con una creciente preocupación por el impacto de la agricultura en el ambiente [68]. Estas circunstancias han convertido a los inoculantes microbianos en una opción atractiva para los productores agrícolas, y han llevado a que su uso sea una práctica extendida para algunos cultivos.

Los fertilizantes a base de microorganismos se comercializan desde hace al menos cien años, pero han ganado mayor notoriedad en las últimas décadas [69,70]. Son una alternativa tanto para disminuir los costos como los efectos adversos asociados con la excesiva o incorrecta utilización de agroquímicos (fertilizantes, pesticidas), obteniendo asimismo grandes rendimientos en el cultivo [69,71].

Existe en el mercado una enorme variedad de productos a base de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para una gran diversidad de cultivos. En el caso particular de las leguminosas, el uso de rizobios con gran capacidad de nodulación y una eficiente fijación de N_2 , en conjunto con un buen manejo, permite obtener altos rendimientos y contribuir a la reserva de N en el suelo [72]. En muchos casos, la inoculación de leguminosas con rizobios es requerida y hasta casi obligada para la producción de granos y de forraje. Esto es debido a la ausencia en los suelos de poblaciones de rizobios efectivos, o a su presencia en baja proporción, o a su poca competitividad en el suelo [73]. Como ejemplos, en Uruguay, la alfalfa se inocula con *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* y la soja con *Bradyrhizobium elkanii* en cada ciclo del cultivo. En condiciones adecuadas ninguna de estas leguminosas necesita fertilización nitrogenada a lo largo del cultivo, ya que todo el nitrógeno requerido para su crecimiento proviene directamente de la FBN y del suelo. Algunas semillas de leguminosas incluso se comercializan ya pre-inoculadas con sus rizobios correspondientes [74].

La mayoría de los inoculantes para leguminosas se basan en un rizobio, aunque algunas excepciones utilizan dos o más especies distintas de rizobios, o incluso cepas distintas de la misma especie [68]. El caso más típico resulta ser el de los inoculantes utilizados hoy día a nivel nacional para soja, que se basan en 2 cepas distintas de *Bradyrhizobium elkanii*. El fundamento para el uso de inoculantes mixtos se basa en la diferente eficiencia simbiótica de diferentes rizobios.

Actualmente, las cepas de *B. elkanii* U-1301 y U-1302 son las únicas recomendadas en Uruguay para ser incluidas en formulaciones de inoculantes comerciales para soja [74]. *B. elkanii* U-1301 y U-1302 son también dos de las 4 cepas de bradyrizobios recomendadas para inoculantes de soja en Brasil donde se comercializan bajo la nomenclatura *B. elkanii* SEMIA 587 y 5019, respectivamente [75]. Recientemente, en trabajos realizados en Facultad de Agronomía se verificó la presencia de la cepa de *B. japonicum* SEMIA 5080, utilizada en inoculantes de Brasil, en suelos de Uruguay con historia de cultivo de soja, con una alta persistencia y gran capacidad competitiva [76]. Además, se reportó la existencia de varias cepas “naturalizadas” de bradyrizobios nodulantes de soja. Algunas de estas cepas fueron mejores, en términos de eficiencia simbiótica, que la mezcla de *B. elkanii* U-1301 y U-1302 comercial [77].

En el mercado local se pueden encontrar diversos productos a base de estas cepas y que incluyen otros atributos que les dan valor agregado a las formulaciones, por ejemplo, el agregado de moléculas inductoras de la nodulación, el agregado de compuestos que afectan la viabilidad rizobiana sobre las semillas, o el superconcentrado de rizobios, tal como se describe a continuación.

1.7 Co-inoculantes para leguminosas

Un buen inoculante de leguminosas debe ser capaz de aportar un alto número de rizobios efectivos, siendo a su vez económicamente viable [78]. Uno de los principales desafíos que enfrentan los inoculantes es la

sobrevivencia limitada de las bacterias, lo que lleva a que las semillas se inoculen poco tiempo antes de la siembra para asegurar un número adecuado de bacterias por semilla cuando esta germina. Se estima que cerca del 10% de la población inicial de bacterias sobrevive al cabo de 24 h de inoculado el producto en las semillas [79]. Ante la necesidad de mejorar la “performance” de los productos y obtener mayores rendimientos, una estrategia es el desarrollo de formulaciones capaces de contener altos números de células viables a lo largo de la vida útil del producto. De esta forma, las semillas inoculadas en diferentes momentos pueden recibir la cantidad necesaria de rizobios para una óptima nodulación. Algunas formas de mejorar la sobrevivencia incluyen la aplicación de adherentes y anti-desecantes sobre las semillas.

Otra estrategia utilizada para el mejoramiento de las formulaciones es la adición de moléculas clave en la señalización de los procesos que llevan al establecimiento de la simbiosis, como lo son los flavonoides y los FN. Estos compuestos se incluyen en los inoculantes como inductores de la nodulación, y pueden llevar a mejoras en el rendimiento de los cultivos relacionadas con un mayor número de nódulos en las raíces y una mayor FBN [80,81]. Para soja, existen en el mercado distintos productos que aprovechan la capacidad inductora de los flavonoides o de los FN, como INDUCER (Lage y Cía., www.lageycia.com) [81], Signum (Rizobacter, www.rizobacter.com), TagTeam LCO y Optimize (Bayer, www.cropscience.bayer.us/).

Más recientemente, la inoculación conjunta de rizobios y otras BPCV (o co-inoculación) ha cobrado mayor relevancia. Con la co-inoculación, se pueden utilizar bacterias que actúan de forma sinérgica con los rizobios para mejorar la nutrición y/o la salud de los cultivos. La estrategia se basa en el uso de capacidades múltiples de promoción del crecimiento vegetal. Mediante los distintos mecanismos de promoción del crecimiento o colaborando en el proceso de infección por los rizobios, las BPCV podrían mejorar significativamente el rendimiento final del cultivo [68,82]. Actualmente, se comercializa a nivel nacional Rizopack 206HC para soja, un pack que contiene dos inoculantes separados, uno rizobiano (Rizo Liq TOP HC), y un bio-controlador fúngico (Rizoderma) (Rizobacter, www.rizobacter.com). A nivel de BPCV no rizobianas, RIZOFOS LIQ SOJA (Rizobacter) y RISE P (Salutaguse Parmitehas AS-Lallemand; www.lallemandplantcare.com/) son dos productos importados que contienen *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente, autorizados para su comercialización en territorio nacional, para soja [74]. No existen en Uruguay productos mixtos que combinen dos BPCV en la misma formulación, para ningún cultivo.

A nivel regional, la investigación en co-inoculación en soja es amplia, y la mayoría de los reportes refieren al uso combinado de bradyrizobios y *Azospirillum* [83–86]. *Azospirillum* es un género de bacterias capaces de fijar N₂ y de promover el crecimiento vegetal incluso en condiciones ricas en N. Este efecto es atribuido a la producción de auxinas y otras fitohormonas por *Azospirillum* [87–89]. Este género de bacterias es comúnmente utilizado en la producción de inoculantes comerciales principalmente para gramíneas [68,90,91]. En Uruguay existen insumos formulados con *A. brasilense* con autorización de venta en para cultivos de maíz, trigo, sorgo y cebada [74].

Otros ejemplos de BPCV que se utilizan en conjunto con rizobios u otras BPCV en el Mundo, son *Pseudomonas*, *Bacillus* [92], y *Delftia* (www.lallemandplantcare.com). Masterfix L Dual Force es un producto co-inoculante recientemente presentado en Brasil, que tiene la particularidad de contener dos bacterias (bradyrizobios y azospirilos) juntas en el mismo producto. Este producto es promocionado como el primero de su tipo en el mundo (<https://www.stoller.com.br/solucoes/biologicos/dual-force/>).

Dada la importancia del cultivo, surge la necesidad de mejorar los inoculantes para soja con el fin de obtener incrementos en el rendimiento del cultivo. En este contexto, la co-inoculación de las semillas con bradyrizobios y otras BPCV se presenta como una alternativa prometedora y no explorada en el País, para el desarrollo de nuevos productos.

1.8. Técnicas para el análisis masivo de compuestos: Aproximaciones ómicas

Mientras que el genotipo de un organismo se encuentra determinado por los genes que este posee, los que conforman su genoma, la determinación del fenotipo está dada por el genoma, y la influencia del ambiente. El flujo de información genética entre el genotipo y el fenotipo se da mediante la transcripción del ADN y la traducción del ARN, que resultan en la producción de las macromoléculas que conforman el transcriptoma (ARN) y el proteoma (proteínas), respectivamente. Los metabolitos o compuestos de bajo peso molecular (CBPM), que suelen ser productos o sustratos de las acciones de las proteínas producidas por el organismo, constituyen su metaboloma. El estudio del genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma brinda información muy diversa y útil para responder preguntas de la más variada naturaleza. Las disciplinas que se encargan de estudiar estos conjuntos de compuestos se conocen como -ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica).

Dentro de las aproximaciones ómicas, la genómica y la transcriptómica son las que se encuentran más desarrolladas gracias al avance de las tecnologías de secuenciación masiva y de análisis de datos cada vez más accesibles. Por otra parte, la proteómica y metabolómica han mostrado un enorme crecimiento en los últimos años, facilitado por los avances en técnicas separativas y de espectrometría de masa (MS, del inglés *Mass Spectrometry*). Como resultado de estos estudios se genera un gran volumen de datos, y por ello dependen enteramente de la bioinformática y la estadística para lograr obtener información relevante a partir de los datos generados.

Las aproximaciones ómicas se diferencian de los enfoques más tradicionales de investigación basados principalmente en hipótesis, y frecuentemente reduccionistas [93]. En las ómicas, en lugar de centrarse en una parte del sistema biológico de estudio, el investigador puede realizar un enfoque de todo el sistema en momentos determinados. Estos análisis holísticos de sistemas biológicos complejos con la ayuda de análisis computacionales y matemáticos, ha permitido el desarrollo de la biología de sistemas. En la biología de sistemas se suelen analizar e integrar datos generados mediante la utilización de técnicas de alto

rendimiento que permiten analizar cuali- y cuantitativamente distintas situaciones fisiológicas, de desarrollo o en distinta localización de muchos miles de productos, sean genes, ARNs, proteínas o metabolitos [93].

1.8.1. Proteómica

En los últimos años se ha observado un avance sustancial en cuanto a la resolución, precisión y sensibilidad de los espectrómetros de masa utilizados para analizar proteínas. La introducción de analizadores de masa híbridos con tecnología Orbitrap ha mejorado significativamente los análisis proteómicos, facilitando la implementación de aproximaciones “Bottom up”, que implican el análisis de los péptidos liberados de una proteína mediante proteólisis [94,95].

Cuando se utilizan este tipo de aproximaciones para analizar una mezcla de proteínas se lo denomina proteómica “shotgun”, término que resulta de su analogía con la técnica utilizada para secuenciar genomas [94,96]. Los péptidos analizados son identificados mediante la comparación de los espectros de masa generados mediante su fragmentación con espectros de masa teóricos obtenidos por fragmentación *in silico* de proteínas incluidas en una base de datos. Finalmente, se infieren las proteínas mediante la asignación de las secuencias peptídicas a las proteínas correspondientes [94].

A su vez, estas proteínas pueden ser cuantificadas mediante marcaje con isótopos estables o técnicas libres de marcaje. Estas últimas presentan la ventaja de no requerir pasos adicionales para el procesamiento de las muestras que puedan acarrear un mayor número de errores.

La cuantificación relativa de la expresión proteica utilizando esta metodología se puede lograr de dos formas:

- 1) por conteo de espectros, que utiliza la frecuencia con la que se identifica un péptido de una proteína como medida de su abundancia relativa; o
- 2) por intensidad iónica, que se vale de la señal obtenida mediante cromatografía y MS del pico correspondiente a un péptido perteneciente a una proteína.

La cuantificación relativa de las proteínas detectadas permite realizar comparaciones entre muestras obtenidas en distintas condiciones y evaluar sus efectos sobre la expresión proteica. De esta forma se pueden identificar los procesos que se ven afectados en las distintas condiciones y seleccionar proteínas de interés para análisis posteriores.

1.8.2. Metabolómica

El estudio del metaboloma implica el análisis de una gran variedad de CBPM con diferentes propiedades y que pueden estar presentes en un amplio rango de concentraciones, lo que le confiere una elevada complejidad. En consecuencia, se requieren técnicas y herramientas analíticas muy poderosas para enfrentar este tipo de análisis [97].

Las dos técnicas analíticas más comúnmente utilizadas en metabolómica son la Resonancia Magnética Nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) y la MS. Esta última cuenta con una mayor sensibilidad, y su utilización en conjunto con técnicas de separación cromatográfica la vuelven particularmente útil para el estudio del metaboloma vegetal [97,98]. Adicionalmente, la introducción de tecnologías de MS de alta resolución (HRMS, del inglés *High Resolution Mass Spectrometry*) como los sistemas basados en Orbitrap, son grandes aliados de la metabolómica. Las principales ventajas de los instrumentos basados en Orbitrap para estudios de metabolómica por HRMS incluyen alto poder de resolución, excelente exactitud de masa, flexibilidad en la elección de la fuente de iones o técnica de fragmentación y capacidad de realizar MS_n permitiendo una identificación de metabolitos más confiable o caracterizar compuestos [99,100]

Mediante las aproximaciones metabolómicas se estudia el perfil de metabolitos presentes en muestras biológicas en determinados momentos. Estos enfoques, que pueden ser dirigidos o no dirigidos, pretenden tanto detectar cambios como elucidar los procesos biológicos que llevan a ellos [99].

Las aproximaciones metabolómicas dirigidas apuntan a analizar, y en lo posible cuantificar, un número limitado de compuestos pertenecientes a un grupo definido *a priori*. En cambio, las aproximaciones no dirigidas se basan en el estudio de todos los metabolitos extraídos que puedan ser detectados [100,101]. En conjunto, estas técnicas permiten evidenciar cambios entre los distintos grupos de muestras, seleccionar marcadores para estos cambios y estudiar los mecanismos que dan lugar a los mismos.

El conjunto de CBPM presentes en las plantas depende de su metabolismo primario y secundario. El primero resulta en la producción de una serie de compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal, y sus estructuras y abundancia se encuentran altamente conservadas. Por otra parte, como producto de su metabolismo secundario las plantas producen una gran variedad de compuestos con diversas funciones relacionadas a la interacción con el ambiente biótico y abiótico [102]. Son estos últimos compuestos los responsables de la mayor parte de la diversidad metabólica encontrada en las plantas, debido a que difieren ampliamente entre los distintos linajes y presentan vías de biosíntesis generalmente restringidas a géneros específicos [102].

Los polifenoles son una clase de compuestos producidos como consecuencia del metabolismo secundario de las plantas. Existe en la naturaleza una gran diversidad de estos compuestos, con una variedad de

funciones, como la protección contra radiación UV, la defensa contra patógenos y herbivorismo, pigmentación, señalización y comunicación con microorganismos [103–105].

Un tipo de polifenoles, los isoflavonoides, conforman una de las primeras señales intercambiadas en la interacción entre las leguminosas y los rizobios, tal como se describió anteriormente (Sección 1.4), evidenciando la importancia de estos compuestos en el establecimiento de esas asociaciones simbióticas. Los polifenoles presentan una gran versatilidad, lo que permite a las plantas responder adecuadamente a diferentes condiciones adversas [103]. Consecuentemente, el estudio de este grupo de compuestos en muestras de origen vegetal sometidas a distintos tratamientos de inoculación con BPCV puede ayudarnos a develar los distintos mecanismos que subyacen al efecto benéfico causado por estas bacterias.

Otro grupo de compuestos que brindan a las plantas una gran capacidad de respuesta a estímulos exógenos son las fitohormonas. Además de su rol crucial en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, estas moléculas participan en los mecanismos de resistencia o tolerancia a estrés biótico y abiótico [106,107]. Es así como la producción de fitohormonas puede darse en las plantas tanto como consecuencia de presiones ambientales, como también por cambios en el desarrollo y crecimiento que se encuentran genéticamente programados [106,107]. Algunas bacterias tienen la capacidad de producir fitohormonas o regular su concentración en las plantas, tal como se describió en la Sección 1.5 y en la Figura 2 [91]. El estudio de las fitohormonas en sistemas de interacción planta-bacteria resulta particularmente relevante para explicar los efectos causados por la interacción. En la Tabla 1 se resumen los principales efectos de los distintos grupos de fitohormonas.

Tabla 1. Principales grupos de hormonas vegetales y sus efectos [108,109].

Grupo	Efectos	Ejemplos
Auxinas	Desarrollo radicular	Ácido 3-indolacético (AIA)
	Crecimiento celular	
	Elongación del tallo	
	División celular	
	Diferenciación de tejido vascular	
Giberelinas	Elongación del tallo	Ácidos giberélicos (GA1 y GA4)
	Inducción de la germinación	
	Crecimiento de frutos	
Citoquininas	División celular	Zeatina
	Morfogénesis del tallo	
	Crecimiento de yemas axilares	
	Desarrollo de cloroplastos	
Etileno	Inducción de RSI	
	Maduración de frutos	
	Abscisión de hojas y frutos	
	Senescencia de hojas y flores	
Ácido abscísico	Salida de la dormancia	
	Cierre de estomas	
	Inhibición del crecimiento del tallo	
	Inducción de síntesis de proteínas de almacenamiento	
	Rol en la defensa ante ataques de insectos	
Jasmonatos	Promoción de crecimiento radicular	Ácido jasmónico (AJ) AJ metil éster
	Respuesta a estrés hídrico	
	Inducción de RSI	
	Inhibición del crecimiento	
	Inhibición de la germinación	
	Promoción de la senescencia	
Salicilatos	Maduración de frutos	Ácido salicílico (AS)
	Abscisión	
Brasinoesteroides	Inducción de SAR	
	Inhibición de biosíntesis de etileno	
	Elongación del tallo	
Brasinoesteroides	Inhibición del desarrollo radicular	
	Promoción de biosíntesis de etileno	

1.9. Antecedentes

Delftia sp. JD2 es una Beta-proteobacteria de la familia Comamonadaceae, originalmente aislada de una muestra de suelo contaminado con metales pesados [110,111]. JD2 es una cepa capaz de reducir enzimáticamente Cr(VI) a su forma menos tóxica de Cr(III), producir sideróforos y auxinas [112]. A su vez, es capaz de promover el crecimiento vegetal en alfalfa, trébol y soja, cuando es co-inoculada en semillas

junto con los rizobios compatibles correspondientes [112–114]. Particularmente en alfalfa, los metabolitos secundarios producidos por efecto de la co-inoculación con *Ensifer meliloti* U143 y *Delftia* sp. JD2 presentan la capacidad de promover el crecimiento vegetal de plantas inoculadas. A su vez, se constató la colonización de las raíces de alfalfa por parte de JD2 comenzando por las raíces laterales emergentes, y observándose células bacterianas presentes a lo largo de la raíz y la superficie de los nódulos a los 7 días luego de la inoculación [115]. En términos productivos, las plantas de alfalfa cuando son co-inoculadas con *E. meliloti* y JD2 presentan mayor número de nódulos, una nodulación temprana y una mayor biomasa aérea.

En estudios previos en soja, la co-inoculación de las semillas con *B. elkanii* y JD2 tuvo como consecuencia una mayor nodulación en ensayos *in vitro*, así como un aumento de la biomasa radicular y de la altura de la parte aérea de plantas en un estadio de cuarto nudo (V4) en condiciones de invernáculo. A su vez, se registró una mayor acumulación de N total y ureidos en plantas co-inoculadas crecidas en invernáculo, cosechadas durante el estadio reproductivo de floración completa (R2). Los efectos de la co-inoculación se vieron también reflejados en la producción de granos, con un mayor índice de cosecha para plantas co-inoculadas cosechadas en estadio de madurez completa [113].

JD2 actuaría como “helper”, término acuñado para *Azospirillum* [116] en referencia a la mejora que se produce tanto en la capacidad de nodulación como en la FBN en algunas leguminosas cuando se co-inoculan estas bacterias con los rizobios. A nivel global existen productos a base de cepas de *Delftia* para leguminosas, que no se comercializan en Uruguay. Para soja encontramos las formulaciones BioBoost, y LALFIX, comercializadas por Lallemand (Canada, www.lallemandplantcare.com). Ambas están basadas en la inoculación conjunta de cepas de *Bradyrhizobium* con una cepa de *Delftia acidovorans*.

2. Hipótesis de trabajo

Las hipótesis de investigación predicen que:

- Durante la asociación entre *Delftia* sp. JD2, *B. elkanii* y las plantas de soja se producen cambios en las raíces y la rizosfera asociados a la promoción del crecimiento vegetal.
- La exposición a la isoflavona genisteína produce cambios celulares en JD2.

3. Objetivo general

Caracterizar la respuesta de las plantas de soja inoculada o co-inoculada con JD2, y la respuesta de esta cepa expuesta a genisteína, mediante aproximaciones ómicas.

3.1. Objetivos específicos

- Evaluar el perfil metabólico de muestras de raíces y exudados de plantas inoculada o co-inoculada con JD2.
- Estudiar el efecto de la co-inoculación de plantas de soja con la cepa JD2 sobre la expresión de proteínas en nódulos.
- Analizar la expresión de proteínas celulares en *Delftia* sp. JD2 expuesta a genisteína.

3.2. Estrategia

Para cumplir con los objetivos propuestos, se plantea la utilización de dos aproximaciones ómicas: metabolómica y proteómica. Por un lado, evaluar la composición de raíces y exudados rizosféricos mediante aproximaciones metabolómicas dirigidas y no dirigidas. Por otra parte, se propone analizar el efecto de JD2 sobre la expresión de proteínas en nódulos de plantas de soja y la expresión de proteínas celulares de JD2 en presencia de genisteína, utilizando la aproximación proteómica de “shotgun” (Figura 4).

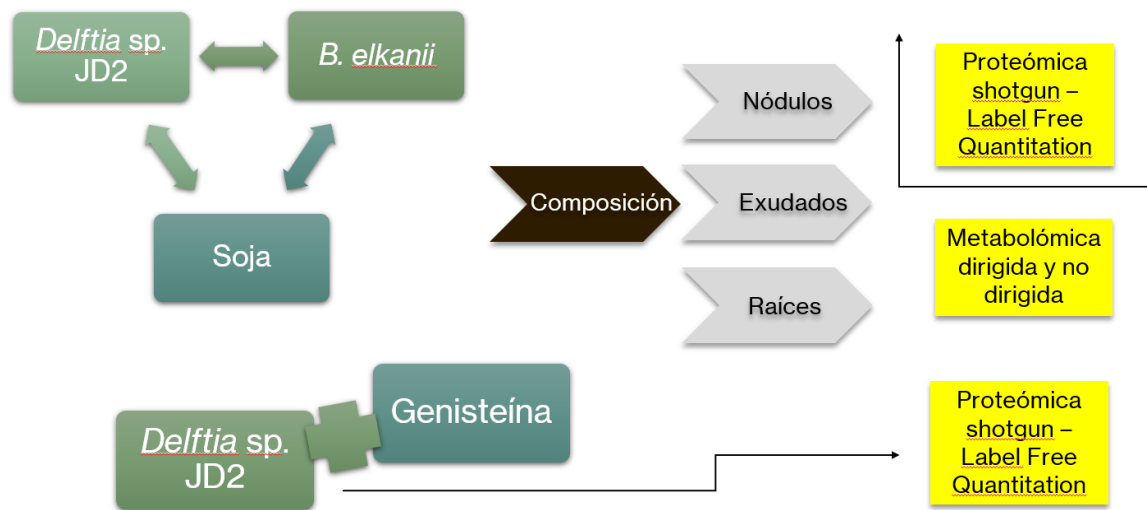


Figura 4. Esquema de la estrategia planteada para llevar a cabo los objetivos del trabajo. Se esquematizan los tipos de muestras estudiados (nódulos, exudados y raíces, y proteínas celulares de JD2), su origen (interacción tripartita soja-bradyrizobios-JD2, y cultivo de JD2 en presencia de genisteína) y las aproximaciones utilizadas para su análisis.

4. Materiales y métodos

4.1. Cepas bacterianas y material vegetal

Para todos los ensayos de inoculación, tanto *in vitro* como en macetas, se utilizaron las cepas rizobianas *B. elkanii* U1301 y U1302, y la BPCV *Delftia* sp. JD2. Ambas cepas de *B. elkanii* fueron facilitadas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). La cepa *Delftia* sp. JD2 forma parte de la colección de microorganismos de nuestro grupo de investigación.

Las cepas de *B. elkanii* crecieron en medio YEM [117] (Anexo 1). Por otro lado, JD2 creció en medio TY (Anexo 1) para los ensayos de inoculación de plantas, y TY diluido al décimo para los análisis de la expresión proteica en presencia de genisteína.

Las semillas de soja y utilizadas fueron de la variedad GE 590ci (<https://www.gye.com.uy/>), un cultivar de ciclo largo (ciclo V), suministradas por la empresa Lage y Cía. (<https://www.lageycia.com/>).

4.2. Obtención de muestras

4.2.1. Obtención de muestras de raíces

Con el fin de comprender los efectos causados por la co-inoculación, se estudió la composición química de raíces de plantas de soja sometidas a los distintos tratamientos de inoculación. Para ello, se trabajó con muestras de plantas crecidas en invernáculo obtenidas en el marco del proyecto de tesis de maestría de la Mag. Cécica Cagide [113,118]. Brevemente, semillas de soja desinfectadas superficialmente fueron sembradas en macetas conteniendo una mezcla de tierra-arena-vermiculita (2:2:1) e inoculadas de acuerdo con los tratamientos especificados en la Tabla 2. La inoculación con U1301 y U1302 se llevó a cabo utilizando el inoculante comercial LIQUIK (Lage y Cía., <https://www.lageycia.com/producto.php/14>), siguiendo las indicaciones del productor e implementando las concentraciones detalladas en la Tabla 2.

Las plantas crecieron en condiciones de invernáculo, con un rango de temperatura entre 15 y 30 °C, y un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad, controlado utilizando tubos Gro-lux (Gro-luxTM, Sylvania). Los riegos se realizaron con aproximadamente 250 ml de agua, solución de hiperfosfato 1 g/L y medio nutritivo Jensen al 10 % (Anexo 1), alternadamente.

Las plantas se cosecharon en los estadios de cuarto nudo (V4, 30 días aprox.) y floración completa (R2, 90 días aprox.). Las raíces fueron separadas, lavadas con agua y los nódulos extraídos. Finalmente, las raíces fueron liofilizadas, molidas y almacenadas a 4°C hasta su uso. Más detalles de la metodología de obtención de las muestras de raíces se encuentran en los trabajos de Cagide (2017) y Cagide y col. (2018) [113,118].

4.2.2. Obtención de muestras de exudados

El enfoque utilizado para el estudio de la interacción triple entre bradyrizobios, JD2 y soja implicó la caracterización de las señales intercambiadas entre estos organismos en etapas tempranas de la interacción. Para ello, se realizaron estudios comparativos de la composición química de exudados radiculares de plantas de soja crecidas en condiciones *in vitro* e hidroponía, e inoculadas con los microorganismos de interés. A continuación, se detalla la metodología utilizada para la obtención de los exudados.

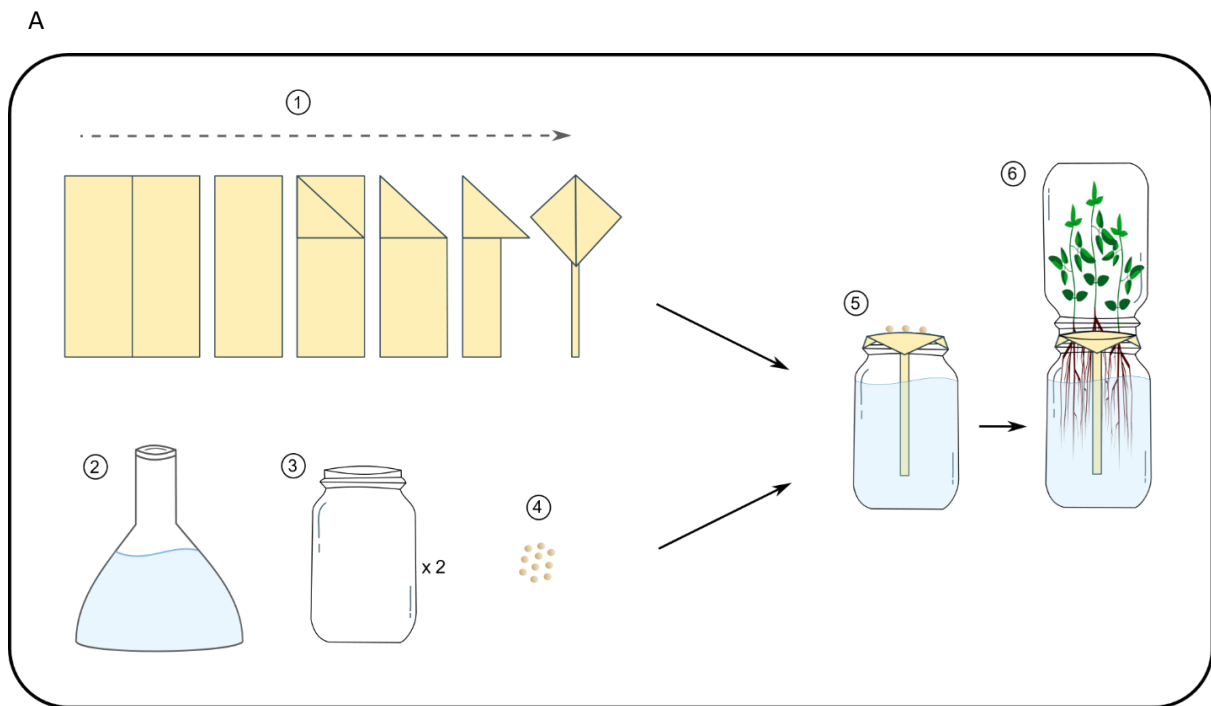
4.2.2.1. Desinfección de semillas y germinación

Las semillas de soja se lavaron con agua destilada estéril en agitación por 1 min, se incubaron en una solución de NaClO al 2 % por 15 min en agitación, y se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri conteniendo agar-agua (0,8 %) y se incubaron por 48 h a 30 °C y oscuridad, permitiendo su germinación.

Se realizaron controles de desinfección utilizando el agua correspondiente al último lavado de las semillas. Esta solución fue sembrada en placas de Petri conteniendo medio YEM sólido o TY sólido que se incubaron en estufa a 30 °C y oscuridad por 2-3 días.

4.2.2.2. Crecimiento en condiciones *in vitro* e hidroponía

Se utilizaron soportes de papel de filtro Whatman N°1 plegado, de forma similar a como se describe en [119], y en la Figura 5, con adaptaciones para frascos de vidrio cilíndricos para compotas. Cada frasco contenía 250 ml de medio salino Somesagaran y Hoben (S-H, Anexo 1) al 10%. El soporte de papel se dispuso de forma tal que la boca del frasco quedó tapada por el papel, quedando el segmento inferior del soporte en contacto con el medio líquido. La parte superior del frasco fue cubierta con papel de aluminio para su esterilización en autoclave. Posteriormente, y en condiciones de esterilidad, se trasplantaron a los soportes de papel, en las bocas de los frascos entre 3 y 7 plántulas por frasco ubicando la raíz emergente hacia el interior del papel. Luego de sembradas, se cubrió nuevamente la parte superior con papel de aluminio estéril.



B



Figura 5. (A) Esquematación de la confección del sistema de crecimiento de plantas en condiciones de hidroponía, para la obtención de exudados rizosféricos. 1) Secuencia de pliegues para el armado de soportes de papel de filtro; 2) Medio salino S-H, para crecimiento de plantas; 3) Frascos de vidrio estériles; 4) Semillas de soja desinfectadas superficialmente y germinadas; 5) Soporte de papel de filtro en contacto con el medio salino, con las semillas de soja prontas para ser inoculadas y 6) Sistema de hidroponía cerrado con un frasco de vidrio estéril adicional, con las plantas de soja creciendo en su interior. Esquema adaptado de Riviezzi et al., 2021a. (B) Fotografías del sistema de crecimiento tomadas durante el desarrollo de los experimentos.

Las plántulas se mantuvieron en cuarto de cultivo a 26°C por 48 h (largo de raicillas de 2-3 cm), luego de las cuales se realizó la inoculación en condiciones de esterilidad, implementando los tratamientos de inoculación detallados en la Tabla 2.

La inoculación se realizó directamente sobre la raíz principal emergente de cada plántula, con 100 µl de solución bacteriana en concentraciones 10 veces mayores que la concentración final para cada cepa (indicadas en la Tabla 2). Luego de la inoculación, se colocó un frasco de vidrio cilíndrico estéril invertido sobre la boca de cada frasco conteniendo las plántulas, para permitir el desarrollo de la parte aérea vegetal en condiciones asépticas (Figura 5).

Las plantas crecieron a 26°C, con un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad controlado por medio de tres tubos Gro-lux (Gro-lux™, Sylvania), por períodos de 4, 7 y 15 días post-inoculación (dpi). Los experimentos contaron con 9 réplicas (9 frascos) correspondientes a cada tratamiento.

Tabla 2. Tratamientos de inoculación implementados en los experimentos con plantas

Tratamiento	Microorganismo	Descripción
COINO	<i>B. elkanii</i> U1301 y U1302, <i>Delftia</i> sp. JD2	Inoculación con 10 ⁷ UFC/semilla de U1301 y U1302, y 10 ⁶ UFC/semilla de JD2
BRADY	<i>B. elkanii</i> U1301 y U1302	Control positivo: inoculación con 10 ⁷ UFC/semilla de U1301 y U1302
JD2	<i>Delftia</i> sp. JD2	Inoculación con 10 ⁶ UFC/semilla de JD2
CONTROL	Sin inocular	Control negativo: plantas sin inocular, tratadas con 100 µl de buffer fosfato (Anexo 1)

4.2.2.3. Colecta de exudados

Se colectó el medio de hidroponia conteniendo los exudados rizosféricos a los 5, 7 o 15 dpi. El medio colectado se filtró utilizando primero papel de filtro Whatman N°1 para eliminar restos de semillas y plántulas, y luego membranas de nylon con tamaño de poro de 0,45 µm, para eliminar las células bacterianas. Los exudados se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis.

4.2.2.4. Controles de recuperación

Alícuotas de una muestra de exudado de cada tratamiento fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio YEM sólido, TY sólido o YEM sólido con adición de Cr (VI) en una concentración de 0,5 mM. Las placas se incubaron en estufa a 30°C y oscuridad por 5 días, para corroborar la presencia de los microorganismos inoculados y ausencia de contaminación.

4.2.3. Obtención de muestras de nódulos

Los nódulos se obtuvieron de plantas crecidas en macetas de 1 Kg y condiciones controladas. Se sembraron tres semillas de soja desinfectadas superficialmente en cada maceta. Las macetas contenían vermiculita esterilizada mediante autoclave. La inoculación se realizó directamente sobre las semillas al momento de la siembra, de acuerdo con los tratamientos COINO y BRADY descritos en la Tabla 2. Pasados 10 días luego de la siembra e inoculación se eliminaron dos plantas de cada maceta, de forma tal que se mantuvo una única planta por maceta hasta el final del ensayo. Las plantas se cosecharon luego de 49 días de crecimiento a 26°C con un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad y riegos alternados con agua, hiperfosfato (1g/L) o medio Jensen diluído al 10% (Anexo 1).

Los nódulos se separaron de las raíces, se lavaron con agua destilada, se pesaron (peso fresco de nódulos, PFN), se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las raíces y partes aéreas vegetales se secaron a 60°C hasta alcanzar un peso constante (peso seco de parte aérea, PSA; y raíces, PSR). Los datos de PSA, PSR y PFN fueron sometidos a análisis estadístico utilizando el paquete InfoStat [120], con comparaciones *post hoc* basadas en el test DGC ($p > 0.05$).

4.3. Análisis proteómico

Con el fin de evaluar cambios en la expresión de proteínas en los nódulos en función de la inoculación, se llevó a cabo un análisis proteómico de secuenciación mediante una aproximación de *shotgun/bottom up proteomics*. De esta forma, realizando un análisis de cuantificación relativa (*label free quantification*) es posible inferir la identidad de las proteínas presentes en los nódulos y comparar sus niveles en las distintas condiciones de inoculación [94].

Por otra parte, se estudió el efecto de uno de los principales flavonoides producidos por la soja, la genisteína, sobre la expresión proteica en la cepa *Delftia* sp. JD2 utilizando la misma aproximación. A continuación, se detalla el procedimiento de obtención de proteínas de nódulos y de JD2.

4.3.1. Extracción de proteínas de nódulos

La extracción de proteínas de nódulos se realizó de acuerdo con el protocolo de Larrainzar y col. (2007) [121], con modificaciones. Brevemente, aproximadamente 100 mg de nódulos congelados en nitrógeno líquido se maceraron en mortero agregando 500 µl de buffer de extracción (Anexo 1). El macerado se centrifugó por 15 min a 2000 rpm y 4°C. El pellet, que contiene a los simbiosomas, se lavó con buffer de extracción, retomado en 500 µl de buffer fosfato (Anexo 1) y se sonicó (disrupción celular) tres veces durante 15 s en frío. Finalmente, se centrifugó por 15 min a 10000 g y 4 °C. El sobrenadante, que contiene las proteínas del simbiosoma, se congeló a -20 °C, liofilizó y retomó en 150 µl de buffer fosfato. Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Bradford [122].

4.3.2. Obtención de proteínas celulares de JD2

Se prepararon cultivos de JD2 en medio TY diluido al décimo, en presencia y ausencia de genisteína 20 μM (disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO)). Las células se recuperaron cuando los cultivos alcanzaron una $\text{DO}_{620\text{nm}}$ de entre 0,16 y 0,18 mediante centrifugación (15 min a 10000 rpm y 4 °C) y se lavaron con buffer fosfato 50mM (pH 7, anexo 1). Para la extracción de proteínas, las células se suspendieron en buffer fosfato mediante agitación por 30 min a 4°C, se sonicaron 3 veces por 15 s en frío (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer) y se incubaron a 4 °C en agitación por 30 min. La suspensión se centrifugó por 15 min a 10000 rpm y 4 °C y el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso. Se realizaron 3 réplicas biológicas para cada condición. Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el método de Bradford [122].

4.3.3. Shotgun/Cuantificación relativa de proteínas

Para el análisis de las muestras se utilizó el servicio de secuenciación de proteínas por MS del CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) con una alícuota de 35 μg de proteínas de cada muestra (nódulos o bacterias), que se dejaron ingresar aproximadamente 1 cm en el gel separador. El gel fue teñido con Coomassie G-250. Las bandas resultantes de cada muestra fueron escindidas del gel y almacenadas en tubos de 1,5 ml a 4 °C hasta ser enviadas al servicio de secuenciación.

El primer análisis realizado fue un análisis exploratorio sobre muestras proteicas de exudados en el que no se realizaron cuantificaciones. Este análisis exploratorio permitió examinar las muestras en composición y distribución de proteínas en función de su origen. A continuación, se realizaron análisis completos de detección, identificación y cuantificación de proteínas. Para la detección, las proteínas contenidas en el gel fueron digeridas con trispina, desaladas utilizando puntas ZipTip C18 y analizadas mediante nanoHPLC (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Scientific, Estados Unidos). La separación cromatográfica de los péptidos se logró utilizando una columna de fase reversa Easy-Spray Column PepMap C18 (2 μm , 100 A, 75 μm x 500 mm; Thermo Scientific, Alemania). El método de ionización fue mediante electrospray (EASY-SPRAY, Thermo Scientific, Estados Unidos), aplicando un voltaje de spray de 2,50 kV. Los espectros de masa fueron adquiridos en modo *Full MS* (70000 FWHM) y MSMS (17500 FWHM), y polaridad positiva. La adquisición en modo MSMS se realizó únicamente con los 15 picos de mejor relación señal/ruido de cada ciclo de medición.

4.3.4. Análisis de datos

El análisis de los datos de MS fue llevado a cabo en Facultad de Ciencias (UdelaR), Sección Bioquímica¹, utilizando el software MaxQuant (v. 1.6.12.0) para la identificación y cuantificación de proteínas [123]. Los espectros MS/MS se compararon con los proteomas de *Delftia* sp. JD2 (UP000093107), para el análisis de proteínas celulares de JD2, y de *B. elkanii* (UP00032215) y soja (UP000008827) mediante el “plug-in” Andromeda. Todos los proteomas fueron obtenidos de la base de datos UniProt (The UniProt Consortium, 2021; <https://www.uniprot.org>). La cuantificación libre de marcaje (LFQ, Label Free Quantification) fue realizada utilizando el algoritmo MaxFLQ [124].

Los datos procesados con MaxQuant fueron posteriormente analizados mediante el software Perseus (v. 1.6.14.0) [125]. Las intensidades obtenidas mediante LFQ fueron transformadas mediante logaritmo con base 2, y solo las proteínas cuantificadas en al menos dos muestras de cada condición fueron tomadas en cuenta para el análisis estadístico. Los cambios significativos en la abundancia de una proteína entre condiciones distintas fueron evaluados mediante test-t de Student. Aquellas proteínas con un p-valor < 0.05 y un “fold-change” > 2 fueron consideradas como significativamente reguladas. Se define fold-change (FC) como la medida del cambio observado entre dos condiciones, dada por la razón entre los valores registrados para el mismo parámetro en ambas condiciones

4.4. Metabolómica

El análisis de las muestras se centró en el perfilado metabólico de las mismas, con especial énfasis en la composición de flavonoides y otros polifenoles, y la presencia de fitohormonas. Dicho análisis se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a MS de alta resolución (UHPLC-HRMS, del inglés *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*), utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI, del inglés *ElectroSpray Ionization*) (UHPLC-ESI-HRMS, Orbitrap).

4.4.1. Perfilado metabólico y estudio polifenólico

Los análisis fueron realizados en colaboración con el grupo de Cromatografía, Electroforesis Capilar y Espectrometría de Masa (CECEM), en la Facultad de Química, Universidad de Barcelona (UB)².

¹ Agradecimiento especial al Lic. César García Laviña por la ayuda con el análisis de los datos de espectrometría de masa.

² Los análisis metabolómicos se realizaron en el marco de una estancia de investigación financiada por ANII, con código MOV_CA_2018_1_149867 bajo la dirección del Dr. Oscar Núñez.

4.4.1.1. Extracción de compuestos desde raíces y exudados

Para la extracción de los compuestos presentes en raíces de plantas cosechadas en los estadios V4 y R2 (Sección 4.2.3.), se adicionó 1 ml de metanol 80 % a 50 mg de muestra y se mezcló en vortex por 30 s. Luego de 10 min de incubación en baño de ultrasonido (5510 Branson ultrasonic bath, Hampton, NH, USA), las muestras se centrifugaron a 4800g por 15 min, se filtraron utilizando filtros de nylon de 0,22 μm y finalmente fueron guardadas a -20 °C hasta su utilización.

El análisis de exudados se realizó sobre muestras correspondientes a 7 y 15 dpi (Sección 4.2.2.). Se adicionó a cada muestra de exudados liofilizados 300 μl de metanol 80 %, se mezcló en vortex por 30 s y se continuó con los mismos pasos de extracción de compuestos descritos para las raíces.

4.4.1.2. Análisis mediante UHPLC-ESI-HRMS

El análisis cromatográfico de las muestras se llevó a cabo utilizando un equipo Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipado con una bomba cuaternaria, un “autosampler”, y un horno de columna. Una columna de fase reversa Ascentis Express C18 (150 x 2.1 mm, 2.7 μm) (Supelco, Bellefonte PA, USA) fue utilizada para la separación cromatográfica.

El método cromatográfico consistió en un gradiente de elución basado en solución acuosa de ácido fórmico 0,1 % (Solvente A) y acetonitrilo conteniendo 0,1 % de ácido fórmico (Solvente B), como se describe a continuación: 0-1 min, condiciones isocráticas con 10 % de B; 1-20 min, gradiente lineal desde 10 % a 95 % de B; 20-23 min, escalón isocrático con 95 % de B; 23-24 min vuelta a condiciones iniciales con 10 % de B; y desde 24 a 30 min, condiciones isocráticas con 10 % de B para reequilibrar la columna. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, y el volumen de inyección (en modo “full loop”) fue de 10 μl .

El equipo de UHPLC fue acoplado a un sistema Q-Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Fisher Scientific), equipado con una fuente de ionización por electrospray (HESI-II) operada en modo de ionización negativo. Se utilizó nitrógeno como gas envolvente, gas de barrido y gas auxiliar, con velocidades de flujo de 60, 0 y 10 ua (unidades arbitrarias), respectivamente. Para la fuente de ionización la temperatura utilizada fue de 350 °C, y el voltaje de capilar aplicado fue de -2.5 kV. La temperatura del capilar del instrumento fue de 320 °C. El equipo HRMS fue afinado y calibrado usando solución de calibración cada 3 días. Este equipo fue operado en modo “full-scan” con un rango m/z de 100 a 1500 y una resolución de masa de 70000 FWHM (del inglés *full width at half maximum*).

Las muestras de raíces y exudados fueron analizadas en secuencias independientes, en orden aleatorio. Se incluyó un control de calidad (mezcla de partes iguales de todas las muestras analizadas en la secuencia) y blancos constituidos por solución de metanol 80 %, cuya inyección fue repetida a continuación del análisis de 11 muestras.

Para todas las muestras de raíces se utilizaron al menos 3 réplicas biológicas. Adicionalmente, se realizaron réplicas técnicas e instrumentales con el fin de obtener 12 registros para cada muestra. Para las muestras de exudados se realizaron únicamente réplicas biológicas, con un total de 9 por tratamiento.

4.4.1.3. Procesamiento y análisis de datos: aproximaciones no dirigida y dirigida

Los datos de espectrometría de masa de alta resolución obtenidos fueron procesados implementando dos aproximaciones: dirigida y no dirigida.

En la aproximación no dirigida se estudiaron las “huellas metabolómicas” obtenidas mediante HRMS a una resolución de 70000 FWHM. Para ello se trabajó con todos aquellos iones presentes en las muestras que poseen un m/z entre 100 y 1500 y presentaron una intensidad mayor a 10^5 (NL, “Normalization Level” – intensidad del pico base). Los datos generados por UHPLC-HRMS fueron convertidos al formato. mzXML utilizando el software MSConvert [126]. Los archivos. mzXML fueron luego procesados utilizando el software MZMine [127] para construir los cromatogramas a partir de los índices masa/carga (m/z) detectados. Posteriormente, los cromatogramas fueron alineados y los datos exportados como valores separados por coma (.csv). Con el área de los picos correspondientes a los iones detectados en los distintos tiempos de retención (TR), se confeccionó una matriz quimiométrica conteniendo la “huella metabolómica” de las muestras.

Para la aproximación dirigida, los datos obtenidos por UHPLC-ESI-HRMS fueron procesados mediante el software Trace Finder™ 3.3 EFS (Thermo Fisher Scientific), utilizando una base de datos personalizada de masa exacta, compuesta por 86 compuestos, mayormente polifenoles. La base de datos utilizada incluye los flavonoides de mayor importancia en la interacción de plantas de soja con rizobios, además de otros polifenoles y derivados glucosilados de flavonoides. A su vez, se incluyeron algunas fitohormonas, azúcares y aminoácidos. Todos los compuestos incluidos en la base de datos se detallan en el Anexo 2.

En base a los datos obtenidos por UHPLC-ESI-HRMS en las condiciones empleadas, se obtuvo el área y el TR de los picos correspondientes a los iones detectados que coinciden con los compuestos de la base de datos. Con ellos, se construyó una matriz de datos quimiométrica con la “huella polifenólica” de las muestras, empleando el valor del área de los picos de los compuestos detectados.

Con las matrices construidas conteniendo los perfiles fitoquímicos de las muestras se realizaron los análisis multivariados de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, del inglés *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) utilizando el software Solo 8.1 (Eigenvector Research), para estudiar las diferencias producidas por los distintos tratamientos de inoculación. Los valores de Importancia de la Variable en la Proyección (*VIP scores*, del

inglés *Variable Importance in Projection*) fueron utilizados para seleccionar aquellas variables con mayor influencia sobre la distribución de las muestras, utilizando como valor de corte 1.2.

Se evaluaron los cambios significativos en la abundancia de los metabolitos detectados mediante la utilización de la herramienta Volcano Plot de la plataforma MetaboAnalyst [128]. De esta forma se comparó el “fold change” de los metabolitos detectados en función del tipo de muestra y el tratamiento de inoculación. Finalmente, se seleccionaron aquellas variables/metabolitos que presentaron valores de VIP scores mayores a 1.2, que a su vez tuvieran un “fold change” mayor a 2 con un p-valor < 0.05. Las comparaciones fueron realizadas incluyendo todos los tratamientos como primera aproximación, y entre pares de tratamientos para la selección de variables.

Luego de la identificación tentativa de los compuestos a partir de los datos de masa exacta, se asignaron las fórmulas moleculares a los compuestos y estas fórmulas moleculares se identificaron tentativamente con compuestos encontrados en diferentes bases de datos disponibles en internet. Se utilizaron las bases de datos HMDB [129] y Foodb, ambas del Centro de Innovación Metabolómica (TMIC, The Metabolomic Innovative Center, www.metabolomicscentre.ca). La base de datos HMDB (de Human Metabolome Data Base), contiene información detallada de los metabolitos de bajo peso molecular presentes en el cuerpo humano (www.hmdb.ca). La base Foodb contiene información sobre componentes alimentarios, macronutrientes y micronutrientes (www.foodb.ca). Ambas bases contienen detalles de composición, estructura, fórmula, datos fisicoquímicos, orígenes, vías de biosíntesis, etc. Estas bases se utilizaron para definir la nomenclatura de los compuestos, la clase química, sus presuntos efectos/roles y concentraciones en varios alimentos.

4.4.2. Cuantificación de polifenoles de interés

Dos mezclas de estándares fueron analizadas en diferentes concentraciones (0.001, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 5, 10, 15 y 20 ppm) y se confeccionaron rectas de calibración, con el fin de cuantificar estos compuestos en las muestras de raíces y exudados. Los estándares utilizados se detallan en la Tabla 3. Las mismas mezclas de estándares (en todas las concentraciones) fueron analizadas repetidas veces a lo largo de cada secuencia y se realizó la cuantificación considerando la proximidad en tiempo de inyección de los estándares con las muestras. Para la confección de las rectas de calibración se utilizaron al menos cinco puntos.

Tabla 3. Lista de estándares utilizados para la cuantificación de compuestos fenólicos

Compuestos fenólicos	$m/z[M-H]^-$	TR (min)
Ácido 4-hidroxibenzoico	137.0238	3.66
Ácido cinámico	147.0446	8.69
Ácido ferúlico	193.0500	6.14
Ácido <i>p</i> -cumárico	163.0395	5.42
Apigenina	269.0450	9.18
Cumestrol	267.0293	9.25
Daidzeína*	253.0500	9.40
Daidzina	415.1029	4.65
Genisteína	269.0450	9.22
Genistina	431.0978	5.75
Luteolina	285.0399	8.07
Quercetina	301.0348	8.26
Rutina	609.1455	5.34

*La daidzeína fue incluida únicamente en el análisis de exudados.

A partir del TR y m/z de cada compuesto, se integraron las áreas de los picos de los iones correspondientes en las muestras y se realizaron cálculos de concentración utilizando las rectas de calibración. Para la cuantificación de los compuestos se tomó en cuenta la proximidad temporal entre las muestras y la recta de calibración utilizada. Los resultados se expresan como partes por millón (ppm).

Adicionalmente, los datos de TR y m/z de los estándares analizados fueron utilizados para confirmar o rechazar la identidad de estos compuestos en las listas de variables seleccionadas mediante las aproximaciones de metabolómica dirigida y no dirigida.

4.4.3. Cuantificación de fitohormonas

Las muestras de raíces y exudados liofilizados fueron analizadas mediante el servicio de cuantificación de hormonas vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España (<http://www.ibmcp.upv.es/es/servicios/cuantificacion-hormonas-vegetales>).

Se cuantificaron las fitohormonas que se detallan en la Tabla 4, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa de alta resolución.

Tabla 4. Fitohormonas cuantificadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. AG1 y AG2 son giberelinas activas, importantes para el crecimiento y desarrollo vegetativo. Difieren en que AG1 presenta un grupo hidroxilo en el C-13 y AG2 no [130].

Nombre	Abreviación
Ácido giberélico	AG1
Ácido giberélico	AG4
Ácido abscísico	ABA
Ácido jasmónico	AJ
Ácido salicílico	AS
Ácido indol-3-acético	AIA
Dihidrozeatina	DHZ
Isopenteniladenina	iP
trans-Zeatina	tZ

Para ello, el material liofilizado (raíces o exudados) se suspendió en una mezcla de metanol al 80% y ácido acético al 1% que contenía como estándares internos a las fitohormonas deuteradas (17,17-2H)AGn, (2H5)AIA, (2H4)AS y (2H6)ABA s para cuantificar AS, AG, AIA y ABA, respectivamente, y dhJA (dihydro jasmonic acid) para la cuantificación de AJ [131].

Las suspensiones se incubaron en agitación durante 1 h a 4 °C y se mantuvieron a –20°C durante la noche. Para la extracción en fase sólida (SPE, del inglés *Solid Phase Extraction*) se utilizaron cartuchos Oasis HLB (fase reversa). Las fitohormonas contenidas en las muestras eluidas, suspendidas en acetonitrilo al 6% mezclado con ácido acético al 1%, se separaron por UHPLC (columna Accucore RP-MS de 2.6 µm, 50x2.1mm, Thermo Scientific, UK) con un gradiente de 5–50% de acetonitrilo con ácido acético al 0,05%, a 400 µl min⁻¹ por 14 min. Las concentraciones se analizaron con un espectrómetro de masa Q-Exactive (Orbitrap; ThermoFisher Scientific, MA, USA) utilizando SIM, curvas de calibración y los programas Xcalibur 2.2 SP1 48 (ThermoFisher) y TraceFinder.

Para el análisis de los datos se utilizó el software InfoStat [122], mediante el cual se realizó análisis de la varianza (ANOVA) con comparación a posteriori de a pares basada en la prueba de DGC (p-valor < 0,05). Los resultados se muestran como promedios acompañados de sus respectivos desvíos estándar.

5. Resultados

5.1. Proteómica

Los análisis proteómicos se realizaron sobre extractos proteicos obtenidos de células de *Delftia* sp. JD2 y sobre fracciones proteicas obtenidas de nódulos de plantas de soja.

5.1.1. Efecto de la co-inoculación de soja con bradyrizobios y *Delftia* sp. JD2 sobre el proteoma de la fracción nodular enriquecida en simbiosomas

Para la obtención de nódulos, las plantas de soja inoculadas con bradyrizobios y co-inoculadas con JD2 crecieron en condiciones controladas (de temperatura y fotoperíodo) durante 49 días, tal como se describe en la sección 4.2.2. Luego de la cosecha, se determinó un PSR significativamente mayor en plantas co-inoculadas en comparación con las inoculadas únicamente con cepas de *Bradyrhizobium* (Tabla 5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el PSA ni en el PFN (Tabla 5).

Tabla 5. Medidas de peso seco de raíces (PSR), de parte aérea (PSA) y peso fresco de nódulos (PFN) de plantas crecidas en condiciones controladas y cosechadas a los 49 días para la obtención de nódulos. Letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamientos	PSR (g/planta)	PSA (g/planta)	PFN (mg/planta)
BRADY	0,20 ± 0,11 b	0,46 ± 0,19 a	4,68 ± 1,40 a
COINO	0,26 ± 0,09 a	0,52 ± 0,18 a	4,71 ± 1,40 a

Debido a la heterogeneidad de las muestras proteicas, principalmente debido a la triple procedencia de las proteínas (soja, bradyrizobios y *Delftia*), se realizó en primera instancia una aproximación exploratoria en nódulos (sección 4.3.3), a partir de una réplica de cada tratamiento. En este análisis exploratorio se detectaron proteínas de origen vegetal y bacteriano, de *Glycine max* y *Bradyrhizobium elkanii*, respectivamente. No se detectaron proteínas de *Delftia* sp. JD2.

A continuación, se realizaron los análisis cuantitativos de los cambios en la expresión proteica en los simbiosomas. En las muestras de plantas co-inoculadas se detectaron 2555 proteínas, de las cuales 1711 fueron identificadas por más de dos péptidos. Del total de proteínas identificadas, 1063 corresponden a *B.*

elkanii y 650 a *G. max*. Se confirmó la ausencia de proteínas de JD2 bajo las condiciones de análisis empleadas.

No se evidenciaron grandes diferencias entre las muestras de los dos tratamientos de inoculación. En 8 proteínas se vio su abundancia incrementada en muestras de plantas co-inoculadas y en 3 proteínas, el resultado fue el contrario (Tabla 6).

Tabla 6. Proteínas expresadas diferencialmente en fracciones proteicas obtenidas de simbiosomas de nódulos de soja a los 49 días de crecimiento de las plantas, en condiciones controladas. La tabla muestra las proteínas sobre- y sub- producidas en plantas co-inoculadas, en relación con las inoculadas con bradyrizobios. Se detalla en paréntesis el número de acceso de cada proteína en Uniprot, y el fold-change (FC). El FC refiere a la relación del cambio observado en la producción de cada proteína en simbiosomas de plantas co-inoculadas.

Origen	Proteínas sobre-producidas	Fold-change	Proteínas sub-producidas	FC
Soja	Glicoproteína del tallo (P10743) de 31 kDA	10,4	Anexina (AOA0R4J363)	2,0
	Ferritina (C6TCN5)	4,4	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (C6T8V8)	4,2
	Inhibidor tipo Kunitz, de proteasa de tripsina (B1ACD5)	2,5		
	Subunidad beta de Proteosoma (C6SV91)	2,4		
	Aminopectidasa (I1K8E3)	2,2		
	Subunidad beta de proteína asociada a Translocon -TRAP- (I1MLC3)	2,0		
<i>B. elkanii</i>	Proteína de unión a ATP de sistema de eflujo de lipopolisacáridos (Transportador de tipo ABC A0A0D1LV99)	2,9	6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa (A0A0D1M2C7)	2,2
	Lipoproteína de membrana externa transportadora (A0A0D1P690)	2,3		

Entre las diferencias encontradas en proteínas vegetales, se constataron aumentos en la expresión de proteínas con funciones de almacenamiento vegetativo en tallo, almacenamiento de hierro, inhibición de proteasa de tripsina, translocación de polipéptidos a nivel del retículo endoplasmático, e hidrólisis de péptidos. Por otra parte, la abundancia relativa de una anexina y una aminotransferasa de aminoácidos ramificados de origen vegetal se vio disminuida en plantas co-inoculadas (Tabla 6).

Entre las proteínas de origen bacteriano se encontraron incluso menos diferencias. Solamente dos proteínas relacionadas con el transporte transmembrana, provenientes de *B. elkanii*, resultaron significativamente aumentadas en cuanto a su abundancia relativa en muestras de plantas co-inoculadas: una proteína con dominio de transportador ABC involucrado en el eflujo de β -glucanos y una lipoproteína transportadora de membrana externa. Una única proteína proveniente de *B. elkanii* presentó una abundancia relativa significativamente menor en plantas co-inoculadas, la 6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa. Esta enzima (EC:2.5.1.78) está involucrada en la biosíntesis de riboflavina -vitamina B2- , el precursor de flavín mononucleótido y el dinucleótido flavina-adenina, co-factores esenciales para una amplia variedad de enzimas redox.

5.1.2. Efecto de la genisteína sobre el proteoma de *Delftia* sp. JD2

Se analizaron los efectos de la isoflavona genisteína, sobre el proteoma de JD2. En el análisis proteómico se detectaron en total 2162 proteínas, de las cuales 1849 fueron identificadas utilizando más de dos péptidos. Luego del análisis de los datos, se observó que la presencia de genisteína en el medio de crecimiento aumenta la expresión de 31 proteínas y disminuye la expresión de otras 10 (Tabla 7).

Tabla 7. Proteínas intracelulares de *Delftia* sp. JD2 expresadas diferencialmente en cultivos bacterianos de 14 h de crecimiento en medio TY diluido al décimo, con el agregado de genisteína. La tabla muestra las proteínas cuya expresión fue regulada negativa o positivamente por la presencia de genisteína, y el fold-change (FC) y número de acceso (Accession Number) adjudicado en UniProt de cada una. El FC refiere a la proporción de cambio cuantificado en cada proteína al comparar su expresión en ausencia y presencia de genisteína en el medio de crecimiento.

Accession Number	Proteínas sobre-producidas en presencia de genisteína	FC
A0A1C7LHB1	Proteína flagellar HAP2 (Hook-Associated Protein 2)	19,7
A0A1C7L4W0	Proteína de unión a sustrato, transportador de cobalto de tipo ABC	7,9
A0A1C7LEC3	Proteína de gancho flagellar, FlgL	6,5
A0A1C7LD66	Proteína de gancho flagellar, FlgK	4,8
A0A1C7LFH6	Hidrolasa de 6-aminohexanoato	4,5
A0A1C7L5C0	N-etilmaleimida reductasa	4,2
A0A1C7LB89	Bomba de eflujo de membrana	3,9
A0A1C7LCN4	Transportador multidroga	3,9
A0A1C7LEZ0	Regulador transcripcional de la familia TetR	3,8
A0A1C7LCV8	Oxidoreductasa de molybdopterinina	3,3
A0A1C7LB09	Proteína PilY, de ensamble de Pilus	3,3

A0A1C7LCT6	Glutamato-1-semialdehido 2,1-aminomutasa	3,1
A0A1C7LEH2	Receptor dependiente de TonB	3,0
A0A1C7L7T2	Kinasa del ácido anhidro-N-acetilmurámico (Fragmento)	3,0
A0A1C7L4E7	Proteína sin caracterizar	2,7
A0A1C7L6P3	Superóxido dismutase	2,6
A0A1C7L8R9	Hidrolasa alfa/beta	2,5
A0A1C7L7R4	Amidasa de N-acetilmuramoil-L-alanina	2,5
A0A1C7LB36	Proteína de unión a sustrato, transportador de tipo ABC	2,5
A0A1C7LLJ7	Hidrolasa de choloilglicina	2,4
A0A1C7L709	Beta-lactamasa	2,3
A0A1C7L5P8	Regulador transcripcional	2,2
A0A1C7LM11	Diguanilato ciclasa	2,2
A0A1C7LGS8	Proteína sin caracterizar	2,2
A0A1C7LGV8	Glutamato sintasa	2,2
A0A1C7L3M3	Proteasa HtpX, homólogo	2,2
A0A1C7LB54	Proteína sin caracterizar	2,2
A0A1C7LAA3	Transportador de hierro, FeoB	2,1
A0A1C7LHW3	Hemolisina D	2,1
A0A1C7L5J0	Epimerasa dependiente de NAD	2,1
A0A1C7L7Y7	Histidina kinasa	2,0
A0A1C7LCE2	Monóxido de carbono deshidrogenasa	2,0
Accession Number	Proteínas sub-producidas en presencia de genisteína	FC
A0A1C7LA47	Regulador transcripcional de la familia LacI	4,3
A0A1C7LKT4	L27 proteína ribosomal 50S	4,1
A0A1C7LEX6	4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa	3,1
A0A1C7LA03	Factor Tu de elongación	2,8
A0A1C7LKC6	Regulador transcripcional	2,6
A0A1C7LLN4	L33 proteína ribosomal 50S	2,5
A0A1C7LIM0	Transacilasa de proteína portadora de malonil CoA-acil	2,5
A0A1C7LFI3	S16 proteína ribosomal 30S	2,1
A0A1C7LDL8	Gama-aminobutirato permease	2,0
A0A1C7L6G6	Rep helicasa de ADN dependiente de ATP	2,0

Entre las proteínas cuya expresión se vio aumentada, se destacan incrementos de entre 5 y 20 veces (expresados como fold-change, o medida del cambio observado entre las condiciones con y sin genisteína) en proteínas del gancho flagelar, y una expresión 3 veces mayor de la proteína de ensamblado del Pilus PilY.

Se registró además una expresión 2.2 veces mayor de una enzima diguanilato ciclasa (EC 2.7.7.65), en presencia del flavonoide. Esta enzima es responsable de la producción de diguanilato cíclico (c di-GMP), una molécula de señalización universal que participa en diversos procesos bacterianos [132]. Adicionalmente, se observó el aumento en la expresión de una beta-lactamasa (2,3 veces), y de un

regulador transcripcional de la familia TetR (3,8 veces). Este último conforma un sistema de un único componente involucrado en la comunicación intercelular, y en la regulación de bombas de eflujo de antibióticos [133] (Tabla 7). A su vez, se vio aumentada la expresión de varias proteínas de membrana como algunos transportadores de tipo ABC, una bomba de eflujo, un transportador multidrogas, un transportador de hierro, o un receptor dependiente de TonB. El receptor dependiente de TonB participa en el proceso de adquisición de sustratos específicos, principalmente hierro-sideróforos [134].

Por otro lado, la presencia de genisteína produce aumentos en la expresión de una proteasa HtpX, descrita en *E. coli* como una metaloproteasa relacionada con la proteólisis de proteínas de membrana [135,136]; y de dos proteínas involucradas en el reciclado de la pared celular: la anhidro-N-acetilmurámico quinasa (EC 2.7.1.170) y la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (EC 3.5.1.28). La primera es una enzima implicada en la utilización del ácido anhidro-N-acetilmurámico. Este puede provenir del medio o derivar de la propia mureína de la pared celular bacteriana durante su reciclaje [137]. La segunda es una amidohidrolasa de peptidoglicanos, que corta el enlace entre residuos de N-acetilmuramil y L-alanina en ciertos glicopéptidos de la pared celular [138]. Entre las 10 proteínas cuya expresión resultó disminuida ante la presencia de genisteína, encontramos a las proteínas ribosomales 50S L27, 50S L33 y 30S S16, además del factor de elongación Tu (Tabla 7).

5.2. Metabolómica

Para evaluar la calidad de los datos obtenidos mediante las aproximaciones metabolómicas no dirigida y dirigida, se realizó un PCA utilizando las matrices quimiométricas confeccionadas con los datos obtenidos. Como se puede observar en la Figura 6, los registros correspondientes al Control de Calidad (QC) se agrupan hacia el centro del gráfico, indicando una buena reproducibilidad durante todo el análisis.

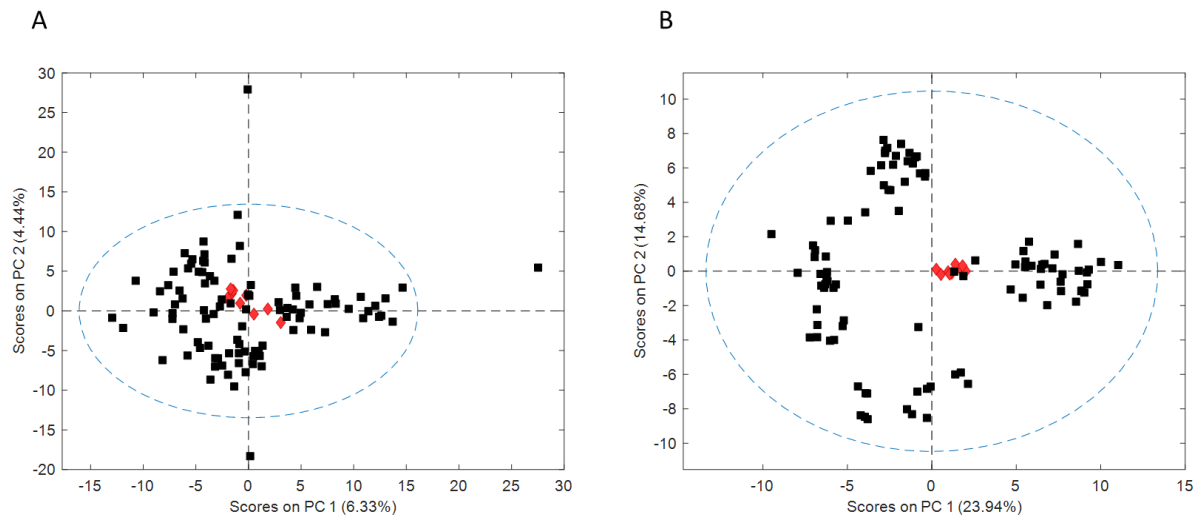


Figura 6. Control de Calidad en análisis de raíces. (A) Control de calidad utilizando datos obtenidos mediante aproximación no dirigida y (B) Control de calidad utilizando datos obtenidos mediante aproximación dirigida. PCA de las muestras de raíces de plantas en V4 y R2 (■); QC (◆, muestras de control de calidad, utilizada para monitorear el sistema y la estabilidad de las muestras en el transcurso del análisis).

El control de calidad realizado en muestras de exudados mediante PCA para la aproximación no dirigida no fue satisfactorio, por lo que no se realizaron análisis posteriores con estos datos (Figura 7).

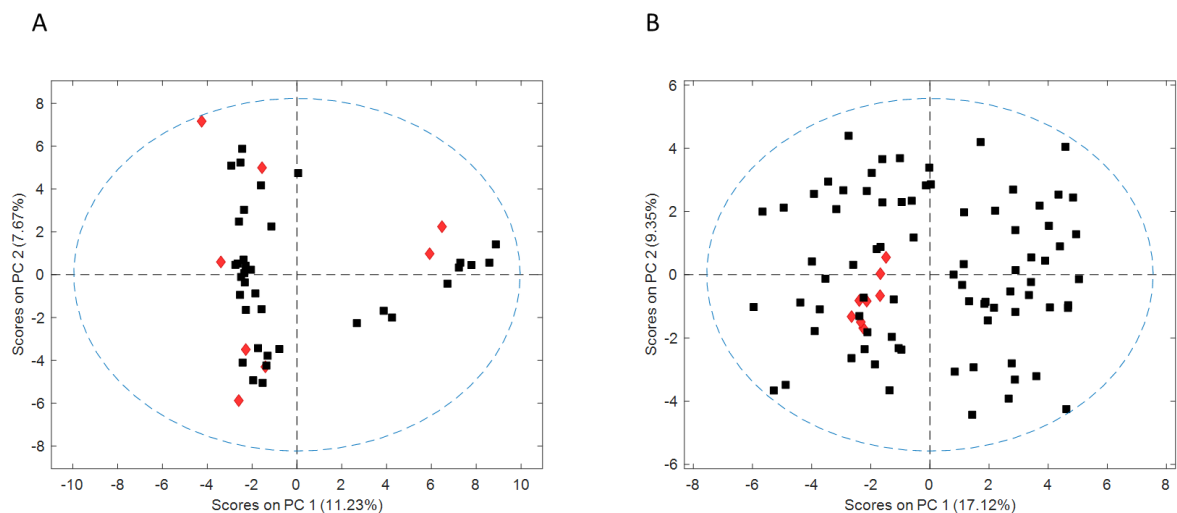


Figura 7. Control de Calidad en análisis de exudados (A) Control de calidad utilizando datos obtenidos mediante aproximación no dirigida y (B) Control de calidad utilizando datos obtenidos mediante aproximación dirigida. PCA de las muestras de exudados rizosféricos en 7 y 15 dpi (■); QC (◆, muestras de control de calidad, utilizada para monitorear el sistema y la estabilidad de las muestras en el transcurso del análisis).

5.2.1. Aproximación no dirigida en raíces

La matriz quimiométrica resultante de este análisis contó con dimensiones de 96 x 657, donde el primer valor corresponde al número de muestras analizadas y el segundo al número de variables (metabolitos) detectadas/utilizadas.

Se observó en este análisis la separación de las muestras en función del estadio de desarrollo vegetal, y se obtuvo una discriminación aún mejor de estos grupos mediante PLS-DA (Figura 8). El estudio independiente de ambos tiempos de muestreo permitió diferenciar las muestras provenientes del tratamiento BRADY de las de COINO, en ambos tiempos de muestreo (Figura 8). De la misma forma, se observó una clara separación entre las muestras de los tratamientos JD2 y Control en el estadio V4 (Figura 8).

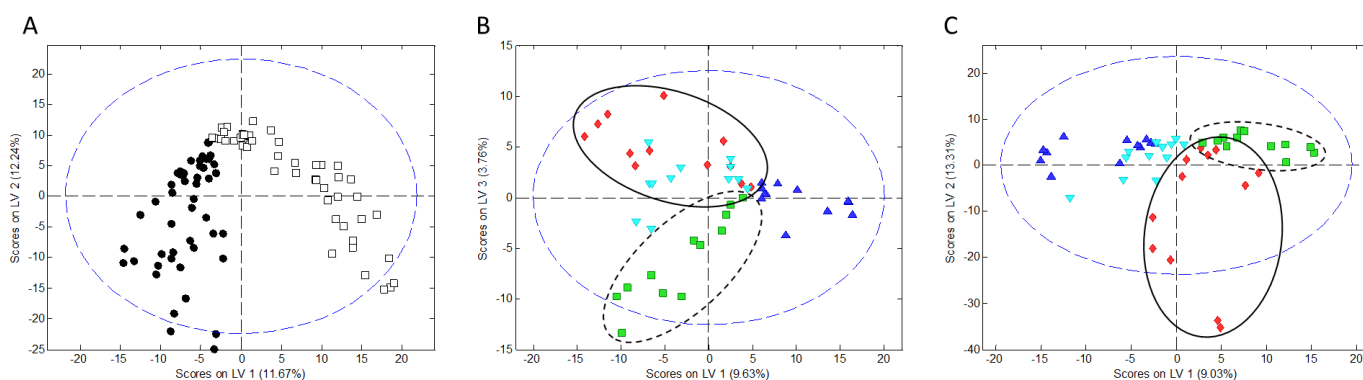


Figura 8. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de soja. A, se muestran todas las muestras analizadas, diferenciando entre tiempos de cosecha V4 (□) y R2 (●). B y C muestran el análisis independiente de los tiempos de cosecha V4 y R2, respectivamente (♦ BRADY, ■ COINO, ▼ JD2 y ▲ Control). Las elipses indican los grupos de muestras correspondientes a los tratamientos BRADY (línea sólida) y COINO (línea punteada).

5.2.2. Aproximación dirigida en raíces y exudados

Como resultado del análisis de los datos obtenidos mediante LC-HRMS utilizando el software TraceFinder, se detectaron 53 y 32 compuestos de los incluidos en la base de datos utilizada (Anexo 2), en muestras de raíces de soja y exudados, respectivamente. Debido a que un mismo metabolito con un m/z puede ser detectado en diferentes TR, se consideró a cada par m/z -TR como una variable independiente, con el fin de no perder información potencialmente relevante. Consecuentemente, las matrices quimiométricas resultaron con las siguientes dimensiones: 96 x 121 para raíces y 79 x 53 para exudados, donde el primer valor corresponde al número de muestras analizadas y el segundo al número de variables (compuestos) detectadas/utilizadas.

5.2.2.1. Raíces

Como se puede observar en la Figura 9, se constató la separación de las muestras en dos grupos compuestos cada uno de ellos por muestras correspondientes al mismo tiempo de muestreo. Esta observación se hace aún más evidente al implementar el análisis PLS-DA, el cual mejora la discriminación entre muestras de raíces colectadas durante el estadio V4 de aquellas colectadas en R2 (Figura 9A, B y C).

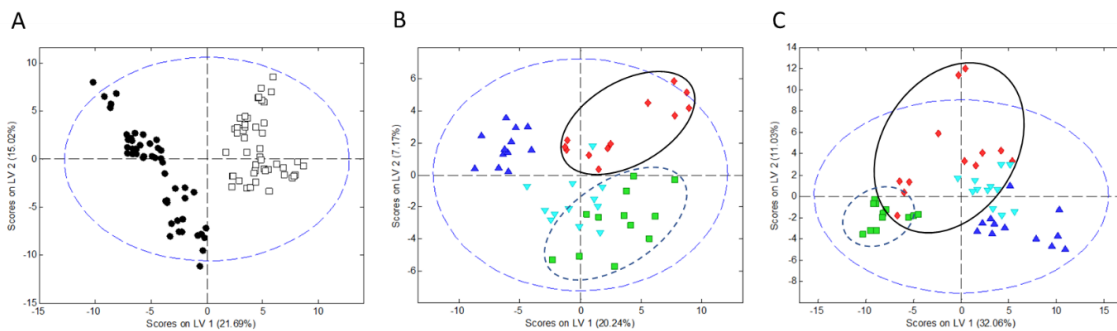


Figura 9. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de soja. A), se muestran todas las muestras de raíces analizadas, diferenciando entre tiempos de cosecha V4 (□) y R2 (●); B y C muestran el análisis independiente de los tiempos de cosecha V4 y R2, respectivamente. ◆ BRADY, ■ COINO, ▼ JD2 y ▲ Control. Las elipses indican los grupos de muestras correspondientes a los tratamientos BRADY (línea sólida) y COINO (línea punteada).

A efectos de evidenciar el impacto de los distintos tratamientos de inoculación sobre la composición de las muestras, fue necesario analizar cada tiempo de muestreo por separado. Se observó la separación de las muestras correspondientes a COINO de aquellas provenientes de BRADY, siendo esta diferencia más marcada en raíces colectadas en el estadio V4 (Figura 9B). A su vez, se observó una clara separación entre las muestras de raíces del tratamiento JD2 respecto al Control, en este estadio (Figura 9B).

Estas diferencias son incluso más marcadas cuando se comparan las muestras de a pares de tratamientos dentro del mismo tiempo de muestreo, incluyendo en cada matriz solamente muestras correspondientes a los dos tratamientos que se quieren comparar. Así, se pudieron observar diferencias que el análisis conjunto de todos los tratamientos no permitió distinguir. El análisis de a pares facilita la interpretación de los resultados y la selección de los metabolitos con mayor influencia sobre las diferencias causadas por la presencia de JD2. Por ello se compararon las muestras del tratamiento COINO con muestras del tratamiento BRADY por un lado, y muestras del tratamiento JD2 con las del tratamiento Control, por el otro, para cada tiempo de muestreo. En cada comparación de a pares, se seleccionaron aquellos metabolitos que presentaron valores de VIP mayores a 1.2 y una abundancia significativamente diferente por efecto de JD2.

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS COINO vs BRADY

Las comparaciones entre este par de tratamientos permitieron seleccionar 7 y 23 variables discriminantes y con variación significativa, en muestras de raíces en estadio V4 y R2, respectivamente (Tabla 8). Mediante este análisis se evidenció un marcado descenso de compuestos fenólicos en raíces COINO en ambos estadios de desarrollo, donde aproximadamente el 71 % y 87 % de los metabolitos seleccionados presentaron una abundancia menor en muestras de COINO en V4 y R2, respectivamente.

Tabla 8. Metabolitos con identidad probable, seleccionados en muestras de raíces de plantas en estadios V4 y R2 como discriminantes con un cambio relativo significativo entre los tratamientos COINO y BRADY. Los metabolitos fueron seleccionados en base a sus valores de VIP obtenidos mediante PLS-DA (con un umbral de 1,2) y FC significativo (p -valor ≤ 0.05). El $\log_2(FC)$, expresado en valor absoluto, describe el cambio relativo en COINO respecto a BRADY, la dirección del cambio se encuentra representada con flechas de tendencia. TR: Tiempo de retención.

Clase ^a	Fórmula	TR	Metabolito probable	VIP	log2 (FC)	Tendencia ^d
Estadio V4						
Ácido benzoico y derivados	C ₈ H ₈ O ₄	6.50	Ácido vanílico / ácido homogentísico	2.663	-	A
Ácido hidroxicinámico / cinamaldehído	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	7.40	Etil cafeato / sinapaldehído	1.526	-	A
Flavonoide (flavonol O-metilado)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	8.13	Isoramnetina / ramnetina	1.514	1.072	↓
Flavonoide (isoflavona O-metilada)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	12.40	Biochanina A / Gliciteína	2.362	1.215	↓
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	6.72	Ácido salicílico / ácido hidroxibenzoico / dihidroxibenzaldehído/ sesamol	1.546	1.529	↓
Flavonoide / Pterocarpano	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.92	Naringenina / glicinol	2.526	1.640	↓
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	7.44	Ácido salicílico / ácido hidroxibenzoico / dihidroxibenzaldehído / sesamol	1.711	2.442	↓
Estadio R2						
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₂	5.27	Ácido benzoico / hidroxibenzaldehído	1.542	1.376	↑
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	1.73	Ácido salicílico / ácido hidroxibenzoico / dihidroxibenzaldehído/ sesamol	1.225	2.853	↓
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	3.49	Ácido 4-hidroxibenzoico ^b	1.470	2.280	↓

Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	5.98	Ácido salicílico / ácido hidroxibenzoico / dihidroxibenzaldehído/ sesamol	1.212	-	ND
Ácido benzoico y derivados	C ₇ H ₆ O ₃	6.72	Ácido salicílico / ácido hidroxibenzoico / dihidroxibenzaldehído/ sesamol	1.291	-	ND
Ácido benzoico / hidroxibenzaldehídos	C ₇ H ₆ O ₄	2.36	Ácido dihidroxibenzoico / galaldehído	1.359	2.994	↓
Ácido benzoico / hidroxibenzaldehídos	C ₇ H ₆ O ₄	6.89	Ácido dihidroxibenzoico / galaldehído	1.267	-	ND
Ácido benzoico / hidroxibenzaldehídos	C ₇ H ₆ O ₄	8.63	Ácido dihidroxibenzoico / galaldehído	1.188	1.733	↓
Cumarina	C ₉ H ₆ O ₃	4.53	Umbeliferona / 4-Hidroxycumarina	1.172	1.327	↑
Cinamaldehído	C ₉ H ₈ O ₃ ^c	5.90	3,4-dihidroxicinamaldehído	1.209	1.415	↓
Ácido hidroxicinámico	C ₉ H ₈ O ₄	3.71	Ácido cafeico / ácido didroxicinámico	1.237	2.567	↓
Ácido hidroxicinámico	C ₉ H ₈ O ₄	5.86	Ácido cafeico / ácido didroxicinámico	1.406	2.522	↓
Ácido benzoico y derivados	C ₉ H ₁₀ O ₅	5.48	Ácido siringico / etilgalato	1.344	-	ND
Flavonoide (flavonol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ^c	7.02	Morina	1.161	2.888	↓
Flavonoide (flavonol O-methylated)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7.36	Isoramnetina / ramnetina	1.395	1.516	↑
Glucósido de flavonoides	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ ^c	9.32	Genisteína/Apigenina glucósido	1.274	3.991	↓
Glucósido de flavonoides	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ ^c	9.66	Genisteína/Apigenina glucósido	1.243	3.158	↓
Glucósido de flavonoides	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	3.12	Naringenina 7-O-glucósido / dihidrogenistina	1.342	2.278	↓
Glucósido de flavonoides	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	5.56	Naringenina 7-O-glucósido / dihidrogenistina	1.304	2.013	↓
Flavanoide (dihidroflavonol O-glucósido)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	4.55	Dihidrokaempferol 3-O-glucósido	1.320	2.322	↓
Flavonoide (dihidroflavonol O-glucósido)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	6.12	Dihidrokaempferol 3-O-glucósido	1.279	-	ND
Flavonoid (flavona, dihidroisoflavona, chalcona)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	10.25	Liquiritigenina / dihidrodaidzeina / isoliquiritigenina	1.441	1.099	↓
Carbohidrato	C ₄ H ₈ O ₅	1.06	Ácido treónico	1.257	-	ND

* ND, no detectado en muestras de COINO; A, metabolito detectado únicamente en muestras de COINO; ^a

Taxonomía de compuestos tentativos basada en su fórmula empírica y en las bases de datos HMDB (www.hmdb.com) y FooDB (www.foodb.com); ^b Metabolitos cuya identidad fue confirmada mediante uso de estándares; ^c Metabolitos cuya identidad fue descartada mediante el uso de estándares ácido *p*-cumárico (C₉H₈O₃, TR = 5.9), quercetina (C₁₅H₁₀O₇, TR = 7.02) y, genistina o genisteína glucósido (C₂₁H₂₀O₁₀, TR = 9.32 y 9.66); ^d Tendencia de la dirección del cambio inferida mediante los vectores de proyección del análisis PLS-DA.

Las variables seleccionadas en muestras del estadio V4 corresponden principalmente a flavonoides y ácidos benzoicos (3 en cada caso). Estos dos grupos de compuestos son también los mayoritarios entre las variables seleccionadas para las muestras de R2, donde también fueron seleccionados varios glicósidos de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. Entre los cambios de mayor magnitud observados en los metabolitos seleccionados encontramos al AS, el ácido dihidroxibenzoico (DHBA) y el ácido cafeico, para los cuales se han reportado funciones en la inducción de RSA, quelación de hierro y el balance de agua, respectivamente [108,139,140]. A su vez, un glucósido de isoflavona, posiblemente de apigenina o genisteína, presentó una de las mayores disminuciones en su abundancia entre los metabolitos seleccionados.

COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS JD2 vs Control

La comparación entre los tratamientos JD2 y Control permitió seleccionar 16 y 13 metabolitos en los estadios V4 y R2, respectivamente (Tabla 9). En estas variables se registró un claro aumento de compuestos fenólicos en presencia de JD2, en ambos tiempos de muestreo. En el estadio V4 el 81 % de los compuestos seleccionados presentaron mayor abundancia en muestras inoculadas con JD2, siendo el ácido benzoico y el AS los únicos compuestos que presentaron menor abundancia en estas muestras.

Tabla 9. Metabolitos identificados tentativamente en muestras de raíces de plantas en estadios V4 y R2, seleccionados como discriminantes entre los tratamientos JD2 y Control, con un cambio relativo significativo en el tratamiento JD2 respecto al Control. Los metabolitos fueron seleccionados en base a sus valores de VIP obtenido mediante PLS-DA (con un umbral de 1,2) y “fold-change” (FC) significativo (p-valor ≤ 0.05). El $\log_2(\text{FC})$, expresado en valor absoluto, describe el cambio relativo en el tratamiento JD2 respecto al Control, la dirección del cambio se encuentra representada con flechas de tendencia. TR: Tiempo de retención.

Class ^a	Fórmula	TR	Metabolito tentativo	VIP	$\log_2(\text{FC})^*$	Tendencia ^d
V4						
Ácido benzoico y derivados	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2^c$	5.27	Ácido benzoico / salicilaldehído	1.401	1.013	↓
Ácido benzoico y derivados	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2^c$	6.37	Ácido benzoico / salicilaldehído	1.794	2.744	↓
Ácido benzoico y derivados	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3^c$	6.72	Ácido salicílico / dihidroxibenzaldehído	1.735	2.426	↓
Ácido benzoico y derivados	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	7.27	Ácido vanílico / ácido homogentísico	1.212	1.106	↑
Ácido hidroxicinámico	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	5.86	Ácid cafeico	1.332	1.602	↑

Fenol / ácido fenilpropanoico	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.62	Siringaldehído / dihidrocafeato	1.794	-	A
Ácido hidroxicinámico /cinamaldehído	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	9.04	Etil cafeato / sinapaldehído	1.529	-	A
Ácido hidroxicinámico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	5.92	Ácido sinápico	2.471	2.373	↑
Flavonoide (flavanona)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	7.06	Naringenina	1.975	1.552	↑
Flavonoide (flavonol / aurona)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ ^c	6.65	Kaempferol / aureusidina	1.168	2.166	↑
Flavonoide (flavan-3-ol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	4.88	Catequinas	1.973	1.688	↑
Flavonoide (flavan-3-ol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	5.58	Catequinas	1.519	1.640	↑
Flavonoide (dihidroflavonol O-glucósido)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	4.55	Dihidrokaempferol 3-O-glucósido	1.335	1.025	↑
Carbohidrato	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.06	Xilosa / arabinosa / ribosa / xilofuranosa	2.091	2.783	↑
Carbohidrato	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.34	Xilosa / arabinosa / ribosa / xilofuranosa	1.642	1.576	↑
Triterpenoide	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	14.5	Ácido asiático	1.911	2.279	↑
R2						
Glucósido de flavonoide	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.33	Rutina ^b	2.606	2.088	↓
Cumarina	C ₉ H ₆ O ₃	4.53	Umbeliferona / 4-Hidroxycumarina	1.488	1.105	↑
Ácido hidroxicinámico y derivados	C ₉ H ₁₀ O ₃	5.58	Ácido dihidro <i>p</i> -cumárico / cafeil alcohol	1.877	-	A
Indol	C ₁₀ H ₉ NO ₂	5.80	Ácido indolacético (IAA)	1.824	2.368	↑
Ácido hidroxicinámico	C ₉ H ₈ O ₄	5.86	Ácido cafeico / ácido dihidroxicinámico	2.049	1.198	↑
Ácido benzoico y derivados	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.62	Siringaldehído / dihidrocafeato	1.574	-	A
Ácido hidroxicinámico / cinamaldehído	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	10.53	Etil cafeato / sinapaldehído	2.188	1.756	↓
Flavonoide (flavonol / aurona)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6.65 ^c	Kaempferol / aureusidina	1.388	1.387	↑
Isorhamnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7.36	Isoramnetina	1.291	1.347	↑
Glucósido de terpenoide	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	11.15	Soyasaponina I	1.976	1.212	↑
Triterpenoide	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	14.5	Ácido asiático	1.461	2.273	↑
Indol	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	6.00	Triptófano	1.387	1.070	↓
Carbohidrato	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1.67	Trehalosa / maltosa / celobiosa	1.238	1.469	↓

*A, metabolito detectado únicamente en muestras del tratamiento JD2; ^a Taxonomía de compuestos tentativos basada en su fórmula empírica y en las bases de datos HMDB (www.hmdb.com) y FooDB (www.foodb.com); ^b Metabolitos cuya identidad fue confirmada mediante uso de estándares; ^c Metabolitos cuya identidad fue descartada mediante el uso de estándares 4-hidroxibenzaldehído (C₇H₆O₂, TR = 5.27 y 6.37), ácido 4-hidroxibenzoico (C₇H₆O₃, TR = 6.72) y luteolina (C₁₅H₁₀O₆, TR = 6.65); ^d Tendencia de la dirección del cambio inferida mediante los vectores de proyección del análisis PLS-DA.

En el estadio R2, el 69 % de los metabolitos seleccionados presentaron mayor abundancia en muestras de plantas inoculadas con JD2. En este estadio se registró menor abundancia de 4 compuestos, entre los que encontramos un glucósido de flavonoide y un indol (Tabla 9). Los metabolitos que presentaron mayor variación entre estos dos tratamientos fueron el ácido benzoico, la xilosa y el AS en V4, y el AIA, la rutina y el ácido asiático en R2. En particular, el AIA se vio aumentado en muestras de JD2, registrándose a su vez un descenso del triptófano en estas muestras (Tabla 9).

5.2.2.2. Exudados

El análisis PLS-DA permitió discriminar las muestras de exudados en dos grupos de acuerdo con el tiempo de muestreo (7 y 15 dpi, Figura 10A). Adicionalmente, en el análisis independiente de cada tiempo de muestreo se lograron diferenciar las muestras provenientes de los tratamientos COINO y BRADY, tanto en 7 como 15 dpi (Figura 9E y F). No se observó una separación clara entre muestras de los tratamientos JD2 y Control mediante el análisis conjunto de los cuatro tratamientos (Figura 10B y C). Sin embargo, el análisis de a pares (COINO vs. BRADY y JD2 vs. Control) permitió diferenciar los tratamientos en todos los casos.

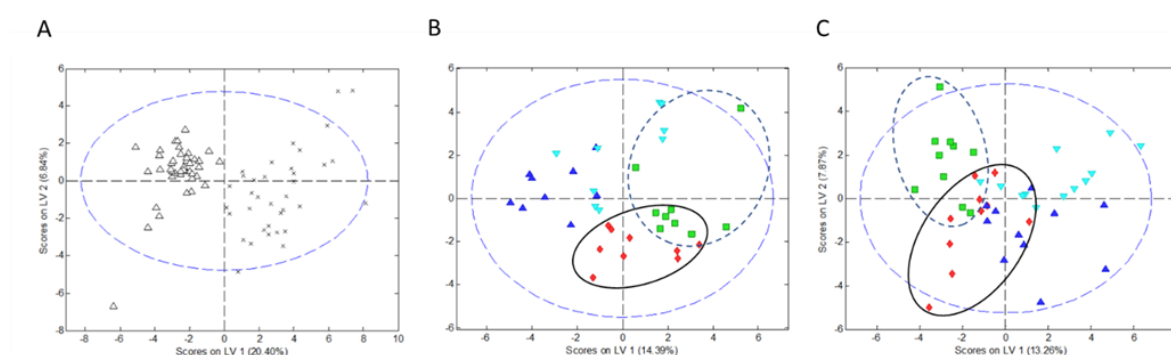


Figura 10. Gráficos de “scores” de PLS-DA correspondientes al análisis no dirigido de muestras de raíces de exudados rizosféricos. (A), se muestran todas las muestras de exudados analizadas, diferenciando entre tiempos de muestreo 7 (x) y 15 (Δ) dpi; B y C muestran el análisis independiente de los tiempos de muestreo 7 y 15 dpi, respectivamente. ◆ BRADY, ■ COINO, ▼ JD2 y ▲ Control. Las elipses indican los grupos de muestras correspondientes a los tratamientos BRADY (línea sólida) y COINO (línea punteada).

En las muestras de exudados se evidenciaron tendencias similares a las observadas en raíces, pero se detectaron menos compuestos por las bajas señales, posiblemente debido a la baja concentración de los compuestos en los exudados de las (distintas) muestras. Se seleccionaron 9 compuestos discriminantes y diferenciales mediante las comparaciones de a pares (Tabla 10). Tres de estos compuestos corresponden a la comparación COINO vs. BRADY, 1 de ellos detectado en 7dpi y 2 en 15dpi. El resto de los compuestos corresponden a la comparación JD2 vs. CONTROL, con 3 compuestos seleccionados en cada tiempo de

muestreo (Tabla 10). Entre estos compuestos encontramos principalmente flavonoides, glucósidos de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos y sus derivados.

Tabla 10. Metabolitos identificados tentativamente en muestras de exudados rizosféricos colectados 7 y 15 dpi, seleccionados como discriminantes en las comparaciones de a pares de tratamientos COINO y BRADY o JD2 y Control, con un cambio relativo significativo entre ambos tratamientos. Los metabolitos fueron seleccionados en base a sus valores de VIP obtenido mediante PLS-DA (con un umbral de 1,2) y “fold-change” (FC) significativo (p -valor ≤ 0.05). El $\log_2(FC)$, expresado en valor absoluto, describe el cambio relativo entre COINO respecto a BRADY o entre JD2 respecto al Control, la dirección del cambio se encuentra representada con flechas de tendencia. TR: Tiempo de retención.

Días de muestreo (dpi)*	Clase ^a	Fórmula	TR	Metabolito tentativo	VIP	log2 (FC)	Tendencia ^d
JD2 vs Control							
7	Flavonoide (flavona, dihidroisoflavona, chalcona)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	10.08	Liquiritigenina / dihidrodaidzeina / isoliquiritigenina	2.045	1.839	↑
	Flavonoide (isoflavona)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	9.65	Daidzeina ^b	1.756	1.423	↑
	Ácido hidroxicinámico	C ₉ H ₈ O ₄ ^c	9.67	Ácido hidroxicinámico	2.393	1.174	↓
15	Ácido hidroxicinámico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	8.07	Ácido sinápico	2.135	-	ND
	Ácido hidroxicinámico y derivados	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	8.18	Etil cafeato / sinapaldehído	1.951	-	A
	Glucósido de flavonoide	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ ^c	13.37	Glucósido de daidzeina o genisteína / hispidol	1.975	1.218	↓
COINO vs BRADY							
7	Ácido hidroxicinámico	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	8.55	Derivados de ácido <i>p</i> -cumárico o ácido cinámico	3.027	1.238	↓
15	Flavonoide (glucósido de isoflavona)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	11.39	Sisotrina / glicitina	2.096	1.781	↓
	Ácido hidroxicinámico	C ₉ H ₈ O ₄ ^c	9.67	Ácido hidroxicinámico	2.123	2.951	↑

*ND, no detectado en muestras de JD2; A, metabolito detectado únicamente en muestras del primer tratamiento indicado en el par correspondiente; ^a Taxonomía de compuestos putativos basada en su fórmula empírica y en las bases de datos HMDB (www.hmdb.com) y FooDB (www.foodb.com); ^b Metabolitos cuya identidad fue confirmada mediante uso de estándares ; ^c Metabolitos cuya identidad fue descartada mediante el uso de estándares ácido cafeico (C₉H₈O₄, TR = 9.67) y daidzeína 7-O-glucósido (C₂₁H₂₀O₉, TR=13.37); ^d Tendencia de la dirección del cambio inferida mediante los vectores de proyección del análisis PLS-DA.

5.3. Cuantificación de polifenoles

Se logró cuantificar a los polifenoles cumestrol, daidzina, genisteína y genistina en muestras de raíces de soja obtenidas de los ensayos en invernáculo. Para el resto de los compuestos fenólicos detallados en la Tabla 3, la intensidad registrada en muestras de raíces no permitió una correcta integración de los picos cromatográficos. Asimismo, no fue posible cuantificar ninguno de los compuestos presentes en la Tabla 3 en muestras de exudados ya que la baja intensidad registrada (Anexo 3) en estas muestras no permitió la correcta integración de los picos cromatográficos.

En relación con los compuestos cuantificados, no se registraron diferencias significativas en la concentración entre muestras provenientes de los tratamientos COINO y BRADY, en ambos tiempos de muestreo. Por otra parte, se observaron diferencias significativas en la concentración de genisteína entre muestras de los tratamientos JD2 y CONTROL, con una mayor acumulación del flavonoide en el último (Tabla 11).

Los valores obtenidos para las muestras cosechadas en el estadio V4 mostraron que la presencia de rizobios (tratamientos COINO y BRADY) resultó en un aumento significativo de la concentración de cumestrol, en comparación con plantas sin inocular. En cambio, las raíces de plantas sin inocular cosechadas en R2 mostraron mayor acumulación de daidzina y genisteína que las raíces de plantas inoculadas con rizobios (tratamientos COINO y BRADY), además de una mayor acumulación de genistina en comparación con raíces de plantas co-inoculadas (Tabla 11). No se detectó luteolina en ninguna muestra.

Tabla 11. Concentración (ng/g) de algunos polifenoles relevantes en la interacción rizobio-leguminosa en muestras de raíces. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).

Tratamiento, estadio	Cumestrol	Daidzina	Genisteína	Genistina
V4				
Control	39.4 ± 20 b	78.1 ± 30 a	19.4 ± 20 a	687.6 ± 220 a
JD2	124.4 ± 50 a	109.8 ± 50 a	19.5 ± 10 a	922.6 ± 360 a
BRADY	204.4 ± 150 a	67.0 ± 20 a	30.2 ± 10 a	593.4 ± 200 a
COINO	151.8 ± 60 a	79.2 ± 40 a	29.1 ± 20 a	698.3 ± 220 a
R2				
Control	283.5 ± 40 a	122.4 ± 20 a	40.7 ± 10 a	1.520.7 ± 390 a
JD2	264.4 ± 90 a	84.4 ± 40 b	24.6 ± 10 b	1.361.1 ± 390 a
BRADY	270.3 ± 60 a	50.4 ± 30 b	22.2 ± 10 b	932.6 ± 740 b
COINO	262.0 ± 80 a	74.0 ± 50 b	13.5 ± 10 c	866.2 ± 630 b

5.4. Composición de fitohormonas en muestras de raíces

Se cuantificaron fitohormonas en muestras de raíces de plantas que crecieron en invernáculo y se cosecharon en estadios de V4 y R2. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración (ng/g) de hormonas vegetales en muestras de raíces. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).

Tratamiento, estadio	GA4	GA1	ABA	AJ	AS	AIA	DHZ	iP	tZ
V4									
JD2	0.49 ± 0.1 b	0.4 ± 0.1 a	257.0 ± 18.2 b	903.7 ± 776.6 b	162.8 ± 78.3 a	127.7 ± 44.4 a	1.2 ± 0.6 b	2.7 ± 1.1 a	0,3 ± 0,1 a
BRADY	0.1 ± 0.0 c	0.3 ± 0.0 a	268.8 ± 26.4 b	467.8 ± 405.2 b	148.5 ± 49.0 b	100.5 ± 40.5 b	1.5 ± 0.3 a	2.2 ± 2.7 b	0,2 ± 0,1 b
COINO	0.8 ± 0.1 a	0.1 ± 0.0 b	487.0 ± 111.0 a	2351.0 ± 619.1 a	149.2 ± 62.4 b	134 ± 32.7 a	1.0 ± 0.6 b	2.1 ± 0.8 b	0,3 ± 0,1 a
R2									
Control	0.1 ± 0.0 c	0.2 ± 0.0 b	157.0 ± 23.5 b	3998.2 ± 132.8 a	1077.1 ± 125.4 ab	74.9 ± 3.2 b	0.7 ± 0.3 b	1.9 ± 0.1 b	0,2 ± 0,0 b
JD2	0.5 ± 0.2 b	0.2 ± 0.2 b	330.5 ± 115.9 a	2745.1 ± 590.3 b	1674.4 ± 959.5 a	118.5 ± 72.3 a	1.5 ± 1.0 b	1.7 ± 0.6 b	0,3 ± 0,0 b
BRADY	1.2 ± 0.2 a	0.5 ± 0.2 a	407.2 ± 69.9 a	2566.5 ± 442.4 b	1019.6 ± 541.8 ab	74.4 ± 16.9 b	2.3 ± 1.6 a	4.2 ± 0.3 a	0,3 ± 0,1 b
COINO	0.1 ± 0.0 c	0.5 ± 0.0 a	495.5 ± 163.2 a	1477.8 ± 762.1 c	402.9 ± 180.3 b	126.7 ± 97.0 a	3.4 ± 0.4 a	1.7 ± 0.9 b	0,5 ± 0,1 a

*Giberelinas: Acido giberélicos -GA4 y GA1-; Acido abscísico: ABA; Acido jasmónico: AJ; Acido salicílico: AS; Auxina: Acido indol-acético -AIA-; Citoquininas: Dihidrozeatina -DHZ -; isopentenil adenosina -iP- y tranzeatina -tZ-.

Al comparar muestras de los tratamientos COINO y BRADY, la mayor cantidad de diferencias significativas en la concentración de fitohormonas se observó en las raíces cosechadas en el estadio V4 (7 fitohormonas producidas de forma diferencial). En R2, 6 hormonas presentaron diferencias significativas en acumulación.

Las raíces de plantas co-inoculadas y en estadio V4 presentaron 5 y 1,9 veces más de AJ, que aquellas que fueron inoculadas solamente con bradyrizobios o con JD2, respectivamente (Tabla 12). Esta fitohormona está involucrada en la respuesta a patógenos mediando los procesos de RSI, respectivamente [108,109]. En estas muestras, la co-inoculación produjo también un aumento de 5 y 1,8 veces en las concentraciones de GA4 y ABA, respectivamente, en relación con la inoculación solo con rizobios; y de 2 y 1,9 veces, respectivamente, respecto a la inoculación con JD2 (Tabla 12). Ambas fitohormonas están involucradas en la respuesta a estrés hídrico. Sin embargo, otra giberelina, la GA1, se vio disminuida a la mitad en COINO, en relación con BRADY.

En el caso de GA4, las raíces de plantas inoculadas con JD2 presentaron 2,6 veces mayor concentración de GA4 que las que recibieron inoculación con bradyrizobios. A su vez, los niveles de las citoquininas analizadas (DHZ, tZ e iP) presentaron diferencias significativas variables entre tratamientos (Tabla 12). La concentración

de la auxina AIA fue mayor en exudados de plantas co-inoculadas o inoculadas con JD2, en relación con las que solo se inocularon con bradyrizobios.

No se analizaron muestras del tratamiento de plantas sin inocular en V4. La baja cosecha de material vegetal en ese tratamiento no fue suficiente para cubrir los requerimientos de todo el análisis metabólico.

En el estadio R2, el GA4 y el AJ disminuyeron en el tratamiento COINO respecto a BRADY y JD2. En el caso de GA4, su concentración disminuye casi 8 veces en COINO, con relación a BRADY. Se observan además diferencias significativas en la concentración de las citoquininas IP y tZ. IP disminuye 2,5 veces en el tratamiento COINO en relación con BRADY, aunque la inoculación con JD2 mantiene sus niveles similares al Control y COINO. En el caso de tZ y DHZ sus niveles son 1,5 veces mayores en muestras de COINO en comparación con BRADY, aunque este aumento solo fue estadísticamente significativo para tZ.

En relación con muestras de plantas Control, la inoculación con JD2 afectó significativamente la concentración de 4 hormonas vegetales en R2 (Tabla 12). La concentración GA4 y ABA fue 5 y 3 veces mayor, respectivamente. Al mismo tiempo, se observó una menor concentración de AJ en plantas inoculadas con JD2, en relación con el Control (Tabla 12). Finalmente, JD2 es capaz de producir AIA, y en tal sentido, se registraron diferencias significativas en la concentración de esta fitohormona entre el control y el tratamiento de plantas inoculadas con JD2.

5.5. Composición de fitohormonas en muestras de exudados rizosféricos

Se cuantificaron fitohormonas en muestras de exudados rizosféricos colectados 5 dpi de plantas en hidroponía. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración (ng/g) en muestras de exudados rizosféricos de hormonas vegetales colectados a 5 dpi. Las letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa entre tratamientos correspondientes al mismo estadio ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	GA4	GA1	ABA	AJ	AS	AIA	DHZ	IP	tZ
Control	0.1 ± 0.0 b	0.15 ± 0.03 b	38.2 ± 8.2 b	3.3 ± 0.4 b	2078.4 ± 612.8 a	74.9 ± 24.4 b	0.3 ± 0.1 b	0.5 ± 0.2 b	0,3 ± 0,2 b
JD2	0.1 ± 0.0 b	0.37 ± 0.05 a	33.9 ± 17.7 b	3.3 ± 2.0 b	2316.8 ± 421.6 a	192.2 ± 237.2 b	0.1 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 b	0,2 ± 0,0 b
BRADY	0.3 ± 0.1 a	0.31 ± 0.05 a	88.8 ± 62.0 a	14.5 ± 5.9 a	557.6 ± 383.7 b	3094.2 ± 601.0 a	0.8 ± 0.3 a	3.0 ± 1.1 a	0,5 ± 0,4 a
COINO	0.2 ± 0.0 b	0.35 ± 0.09 a	39.4 ± 22.2 b	13.1 ± 5.5 a	351.5 ± 32.9 b	1638.5 ± 1914.5 a	0.3 ± 0.1 b	1.4 ± 1.6 b	0,3 ± 0,2 b

*Giberelinas: Acido giberélicos -GA4 y GA1-; Acido abscísico: ABA; Acido jasmónico: AJ; Acido salicílico: AS; Auxina: Acido indol-3 acético -AIA-; Citoquininas: Dihidrozeatina -DHZ -; isopentenil adenosina -IP- y tranzeatina -tZ-.

Se observaron diferencias significativas en cinco fitohormonas (GA4, ABA, DHZ, IP y tZ) cuyas concentraciones fueron entre 1,7 y 3 veces menores en COINO respecto a BRADY. No hubo diferencias entre estos dos tratamientos para AS, AJ y AIA (Tabla 13).

Por otro lado, el efecto de la inoculación simple con JD2 produjo la acumulación de 2,5 veces más GA1, en relación con Control (Tabla 13). Los compuestos recolectados en los líquidos de hidroponia son producidos en bajas concentraciones hacia un alto volumen líquido, sin embargo, resaltan las altas concentraciones de AIA detectados, al igual que de AS. JD2 no afectó la concentración de AIA en los exudados, tanto cuando esta cepa fue inoculada (JD2 en relación con el control) como co-inoculada (COINO respecto a brady). Las muestras de COINO y BRADY presentaron entre 10 y 40 veces más AIA que aquellas obtenidas de plantas control o JD2 (Tabla 13).

6. Discusión

6.1. Proteómica

La capacidad de promoción del crecimiento de soja por parte de JD2 fue previamente reportada, con notables efectos sobre la nodulación, el crecimiento y la producción de grano, en distintas condiciones [113]. A su vez, la acumulación de nitrógeno y ureidos, las diferencias en los niveles de clorofilas y carotenoides, y los distintos perfiles metabólicos observados en plantas que fueron co-inoculadas con bradyrizobios y JD2 brindaron una perspectiva más amplia de los procesos que tienen lugar en la planta como resultado su interacción con los microsimbiontes. Para continuar avanzando en nuestro entendimiento sobre los procesos que ocurren como consecuencia de esta interacción, nos apoyamos en primera instancia en una aproximación proteómica (*shotgun*).

6.1.1. Cambios en la expresión proteica en simbiosomas

La expresión diferencial de proteínas y de genes ha sido ampliamente estudiada en plantas leguminosas, incluso en condiciones de estrés [141–144]. Clement y col. [145] y Cilliers y col. [146], por ejemplo, reportaron aumentos en la expresión de transcritos correspondientes a glutamina sintetasa, metalotioneína, ferritina y varias proteasas de cisteína en nódulos de soja en condiciones de estrés hídrico. Los autores demostraron que en los nódulos se modifica la expresión de los transcritos para sobrellevar las condiciones de estrés abiótico.

A pesar de los numerosos trabajos en proteómica en leguminosas, los efectos de la co-inoculación sobre el metabolismo en nódulos o simbiosomas no ha sido estudiado mediante este tipo de aproximaciones ómicas. En este trabajo, la inoculación conjunta de JD2 y bradyrizobios en plantas de soja no produjo grandes diferencias en la expresión de proteínas presentes en simbiosomas.

Entre las proteínas cuya expresión aumentó en condiciones de co-inoculación encontramos a la “stem 31 kDa glycoprotein”, o también *Vegetative storage protein B* (VspB, uniprot P10743). VspB es una proteína de la pared celular con funciones de almacenamiento. Su expresión ha sido evaluada en plantas de soja bajo diferentes tipos de stress abióticos. Es negativamente regulada en hojas y raíces de plantas bajo estrés por inundación [147], y estrés salino [148], respectivamente, pero aumenta su expresión en hojas de plantas expuestas a sequía [149] y a shock térmico [150]. Por su parte, Salavatti y col. [151] reportaron una regulación negativa en la expresión de transcritos de VspB en raíces noduladas de una

variedad de soja hipernodulante, y un aumento en la expresión en variedades tanto no nodulante como con nodulación normal.

Las proteínas de almacenamiento, como la VspB, están relacionadas con el metabolismo y el almacenamiento de N y su expresión puede ser alterada por los niveles de Metil-jasmonato [152]. Este último pertenece a la familia de los AJ, relacionados con respuestas vegetales a stress biótico. En esta tesis encontramos mayores niveles de AJ en raíces de plantas cosechadas en V4; el mismo estadio donde también observamos la sobre-expresión de VspB. Es conocido que una infección radicular, aún en las asociaciones mutualistas, implica la activación inicial y a veces acotada de mecanismos de reconocimiento y defensa en la planta infectada [153], lo cual puede explicar nuestros resultados cuando la planta es co-infectada. Considerando los efectos reportados de la cepa JD2 sobre la nodulación en soja, nuestros resultados sugieren que VspB podría estar implicada tanto en la regulación del número de nódulos y la tasa de nodulación, como en la respuesta de la planta a estrés abiótico y biótico.

La proteína inhibidora de proteasa de Kunitz (KPI) se encontró positivamente regulada en nuestras condiciones de co-inoculación. KPI tiene actividad inhibidora de proteinasas y pertenece a la familia de inhibidores de serin-proteasas. Esta familia está implicada en el almacenamiento de proteínas, la regulación de la actividad proteasa durante la germinación, la respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico, la muerte celular programada, y el crecimiento y el desarrollo vegetal [154]. Mientras que Manen y col. [155] reportaron una KPI como una nodulina específicamente expresada en nódulos senescentes de *Psophocarpus tetragonolobus*, Islam y col. [156] mostraron que algunos miembros de esta familia de proteínas tienen roles en la resistencia a estrés hídrico en trébol.

Otra proteína involucrada en resistencia a estrés, la subunidad β del proteasoma, se encontró también positivamente regulada en muestras de plantas co-inoculadas. El proteasoma se encarga de llevar a cabo la hidrólisis de proteínas de forma dependiente e independiente de ubiquitinación, controlando actividades celulares básicas [157]. Las plantas poseen una combinación de proteasomas 26S y 20S, cuyas actividades son reguladas para controlar el desarrollo vegetal y la respuesta a estrés [158]. Ahsan y col. [150] encontraron subunidades del proteasoma (tipo β -3-A, β 6, 9 y β) diferencialmente expresadas en todos los tejidos de plantas de soja sometidas a estrés por calor. Asimismo, Mohammadi y col. [149] reportaron un aumento en la expresión de la subunidad β del proteasoma en raíces de soja bajo condiciones de estrés hídrico. Por su parte, Salavati y col. [151] encontraron aumentada la

expresión del gen de la subunidad α del proteasoma en raíces noduladas de variedades de soja hipernodulante en comparación con una variedad no nodulante.

Las proteasas poseen roles en el desarrollo vegetal y también en la tolerancia a estrés. Su actividad es importante en el mantenimiento de la homeostasis y el reciclaje de recursos, y pueden actuar además como moléculas señalizadoras [159]. En especial, las metaloproteasas, como las aminopeptidasas (Tabla 6), se encuentran involucradas en la nodulación, la diferenciación de plástidos, la regulación del meristema en raíz y tallo, la sensibilidad a conjugados de auxinas y la meiosis [160].

En nódulos de plantas co-inoculadas se vio aumentada la expresión de ferritina, un complejo proteico que forma múltiples interacciones metal-proteína. Este complejo tiene funciones de almacenamiento intracelular de hierro, tanto en procariontes como en eucariotes, y regula la homeostasis de este compuesto. La ferritina se encuentra involucrada en la respuesta a estrés térmico en trigo [161], y en la respuesta al estrés oxidativo, crecimiento y desarrollo de garbanzo [162].

Nuestros resultados parecen relacionarse con respuestas de defensa vegetal lo que sugiere que la presencia de JD2 puede estar involucrada en la resistencia de las plantas de soja a estrés abiótico. De alguna forma JD2 estaría preparando a las plantas para enfrentar potenciales situaciones de estrés. En tal sentido, en ensayos en invernáculo previos a esta tesis, se observó que frente a una deficiencia hídrica fortuita las plantas de soja co-inoculadas con bradyrizobios y la cepa JD2 toleraron más el estrés (datos no publicados). Conociendo los resultados proteómicos, resulta interesante repetir estos experimentos bajo condiciones de deficiencia hídrica impuesta y controlada, incluyendo la evaluación de parámetros biométricos y fisiológicos, el análisis de la expresión de genes y proteínas mediante qPCR y análisis proteómicos.

Entre las proteínas con expresión disminuida en muestras de nódulos de plantas co-inoculadas encontramos una anexina. Las anexinas pertenecen a una familia multigénica de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio. Estas proteínas participan en la respuesta a estrés abiótico y en la señalización durante el crecimiento y desarrollo de las plantas [163]. El genoma de soja posee al menos 23 genes de anexinas (GmANN1 – GmANN23) con distintos patrones de expresión en diferentes órganos, principalmente inducidos por estrés debido a altas o bajas temperaturas y alta salinidad [150,164]. Estos resultados brindan aún más sustento en favor del rol de JD2 en procesos de resistencia o tolerancia a estrés.

La regulación negativa de la expresión de anexinas ha sido relacionada con una menor infección y nodulación. Carrasco-Castilla y col. [165] mostraron que al menos una anexina está implicada en el desarrollo y funcionamiento de los nódulos en *Phaseolus vulgaris*. Como se reportó previamente, uno de los efectos de la JD2 sobre soja es la inducción de una nodulación temprana [113]. Por lo tanto, una vez que los nódulos ya se encuentran establecidos no sería necesaria la presencia de anexinas que asistan en este proceso.

La disminución observada en la expresión de una aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de origen vegetal indica un posible cambio en el patrón de aminoácidos utilizados por el bacteroide. Esta enzima participa en el paso final de la biosíntesis de leucina, isoleucina y valina. Este resultado concuerda con Prell y col. [166] quienes por medio de análisis de microarreglos y RT-PCR encontraron negativamente regulada la ruta biosintética de estos aminoácidos en bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Adicionalmente, Strodtman y col. [167] reportaron la disminución temporal de la cantidad de enzimas involucradas en la producción de aminoácidos de cadena ramificada en nódulos de soja. Esto nos sugiere que los nódulos de las plantas co-inoculadas se encuentran en un distinto estado metabólico comparado con aquellos de plantas inoculadas únicamente con bradyrizobios, en las condiciones ensayadas durante el presente trabajo. Los nódulos de plantas co-inoculadas parecen cambiar su preferencia por una combinación distinta de aminoácidos.

Estos resultados nos llevan a cuestionarnos si el metabolismo de estos aminoácidos tiene un rol relevante en el establecimiento de los bacteroides o de los simbiosomas. En este sentido, La determinación de la expresión de genes relacionados a este metabolismo mediante qPCR en nódulos colectados en distintos estadios de crecimiento, ayudarían a responder esta pregunta.

6.1.2. Cambios inducidos por la genisteína en la expresión proteica de JD2

El efecto de diversas situaciones de estrés sobre el proteoma de cepas de rizobios ha sido previamente reportado y discutido [168–170](entre otros). Por ejemplo, el efecto de la naringenina en el exoproteoma de *Rhizobium etli* fue estudiado por Meneses y col. [171] y Taboada y col. [172]. Los primeros autores reportaron la inducción por este flavonoide de proteínas implicadas en la simbiosis (adhesinas, flagelinas, EF-Tu, enzimas glucolíticas, etc). Taboada y col. [172] demostraron que la adición de naringenina a cultivos de *R. etli* induce la acumulación de proteínas relacionadas al transporte y metabolismo de carbohidratos en vesículas de membrana externa.

Sin embargo, el efecto de los flavonoides en el proteoma intracelular de BPCV no rizobianas no está claro. La presencia de genisteína en el medio de crecimiento de JD2 aumentó la expresión de proteínas flagelares, de la proteína de ensamblaje del Pilus Pili y de un regulador transcripcional de un componente perteneciente a la familia Tet (TetR). Entre las proteínas flagelares se encontraron únicamente proteínas asociadas al gancho flagelar. Es posible que la ausencia de proteínas del filamento flagelar se deba a los efectos disruptivos que tiene la centrifugación sobre estas proteínas de membrana. Recientemente, Yu y col. [173] encontraron que determinados flavonoides aumentan la movilidad tipo swarming y curli en *Pseudomonas fluorescens*. Estos dos procesos son relevantes en el proceso de colonización de la raíz. Los autores sugieren que el regulador TetR detecta el flavonoide y actúa como señal en la interacción entre plantas y microorganismos beneficiosos no simbióticos. En concordancia, es posible que la genisteína sea el ligando o molécula señal para el regulador TetR sobre-expresado en JD2.

En relación con lo anterior, Yu y col. [173] y Wenzel y col. [174] mostraron que los flavonoides aumentan la expresión de un regulador transcripcional de la familia TetR en *Pseudomonas fluorescens* y *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. Un regulador transcripcional de este tipo, en *Pseudomonas syringae* AefR utiliza fitoesteroides como ligandos, y regula el comportamiento de *quorum sensing* y la capacidad epifítica de este microorganismo [133]. Estos y nuestros resultados indican la relevancia del rol de estos reguladores en el establecimiento de una comunicación efectiva entre plantas y microorganismos. Por su parte, Okutani y col. [175] reportaron el enriquecimiento de bacterias pertenecientes a la familia Comamonadaceae, como las del género *Delftia*, en suelo rizosférico de soja tratado con daidzeína, lo que sugiere que algunos miembros de esta familia responden a las isoflavonas. Con estos datos, es posible que la genisteína induzca el movimiento o quimiotaxis de JD2 hacia las raíces de soja, las cuales liberan este compuesto.

La expresión de la enzima diguanilato ciclasa, responsable de la producción de c-di-GMP, resultó aumentada en presencia de genisteína. El c-di-GMP es un mensajero secundario que se encuentra asociado a la transición de un estilo de vida plantónico a uno sésil (formación de biofilm) en bacterias [176]. Niveles altos de c-di-GMP inducen a las células bacterianas a formar biofilms [177]. Sun y col. [178] mostraron que una mutación en el gen que codifica una c-di-GMP fosfodiesterasa de *Azorhizobium caulinodans* incrementó la resistencia a H₂O₂, la producción de exopolisacáridos (EPS), y la nodulación de *Sesbania rostrata*. La c-di-GMP fosfodiesterasa es responsable de la hidrólisis de este mensajero secundario por lo que estaría asociada a sus altos niveles. Adicionalmente, Kuchma y col. [179] mostraron una regulación negativa de la formación de biofilm y motilidad de tipo swarming, por la c-di-

GMP fosfodiesterasa en *Pseudomonas aeruginosa*. Todo indicaría que el aumento observado en la expresión de la enzima diguanilato ciclasa en JD2 en presencia de genisteína puede estar asistiendo en el establecimiento de biofilms en la superficie de las raíces de soja, quizás asociado a la producción de EPS por parte de JD2.

Debido a que las leguminosas producen H_2O_2 durante la invasión bacteriana de los pelos radicales [180] nos preguntamos si la regulación positiva de la diguanilato ciclasa se encuentra implicada en la defensa al estrés oxidativo impuesto por la planta durante la infección. En relación con esto, está demostrado que JD2 coloniza la raíz de plantas leguminosas y se comporta como un microorganismo epifítico [183]. La hipótesis de la influencia de la genisteína en la respuesta de JD2 al posible estrés oxidativo impuesto por las plantas está apoyada por el aumento en la expresión de una superóxido dismutasa (Tabla 7).

La presencia de genisteína produce además cambios en la estructura de la membrana, preparando, quizás, a JD2 para una posible colonización de las raíces. Asimismo, Balsanelli y col. [181] reportaron una alteración en la transcripción de genes asociados a la biosíntesis de polisacáridos; al reemplazo de peptidoglicanos y la síntesis de proteínas de la membrana externa, en células epifitas de *Herbaspirillum seropedicae*, en comparación con las células planctónicas, lo que sugiere una reorganización de la envoltura de la pared celular durante la colonización.

La cepa JD2 produce sideróforos y presenta resistencia a varios antibióticos y metales pesados [114,116]. En el presente trabajo demostramos que la genisteína regula positivamente la producción de proteínas de JD2 involucradas en la adquisición de nutrientes (hierro, mediante importación de sideróforos) y el eflujo de compuestos tóxicos. Adicionalmente, encontramos un aumento en la expresión de HtpX en JD2, una metaloproteasa localizada en la cara citosólica de la membrana que asiste en la proteólisis de sustratos unidos a membrana [137]. A su vez, observamos la regulación positiva de algunas proteínas involucradas en el reciclaje de la pared celular (quinasa de ácido anhidro-N-acetilmurámico y amidasa de N-acetilmuramoil-L-alanina). Estos resultados sugieren que en la membrana se están reacomodando las proteínas para la adquisición de nutrientes escasos (probablemente hierro), el eflujo de metales o drogas y el cambio hacia un estilo de vida epifítico.

Los resultados de proteómica tanto de nódulos como de cultivos de JD2 se resumen en la Figura 11 y aparecen en el artículo *Facing the communication between soybean plants and microorganisms (Bradyrhizobium and Delftia) by quantitative shotgun proteomics* publicado en el Journal Symbiosis, y adjunto en el Anexo 4.

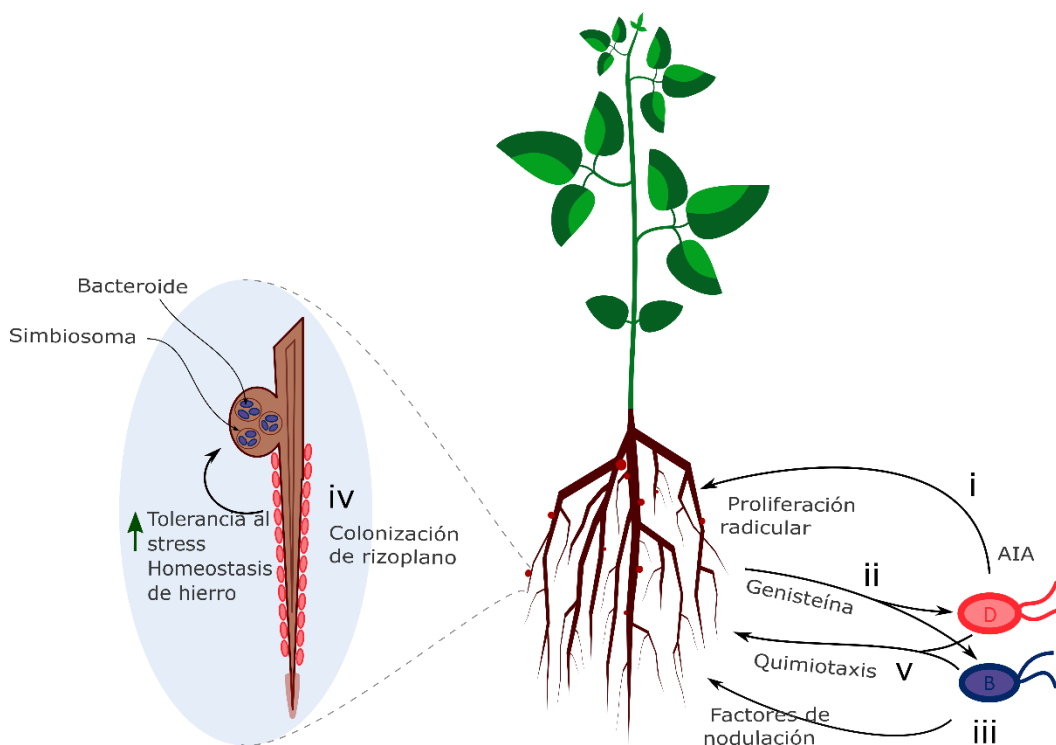


Figura 11. Breve descripción de algunos eventos que ocurren durante la interacción entre soja, *Bradyrhizobium* y *Delftia* (Modificado de Riviezzi y col. [182]). Secuencia de eventos: JD2 (D) produce y libera auxinas que inducen la proliferación de la raíz [183] (i); la planta produce genisteína (ii), este flavonoide induce la producción de proteínas involucradas en la formación de FN por parte de los bradyrizobios (B) [34] (iii); y JD2 coloniza el rizoplasma (iv). A su vez, la genisteína induce la quimiotaxis hacia la planta de ambos microorganismos (v). Del lado izquierdo de la figura, los FN inducen la formación de nódulos, donde se establecen los simbiosomas y los bradyrizobios se diferencian en bacteroides [34]. Como consecuencia de la colonización del rizoplasma por parte de JD2 (comportamiento epifítico) [183], los simbiosomas de soja presentan una regulación positiva de proteínas involucradas en la tolerancia a estrés, y almacenamiento de hierro y homeostasis.

6.2. Metabolómica

En este trabajo se observó una clara separación entre las muestras tanto de raíces como exudados en función del tiempo de muestreo y el tratamiento de inoculación (Figura 9). Los compuestos fenólicos responsables de esta discriminación entre muestras fueron principalmente los ácidos hidroxicinámicos y benzoicos y los flavonoides. Existen múltiples reportes que muestran un aumento en el contenido

fenólico en plantas luego de la inoculación con BPCV [184–191]. A los polifenoles se le atribuyen diversos roles en las plantas, como soporte estructural, protección contra radiación ultravioleta (actuando como antioxidantes), y protección contra estrés biótico o abiótico. Los compuestos fenólicos incluyen a los flavonoides, ácidos fenólicos simples, cumarinas, taninos, ácidos cinámicos, entre otros ampliamente encontrados en plantas.

Durante la interacción entre plantas y microorganismos, los compuestos fenólicos juegan importantes roles estimulando o inhibiendo el crecimiento y/o la actividad fisiológica de los microorganismos de la rizósfera [38,192]. Estos compuestos representan una potencial fuente de carbono, y pueden actuar como fuertes quimioatrayentes [193,194]. En la simbiosis entre rizobios y leguminosas, los flavonoides juegan un papel vital mediante la inducción de los genes *nod* rizobianos, afectando de esta forma la producción de FN, con la subsecuente inducción de la formación de nódulos [34,195]. Sin ir más lejos, en los estudios proteómicos de esta tesis se observó que la genisteína regula de forma positiva algunas proteínas de JD2 involucradas en la quimiotaxis (Figura 10)[182].

Además de la discriminación de muestras, en el estudio metabolómico se logró evidenciar diferencias en el perfil de metabolitos acumulados en función del tratamiento de inoculación, tal como se discute a continuación de a pares. Si bien para la mayoría de los metabolitos no se confirmó la identidad con estándares, en la discusión se mencionan los patrones polifenólicos de las muestras tomando en cuenta los metabolitos tentativos más probables en función del tipo de la asociación planta-microorganismos en estudio.

6.2.1. Cambios en el perfil de metabolitos en muestras de plantas inoculadas con JD2

En plantas no noduladas (tratamientos JD2 y Control), la inoculación con JD2 cambia el patrón de metabolitos presentes en muestras de raíces y exudados. Se observaron numerosos compuestos fenólicos y carbohidratos que resultaron discriminantes en las muestras de plantas inoculadas con JD2 en relación con plantas Control (Tabla 9). Dado que las plantas de los tratamientos JD2 y Control no atraviesan un proceso de nodulación, la síntesis de compuestos fenólicos y otros discriminantes puede estar asociada a funciones de defensa y alelopatía y a la búsqueda de rizobios o de compuestos nitrogenados en el medio de crecimiento [195,196].

El aumento en los niveles de naringenina y liquiritigenina en raíces y exudados rizosféricos del tratamiento JD2 fue uno de los factores responsables de la separación del Control. Esto puede

representar una estrategia de las plantas para reclutar rizobios de sus alrededores. La relevancia de la acumulación de naringenina en raíces y liquiritigenina (o isoliquiritigenina) en exudados rizosféricos se debe a que estos compuestos son convertidos a las isoflavonas genisteína y daidzeína, respectivamente [196,197]. Asimismo, se encontró acumulada la aglicona de daidzeína en la rizósfera de plantas inoculadas con JD2. Tanto las formas glucosiladas como las agliconas de genisteína y daidzeína son inductores activos de *genes nod* en bradyrizobios [80]. Resultados similares han sido publicados previamente enfatizando que en el caso de las leguminosas la liberación de flavonoides específicos es un mecanismo mediante el cual estas buscan cepas bacterianas compatibles. A su vez, tanto rizobios como cepas no rizobianas pueden producir cambios en la composición y abundancia de los flavonoides exudados por las leguminosas [195,198] y no leguminosas [191]. En arroz, por ejemplo, algunos ácidos fenólicos y flavonoides resultaron los metabolitos secundarios más discriminantes entre muestras de raíces frente a la inoculación con cepas de *Azospirillum* [191].

Nuestros resultados muestran que el AIA se acumuló en raíces de plantas del tratamiento JD2 en el estadio R2. Asimismo, detectamos una disminución del triptófano, precursor en la biosíntesis de AIA (Tabla 9). Ambos resultados sugieren una activa producción de auxinas en R2. De la misma forma, la acumulación de esta fitohormona se vio incrementada en exudados rizosféricos de plantas de alfalfa inoculadas con *Delftia* [183]. La acumulación de AIA podría presentar un beneficio para las plantas, ante la necesidad de explorar mayor volumen de sustrato con el fin de satisfacer sus requerimientos de nutrientes, principalmente de N, por ser la condición que genera mayor estrés sobre las plantas de los tratamientos JD2 y Control, que no fueron fertilizadas.

En condiciones de campo, el N presente en el suelo podría ser suficiente para satisfacer los requerimientos de N de las plantas en las primeras etapas de desarrollo vegetativo. Sin embargo, en estadios más avanzados (reproductivos) es probable que una fuente externa de N sea necesaria para el correcto crecimiento de las plantas. En ese escenario, las auxinas producidas por las bacterias aportan a la disponibilidad de estas fitohormonas que ayudan al desarrollo radicular y a la exploración del suelo en búsqueda de nutrientes. Sin embargo, en trabajos anteriores se observó que la inoculación simple con JD2 no modifica la biomasa radicular ni el contenido total de N en plantas en estadio R2, en comparación con plantas sin inocular, aunque la inoculación con JD2 promovió un mayor rendimiento en granos en comparación con plantas sin inocular [113].

Por otro lado, una serie de biomarcadores de lignificación de la raíz (ácido sinápico y sus derivados, metabolitos del ácido cafeico, y aldehídos de siringico) se encontraron acumulados en tejidos de raíces

de plantas inoculadas con JD2, en comparación con plantas del tratamiento Control. Mas aún, algunos de estos compuestos se observaron únicamente en plantas correspondientes al tratamiento JD2. La acumulación de ácido hidroxicinámico y ácidos benzoicos se encuentra relacionada a defensa en plantas, y podría estar vinculada al fortalecimiento de las paredes celulares [199–203]. A pesar de que la lignificación es esencial para el crecimiento vegetal, varios autores reportaron una correlación negativa entre la lignificación y el desarrollo radicular en plantas de soja no inoculadas [200–206]. A diferencia de los estudios citados, trabajos previos muestran que la inoculación simple con JD2 no afecta el crecimiento de las raíces [113].

6.2.2. Efecto de la co-inoculación en el perfil de metabolitos de raíces y exudados

La co-inoculación y la inoculación simple con bradyrizobios (BRADY) son diferentes escenarios que implican el establecimiento de una simbiosis rizobio-leguminosa. La mayoría de los metabolitos seleccionados por su importancia en la diferenciación entre las muestras de raíces de plantas co-inoculadas se vieron disminuidos en relación con los detectados en el tratamiento BRADY (Tabla 8).

Una isoflavona (glicitina o sisotrina) que puede actuar como inductora de genes *nod* en *Bradyrhizobium* [207] resultó ser el único flavonoide discriminante entre exudados de muestras de los tratamientos COINO y BRADY. Es interesante observar como la reducción en los niveles de algunos flavonoides determina una mejor nodulación y crecimiento en plantas co-inoculadas, especialmente en etapas tempranas de la interacción, tal como fue evaluado en exudados rizosféricos.

Algunos ácidos fenólicos pueden tanto estimular como reprimir la nodulación. Por ejemplo, algunos son capaces de inducir la expresión de genes *nod* en cepas de rizobios con amplio espectro de hospedero [208]. Varios ácidos fenólicos discriminantes fueron detectados en raíces de plantas co-inoculadas en estadios vegetativos (tablas 8 y 9), cuando las plantas co-inoculadas muestran nódulos visibles [113]. En este punto, los ácidos fenólicos podrían actuar como modificadores de la interacción rizobio-leguminosa, como fue propuesto por Seneviratne and Jayasinghearachchi [193]. Estos autores encontraron que altas concentraciones de ácido cumárico estimulan la FBN en la simbiosis entre *B. elkanii* y soja [193].

Sin embargo, la mayor parte de los compuestos fenólicos que explican las diferencias entre plantas de los tratamientos COINO y BRADY se vieron sub-producidos en raíces (Tabla 8). Los resultados aquí presentados muestran una disminución de flavonoides específicos en raíces del tratamiento COINO en

comparación con BRADY, lo que sugiere una transformación activa de los flavonoides, cambiando de esta forma la composición de la rizósfera hacia un balance diferente de compuestos.

Al mismo tiempo, no encontramos diferencias en la composición de las muestras en estadio V4 en cuanto a daidzeína, genisteína, genistina y cumestrol, todos ellos compuestos inductores de genes *nod*. La nodulación se encuentra ya establecida en el estadio V4, y cerca de su máximo en etapas reproductivas, por lo tanto, las plantas co-inoculadas no necesitan la producción un flavonoide inductor activo en ninguna de estas etapas de crecimiento. Los datos obtenidos también muestran la acumulación de umbeliferona en raíces de plantas de los tratamientos JD2 y COINO en el estadio R2. Este compuesto es un potencial producto de la degradación de flavonoides inductores de genes *nod* [209]. La co-inoculación de las plantas lleva a una temprana nodulación y mayor acumulación de N en las hojas, lo cual es esencial en las etapas finales del desarrollo de semillas, cerca de la madurez fisiológica de las plantas [113].

La presencia de metabolitos con potencial aleloquímico fue variada de acuerdo con el tratamiento de inoculación. El kaempferol y la rutina, compuestos con reportados efectos alelopáticos [38,210], resultaron discriminantes como resultado de nuestro análisis metabolómico de raíces. En general, se detectó una menor concentración de aleloquímicos en el tratamiento COINO por lo que estos podrían ser priorizados en futuros análisis.

El AS, el AJ y el ABA poseen roles bien definidos en la respuesta de defensa en plantas [59,211,212]. La síntesis del AS es inducida por la infección de patógenos [213,214], pero su rol en la simbiosis entre leguminosas y rizobios no está bien claro [215]. Por ejemplo, en soja, Lian y col. [216] reportaron efectos negativos dependiente de la concentración del AS sobre el desarrollo de plántulas, lo que puede alterar la nutrición nitrogenada de las plantas. Según estos autores esta fitohormona inhibe la producción de FN por parte de los rizobios, reduce el número de nódulos, y provoca la disminución de la tasa fotosintética [216]. El contenido en AS no fue diferente entre los tratamientos COINO y BRADY en ningún tiempo de muestreo, pero si se observaron diferencias en la acumulación de AJ y ABA.

El rol del AJ y ABA en las interacciones rizobio-leguminosa depende de muchos factores pudiendo tener efectos tanto positivos como negativos [215]. El ABA afecta positivamente la nodulación y la FBN, principalmente asistiendo en condiciones de estrés abiótico, influyendo de esta forma en el crecimiento vegetal durante condiciones de estrés [217], mientras que el AJ afecta la expresión de genes *nod*, incrementa la producción de FN y la fijación de N en *B. japonicum* [218,219]. En este trabajo observamos que el ABA se acumuló en mayor cantidad en muestras de exudados del tratamiento BRADY en

comparación con COINO, en una etapa temprana de la interacción (5 dpi). Sin embargo, en raíces, los niveles de esta fitohormona fueron mayores en plantas co-inoculadas en comparación con el tratamiento BRADY, en estadio V4. Estos resultados se acompañan con la regulación positiva de la producción de proteínas involucradas en la tolerancia a estrés en los simbiosomas de plantas de soja co-inoculadas en el estadio V4 discutidos en la sección anterior. El AJ aumentó en plantas del tratamiento COINO en V4 y disminuyó en R2, en comparación con BRADY. Estos reportes concuerdan con la mayor nodulación observada en plantas co-inoculadas con bradyrizobios y JD2 en estadio V4 y con la efectiva FBN en R2 [113].

Las citoquininas y las auxinas son necesarias para la nodulación [220]. Lin y col. [221] propusieron que existe un antagonismo balanceado entre los efectos de auxinas y citoquininas, donde las primeras promueven la infección y las segundas inhiben la infección rizobiana de la epidermis. De esta forma, ambas fitohormonas afectan la iniciación y organogénesis de los nódulos. En las raíces de plantas del tratamiento COINO observamos aumentos en la concentración de AIA y tZ, en comparación con el tratamiento BRADY, mientras que DHZ e iP se observaron en niveles más bajos en V4 y R2, respectivamente. Van Zeijl y col. [222] y Reid y col. [223] mostraron que tanto la adición de FN como la presencia de rizobios inducen la producción de iP y tZ en *M. trunculata* y *Lotus japonicus*, respectivamente. Las auxinas se acumulan en los pelos radicales de raíces infectadas, y en el cortex y periciclo de nódulos jóvenes [221], tal como los observados en plantas del tratamiento COINO en estadio V4 que fueron las únicas que presentaron nódulos visibles en esta etapa del desarrollo. Asimismo, estas fitohormonas se acumulan en los haces vasculares y el ápice de nódulos maduros, como los observados en plantas co-inoculadas en estadio R2 [113].

En base a los resultados, la co-inoculación con una bacteria productora de auxinas cambia el balance de fitohormonas, afectando así el resultado de la simbiosis. Aunque algunas especies del género *Bradyrhizobium* son capaces de producir AIA [224], el diseño experimental implementado en el presente trabajo solo nos permite atribuir los cambios observados en el metaboloma de plantas co-inoculadas a la presencia de JD2. Fue previamente reportado que JD2 produce auxinas en medio de cultivo mediante el método de Salkowsky [112], pero aún no se ha confirmado la producción de AIA específicamente por parte de esta cepa. Es posible que las auxinas producidas por JD2 aumenten la disponibilidad de AIA en los estadios V4 y R2.

Los resultados de metabolómica tanto de raíces como de exudados de plantas de soja en diferentes momentos de muestreo se resumen en la Figura 12 y aparecen en el artículo *Comparative metabolite*

analysis of Delftia-Bradyrhizobium co-inoculated soybean plants using UHPLC-HRMS-based metabolomic profiling publicado en el Journal Symbiosis, y adjunto en el Anexo 5.

Como parte de la difusión del proyecto que financió la tesis (Proyecto FMV 1-2017-1-136505)³ se produjo el material divulgativo en formato de comic que se presenta en el Anexo 5. Se trata de una historieta desarrollada junto al grupo ComicBacterias (<https://www.comicbacterias.com/mini-bactericomics/juego-delftia-jd2/>) y Bandas Educativas.

³ Financiado por ANII (Agencia Nacional de Investigación e innovación) y titulado “Implicancias de la interacción triple soja-bradyrizobios-*Delftia* sp. JD2 sobre la respuesta vegetal”.

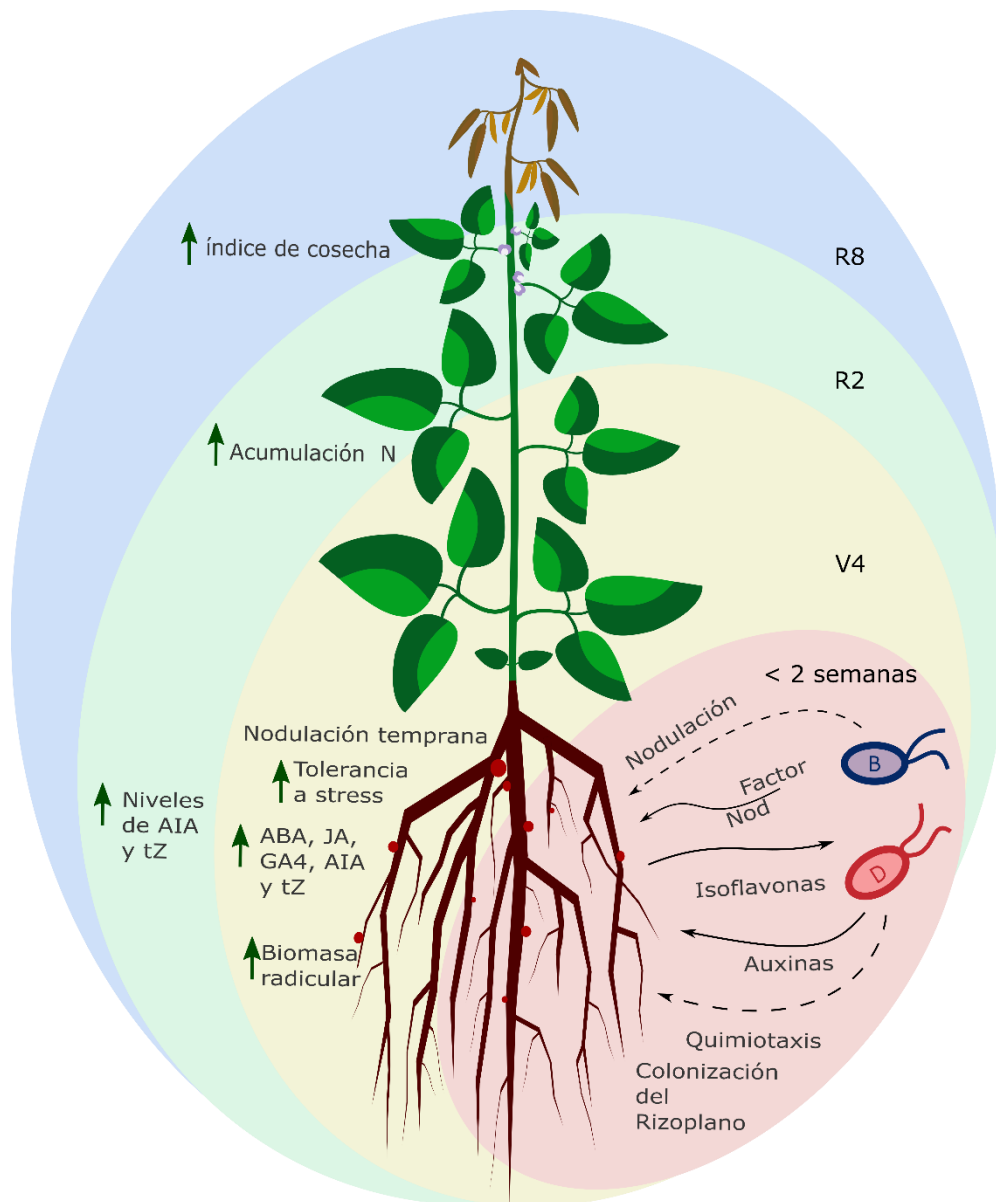


Figura 12. Representación temporal de los principales cambios observados durante la interacción entre soja, *B. elkanii* y JD2, en comparación con la inoculación simple de soja con *B. elkanii* (Modificado de Riviezzi y col. 2021b). En etapas tempranas (< 2 semanas), el rizoplasma es colonizado por JD2 y los bradyrizobios; las isoflavonas junto con otros metabolitos exudados por las raíces inducen la quimiotaxis hacia las raíces. Las isoflavonas inducen la expresión de genes *nod* (con la consecuente síntesis de Factores de Nodulación – FN – por parte de los bradyrizobios). JD2 produce auxinas que podrían contribuir a la disponibilidad de estas fitohormonas para las plantas, induciendo el crecimiento radicular. En el estadio V4, la co-inoculación promueve la nodulación. El incremento de auxinas y citoquininas podrían explicar las mejoras observadas en el crecimiento vegetal y acumulación de N en el estadio R2 y un mayor índice de cosecha en el estadio R8, en comparación con la inoculación únicamente con bradyrizobios (Cagide y col. 2018).

7. Conclusiones

En resultados previos se observó que la co-inoculación de plantas de soja con JD2 y bradyrizobios incrementa la nodulación mediante la regulación de algunos metabolitos [113,182]. En este trabajo, los efectos de la co-inoculación sobre la fisiología de las plantas de soja se estudió mediante aproximaciones proteómica y metabolómica con el enfoque en un grupo específico de compuestos, y se resumen en los modelos de las Figuras 10 y 11.

El perfilado polifenólico mediante UHPLC-HRMS nos permitió obtener descriptores químicos relevantes para la clasificación de muestras de raíces y exudados, en relación con las etapas del desarrollo vegetal y los tratamientos de inoculación. De esta manera, se logró diferenciar a los distintos tiempos de muestreo y tratamientos mediante la clasificación lograda con el análisis PLS-DA. Con la implementación de comparaciones de a pares de tratamientos (COINO vs BRADY y JD2 vs Control), encontramos varios flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzoicos y sus derivados como responsables de la separación observada entre las muestras.

El análisis de muestras obtenidas de ensayos en condiciones de invernáculo nos permitió evaluar los efectos de JD2 en la fisiología de las raíces. Por otra parte, la evaluación de exudados rizosféricos obtenidos de plantas crecidas en condiciones de hidroponia facilitó la detección de algunos metabolitos implicados en la comunicación entre los simbiontes durante las etapas tempranas de la interacción. Entre ellos, observamos el aumento en los niveles de precursores de flavonoides en exudados rizosféricos de plantas inoculadas con JD2, lo que sugiere que se produce una síntesis y liberación activa de isoflavonas hacia la rizosfera en presencia de esta cepa.

Las diferencias entre tratamientos en la concentración de los inductores de genes *nod* no fueron significativas en las raíces en estadio V4, aunque la genisteína se detectó en menores niveles en raíces correspondientes a COINO en comparación con BRADY en el estadio R2. La nodulación se encuentra ya establecida en V4, por lo que no sería necesaria la producción de flavonoides inductores de genes de nodulación en estos estadios de crecimiento.

Las mayores diferencias en los niveles de fitohormonas se observaron en raíces de plantas co-inoculadas en estadio V4. Niveles mayores de AIA y tZ fueron detectados también en plantas co-inoculadas en estadio R2. Los resultados apoyan la hipótesis de que la producción de auxinas por JD2 juega un rol

crucial en las mejoras registradas sobre las características agronómicas de soja, cuando las semillas son inoculadas juntamente con JD2 y bradyrizobios.

Nuestros resultados indican que:

- La presencia de genisteína induce en las células de JD2 cambios en la producción de proteínas involucradas con la movilidad, la formación de biofilms y la colonización, procesos relacionados con el comportamiento epifítico de la bacteria que la lleva a una colonización activa de la superficie de las raíces.
- las plantas distinguen una interacción asociativa en condiciones de co-inoculación y que se disparan en ellas mecanismos de defensa vegetal frente a posibles estreses. La co-inoculación produce un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la tolerancia al estrés, preparando al nódulo (o la planta) para enfrentar un ambiente potencialmente dañino. La evaluación de esta simbiosis en condiciones de estrés en el futuro nos podría ayudar a responder estas preguntas y/o confirmar lo observado como resultado de este trabajo.
- En relación con los efectos sobre la nodulación y acumulación de N causados por la co-inoculación, se confirma que la presencia de JD2 juega un rol crucial en la relación entre los contenidos de auxinas y citoquininas. Esta relación es a su vez determinante en el establecimiento de la nodulación y en la magnitud de la FBN.

8. Referencias

- [1] M.B. Tauger, *Agriculture in world history*, 2010. <https://doi.org/10.4324/9780203847480>.
- [2] E. Kingwell-Banham, C.A. Petrie, D.Q. Fuller, *The Cambridge World History: Volume 2, A World with Agriculture, 12,000 BCE–500 CE.*, 2015.
- [3] Land use in agriculture by the numbers, Food Agric. Organ. United Nations. (2020). <https://www.fao.org/sustainability/news/detail/en/c/1274219/>.
- [4] FAOSTAT, FAOSTAT, *Www.Fao.Org.* (2020). <https://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- [5] L. Qiu, R. Chang, The origin and history of soybean., in: *Soybean Bot. Prod. Uses*, 2010: pp. 1–23. <https://doi.org/10.1079/9781845936440.0001>.
- [6] A. Blum, I. Narbondo, G. Oyhantçabal Benelli, D. Sancho, *Soja transgénica y sus impactos en Uruguay La nueva colonización*, 2009.
- [7] A.Y.P. MINISTERIO DE GANADERÍA, *Anuario Estadístico Agropecuario 2021*, (2021). <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO ANUARIO 2021 Web.pdf>.
- [8] Estadísticas Agropecuarias (DIEA), *Resultados de la Encuesta Agrícola “Primavera 2021,” Nisterio Ganad. Agric. y Pesca.* (2021). <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-encuesta-agricola-primavera-2021>.
- [9] F. Central, *Soybeans, mature seeds, raw*, U.S. Dep. Agric. (2019). <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/174270/nutrients>.
- [10] G. Rizzo, L. Baroni, *Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets.*, *Nutrients.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10010043>.
- [11] M. Morris, X.P. Ye, C.J. Doona, *Dyeing Para-Aramid Textiles Pretreated with Soybean Oil and Nonthermal Plasma Using Cationic Dye.*, *Polymers (Basel).* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13091492>.
- [12] A.J. Clark, A.H. Ross, S.A.F. Bon, *Synthesis and Properties of Polyesters from Waste Grapeseed Oil: Comparison with Soybean and Rapeseed Oils*, *J. Polym. Environ.* 25 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0883-3>.
- [13] F. and A.O. of the U. Nations, *Pulses: The Heroes of Nutrition & Agricultural Sustainability*, (2016). <https://www.fao.org/pulses-2016/blog/pulses-heroes-nutrition-agricultural-sustainability/en/>.
- [14] D. Šamec, E. Karalija, I. Šola, V. Vujčić Bok, B. Salopek-Sondi, *The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure*, *Plants.* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10010118>.
- [15] A. Serino, G. Salazar, *Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease.*, *Nutrients.* 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu11010053>.
- [16] K.-I. Chen, M.-H. Erh, N.-W. Su, W.-H. Liu, C.-C. Chou, K.-C. Cheng, *Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 9–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4330-7>.
- [17] M.A. Davila, E. Sangronis, M. Granito, *Germinated or fermented legumes: food or ingredients of functional food*, *Arch. Latinoam. Nutr.* 53 (2003) 348–354.

- [18] S.W. Rizkalla, F. Bellisle, G. Slama, Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals., *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 3 (2002) S255-62. <https://doi.org/10.1079/BJN2002715>.
- [19] E.E. Hartwig, K. Hinson, Inheritance of Flower Color of Soybeans 1 , *Crop Sci.* (1962). <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183x000200020021x>.
- [20] S. Kumudini, Soybean growth and development, in: *Soybean Bot. Prod. Uses*, 2010.
- [21] D.R. Hicks, Growth and Development, in: A.G. Norman (Ed.), *Soybean Physiol. Agron. Util.*, 1978: pp. 17–44.
- [22] P.K. Ghosh, D.S. Jayas, Storage of soybean, in: *Soybean Bot. Prod. Uses*, 2010. <https://doi.org/10.1079/9781845936440.0247>.
- [23] C. Franche, K. Lindström, C. Elmerich, Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants, *Plant Soil.* 321 (2009) 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>.
- [24] L.C. Seefeldt, B.M. Hoffman, D.R. Dean, Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 701–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812>.
- [25] M.M. Kuzma, S. Hunt, D.B. Layzell, Role of Oxygen in the Limitation and Inhibition of Nitrogenase Activity and Respiration Rate in Individual Soybean Nodules., *Plant Physiol.* 101 (1993) 161–169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158660/>.
- [26] L. Soto-Urzuía, B.E. Baca, Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno, *Rev. Latinoam. Microbiol.* (2001).
- [27] N. Fernández-Pascual, M., María, Fijación biológica del nitrógeno: factores limitantes., *Cienc. y Medio Ambient. - Segundas Jornadas Científicas Sobre Medio Ambient. Del CCMA-CSIC.* (2002).
- [28] D. Fowler, M. Coyle, U. Skiba, M. a Sutton, J.N. Cape, S. Reis, L.J. Sheppard, A. Jenkins, B. Grizzetti, J.N. Galloway, P. Vitousek, A. Leach, a F. Bouwman, K. Butterbach-Bahl, F. Dentener, D. Stevenson, M. Amann, M. Voss, The global nitrogen cycle in the twenty-first century, *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci.* 368 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>.
- [29] J.N. Galloway, F.J. Dentener, D.G. Capone, E.W. Boyer, R.W. Howarth, S.P. Seitzinger, G.P. Asner, C.C. Cleveland, P.A. Green, E.A. Holland, D.M. Karl, A.F. Michaels, J.H. Porter, A.R. Townsend, C.J. Vörösmarty, Nitrogen cycles: Past, present, and future, *Biogeochemistry.* 70 (2004) 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>.
- [30] M. Do Vale Barreto Figueiredo, A.C. Do Espírito Santo Mergulhão, J.K. Sobral, M. De Andrade Lira, A.S.F. De Araújo, Biological nitrogen fixation: Importance, Associated Diversity, and Estimates, in: *Plant Microbe Symbiosis Fundam. Adv.*, 2013: pp. 267–289. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_10.
- [31] B.A. Geddes, J. Kearsley, R. Morton, G.C. diCenzo, T.M. Finan, Chapter Eight - The genomes of rhizobia, in: P. Frendo, F. Frugier, C.B.T.-A. in B.R. Masson-Boivin (Eds.), *Regul. Nitrogen-Fixing Symbioses Legum.*, Academic Press, 2020: pp. 213–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.014>.
- [32] G.E.D. Oldroyd, J.A. Downie, Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>.
- [33] M.R. O'Brian, P.M. Kirshbom, R.J. Maier, Bacterial heme synthesis is required for expression of the leghemoglobin holoprotein but not the apoprotein in soybean root nodules., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 8390–8393. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC299548/>.

- [34] M.A. Morel, S. Castro-sowinski, The Complex Molecular Signaling Network in Microbe–Plant Interaction, in: *Plant Microbe Symbiosis Fundam. Adv.*, N. K. Aror, 2013: pp. 169–199. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4>.
- [35] F. Salvagiotti, K.G. Cassman, J.E. Specht, D.T. Walters, A. Weiss, A. Dobermann, Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review, *F. Crop. Res.* 108 (2008) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>.
- [36] M.L. Falcone Ferreyra, S.P. Rius, P. Casati, Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications, *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>.
- [37] D. V Badri, J.M. Vivanco, Regulation and function of root exudates, *Plant. Cell Environ.* 32 (2009) 666–681. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>.
- [38] L.A. Weston, U. Mathesius, Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy, *J. Chem. Ecol.* 39 (2013) 283–297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>.
- [39] H.P. Bais, T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy, J.M. Vivanco, THE ROLE OF ROOT EXUDATES IN RHIZOSPHERE INTERACTIONS WITH PLANTS AND OTHER ORGANISMS, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
- [40] K. Małgorzata Brodowska, *European Journal of Biological Research Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues*, *Eur. J. Biol. Res.* (2017).
- [41] H.M. Ho, R.Y. Chen, L.K. Leung, F.L. Chan, Y. Huang, Z.Y. Chen, Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00304-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00304-9).
- [42] N.A. Eckardt, The Role of Flavonoids in Root Nodule Development and Auxin Transport in *Medicago truncatula*, *Plant Cell.* 18 (2006) 1539–1540. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044768>.
- [43] L. Suominen, R. Luukkainen, C. Roos, K. Lindström, Activation of the nodA promoter by the nodD genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudate, *FEMS Microbiol. Lett.* 219 (2003) 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01206-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01206-5).
- [44] K.E. Gibson, H. Kobayashi, G.C. Walker, Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>.
- [45] C. Gough, *Rhizobium Symbiosis: Insight into Nod Factor Receptors*, *Curr. Biol.* 13 (2003) R973–R975. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.047>.
- [46] A.F. Haag, M.F.F. Arnold, K.K. Myka, B. Kerscher, S. Dall’Angelo, M. Zanda, P. Mergaert, G.P. Ferguson, Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*- legume symbiosis, *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (2012) n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.2012.12003>.
- [47] A.F. Haag, M.F.F. Arnold, K.K. Myka, B. Kerscher, S. Dall’Angelo, M. Zanda, P. Mergaert, G.P. Ferguson, Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*- legume symbiosis, *FEMS Microbiol. Rev.* (2012) n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.2012.12003>.
- [48] K.M. Jones, H. Kobayashi, B.W. Davies, M.E. Taga, G.C. Walker, How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 619–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>.
- [49] G. Ren, *The evolution of determinate and indeterminate nodules within the Papilionoideae subfamily*, Wageningen University, 2018. <https://edepot.wur.nl/429101>.

- [50] S. Schubert, Nitrogen assimilation by legumes - processes and ecological limitations, *Fertil. Res.* 42 (1995) 99–107. <https://doi.org/10.1007/BF00750503>.
- [51] R. Collier, M. Tegeder, Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export., *Plant J.* 72 (2012) 355–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05086.x>.
- [52] V. Sharma, S. Bhattacharyya, R. Kumar, A. Kumar, F. Ibañez, J. Wang, B. Guo, H.K. Sudini, S. Gopalakrishnan, M. Dasgupta, R.K. Varshney, M.K. Pandey, Molecular basis of root nodule symbiosis between bradyrhizobium and ‘crack-entry’ legume groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Plants.* (2020). <https://doi.org/10.3390/plants9020276>.
- [53] K. Bonaldi, D. Gargani, Y. Prin, J. Fardoux, D. Gully, N. Nouwen, S. Goormachtig, E. Giraud, Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic Bradyrhizobium Sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction., *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24 (2011) 1359–1371. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0093>.
- [54] B.R. Glick, The enhancement of plant growth by free-living bacteria, *Can. J. Microbiol.* 41 (1995) 109–117. <https://doi.org/10.1139/m95-015>.
- [55] R. Kundan, G. Pant, N. Jadon, P.K. Agrawal, Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective, *J. Fertil. Pestic.* (2015). <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000155>.
- [56] D. Miljaković, J. Marinković, S. Balešević-Tubić, The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops., *Microorganisms.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>.
- [57] G. Mark, J.P. Morrissey, P. Higgins, F. O’gara, Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications., *FEMS Microbiol. Ecol.* 56 (2006) 167–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00056.x>.
- [58] F.J. Romera, M.J. García, C. Lucena, A. Martínez-Medina, M.A. Aparicio, J. Ramos, E. Alcántara, M. Angulo, R. Pérez-Vicente, Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants, *Front. Plant Sci.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>.
- [59] C.M.J. Pieterse, A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, S.C.M. Van Wees, Networking by small-molecule hormones in plant immunity., *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>.
- [60] D.K. Choudhary, B.N. Johri, Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR), *Microbiol. Res.* 164 (2009) 493–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>.
- [61] A. Beneduzi, A. Ambrosini, L.M.P. Passaglia, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents, *Genet. Mol. Biol.* 35 (2012) 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>.
- [62] M.M. Elsharkawy, M. Shimizu, H. Takahashi, M. Hyakumachi, Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco, *Plant Pathol.* 61 (2012) 964–976. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02573.x>.
- [63] F. Canchignia Martínez, A.E. Barrera Álvarez, G. Canchignia Malagón, J. Morante Carriel, M. Peñafiel Jaramillo, N. Cruz Rosero, Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género *Pseudomonas* spp como controladores biológicos de insectos y nematodos-plagas, *Cienc. y Tecnol.* (2015). <https://doi.org/10.18779/cyt.v8i1.197>.
- [64] A. Moreno Reséndez, V. García Mendoza, J.L. Reyes Carrillo, J. Vásquez Arroyo, P. Cano Ríos, Rizobacterias

- promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable, *Rev. Colomb. Biotecnol.* (2018). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>.
- [65] A. Kumar, V.K. Singh, V. Tripathi, P.P. Singh, A.K. Singh, Chapter 16 - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Perspective in Agriculture Under Biotic and Abiotic Stress, in: R. Prasad, S.S. Gill, N.B.T.-C.I.T.M.B. Tuteja (Eds.), Elsevier, 2018: pp. 333–342. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00016-5>.
- [66] M. GOSWAMI, S. DEKA, Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: A review, *Pedosphere*. 30 (2020) 40–61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60839-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60839-8).
- [67] P.K. Bhattacharyya, Use of biofertilizers in agriculture., *J. Mycopathol. Res.* 49 (2011) 223–229.
- [68] M.S. Santos, M.A. Nogueira, M. Hungria, Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture., *AMB Express*. 9 (2019) 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- [69] L.M. Kaminsky, R. V. Trexler, R.J. Malik, K.L. Hockett, T.H. Bell, The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants, *Trends Biotechnol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.011>.
- [70] Y. Bashan, Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture, *Biotechnol. Adv.* 16 (1998) 729–770. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2).
- [71] E. Malusà, F. Pinzari, L. Canfora, Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production, in: *Microb. Inoculants Sustain. Agric. Product.*, Springer, 2016: pp. 17–40.
- [72] J. Brockwell, P.J. Bottomley, Recent advances in inoculant technology and prospects for the future, *Soil Biol. Biochem.* 27 (1995) 683–697. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98649-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98649-9).
- [73] C. Tartaglia, G. Azziz, M.J. Lorite, J. Sanjuán, J. Monza, Phylogenetic relationships among introduced and autochthonous rhizobia nodulating *Trifolium* spp. in Uruguayan soils, *Appl. Soil Ecol.* 139 (2019) 40–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.014>.
- [74] Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca - Dirección General de Servicios Agrícolas (MGAP-DGSA), CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES (2022). <https://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/inicioweb.aspx>.
- [75] G.K. de Souza, J. Sampaio, L. Longoni, S. Ferreira, S. Alvarenga, A. Beneduzi, Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control., *Brazilian J. Microbiol.* [Publication Brazilian Soc. Microbiol. 50 (2019) 205–211. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0028-z>.
- [76] P.F. Lagurara Crossa, Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo, 2018. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/31586>.
- [77] N.E. Rodríguez Rodríguez, Diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios naturalizados que nodulan soja en Uruguay, 2020. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/29983>.
- [78] R.S. Smith, Legume inoculant formulation and application, *Can. J. Microbiol.* 38 (1992) 485–492.
- [79] A.R. Lodeiro, Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp, *Rev. Argent. Microbiol.* 47 (2015) 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006>.
- [80] M.A. Morel, C. Cagide, S. Castro-Sowinski, The contribution of secondary metabolites in the success of bioformulations, in: B.R. Arora N., Mehnaz S. (Ed.), *Bioformulations Sustain. Agric.*, Springer, 2016: pp. 235–250.

- [81] B. Riviezzi, C. Cagide, A. Pereira, C. Herrmann, R. Lombide, M. Lage, I. Sicardi, P. Lage, S. Castro-Sowinski, M.A. Morel, Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizosphere*. 15 (2020) 100219. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100219>.
- [82] A.I. Hassen, F.L. Bopape, L.K. Sanger, Microbial Inoculants as Agents of Growth Promotion and Abiotic Stress Tolerance in Plants BT - Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives, in: D.P. Singh, H.B. Singh, R. Prabha (Eds.), *Microb. Inoculants Sustain. Agric. Product.*, Springer India, New Delhi, 2016: pp. 23–36. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_2.
- [83] M.V.C. Garcia, M.A. Nogueira, M. Hungria, Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop., *AMB Express*. 11 (2021) 71. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01230-8>.
- [84] A.M. Chibeba, M. de Fátima Guimarães, O. Rodrigues Brito, M.A. Nogueira, R. Silva Araujo, M. Hungria, Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* Promotes Early Nodulation, *Am. J. Plant Sci*. 6 (2015) 1641–1649. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.610164>.
- [85] M. Hungria, M.A. Nogueira, R.S. Araujo, Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability, *Am. J. Plant Sci*. 6 (2015) 811–817. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>.
- [86] S. Benintende, W. Urich, M. Herrera, F. Gangge, M. Sterren, M. Benintende, Comparación entre coinoculación con *bradyrhizobium japonicum* y *azospirillum brasilense* e inoculación simple con *bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de n en el cultivo de soja, *AgriScientia*. 27 (2010) 71–77.
- [87] J. Fukami, P. Cerezini, M. Hungria, *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation, *AMB Express*. 8 (2018) 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.
- [88] P. Castillo, R. Molina, A. Andrade, A. Vigliocco, S. Alemano, F.D. Cassán, Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: the genus *Azospirillum*, in: *Handb. Azospirillum*, Springer, 2015: pp. 115–138.
- [89] F. Cassán, J. Vanderleyden, S. Spaepen, Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*, *J. Plant Growth Regul.* 33 (2014) 440–459.
- [90] M. Hungria, R.A. Ribeiro, M.A. Nogueira, Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil., *Genome Announc.* 6 (2018). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00393-18>.
- [91] M.A. Morel, S. Castro-Sowinski, The Complex Molecular Signaling Network in Microbe–Plant Interaction, in: N.K. Arora (Ed.), *Plant Microbe Symbiosis Fundam. Adv.*, Springer India, New Delhi, 2013: pp. 169–199. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_6.
- [92] D.M. Zeffa, L.H. Fantin, A. Koltun, A.L.M. de Oliveira, M.P.B.A. Nunes, M.G. Canteri, L.S.A. Gonçalves, Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018, *PeerJ*. 8 (2020) e7905. <https://doi.org/10.7717/peerj.7905>.
- [93] R.P. Horgan, L.C. Kenny, ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, *Obstet. Gynaecol.* 13 (2011) 189–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>.
- [94] Y. Zhang, B.R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, J.R.I.I.I. Yates, Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up

- Proteomics, *Chem. Rev.* 113 (2013) 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>.
- [95] A. Makarov, Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- [96] J.R. Yates III, Mass spectrometry and the age of the proteome, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 1–19. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199801\)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199801)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9).
- [97] T.F. Jorge, MASS SPECTROMETRY-BASED PLANT METABOLOMICS: METABOLITE RESPONSES TO ABIOTIC STRESS, Wiley Online Libr. (2014). <https://doi.org/10.1002/mas>.
- [98] T.F. Jorge, A.T. Mata, C. António, Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics., *Philos. Trans. Ser. A, Math. Phys. Eng. Sci.* 374 (2016). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0370>.
- [99] C.H. Johnson, J. Ivanisevic, G. Siuzdak, Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 451–459.
- [100] A.C. Schrimpe-Rutledge, S.G. Codreanu, S.D. Sherrod, J.A. McLean, Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>.
- [101] L.D. Roberts, A.L. Souza, R.E. Gerszten, C.B. Clish, Targeted metabolomics., *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 30 (2012) Unit 30.2.1-24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>.
- [102] F. Scossa, Y. Brotman, F. de Abreu e Lima, L. Willmitzer, Z. Nikoloski, T. Tohge, A.R. Fernie, Genomics-based strategies for the use of natural variation in the improvement of crop metabolism, *Plant Sci.* 242 (2016) 47–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.021>.
- [103] M. Di Ferdinando, C. Brunetti, G. Agati, M. Tattini, Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas, *Environ. Exp. Bot.* 103 (2014) 107–116.
- [104] C. Moctezuma, A. Hammerbacher, M. Heil, J. Gershenzon, R. Méndez-Alonzo, K. Oyama, Specific Polyphenols and Tannins are Associated with Defense Against Insect Herbivores in the Tropical Oak *Quercus oleoides*, *J. Chem. Ecol.* 40 (2014) 458–467. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0431-3>.
- [105] J. Martín, M.J. Navas, A.M. Jiménez-Moreno, A.G. Asuero, Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction, in: *Phenolic Compd. - Nat. Sources, Importance Appl.*, 2017. <https://doi.org/10.5772/66892>.
- [106] S. Fahad, S. Hussain, A. Matloob, F.A. Khan, A. Khaliq, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F. Khan, N. Ullah, Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review, *Plant Growth Regul.* 75 (2015) 391–404.
- [107] Y.-S. Ku, M. Sintaha, M.-Y. Cheung, H.-M. Lam, Plant Hormone Signaling Crosstalks between Biotic and Abiotic Stress Responses., *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19103206>.
- [108] P.J. Davies, The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions, *Plant Horm. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1.
- [109] D.K. Choudhary, A. Prakash, B.N. Johri, Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action., *Indian J. Microbiol.* 47 (2007) 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>.
- [110] M.A. Morel, A. Iriarte, E. Jara, H. Musto, S. Castro-Sowinski, Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach, *AIMS Bioeng.* 3 (2016) 156–175. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.2.156>.

- [111] M.A. Morel, M.C. Ubalde, S. Olivera-Bravo, C. Callejas, P.R. Gill, S. Castro-Sowinski, Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp., *FEMS Microbiol. Lett.* 291 (2009) 162–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01444.x>.
- [112] M.A. Morel, M.C. Ubalde, V. Braña, S. Castro-Sowinski, *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity., *Arch. Microbiol.* 193 (2011) 63–68. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0632-2>.
- [113] C. Cagide, B. Riviezzi, M. Minteguiaga, M. Morel, S. Castro-Sowinski, Identification of plant compounds involved in the microbe-plant communication during the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. JD2, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31 (2018) 1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>.
- [114] M.C. Ubalde, V. Braña, F. Sueiro, M.A. Morel, C. Martínez-Rosales, C. Marquez, S. Castro-Sowinski, The versatility of *delftia* sp. Isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies, *Curr. Microbiol.* 64 (2012) 597–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0108-5>.
- [115] M.A. Morel, Aspectos bioquímicos, fisiológicos y agronómicos de la co-inoculación de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* y *Delftia* sp., 2014. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/8858>.
- [116] Y. Bashan, G. Holguin, *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996), *Can. J. Microbiol.* 43 (1997) 103–121. <https://doi.org/10.1139/m97-015>.
- [117] J.M. Vincent, *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*, . I.B.P. Handbook., Blackwell Sci. Publ. Oxford, UK, 1970. (1970).
- [118] C. Cagide, Análisis del establecimiento de soja mediante el uso del consorcio bradyrizobios - *delftia*, 2017. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/28613>.
- [119] M. Hungria, R. Araujo, *Manual de Métodos Empleados em Estudos de Microbiologia Agrícola*, 1994. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2663.4727>.
- [120] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo, *InfoStat*, Grup. Infoestat, FCA, Univ. Nac. Córdoba, Argentina. (2016).
- [121] E. Larraínzar, S. Wienkoop, W. Weckwerth, R. Ladrera, C. Arrese-Igor, E.M. González, *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1495–1507. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101618>.
- [122] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [123] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 2301. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>.
- [124] J. Cox, M.Y. Hein, C.A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ., *Mol. Cell. Proteomics.* 13 (2014) 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>.
- [125] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M.Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data, *Nat. Methods.* 13 (2016) 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- [126] R. Adusumilli, P. Mallick, Data Conversion with ProteoWizard msConvert BT - Proteomics: Methods and

- Protocols, in: L. Comai, J.E. Katz, P. Mallick (Eds.), Springer New York, New York, NY, 2017: pp. 339–368. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_23.
- [127] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Orešič, MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics*. 11 (2010) 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>.
- [128] Z. Pang, J. Chong, G. Zhou, D.A. de Lima Morais, L. Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.-É. Jacques, S. Li, J. Xia, MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>.
- [129] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J.A. Cruz, E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhtudinov, L. Li, H.J. Vogel, I. Forsythe, HMDB: a knowledgebase for the human metabolome., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D603-10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn810>.
- [130] P. Hedden, Recent advances in gibberellin biosynthesis, *J. Exp. Bot.* 50 (1999) 553–563. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.334.553>.
- [131] B. Briegas, J. Corbacho, M.C. Parra-Lobato, M.A. Paredes, J. Labrador, M. Gallardo, M.C. Gomez-Jimenez, Transcriptome and Hormone Analyses Revealed Insights into Hormonal and Vesicle Trafficking Regulation among *Olea europaea* Fruit Tissues in Late Development., *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 4819. <https://doi.org/10.3390/ijms21144819>.
- [132] K.M. Dahlstrom, G.A. O’Toole, A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling, *Annu. Rev. Microbiol.* 71 (2017) 179–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093325>.
- [133] L. Cuthbertson, J.R. Nodwell, The TetR Family of Regulators, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2013) 440–475. <https://doi.org/10.1128/mubr.00018-13>.
- [134] G.S. Moeck, J.W. Coulton, TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 675–681.
- [135] M. Sakoh, K. Ito, Y. Akiyama, Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33305–33310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506180200>.
- [136] D. Kornitzer, D. Teff, S. Altuvia, A.B. Oppenheim, Isolation, characterization, and sequence of an *Escherichia coli* heat shock gene, htpX., *J. Bacteriol.* 173 (1991) 2944–2953. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.2944-2953.1991>.
- [137] A. Typas, M. Banzhaf, C.A. Gross, W. Vollmer, From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology., *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2011) 123–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2677>.
- [138] W. Vollmer, B. Joris, P. Charlier, S. Foster, Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases., *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008) 259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>.
- [139] J.J. Ahire, L.M.T. Dicks, 2,3-dihydroxybenzoic acid-containing nanofiber wound dressings inhibit biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*., *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 2098–2104. <https://doi.org/10.1128/AAC.02397-13>.
- [140] R.R. Barkosky, F.A. Einhellig, J.L. Butler, Caffeic Acid-Induced Changes in Plant–Water Relationships and Photosynthesis in Leafy Spurge *Euphorbia esula*, *J. Chem. Ecol.* 26 (2000) 2095–2109.

<https://doi.org/10.1023/A:1005564315131>.

- [141] J. He, V.A. Benedito, M. Wang, J.D. Murray, P.X. Zhao, Y. Tang, M.K. Udvardi, The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server., *BMC Bioinformatics*. 10 (2009) 441. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-441>.
- [142] A.J. Severin, J.L. Woody, Y.-T. Bolon, B. Joseph, B.W. Diers, A.D. Farmer, G.J. Muehlbauer, R.T. Nelson, D. Grant, J.E. Specht, M.A. Graham, S.B. Cannon, G.D. May, C.P. Vance, R.C. Shoemaker, RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome., *BMC Plant Biol*. 10 (2010) 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-160>.
- [143] D.T. Le, R. Nishiyama, Y. Watanabe, M. Tanaka, M. Seki, L.H. Ham, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, L.-S.P. Tran, Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis., *PLoS One*. 7 (2012) e49522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049522>.
- [144] F.B. Machado, K.C. Moharana, F. Almeida-Silva, R.K. Gazara, F. Pedrosa-Silva, F.S. Coelho, C. Grativol, T.M. Venancio, Systematic analysis of 1298 RNA-Seq samples and construction of a comprehensive soybean (*Glycine max*) expression atlas., *Plant J*. 103 (2020) 1894–1909. <https://doi.org/10.1111/tpj.14850>.
- [145] M. Clement, A. Lambert, D. Herouart, E. Boncompagni, Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules, *Gene*. 426 (2008) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.016>.
- [146] M. Cilliers, S.G. van Wyk, P.D.R. van Heerden, K.J. Kunert, B.J. Vorster, Identification and changes of the drought-induced cysteine protease transcriptome in soybean (*Glycine max*) root nodules, *Environ. Exp. Bot*. 148 (2018) 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.005>.
- [147] S. Komatsu, Y. Kobayashi, K. Nishizawa, Y. Nanjo, K. Furukawa, Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress, *Amino Acids*. 39 (2010) 1435–1449. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0608-1>.
- [148] K. Aghaei, A.A. Ehsanpour, A.H. Shah, S. Komatsu, Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress, *Amino Acids*. 36 (2009) 91–98.
- [149] P.P. Mohammadi, A. Moieni, S. Hiraga, S. Komatsu, Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings, *J. Proteomics*. 75 (2012) 1903–1923. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.041>.
- [150] N. Ahsan, T. Donnart, M.Z. Nouri, S. Komatsu, Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach, *J. Proteome Res*. 9 (2010) 189–204. <https://doi.org/10.1021/pr100504j>.
- [151] A. Salavati, A.A.S. Bushehri, A. Taleei, S. Hiraga, S. Komatsu, A comparative proteomic analysis of the early response to compatible symbiotic bacteria in the roots of a supernodulating soybean variety, *J. Proteomics*. 75 (2012) 819–832. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.022>.
- [152] H.S. Mason, D.B. DeWald, J.E. Mullet, Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter., *Plant Cell*. 5 (1993) 241–251. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.3.241>.
- [153] A.G.C. Francisco Ramón Tadeo Serrano, Fisiología de las plantas y el estrés, in: A.G.O. (aut. . Joaquín Azcón Bieto, Manuel Talón Cubillo; Ildefonso Bonilla Mangas (aut.) (Ed.), *Fundam. Fisiol. Veg.*, 2008: pp. 577–597.
- [154] S. Rehman, E. Aziz, W. Akhtar, M. Ilyas, T. Mahmood, Structural and functional characteristics of plant proteinase inhibitor-II (PI-II) family, *Biotechnol. Lett*. 39 (2017) 647–666. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2298-1>.

- [155] J.F. Manen, P. Simon, J.C. Van Slooten, M. Osterlind, S. Frutiger, G.J. Hughes, A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor., *Plant Cell*. 3 (1991) 259–270. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.3.259>.
- [156] A. Islam, S. Leung, A. Nikmatullah, P.P. Dijkwel, M.T. McManus, Kunitz proteinase inhibitors limit water stress responses in white clover (*Trifolium repens* L.) plants, *Front. Plant Sci.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01683>.
- [157] K. Tanaka, The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 85 (2009) 12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>.
- [158] J. Kurepa, S. Wang, Y. Li, J. Smalle, Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance, *Plant Signal. Behav.* 4 (2009) 924–927. <https://doi.org/10.4161/psb.4.10.9469>.
- [159] S. Stael, F. Van Breusegem, K. Gevaert, M.K. Nowack, Plant proteases and programmed cell death, *J. Exp. Bot.* 70 (2019) 1991–1995. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz126>.
- [160] D. Sebastián, M. Guevara, F. Tito, T. Virginia, An Overview of Plant Proteolytic Enzymes, in: 2018: pp. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2_1.
- [161] X. Zang, X. Geng, F. Wang, Z. Liu, L. Zhang, Y. Zhao, X. Tian, Z. Ni, Y. Yao, M. Xin, Z. Hu, Q. Sun, H. Peng, Overexpression of wheat ferritin gene TaFER-5B enhances tolerance to heat stress and other abiotic stresses associated with the ROS scavenging, *BMC Plant Biol.* 17 (2017) 14. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0958-2>.
- [162] S. Parveen, D.B. Gupta, S. Dass, A. Kumar, A. Pandey, S. Chakraborty, N. Chakraborty, Chickpea ferritin CaFer1 participates in oxidative stress response, and promotes growth and development, *Sci. Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep31218>.
- [163] R. Ben Saad, W. Romdhane, A. Hsouna, W. Mihoubi, M. Harbaoui, F. Brini, Insights into plant annexins function in abiotic and biotic stress tolerance, *Plant Signal. Behav.* 15 (2020) 1699264.
- [164] Y.M. Feng, X.K. Wei, W.X. Liao, L.H. Huang, H. Zhang, S.C. Liang, H. Peng, Molecular analysis of the annexin gene family in soybean, *Biol. Plant.* 57 (2013) 655–662. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0334-0>.
- [165] J. Carrasco-Castilla, Y. Ortega-Ortega, D. Jáuregui-Zúñiga, M.A. Juárez-Verdayes, M.K. Arthikala, E. Monroy-Morales, N. Nava, O. Santana, R. Sánchez-López, C. Quinto, Down-regulation of a *Phaseolus vulgaris* annexin impairs rhizobial infection and nodulation, *Environ. Exp. Bot.* 153 (2018) 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.016>.
- [166] J. Prell, J.P. White, A. Bourdes, S. Bunnewell, R.J. Bongaerts, P.S. Poole, Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 12477–12482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106>.
- [167] K.N. Strodman, S. Frank, S. Stevenson, J.J. Thelen, D.W. Emerich, Proteomic characterization of bradyrhizobium diazoefficiens bacteroids reveals a post-symbiotic, hemibiotrophic-like lifestyle of the bacteria within senescing soybean nodules, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3947. <https://doi.org/10.3390/ijms19123947>.
- [168] A. Shamseldin, J. Nyalwidhe, D. Werner, A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* Strains, *Curr. Microbiol.* 52 (2006) 333–339. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-6472-7>.
- [169] D.F. Gomes, J.S.D.S. Batista, A.L. Schiavon, D.S. Andrade, M. Hungria, Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: Identification of conserved and specific responses to heat stress, *BMC Microbiol.* 12 (2012).

- <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-84>.
- [170] J.F. Nilsson, L.G. Castellani, W.O. Draghi, J. Pérez-Giménez, G.A. Torres Tejerizo, M. Pistorio, Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress, *J. Proteome Res.* 18 (2019) 3615–3629. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00275>.
- [171] N. Meneses, H. Taboada, M.F. Dunn, M. del C. Vargas, N. Buchs, M. Heller, S. Encarnación, The naringenin-induced exoproteome of *Rhizobium etli* CE3, *Arch. Microbiol.* 199 (2017) 737–755. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1351-8>.
- [172] H. Taboada, M.F. Dunn, N. Meneses, C. Vargas-Lagunas, N. Buchs, A. Andrade-Domínguez, S. Encarnación, Qualitative changes in proteins contained in outer membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the nod gene inducer naringenin, *Arch. Microbiol.* 201 (2019) 1173–1194. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01682-4>.
- [173] X.Q. Yu, X. Yan, M.Y. Zhang, L.Q. Zhang, Y.X. He, Flavonoids repress the production of antifungal 2,4-DAPG but potentially facilitate root colonization of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens*, *Environ. Microbiol.* (2020). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15052>.
- [174] M. Wenzel, K. Lang, T. Günther, A. Bhandari, A. Weiss, P. Lulchev, E. Szentgyörgyi, B. Kranzusch, M. Göttfert, Characterization of the flavonoid-responsive regulator *frrA* and its binding sites, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 2363–2370. <https://doi.org/10.1128/JB.06567-11>.
- [175] F. Okutani, S. Hamamoto, Y. Aoki, M. Nakayasu, N. Nihei, T. Nishimura, K. Yazaki, A. Sugiyama, Rhizosphere modelling reveals spatiotemporal distribution of daidzein shaping soybean rhizosphere bacterial community., *Plant. Cell Environ.* 43 (2020) 1036–1046. <https://doi.org/10.1111/pce.13708>.
- [176] M. Valentini, A. Filloux, Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria., *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>.
- [177] C. Liu, D. Sun, J. Zhu, J. Liu, W. Liu, The Regulation of Bacterial Biofilm Formation by cAMP-CRP: A Mini-Review, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>.
- [178] Y. Sun, Y. Liu, X. Liu, X. Dang, X. Dong, Z. Xie, Azorhizobium caulinodans c-di-GMP phosphodiesterase Chp1 involved in motility, EPS production, and nodulation of the host plant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 2715–2729. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10404-6>.
- [179] S.L. Kuchma, K.M. Brothers, J.H. Merritt, N.T. Liberati, F.M. Ausubel, G.A. O’Toole, BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8165–8178. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-07>.
- [180] D. Hérouart, E. Baudouin, P. Frendo, J. Harrison, R. Santos, A. Jamet, G. Van de Sype, D. Touati, A. Puppo, Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: A key role in the establishment of the legume-Rhizobium symbiosis?, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 619–624. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01415-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01415-8).
- [181] E. Balsanelli, M.Z. Tadra-Sfeir, H. Faoro, V.C. Pankiewicz, V.A. de Baura, F.O. Pedrosa, E.M. de Souza, R. Dixon, R.A. Monteiro, Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere, *Environ. Microbiol.* 18 (2016) 2343–2356. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12887>.
- [182] B. Riviezzi, C.X. García-Laviña, M.A. Morel, S. Castro-Sowinski, Facing the communication between soybean plants and microorganisms (*Bradyrhizobium* and *Delftia*) by quantitative shotgun proteomics, *Symbiosis.* 83 (2021) 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00758-4>.

- [183] M.A. Morel, C. Cagide, M.A. Minteguiaga, M.S. Dardanelli, S. Castro-Sowinski, The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An interaction that improves plant yield, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28 (2015) 134–142. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0229-R>.
- [184] N. Benhamou, S. Gagné, D. Le Quéré, L. Dehbi, Bacterial-Mediated Induced Resistance in Cucumber: Beneficial Effect of the Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* on the Protection Against Infection by *Pythium ultimum*., *Phytopathology.* 90 (2000) 45–56. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.45>.
- [185] U.P. Singh, B.K. Sarma, D.P. Singh, Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Culture Filtrate of *Sclerotium rolfsii* on Phenolic and Salicylic Acid Contents in Chickpea (*Cicer arietinum*), *Curr. Microbiol.* 46 (2003) 131–140. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3834-2>.
- [186] S. Compant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, E. Ait Barka, Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 1685 LP – 1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>.
- [187] E. Ait Barka, J. Nowak, C. Clément, Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 7246 LP – 7252. <https://doi.org/10.1128/AEM.01047-06>.
- [188] R.P.N. Mishra, R.K. Singh, H.K. Jaiswal, V. Kumar, S. Maurya, Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.), *Curr. Microbiol.* 52 (2006) 383–389. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0296-3>.
- [189] V. Walker, C. Bertrand, F. Bellvert, Y. Moëgne-Loccoz, R. Bally, G. Comte, Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*., *New Phytol.* 189 (2011) 494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x>.
- [190] V. Walker, O. Couillerot, A. Von Felten, F. Bellvert, J. Jansa, M. Maurhofer, R. Bally, Y. Moëgne-Loccoz, G. Comte, Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions, *Plant Soil.* 356 (2012) 151–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0960-2>.
- [191] A. Chamam, H. Sanguin, F. Bellvert, G. Meiffren, G. Comte, F. Wisniewski-Dyé, C. Bertrand, C. Prigent-Combaret, Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association., *Phytochemistry.* 87 (2013) 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>.
- [192] R. Kape, M. Parniske, D. Werner, Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids., *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 316–319. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.1.316-319.1991>.
- [193] G. Seneviratne, H.S. Jayasinghearachchi, Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration?, *Plant Soil.* 252 (2003) 385–395. <https://doi.org/10.1023/A:1024725511783>.
- [194] Y.-K. Chan, Utilization of simple phenolics for dinitrogen fixation by soil diazotrophic bacteria BT - Nitrogen Fixation with Non-Legumes: The Third International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes, Helsinki, 2–8 September 1984, in: F.A. Skinner, P. Uomala (Eds.), Springer Netherlands, Dordrecht, 1986: pp. 141–150. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4378-0_11.
- [195] L.J. Shaw, P. Morris, J.E. Hooker, Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere

- microorganisms., *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 1867–1880. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01141.x>.
- [196] E. Velazquez, L.R.S. and A. Peix, Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids, *Curr. Nutr. Food Sci.* 6 (2010) 109–144. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/157340110791233247>.
- [197] W. Jung, O. Yu, S.-M.C. Lau, D.P. O’Keefe, J. Odell, G. Fader, B. McGonigle, Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 208–212. <https://doi.org/10.1038/72671>.
- [198] M. a. Morel, V. Braña, S. Castro-Sowinski, Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production, in: A. Goyal (Ed.), *Crop Plant*, 2012: pp. 217–240. <https://doi.org/10.5772/37413>.
- [199] M.N. Zaprometov, Tannins, Lignans, and Lignins, in: V. I (Ed.), *Phytochem. Plant Cell Cult.*, Academic Press, 1988: pp. 89–97.
- [200] W.D. dos Santos, M.L.L. Ferrarese, C. V Nakamura, K.S.M. Mourão, C.A. Mangolin, O. Ferrarese-Filho, Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action., *J. Chem. Ecol.* 34 (2008) 1230–1241. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9522-3>.
- [201] D.I.L. Zanardo, R.B. Lima, M. de L.L. Ferrarese, G.A. Bubna, O. Ferrarese-Filho, Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid, *Environ. Exp. Bot.* 66 (2009) 25–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>.
- [202] G.A. Bubna, R.B. Lima, D.Y.L. Zanardo, W.D. Dos Santos, M. de L.L. Ferrarese, O. Ferrarese-Filho, Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*), *J. Plant Physiol.* 168 (2011) 1627–1633. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.03.005>.
- [203] V.H. Salvador, R.B. Lima, W.D. dos Santos, A.R. Soares, P.A.F. Böhm, R. Marchiosi, M. de L.L. Ferrarese, O. Ferrarese-Filho, Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth., *PLoS One.* 8 (2013) e69105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069105>.
- [204] R. Baziramakenga, R.R. Simard, G.D. Leroux, Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean., *J. Chem. Ecol.* 20 (1994) 2821–2833. <https://doi.org/10.1007/BF02098391>.
- [205] G. de S. Bido, M. de L.L. Ferrarese, R. Marchiosi, O. Ferrarese-Filho, Naringenin inhibits the growth and stimulates the lignification of soybean root , *Brazilian Arch. Biol. Technol.* . 53 (2010) 533–542.
- [206] R.B. Lima, V.H. Salvador, W.D. dos Santos, G.A. Bubna, A. Finger-Teixeira, A.R. Soares, R. Marchiosi, M. de L.L. Ferrarese, O. Ferrarese-Filho, Enhanced lignin monomer production caused by cinnamic Acid and its hydroxylated derivatives inhibits soybean root growth., *PLoS One.* 8 (2013) e80542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080542>.
- [207] G. Smit, V. Puvanesarajah, R.W. Carlson, W.M. Barbour, G. Stacey, Bradyrhizobium japonicum nodD1 can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the nodYABCSUIJ operon., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 310–318.
- [208] N.K. Peters, D.P. Verma, Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations., *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 3 (1990) 4–8. <https://doi.org/10.1094/mpmi-3-004>.
- [209] J.R. Rao, J.E. Cooper, Soybean nodulating rhizobia modify nod gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity, *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 8 (1995) 855–862.

- [210] A. Favaretto, S. Chini, S. Scheffer-basso, A. Sobottka, C. Bertol, N. Perez, Pattern of allelochemical distribution in leaves and roots of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees.), *Aust. J. Crop Sci.* 9 (2015) 1119–1125.
- [211] L. García-Gutiérrez, H. Zeriouh, D. Romero, J. Cubero, A. de Vicente, A. Pérez-García, The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses., *Microb. Biotechnol.* 6 (2013) 264–274. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>.
- [212] C. Jiang, Z. Fan, Z. Li, D. Niu, Y. Li, M. Zheng, Q. Wang, H. Jin, J. Guo, *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in Arabidopsis., *Mol. Plant Pathol.* 21 (2020) 854–870. <https://doi.org/10.1111/mpp.12935>.
- [213] L.C. van Loon, P.A. Bakker, C.M. Pieterse, Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria., *Annu. Rev. Phytopathol.* 36 (1998) 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>.
- [214] G. Loake, M. Grant, Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists., *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 (2007) 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>.
- [215] B.J. Ferguson, U. Mathesius, Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions, *J. Chem. Ecol.* 40 (2014) 770–790. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0472-7>.
- [216] B. Lian, X. Zhou, M. Miransari, D.L. Smith, Effects of Salicylic Acid on the Development and Root Nodulation of Soybean Seedlings, *J. Agron. Crop Sci.* 185 (2000) 187–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00419.x>.
- [217] F. Palma, M. López-Gómez, N.A. Tejera, C. Lluch, Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity., *Plant Sci.* 223 (2014) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.005>.
- [218] F. Mabood, D.L. Smith, Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures, *Physiol. Plant.* 125 (2005) 311–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00559.x>.
- [219] F. Mabood, A. Souleimanov, W. Khan, D.L. Smith, Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*, *Plant Physiol. Biochem.* 44 (2006) 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.10.025>.
- [220] H. Liu, C. Zhang, J. Yang, N. Yu, E. Wang, Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis., *J. Integr. Plant Biol.* 60 (2018) 632–648. <https://doi.org/10.1111/jipb.12653>.
- [221] J. Lin, M. Frank, D. Reid, No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis., *Plant Commun.* 1 (2020) 100104. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>.
- [222] A. van Zeijl, R.H.M. Op den Camp, E.E. Deinum, T. Charnikhova, H. Franssen, H.J.M. Op den Camp, H. Bouwmeester, W. Kohlen, T. Bisseling, R. Geurts, Rhizobium Lipo-chitooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in *Medicago truncatula* Roots, *Mol. Plant.* 8 (2015) 1213–1226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.010>.
- [223] D.E. Reid, A.B. Heckmann, O. Novák, S. Kelly, J. Stougaard, Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase 3 Maintains Cytokinin Homeostasis during Root and Nodule Development in *Lotus japonicus*., *Plant Physiol.* 170 (2016) 1060–1074. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00650>.

- [224] D. Torres, I. Benavidez, F. Donadio, E. Mongiardini, S. Rosas, S. Spaepen, J. Vanderleyden, A. Pěňčík, O. Novák, M. Strnad, J. Frébortová, F. Cassán, New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*., *Res. Microbiol.* 169 (2018) 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.002>.

9. Anexos

Anexo 1. Medios de cultivos, buffer y soluciones nutritivas utilizadas

Medio YEM

Componente	Cantidad
Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.75 g
Agua destilada csp	1000 ml
pH	7

Medio YEM sólido: YEM adicionado con Agar 16 g/l

Medio TY

Componente	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.9 g
Agua destilada csp	1000 ml
pH	7

Medio Jensen 10X

Componente	Cantidad
CaHPO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄	2 g
NaCl	2 g
FeCl ₃ 3.4%	2.5 ml
Solución de micronutrientes*	10 ml
Agua destilada	1 l
pH	7

*Solución de micronutrientes

Buffer fosfato (0.2 M, pH7)

Componente	Cantidad
H ₃ BO ₄	1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.75 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.04 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.04 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Agua destilada	500 ml

Solución A: 0.2 M - fosfato de sodio monobásico: 27.8 g/l

Solución B: 0.2 M - fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄.7H₂O): 53.65 g/l

Buffer: 39.0 ml Solución A + 61.0 ml Solución B + Agua destilada hasta completar 200 ml.

Se utiliza a una concentración de 50 mM.

Solución Somesagaran y Hoben (S-H)

Medio nutriente sin N adaptado por Somasegaran y Hoben (1985) de Broughton y Dillworth, (1970).

Solución 1: CaCl₂. 2H₂O: 294,1 g/L (2M)

Solución 2: KH₂PO₄: 136,1 g/L (1M)

Solución 3: Fe-citrato: 6,7 g/L (0,02M)

Mg, MgSO₄. 7H₂O 123,3 g/L (0,5 M)

K₂SO₄ 87.0 g/L (0,5M)

Mn, MnSO₄.H₂O 0,338 g/L (0,002 M)

Solución 4: H₃BO₃: 0,247 g/L (0,004 M)

ZnSO₄.7H₂O: 0,288 g/L (0,001 M)

CuSO₄.5H₂O: 0,1 g/L (0,0004 M)

CoSO₄.7H₂O: 0,056 g/L (0,0002 M)

Na₂MoO₄.2H₂O: 0,048 g/L (0,0002 M)

Para preparar 1 L de solución, mezclar 10 ml de cada solución stock, agregar H₂O hasta completar 1 L.
Ajustar con 1N NaOH a pH 6,6-6,8.

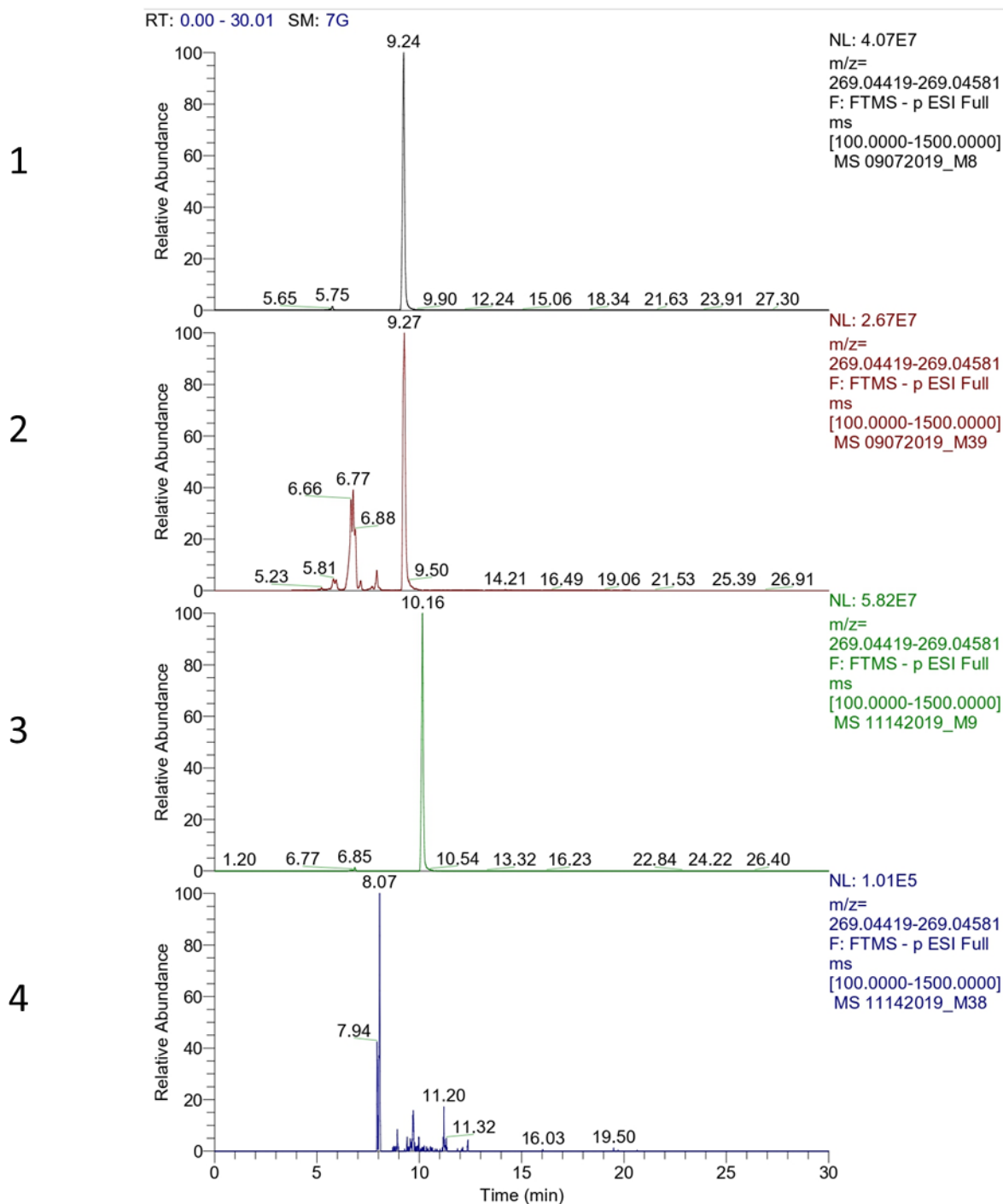
Anexo 2. Lista de compuestos utilizados en el análisis de perfilado metabólico. Se detallan las fórmulas empíricas y las masas exactas.

Compuesto	Formula química	[M-H] ⁻ Masa iónica exacta*
(-)-epicatequina / (+)-catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0717
(-)-epigallocatequina / (+)-galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0666
ácido 2,3-dihidroxibenzoico / ácido 2,4- dihidroxibenzoico / ácido 2,6-dihidroxibenzoico / ácido 3,4- dihidroxibenzoico / aldehído Gálico	C ₇ H ₆ O ₄	153.0193
6''-O-Malonilgenistina	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	517.0987
Apiin (Apigenina 7-O-apiosil-glucósido)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1406
Arbutina	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	271.0823
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	175.0248
Ácido asiático	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.3429
Asparagina	C ₄ H ₈ NO ₃	117.0431
Ácido benzoico / 4-Hidroxibenzaldehído	C ₇ H ₆ O ₂	121.0295
Ácido betulinico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.3530
Biochanina A / Gliciteína / Genkwanina (apigenina 7-metil éter)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0612
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	179.0349
Chalcona	C ₁₅ H ₁₂ O	207.0815
Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	147.0451
Cumarina	C ₉ H ₆ O ₂	145.0295
Cumestrol	C ₁₅ H ₈ O ₅	267.0299
Cianidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	286.0482
Daidzeína	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0506
Daidzeína 7-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.1034
Delfinidina 3-rhamnósido-5-glucósido	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	610.1539
Ácido dihidro <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0557
Dihidrokaempferol 3-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1089
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9989
Etil Cafeato (ácido cafeico etil éster) / Sinapaldehído	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.0662
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506
Flavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	221.0608
GABA	C ₄ H ₉ NO ₂	102.0560
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0142
Genisteína / Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455
Genistin / Apigenina 7-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0983
Glutamato	C ₅ H ₉ NO ₄	146.0458
Hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.1824
Indol-3-acetaldehído	C ₁₀ H ₉ NO	158.0611
Indol-3-acetamida	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O	173.0720
Indol-3-acetonitrilo	C ₁₀ H ₈ N ₂	155.0614
Indol-3-piruvato	C ₁₁ H ₉ NO ₃	202.0509
Ácido indolacético	C ₁₀ H ₉ NO ₂	174.0560
Isoramnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.0510
Isoramnetina 3-O-galactósido / Isoramnetina 3-O-glucósido	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1038

Isoramnetina 3-O-rutinósido	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1617
Kaempferol 3-O-glucósido / Kaempferol 3-O-galactósido / Quercetina 3-O-rhamnósido / Quercitrina	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	446.0854
Kaempferol 3-O-rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1511
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	89.0244
Liquiritigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0662
Liquiritina	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1191
Luteolina / Kaempferol / Auresidina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	133.0142
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0612
Naringenina 7-O-glucósido	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1140
Ácido <i>p</i> -cumarico (ácido hidroxicinámico)	C ₉ H ₈ O ₃	163.0400
Etil éster del ácido <i>p</i> -cumárico	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	191.0713
Ácido <i>p</i> -cumaril glicólico	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	221.0455
Procianidina A2	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575.1195
Procianidina B2 / Procianidina B3 / Procianidina dímero B7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351
Procianidina C1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1985
Procianidina tetrámero	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1153.2619
Prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	114.0560
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0353
Quercetina 3-O-glucósido / Quercetina 3-O-galactósido	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	462.0803
Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0561
Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227.0713
Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.0772
Rutina / Luteolina 7-O-rutinósido / Quercetina 3-O-rutinósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461
Ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) / ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	137.0244
Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0612
Sissotrin / (-)-epicatequina 3-O-galato / (-)-epigalocatequina 3-O-galato / (+)-Galocatequina 3-O-galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0827
Sitosterol ferulato	C ₃₉ H ₅₈ O ₄	589.4262
Soyasaponina I	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.5115
Siringaldehído / ácido verátrico / ácido dihidrocafeico	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0506
Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0455
Ácido treonico	C ₄ H ₈ O ₅	135.0299
Trehalosa / Maltosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.1089
Triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.0826
Umbeliferona (7-hidroxicumarina) / 4-Hidroxicumarina	C ₉ H ₆ O ₃	161.0244
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	167.0349
Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	151.0400
Xilosa	C ₅ H ₁₀ O ₅	149.0455
Zeatina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	218.1047

*masa exacta de la molécula desprotonada

Anexo 3. Comparación de la intensidad de genisteína en cromatogramas obtenidos mediante Xcalibur Software (Thermo Scientific).



Cromatogramas comparativos de los picos de genisteína (m/z 269.0450) registrados en las siguientes muestras: 1) Mezcla de estándares (incluida Genisteína) analizada en la misma secuencia que las raíces, 2) Muestra de control de calidad (QC) de raíces, 3) Mezcla de estándares (incluida Genisteína) analizada en la misma secuencia que los exudados, 4) Muestra de QC de exudados.



Facing the communication between soybean plants and microorganisms (*Bradyrhizobium* and *Delftia*) by quantitative shotgun proteomics

Braulio Riviezzi¹ · César X. García-Laviña² · María A. Morel^{1,3} · Susana Castro-Sowinski^{1,2}

Received: 3 November 2020 / Accepted: 12 February 2021 / Published online: 11 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

The effect of plant-produced flavonoids in rhizobial cells is well-known, and flavonoids are considered the first signals in the rhizobia-plant communication. We previously reported that *Delftia* strains increase the performance (nodulation and nitrogen fixation) of leguminous plants in co-inoculation experiments, as compared with the single rhizobial inoculation. By using an approach based on quantitative shotgun proteomics, we explored the response of *Delftia* sp. JD2 cells to the presence of the flavonoid genistein (*nod* gene-inducer of *Bradyrhizobium* cells). We found that genistein up-regulates the production of regulatory proteins associated with the epiphytic habit (TetR and diguanylate cyclase), proteins involved in the formation of flagella, iron acquisition, resistance to several drugs, the rhizoplane colonization (biofilm establishment), and the rearrangement of the peptidoglycan structure and membrane proteins. These results indicate that genistein induces chemotaxis, mobility and prepares JD2 strain for an epiphytic lifestyle. We also analyzed the effect of the co-inoculation on the proteome of symbiosome-enriched fractions from soybean nodules. The fractions from co-inoculated plants showed an up-regulation of proteins involved in stress endurance (“stem 31 kDa glycoprotein”, “Kunitz trypsin protease inhibitor”, proteasome subunits) and ferritin (involved in iron storage and homeostasis), suggesting that co-inoculation with JD2 prepares the soybean plants to deal with unfriendly environmental conditions. In summary, the plant-secreted genistein functions as a chemical signal in the communications between soybean plants and *Delftia* sp. JD2, while the presence of JD2 would prepare the plant to cope with abiotic stresses in co-inoculation experiments.

Keywords *Bradyrhizobium* · *Delftia* · Shotgun proteomics · Soybean · Symbiosome

1 Introduction

Bacteria from the genus *Delftia* (class Betaproteobacteria; family Comamonadaceae) are known for their metabolic versatility. They have a wide variety of potential biotechnological applications, such as plant growth promotion, bioremediation and bioconversion of phenols, aniline, chloroanilines, herbicides, micropollutants, phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons, anionic surfactants and heavy metals (Braña et al.

2016). In addition, *Delftia* strains are cell factories for the production of biopolymers and nanoparticles (Braña et al. 2016). We previously reported the isolation of chromium (VI)-resistant *Delftia* strains with plant growth-promoting activity that functioned as “helpers”, enhancing the performance of rhizobial inoculant strains during their symbiotic association with alfalfa, clover, and soybean plants (Morel et al. 2011; Ubalde et al. 2012; Morel et al. 2015; Cagide et al. 2018). The rhizobia-*Delftia* co-inoculation of leguminous plants improves the agronomic expectations compared with a single-rhizobial inoculation, mainly because *Delftia* strains produce auxins (indole-3-acetic acid, IAA) and induce the secretion of plant flavonoids (Morel et al. 2015; Cagide et al. 2018). While IAA promotes the development of the root system, flavonoids are fundamental for the establishment of the nitrogen-fixing symbiosis between nodulating rhizobia and leguminous roots (Morel and Castro-sowinski 2013). As a consequence, we detected an increase in total nitrogen and the content of ureides in co-inoculated soybean plants,

✉ María A. Morel
mmorel@iibce.edu.uy; maria.morel.revetria@gmail.com

¹ Grupo Microbiología Molecular, Departamento BIOGEM, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

² Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

including an important beneficial effect on the main productive parameter of soybean, the grain yield (Cagide et al. 2018).

Regarding the co-inoculation of soybean plants with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. JD2 strains, our previous results, using a GC-MS metabolomic approach, showed differences in the chemical composition of nodules and roots between inoculated and co-inoculated treatments. In particular, we demonstrated that JD2 increases the secretion of plant flavonoids, changes the primary and secondary metabolism of the plant and induces a different metabolic status of nodules (Morel et al. 2015; Cagide et al. 2018).

The co-inoculation of leguminous plants is a new biotechnological tool, and probably *Azospirillum* strains are the most known co-inoculant. The increase in leguminous plant yield by *Azospirillum* inoculation has been mainly attributed to an improvement in root development and to a lesser extent to biological nitrogen fixation (Okon and Kapulnik 1986). Regarding the co-inoculation with rhizobial strains, azospirilla enhance the nodulation parameters (Volpin & Kapulnik 1994; Chibeba et al. 2015) and yield (Hungria et al. 2015). In a challenging work, Zeffa et al. (2020) performed a meta-analysis searching for the best co-inoculant for soybean. The authors found that the co-inoculation with *Azospirillum*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* was more effective than with *Serratia*. The co-inoculation increased the number of nodules per plant, nodule biomass, root biomass and shoot biomass, but the authors did not find an increase in grain yield. Unfortunately, the authors did not include *Delftia* strains in the meta-analysis. However, we did find an important increase in pod and grain yield during the co-inoculation of soybean plants with *Bradyrhizobium* and *Delftia* sp. JD2, overcoming the agronomic expectations (Cagide et al. 2018).

Briefly, the events taking place during the rhizobial-plant interaction are: plant secretion of flavonoids; rhizobial recognition of flavonoids and induction of *nod* genes (production and secretion of the Nodulation Factor; NF); plant recognition of NF molecules followed by the induction of the symbiotic response and nodule organogenesis; deformation of root hair and formation of the infection thread (IT); rhizobial invasion through the IT towards the cortical cells; release of rhizobial cells (differentiated into bacteroids) to the host cell cytoplasm; formation of the membrane-delimited symbiosome containing bacteroids; and nitrogen fixation (Morel and Castro-Sowinski 2013). The symbiotic nodule is the plant organ that contains the symbiosomes formed by bacteroids (nitrogen-fixing rhizobia), the peribacteroid membrane (of plant origin, and some proteins synthesized by the bacteroids), and the peribacteroid space (Tsyganova et al. 2017). We wonder how *Delftia* sp. JD2 strain influences a few of these events; thus, to better characterize the influence of JD2 on the bradyrhizobial-soybean symbiosis, we carried out two proteomic studies to analyze: i) how a flavonoid (genistein, produced by soybean) up- and down-regulates proteins from

Delftia sp. JD2 cells and ii) the differentially produced proteins of symbiosome-enriched fractions from bradyrhizobia-*Delftia* co-inoculated plants as compared with single bradyrhizobia inoculated ones.

Based on our previous reports and the available information shown above, we faced the following questions: i) does the soybean secreted flavonoid, genistein, change the pattern of intracellular proteins produced by *Delftia* sp. JD2 strain? ii) does the co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Delftia* strains change the pattern of proteins produced in the symbiosome from soybean nodules? We think that the answers to these questions will give insight into how a successful plant-microbe communication is achieved during this co-inoculation treatment.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains

The bacterial strains *Bradyrhizobium elkanii* U-1301 and U-1302 (microsymbionts of soybean) were supplied by the Laboratory of Soil Microbiology and Inoculant Quality Control (MGAP-DGSA, 2020). The strains were grown in modified Yeast Extract Mannitol (YEM) liquid medium (Vincent, 1970) at 30 °C and 180 rpm, during 4 days. Both strains are commonly used in inoculant bioformulations as described in Riviezzi et al. (2020).

For plant experiments, *Delftia* sp. JD2 strain was grown in TY medium (5 g of tryptone, 3 g of yeast extract, and 0.09 g of anhydrous CaCl₂ per liter). For shotgun proteomics, JD2 cells were grown in 10-fold diluted TY with and without 20 μM genistein, a soybean isoflavone and *nod* gene-inductor of bradyrhizobia cells, at 30 °C and 180 rpm, during 14 h (exponential growth phase).

2.2 Preparation of *Delftia* sp. JD2 cell extracts for the proteomic study

JD2 cells grown in 10-fold diluted TY (with and without genistein) as described above were centrifuged, washed, and suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7). Cells were disrupted by sonication in an ice-box (45 s at a relative power out of 75 and a 0.5 duty period) using an Ultrasonic Homogenizer 4710 Series from Cole-Parmer. The suspensions were clarified by centrifugation (39,000×g for 30 min at 4 °C) and stored at -20 °C until processing. Three independent biological replicates were performed for each condition.

2.3 Plant experiments

Fresh cultures of U-1301 and U-1302 strains were centrifuged and washed. The cell pellets were adjusted at 10⁸ UFC per mL

using 50 mM phosphate buffer (pH 7) (both strains are used together in the commercial formulation for soybean used in Uruguay; see Riviezi et al. 2020). For co-inoculation experiments, JD2 cells (grown in TY medium as described above) were centrifuged, washed, and diluted with 50 mM phosphate buffer (pH 7) to get 10^7 UFC per mL.

Surface-sterilized soybean seeds (*Glycine max* GE 590ci) were sowed in 1 kg pots containing sterilized vermiculite, and their inoculation was performed using 100 μ L of cell suspensions prepared as described above, achieving 10^7 and 10^6 cells per seed for the bradyrhizobial (U-1301 and U-1302) and JD2 strains, respectively. Surface-sterilization was done as described in Cagide et al. (2018). Twelve plants per treatment were grown in a chamber using controlled conditions (26 °C and 16/8 h of light/darkness).

Active nodules (all the reddish ones) were collected after 49 days (V4-V5), washed with distilled water, and stored at -80 °C until use. For protein extraction we used the procedure described by Larrainzar et al. (2007) with modifications. Briefly: 100 mg of nodules were frozen with liquid nitrogen, and then they were disrupted by using a mortar and pestle with 500 μ L of cold extraction buffer (25 mM MES, 450 mM mannitol, 7 mM Na₂EDTA, 7 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 20 mM ascorbic acid, 10 mM dithiothreitol, pH 7.2). After centrifugation (15 min, 2000 rpm and 4 °C), pellets were washed with extraction buffer, resuspended on PBS, and sonicated (45 s at relative power out of 7, on an ice-box). Finally, the cell debris was separated by centrifugation (15 min at 10000 g and 4 °C), and the supernatants (symbiosome-enriched fractions) were concentrated by freeze-drying.

The shoot and root dry weight, and nodule fresh weight of soybean plants were also determined. Data were subjected to statistical analysis using InfoStat package (Di Rienzo et al. 2016), with post hoc pairwise comparison based on DGC test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

2.4 LC-MS/MS analysis

The profile of proteins from samples was analyzed by label-free quantitative shotgun mass spectrometry (LC-MS/MS). Protein extracts were loaded on SDS-PAGE gels and the complete proteome excised as described by Herrera et al. (2019). The portions of gels from each sample were further processed and analyzed at the Proteomics Core Facility CEQUIBIEM (University of Buenos Aires/CONICET, National Research Council). Gel fragments were destained with ammonium bicarbonate and acetonitrile (ACN), reduced with dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide, and digested with trypsin overnight at 37 °C. Peptides were extracted by sonication in 50% ACN and 0.5% trifluoroacetic acid solution, further concentrated by speed-vacuum dry, resuspended in 0.1% formic acid and desalted with Zip-Tip C18. The digests were then analyzed by nano LC-MS/MS in a Q-Exactive Mass

Spectrometer (Thermo Scientific) coupled to a nano HPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific).

Chromatographic peptide separation was performed with a C18 reverse-phase column (Easy-Spray Column PepMap RSLC, P/N ES803) at 35 °C, for 120 min with a flow rate of 200 nl/min. The mobile phase was a two-solution system comprised of 0.1% formic acid in water (Solution A) and 0.1% formic acid in ACN (Solution B). Peptides were loaded in solution A, eluted in 5% of solution B for the first 5 min, 5% to 35% gradient of sol. B for the next 100 min, 35% to 100% for another 5 min and then washed in 100% sol. B for the last 10 min.

Following chromatographic separation, peptides were simultaneously ionized in an electrospray ionization source (EASY-SPRAY, Thermo Scientific) at 2.50 kV spray voltage. Only positive ions were analyzed in the Orbitrap analyzer, operated in the Full-MS and MS/MS mode. The scanned mass range was 400–2000 m/z, with a Full-MS resolution of 70,000 at 400 m/z and a MS/MS resolution of 17,500. For data-acquisition, the MS spectrometer was operated in data-dependent mode, where the 15 most abundant precursor ions were fragmented in a high energy collision dissociation cell (HCD), with a dynamic exclusion range. Peptides with a charge of +1 or with unassigned charge state were excluded from fragmentation for MS/MS.

2.5 Data analysis

The raw MS data were processed using the MaxQuant software (v. 1.6.12.0) for protein identification and quantification (Tyanova et al. 2016a). All MS/MS spectra were searched using the Andromeda plug-in against the *Delftia* sp. JD2 proteome (UP000093107; Morel et al. 2016) and for the plant experiments were also searched against the *Bradyrhizobium elkanii* (UP00032215) and soybean (UP000008827) proteomes from the UniProt. The analysis was performed with almost all the default settings as follows: trypsin/P specificity for digestion with up to two missed cleavages; carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification; N-acetylation of proteins and oxidation of methionine as variable modifications; and at least two peptides for protein identification. Proteins and peptides were identified using a target-decoy approach at a false discovery rate (FDR) of 1% with a reversed database and enabled contaminant search. 'Match between runs' was enabled with a match time window of 0.7 min and an alignment time window of 10 min. Relative label-free quantification (LFQ) was performed by using the MaxFLQ algorithm with a minimum ratio count of one.

MaxQuant-processed data ('proteingroups.txt' file) was further analyzed using the Perseus software (v. 1.6.14.0) (Tyanova et al. 2016b). Hits to the reverse database, contaminants, and proteins only identified with modified peptides were eliminated. LFQ intensities were log₂ transformed, and only those proteins quantified in at least two samples from each condition were

considered for statistical analysis. Missing values were imputed from a normal distribution with the default settings. Student's *t* test was performed to identify proteins with significant changes in abundance between the conditions compared. Those proteins with a *p* value <0.05 and a fold-change >2 were defined as significantly regulated. All raw data and the MaxQuant output tables have been deposited in ProteomeXchange with identifiers PXD022948 and PXD022986.

3 Results

Through a proteomic approach, we evaluated the effect of genistein on JD2's proteome and we assessed the impact of the co-inoculation with bradyrhizobia and JD2 strains on the proteome of symbiosome-enriched fractions.

3.1 The effect of genistein on the proteome of *Delftia* sp. JD2 strain

We addressed the effect of the soybean secreted flavonoid genistein in the proteome of a *Delftia* strain. Through the proteomic analysis, we detected 2162 proteins; among these proteins, 1849 were identified using more than two peptides. The shotgun proteomics data showed that in the presence of genistein, JD2 strain up-regulates 31 proteins and down-regulates the production of 10 proteins (Table 1). Among the up-regulated proteins, the main difference was the up-regulation of a few flagellar hook proteins (5 to 20-fold up-regulation according to the protein) and a Pilus assembly protein PilY (3-fold up-regulation). We also found a 2.2-fold up-regulation of a diguanylate cyclase enzyme (Table 1). This enzyme is responsible for the production of cyclic diguanylate (c di-GMP), a universal signaling molecule that directs several bacterial behaviors (Dahlstrom and O'Toole 2017).

Interestingly, we detected the 3.8-fold up-regulation of a TetR family transcriptional regulator (Table 1). This regulator is a one-component system involved in cell-to-cell communication and a regulator of antibiotic efflux pumps (regulating multidrug resistance; see below and notice the 2.3-fold up-regulation of a β -lactamase; Table 1). We found an up-regulation of several membrane proteins such as a cobalt ABC transporter, an efflux pump, a multidrug transporter, an iron transporter, a TonB-dependent receptor, and other ABC transporters. The TonB-dependent receptor is involved in an energy-dependent uptake of specific substrates, mainly in iron-siderophore import. As shown in Table 1, genistein up-regulates the production of a HtpX protease and two proteins involved in cell wall recycling: the anhydro-N-acetylmuramic acid kinase, and the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. While the former is involved in the utilization of anhydro-N-acetylmuramic acid, the latter is a peptidoglycan (PG) amidohydrolase that cleaves the bond between N-

acetylmuramoyl and L-alanine residues. More intriguing was the down-regulation of ribosomal proteins (50S ribosomal protein L27, 50S ribosomal protein L33, 30S ribosomal protein S16), and the Elongation factor Tu (Table 1). The Tu Factor is responsible for binding an aminoacyl-tRNA to the ribosome with a crucial role in translation. This result indicates that the addition of genistein may induce a general arrest in the synthesis of proteins by JD2 strain.

3.2 The effect of co-inoculation with *Delftia* sp. JD2 on the proteome of the bradyrhizobial-symbiosome-enriched fraction from soybean nodules

We also analyzed if the co-inoculation of soybean plants with *B. elkanii* and *Delftia* strains changes the pattern of proteins produced in the symbiosome. We detected 2555 proteins; 1711 proteins were identified by more than two peptides (1063 from bradyrhizobia and 650 from soybean plant). Changes in the abundance of proteins from plant origin will be addressed first, followed by the changes observed in the microbial counterpart. Table 2 shows the up- and down-regulated proteins of symbiosome-enriched fractions from co-inoculated plants as compared with symbiosome-enriched fractions from single bradyrhizobial inoculated plants. We did not find much difference between samples from co-inoculated and single inoculated plants, suggesting that the presence of JD2 strain poorly affected the proteome of symbiosomes, under our conditions (plants at V4-V5 stages). Notwithstanding the few differences found, the most markedly up-regulated plant proteins in symbiosome-enriched fractions from co-inoculated plants was an increase in abundance of 10-fold for the "stem 31 kDa glycoprotein", a 2.5-fold for the "Kunitz trypsin protease inhibitor" or KPI, a 2.4-fold for the plant proteasome (the "proteasome subunit β "), a 2.2-fold for an aminopeptidase (or metalloprotease, I1K8E3) and a 4.4-fold up-regulation of a ferritin (Table 2). Among soybean down-regulated proteins, we found an annexin and a plant derived branched-chain amino acid (LIV for Leucine, Isoleucine and Valine) aminotransferase with 2- and 4.2-fold down-regulation, respectively (Table 2).

Then, we wonder if the presence of JD2 strain changes the pattern of proteins from the bacteroids (proteins from bradyrhizobia). Table 2 shows that only two proteins from bradyrhizobia were up-regulated: an ABC transporter domain-containing protein and an Outer-membrane lipoprotein carrier protein. Only one protein was down-regulated with statistical significance, the 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. This enzyme is involved in the biosynthesis of riboflavin -vitamin B₂ - the precursor of flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide, essential cofactors for a wide variety of redox enzymes. We did not find proteins from *Delftia* sp. JD2 strain in the symbiosome-enriched fractions from co-inoculated plants, as statistically relevant. As

Table 1 Differentially expressed intracellular proteins produced by *Delftia* sp. JD2 strain in presence of genistein. The table shows the up- and down-regulated proteins, the fold-change and the accession number of proteins in the UniProt in parenthesis. Fold-change is the ratio of the changes observed between the bacterial growth in absence and presence of genistein

Accession Number	Over-produced proteins	Fold-change
A0A1C7LHB1	Flagellar hook-associated protein 2	19,7
A0A1C7L4W0	Cobalt ABC transporter substrate-binding protein	7,9
A0A1C7LEC3	Flagellar hook protein FlgL	6,5
A0A1C7LD66	Flagellar hook protein FlgK	4,8
A0A1C7LFH6	6-aminohexanoate hydrolase	4,5
A0A1C7L5C0	N-ethylmaleimide reductase	4,2
A0A1C7LB89	Efflux pump membrane transporter	3,9
A0A1C7LCN4	Multidrug transporter	3,9
A0A1C7LEZ0	TetR family transcriptional regulator	3,8
A0A1C7LCV8	Molybdopterin oxidoreductase	3,3
A0A1C7LB09	Pilus assembly protein PilY	3,3
A0A1C7LCT6	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	3,1
A0A1C7LEH2	TonB-dependent receptor	3,0
A0A1C7L7T2	Anhydro-N-acetylmuramic acid kinase (Fragment)	3,0
A0A1C7L4E7	Uncharacterized protein	2,7
A0A1C7L6P3	Superoxide dismutase	2,6
A0A1C7L8R9	Alpha/beta hydrolase	2,5
A0A1C7L7R4	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2,5
A0A1C7LB36	ABC transporter substrate-binding protein	2,5
A0A1C7LLJ7	Choloylglycine hydrolase	2,4
A0A1C7L709	β -lactamase	2,3
A0A1C7L5P8	Transcriptional regulator	2,2
A0A1C7LM11	Diguanylate cyclase	2,2
A0A1C7LGS8	Uncharacterized protein	2,2
A0A1C7LGV8	Glutamate synthase	2,2
A0A1C7L3M3	Protease HtpX homolog	2,2
A0A1C7LB54	Uncharacterized protein	2,2
A0A1C7LAA3	Iron transporter FeoB	2,1
A0A1C7LHW3	Hemolysin D	2,1
A0A1C7L5J0	NAD-dependent epimerase	2,1
A0A1C7L7Y7	Histidine kinase	2,0
A0A1C7LCE2	Carbon monoxide dehydrogenase	2,0
Accession Number	Down-produced proteins	Fold-change
A0A1C7LA47	LacI family transcriptional regulator	4,3
A0A1C7LKT4	50S ribosomal protein L27	4,1
A0A1C7LEX6	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	3,1
A0A1C7LA03	Elongation factor Tu	2,8
A0A1C7LKC6	Transcriptional regulator	2,6
A0A1C7LLN4	50S ribosomal protein L33	2,5
A0A1C7LIM0	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	2,5
A0A1C7LFI3	30S ribosomal protein S16	2,1
A0A1C7LDL8	Gamma-aminobutyrate permease	2,0
A0A1C7L6G6	ATP-dependent DNA helicase Rep	2,0

demonstrated using microscopy experiments performed with alfalfa plants, JD2 cells colonize the emergent lateral roots and the longitudinal root cell wall (including root nodules surface) of alfalfa, but apparently, they do not establish as endophytes

(Morel et al. 2015). Thus, our procedure (as described above) for nodule processing and symbiosome-enriched fractions isolation probably minimized the interference due to surface-attached microbes.

Table 2 Differentially expressed proteins in the symbiosome-enriched fractions from co-inoculated soybean nodules. The table shows the up- and down-regulated proteins, the fold-change and the accession number of proteins in the UniProt in parenthesis. Fold-change is the ratio of the changes between the different conditions

Proteins from	Up- and down-regulated proteins in co-inoculation treatments			
	Up-regulated	Fold-change	Down-regulated	Fold-change
Soybean	Stem 31 kDa glucoprotein (P10743)	10,4	Annexin (A0A0R4J363)	2,0
–	Ferritin (C6TCN5)	4,4	Branched-chain-amino-acid aminotransferase (C6T8V8)	4,2
–	Kunitz trypsin protease inhibitor (B1ACD5)	2,5	–	–
–	Proteasome subunit beta (C6SV91)	2,4	–	–
–	Aminopeptidase (I1K8E3)	2,2	–	–
–	Translocon-associated protein subunit beta (I1MLC3)	2,0	–	–
<i>Bradyrhizobium</i>	ABC transporter domain-containing protein (A0A0D1LV99)	2,9	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (A0A0D1M2C7)	2,2
–	Outer-membrane lipoprotein carrier protein (A0A0D1P690)	2,3	–	–

The soybean plants, harvested at V4 stage for the proteomic experiments, showed similar results as reported by Cagide et al. (2018). We found statistical differences between the root dry weight of single bradyrhizobial inoculated (0.196 ± 0.109 g per plant) and co-inoculated soybean plants (0.256 ± 0.09 g per plant); however, we did not find statistical differences ($p < 0.05$) between the shoot dry weight (0.459 ± 0.191 and 0.522 ± 0.183 g per plant, respectively) and nodule fresh weight (4.67 ± 1.4 mg per plant, for both experiments).

4 Discussion

We previously showed that the co-inoculation of soybean with bradyrhizobial strains and *Delftia* sp. JD2 improves the performance of plants as compared with the single inoculation, including an increase in the most productive soybean parameter, the harvest index (HI; the ratio between the grain yield and the total aerial biomass of the crop). Compared with non-inoculated plants, we reported a 12 and 64% in HI of plants inoculated with bradyrhizobia and co-inoculated, respectively (Cagide et al. 2018). In addition, we previously found that, at V4 stage, the co-inoculation of plants increased the plant height and the root dry matter and we presented data regarding the microbe-plant communication events using a metabolomic approach (Cagide et al. 2018). Now, we introduced a new approach (proteomics) to better understand the microbe-plant communication events during the co-inoculation.

4.1 Genistein induces chemotaxis and an epiphytic behavior of *Delftia* sp. JD2 strain

Results showed that genistein increased the production of flagellar proteins and the Pilus assembly protein PilY of JD2

strain, suggesting that this flavonoid induces the movement and/or chemotaxis of JD2 towards the flavonoid-producing soybean root. We only found proteins associated with the flagellar hook. It is very likely that we did not detect the flagellar filament proteins because during the centrifugation of cells, the flagella were disrupted from the JD2 membranes.

We found that genistein induces the production of the enzyme diguanylate cyclase, responsible for the production of c di-GMP, a secondary messenger commonly involved in the bacterial transition between a planktonic lifestyle and biofilm formation (sessile lifestyle). It is already known that a high level of c di-GMP induces microbial cells for a biofilm formation (Liu et al. 2020). Sun et al. (2020) also showed that a mutant in the coding gene of a c di-GMP phosphodiesterase from *Azorhizobium caulinodans* increased the resistance against H₂O₂, exopolysaccharide (EPS) production, and nodulation of *Sesbania rostrata*. Interestingly, the c di-GMP phosphodiesterase is responsible for the hydrolysis of c di-GMP, and it is probably associated with a higher content of c di-GMP. In addition, Kuchma et al. (2007) also showed that the c-di-GMP phosphodiesterase negatively regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, we asked ourselves if the up-regulation of the diguanylate cyclase, which is associated with an increased production of c di-GMP, could be involved in the production of EPS by JD2, assisting in the establishment of a biofilm along the root surface of soybean plants. Since the legume produces H₂O₂ during bacterial root hair invasion, at least during rhizobial infection (Hérouart et al. 2002), we also wonder if the up-regulation of the enzyme is implicated in the defense against the oxidative stress imposed by the plant during the infection. In this regard, we previously demonstrated that JD2 strain colonizes the root of the leguminous plant, behaving as an epiphytic microbe (Morel et al. 2015). In

addition, the hypothesis that genistein induces a response that prepares JD2 cells against the plant oxidative burst could be supported by the 2.6-fold up-regulation of a superoxide dismutase (Table 1). The future construction of a mutant on the diguanylate cyclase gene will help us to understand the role of c di-GMP in the colonization of leguminous plants by the JD2 strain.

In addition to the up-regulation of a diguanylate cyclase, involved in the regulation of a number of complex physiological processes, we found the up-regulation of a one-component transcriptional regulator belonging to the Tet family. Among the one-component system regulators, AefR from *Pseudomonas syringae* uses phytoestrogens as ligands and regulates the quorum sensing behavior and the epiphytic fitness of this microorganism (Cuthbertson and Nodwell 2013). Thus, we speculate that genistein could be the ligand or signal molecule for TetR in *Delftia* sp. JD2 strain. In this respect, Yu et al. (2020) and Wenzel et al. (2012) showed that plant flavonoids increase the expression of a TetR-family transcriptional regulator from *P. fluorescence* and *Bradyrhizobium japonicum*, respectively. In summary, these results point TetR family transcriptional regulator proteins as an important molecular element in establishing an effective plant-microbe communication. In this regard, the construction of TetR mutants for proteomics and plant experiments, and the analysis of the DNA-TetR binding by performing EMSA (electrophoretic mobility shift assay) experiments will help us to identify genes involved in the JD2 response to the flavonoid.

JD2 strain produces siderophores and shows resistance to several antibiotics and heavy metals (chromium and lead) (Morel et al. 2011; Ubalde et al. 2012). We showed now that genistein up-regulates the production of proteins of JD2 cells involved in the uptake of nutrients (iron by siderophore import) and the efflux of toxic molecules. Therefore, we think that the presence of genistein may improve the fitness of JD2 strain to face adverse environmental conditions, such as searching for iron and resisting harmful chemicals. In addition, we found the up-regulation of HtpX from JD2, a metalloprotease located on the cytosolic side of the membrane that assists in the proteolysis of membrane-bound substrates (proteolytic quality control of membrane proteins; Sakoh et al. 2005). We also found that some proteins involved in cell wall recycling are up-regulated (anhydro-N-acetylmuramic acid kinase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase). These results suggest that the membrane is reshuffling proteins for the acquisition of scarce nutrients (probably iron) and the efflux of metals or drugs. The presence of genistein also induces a change in the PG structure, probably preparing JD2 strain for the colonization of the root. Likewise, Balsanelli et al. (2016) showed that epiphytic *Herbaspirillum seropedicae* cells show altered transcription levels of genes associated with polysaccharide biosynthesis, PG turnover, and outer membrane protein biosynthesis as compared with planktonic cells,

suggesting a reorganization of cell wall envelope during colonization. We did not find a change in the production of proteins involved in the synthesis of polysaccharides. Still, the results suggest that genistein up-regulates proteins involved in membrane and PG structure.

4.2 *Delftia* sp. JD2 strain prepares the bradyrhizobial symbiosome (and/or nodule) for a potentially stressful situation

Many works have studied the differential protein or gene expression of leguminous plants (leaves, roots or nodules) under non-stressed and abiotic stress conditions; however, the effect of co-inoculation on nodule or symbiosome metabolism has not been faced yet. Among many studies focused on the differential expression of macromolecules in nodules, we can mention Clement et al. (2008) and Cilliers et al. (2018), who showed the up-regulation of many transcripts, including glutamine synthetase, metallothionein, ferritin and several cysteine proteases from soybean nodules in response to drought stress. The authors demonstrated that nodules change their pattern of transcripts (or proteins) to cope with abiotic stresses.

Regarding the co-inoculation of soybean plants with *Bradyrhizobium* and *Delftia* sp. JD2 strains, we did not find many differences in the production of proteins from symbiosome-enriched fractions. We think that the most important differences would appear at the first stages of nodule development, probably with a profound effect on plant growth and development. An experimental approach at this stage presents some inconveniences, as early-stage nodules are difficult to collect in a sufficient amount for an acceptable protein extraction from symbiosomes. A more plausible alternative approach that we will soon engage is to study the proteome of soybean root tips for deciphering the effect of JD2 strain at the initial step of the microbe-plant interaction.

Among the few up-regulated proteins, we found the up-regulation of the “stem 31 kDa glycoprotein”. This glycoprotein is a cell wall protein down-regulated by flooding stress, and a storage protein found at high levels in the leaves of soybean plants (Komatsu et al. 2010). In addition to the “stem 31 kDa glycoprotein”, Komatsu et al. (2010) also reported the down-regulation of lipoxygenases, germin-like protein precursors, and some oxidoreductases by flooding stress. Salavati et al. (2012) found that, at the transcript level of roots, the expression of the “stem 31 kDa glycoprotein” was down-regulated in a supermodulating plant variety related to a non-nodulating variety, and the expression was intermediate in the normal-nodulating variety. We already showed that the co-inoculation of soybean plants with *B. elkanii* and JD2 strains increases the rate of nodulation and the number of nodules per root (Cagide et al. 2018); thus, our new result also suggests that the “stem 31 kDa glycoprotein” may be involved in regulating the number of nodules and/or the rate of nodulation. Probably this protein is

involved in the endurance to abiotic stresses as well. Based on these reports, we suggest that JD2 strain prepares the plants for potentially stressful situations. In this regard, during failed greenhouse experiments (soybean plants that were not irrigated over a long hot weekend), we noticed that only co-inoculated plants survived. Unfortunately, we did not continue the experiment, and we do not have numerical results. This result encourages us to perform long-term experiments for studying the effect of different abiotic stresses, growing single bradyrhizobia and bradyrhizobia-*Delftia* inoculated soybean plants in greenhouse conditions. These experiments should include the measurement of agronomic parameters and the expression of genes and proteins by qPCR and proteomics analysis.

In addition to the “stem 31 kDa glycoprotein”, we found another protein involved in stress resistance, the “Kunitz trypsin protease inhibitor” (KPI). KPI is a proteinase inhibitor that belongs to the serine protease inhibitors (a multi-gene family) implicated in: protein storage, the regulation of protease activity during germination, and the defense-response to biotic and abiotic stresses, cell death program, growth and development (Rehman et al. 2017). Islam et al. (2017) showed that some members of the KPI family are involved in the endurance to water stress in clover; furthermore, the gene expression of two KPIs (Tr-KPII and Tr-KPI5) increased in response to water deficiency. Interestingly, Manen et al. (1991) showed that a KPI is a nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean.

In our study, we detected the up-regulation of another protein involved in stress resistance, the “proteasome subunit β ” in symbiosome-enriched fractions from co-inoculated plants. The proteasome is the complex that carries out the ubiquitin-dependent and ubiquitin independent selective and efficient hydrolysis of proteins. It plays an important role in controlling basic cellular activities (Tanaka 2009), including the response to different stresses, and thus maintaining the quality of the proper proteome (Mathew and Morimoto 1998). Plants have a mixture of 26S and 20S proteasomes and both proteasome activities are regulated to control plant development and stress responses (Kurepa et al. 2009). In this regard, Ahsan et al. (2010) found that the proteasome subunits (proteasome subunits β type-3-A, β type 6, 9, and β type) were differentially expressed in all tissues of soybean under heat stress. Salavati et al. (2012) and Mohammadi et al. (2012) also reported the regulation of the proteasome subunits. They found an up-regulation of the “proteasome subunit α ” gene in soybean roots from supernodulating plant varieties compared to a non-nodulating variety and, an increase in the expression of the “proteasome β subunit” protein in soybean root under drought stress, respectively. Again, our results suggest that the presence of the JD2 strain may be involved in the endurance of soybean plants and/or nodules to abiotic stresses.

Proteases are involved in plant development and stress endurance; they are also important in cellular protein homeostasis

and recycling of resources, and can function as signaling molecules (Stael et al. 2019). Moreover, metalloproteases (such as the aminopeptidase found in our proteomic study) are involved in nodulation, plastid differentiation, thermotolerance, regulation of root and shoot meristem size, sensitivity to auxin conjugates, and meiosis (Sebastián et al. 2018). Thus, it is not unexpected to find the up-regulation of a protease in the symbiosome-enriched fraction of co-inoculated plants.

Nodules from co-inoculated plants also showed an increase in the production of ferritin, a globular protein complex that forms multiple metal-protein interactions. Ferritin acts as an intracellular iron storage protein, both in prokaryotes and eukaryotes, and regulates iron homeostasis. This protein has been involved in the heat stress response of wheat (Zang et al. 2017), and in the oxidative stress response, growth and development of chickpea (Parveen et al. 2016). Therefore, this protein would be another protein involved in stress endurance.

Among down-regulated proteins in symbiosome-enriched fractions of nodules from co-inoculated plants we found an annexin. Annexins belong to a multi-gene family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins. These proteins are involved in the response to environmental stresses and signaling during growth and development of plants (Saad et al. 2020). The down-regulation of annexins have been associated with an impaired rhizobial infection and nodulation (Carrasco-Castilla et al. 2018). The soybean genome shows at least 23 annexin genes (GmANN1 — GmANN23) with different organ-specific expression patterns that are mainly induced by cold, high salinity and heat-stress of roots (Ahsan et al. 2010; Feng et al. 2013). Working with rhizobial inoculated *Phaseolus vulgaris* plants, Carrasco-Castilla et al. (2018) showed that at least one annexin has an important role in nodule development and functioning. How can we explain the down-regulation of a nodule annexin caused by the presence of JD2 strain? As previously demonstrated, JD2 induces an early nodulation of soybean roots by bradyrhizobia (Cagide et al. 2018). Thus, once the nodules have been established, we could speculate that the annexins involved in the establishment of nodules are not required and, therefore, down-regulated.

Finally, the down-regulation of the plant-derived branched-chain amino acid (LIV for Leucine, Isoleucine and Valine) aminotransferase, an enzyme involved in the final step of LIV biosynthesis, may give light in a change in the pattern of aminoacids used by the bacteroid. The biosynthetic pathway for LIV was down-regulated in the bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, as shown by microarray and RT-PCR (Prell et al. 2009). In addition, the ability to assimilate fixed nitrogen into transferable amino acids, and the amount of enzymes for branched-chain amino acid production, decreased over time in soybean nodules as shown by Strotzman et al. (2018). Thus, the result suggests that nodules from co-inoculated plants are at a different stage of

development when collected after 49 days of growth, as compared with single bradyrhizobial inoculated plants. It also suggests that nodules from co-inoculated plants change their preference for a different set of amino acids. We wonder if the metabolism of LIV has an important role in the establishment of the bacteroid or symbiosome. The expression of genes involved in LIV biosynthesis by qPCR from nodules collected at different stages and in different inoculation conditions will help to answer this question.

In summary, the results showed that the nodules (or symbiosomes) from co-inoculated plants up-regulate proteins involved in abiotic stress endurance, suggesting that the co-inoculation prepared the soybean plant for a potential change from a friendly to an unfriendly environmental condition. The effect of different stress conditions on the proteome of rhizobial strains has been previously reported (Shamseldin et al. 2006; Gomes et al. 2012; Nilsson et al. 2019; among others); however, the effect of flavonoids in the intracellular proteome has not been fully addressed. The effect of the flavonoid naringenin in

the exoproteome of *Rhizobium etli* (the bean microsymbiont) was studied by (Meneses et al. 2017). The authors found that the flavonoid induces the production of proteins involved in symbiosis (adhesins, flagellins, EF-Tu, glycolytic enzymes, etc). Interestingly, Taboada et al. (2019) reported that *R. etli* cultures produce outer membrane vesicles, and that the addition of naringenin to the cultures induces the accumulation of carbohydrate metabolism and transport proteins into the vesicles. Recently, Yu et al. (2020) showed that plant-derived flavonoids enhance the swarming motility and curli of *Pseudomonas fluorescens*, both important phenotypes for root colonization. The authors suggest that the TetR regulator senses the flavonoid, acting as a signaling molecule that supports the mutualistic interaction between plants and non-symbiotic (but beneficial) microorganisms. Interestingly, Okutani et al. (2020) reported that after the treatment of a soybean rhizospheric soil with daidzein there is an enrichment of bacteria belonging to the family Comamonadaceae, suggesting that some members of this family respond to a particular and/or a mixture of isoflavones.

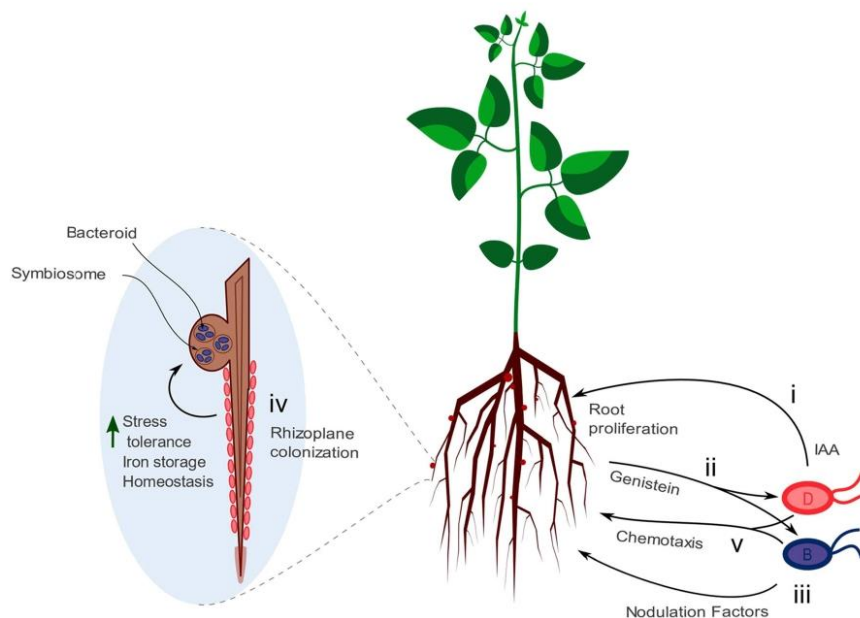


Fig. 1. The microbial-soybean chemical dialog during co-inoculation conditions. A brief description of a few events and molecules (previous and current data) in the *Bradyrhizobium* and *Delftia* co-inoculation process. The following events are shown in the figure: On the right side of the figure - JD2 cells (bacterium marked with a D) produce and secrete the phytohormone indole-acetic acid (IAA, a molecule that induces the root proliferation) (Morel et al. 2015) (i); the plant produces genistein (ii); this flavonoid induces the production of proteins involved in the formation of the Nodulation Factor (NF) by bradyrhizobia cells (bacterium marked with a B) (Morel and Castro-Sowinski 2013) (iii) and, JD2 cells colonize

the rhizoplane (iv) (see Table 1). Genistein also induces the chemotaxis towards the plant in both microbes, *Bradyrhizobium* and *Delftia* strains (v). On the left side of the figure - The NF induces the formation of root nodules, where the bradyrhizobial cells differentiate into bacteroids with the establishment of the symbiosome (Morel and Castro-Sowinski 2013). As a consequence of rhizoplane colonization by JD2 cells (epiphytic behavior) (Morel et al. 2015), the soybean symbiosomes have an up-regulation of proteins involved in stress tolerance and homeostasis (see Table 2).

The results suggest that the co-inoculation does not significantly change the physiology of mature bacteroids.

5 Conclusions and remarks

We showed that the addition of the plant-secreted flavonoid genistein to JD2 cells induces the production of a transcriptional regulator from the family TetR, and a diguanylate cyclase involved in the production of a secondary messenger. These and other proteins found in our study suggest that genistein up-regulates proteins involved in motility, biofilm formation, and colonization, among others, favoring an epiphytic lifestyle. As already shown in the rhizobial-plant interaction (Morel and Castro-sowinski 2013), the flavonoid is probably the first signal in the communication between the plant and the *Delftia* strain (Fig. 1).

As stated in the introduction, we previously showed that the co-inoculation with bradyrhizobial strains and *Delftia* sp. JD2 improves the performance of nodulation and nitrogen fixation of leguminous plants. The current results suggest that the co-inoculation induces the up-regulation of proteins involved in stress endurance, preparing the nodule (or the plant) for a potentially harmful situation (environmental abiotic stress conditions) (Fig. 1). The data obtained during these experiments shed some light on the mechanisms involved in the plant-microbe interaction, but more importantly, it generated more questions to be answered. The results encourage us to face new challenges, the analysis of the symbiotic performance of co-inoculated plants in stress conditions, and the study the molecules from different parts of the plant following transcriptomic, metabolomic, and proteomic approaches.

Acknowledgments This work was financially supported by ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación; Project FMV_1_2017_1_136505) and PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas). S. Castro-Sowinski and María A. Morel are members of the National Research System (SNI, Sistema Nacional de Investigadores). The work of Braulio Riviezi and César X. García was supported by ANII and CAP (Comisión Académica de Posgrado), respectively.

Code availability Not applicable.

Funding This work was financially supported by ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) project FMV_1_2017_1_136505 and PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas).

Data availability The data and materials are shown in the manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

 Springer

References

- Ahsan N, Donnat T, Nouri MZ, Komatsu S (2010) Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. *J Proteome Res* 9:189–204. <https://doi.org/10.1021/pr100504j>
- Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, Faoro H, Pankiewicz VC, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Dixon R, Monteiro RA (2016) Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ Microbiol* 18:2343–2356. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12887>
- Braña V, Cagide C, Morel MA (2016) The sustainable use of *Delftia* in agriculture, bioremediation, and bioproducts synthesis. In: microbial models: from environmental to industrial sustainability. Pp 227–247
- Cagide C, Riviezi B, Minteguiaga M, Morel MA, Castro-Sowinski S (2018) Identification of plant compounds involved in the microbe-plant communication during the coinoculation of soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. strain JD2. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>
- Carrasco-Castilla J, Ortega-Ortega Y, Jáuregui-Zúñiga D, Juárez-Verdayes MA, Arthikala MK, Monroy-Morales E, Nava N, Santana O, Sánchez-López R, Quinto C (2018) Down-regulation of a *Phaseolus vulgaris* annexin impairs rhizobial infection and nodulation. *Environ Exp Bot* 153:108–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.016>
- Chibeba AM, de Fátima Guimarães M, Rodrigues Brito O, Nogueira MA, Silva Araujo R, Hungria M (2015) Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *Am J Plant Sci* 6:1641–1649. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.610164>
- Cilliers M, van Wyk SG, van Heerden PDR, Kunert KJ, Vorster BJ (2018) Identification and changes of the drought-induced cysteine protease transcriptome in soybean (*Glycine max*) root nodules. *Environ Exp Bot* 148:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.005>
- Clement M, Lambert A, Herouart D, Boncompagni E (2008) Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene* 426:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.08.016>
- Cuthbertson L, Nodwell JR (2013) The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:440–475. <https://doi.org/10.1128/mbr.00018-13>
- Dahlstrom KM, O'Toole GA (2017) A symphony of cyclases: specificity in diguanylate cyclase signaling. *Annu Rev Microbiol* 71:179–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093325>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2016) InfoStat version 2016. FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina
- Feng YM, Wei XK, Liao WX, Huang LH, Zhang H, Liang SC, Peng H (2013) Molecular analysis of the annexin gene family in soybean. *Biol Plant* 57:655–662. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0334-0>
- Gomes DF, Batista JS, Schiavon AL, Andrade DS, Hungria M (2012) Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. *BMC Microbiol* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-84>
- Hérouart D, Baudouin E, Frendo P, Harrison J, Santos R, Jamet A, Van de Sype G, Touati D, Puppo A (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiol Biochem* 40:619–624. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01415-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01415-8)
- Herrera LM, Braña V, Franco Fraguas L, Castro-Sowinski S (2019) Characterization of the cellulase-secretome produced by the Antarctic bacterium *Flavobacterium* sp. AUG42. *Microbiol Res* 223–225:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.009>

- Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS (2015) Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*. A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *Am J Plant Sci*. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>
- Islam A, Leung S, Nikmatullah A, Dijkwel PP, McManus MT (2017) Kunitz proteinase inhibitors limit water stress responses in white clover (*Trifolium repens* L.) plants. *Front Plant Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01683>
- Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, Nanjo Y, Furukawa K (2010) Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids* 39: 1435–1449. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0608-1>
- Kuchma SL, Brothers KM, Merritt JH, Liberati NT, Ausubel FM, O'Toole GA (2007) BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189:8165–8178. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-07>
- Kurepa J, Wang S, Li Y, Smalle J (2009) Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal Behav* 4:924–927. <https://doi.org/10.1016/j.psb.4.10.9469>
- Larrazariz E, Wienkoop S, Weckwerth W, Ladrera R, Arrese-Igor C, González EM (2007) *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol* 144:1495–1507. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101618>
- Liu C, Sun D, Zhu J, Liu J, Liu W (2020) The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP: a mini-review. *Front Microbiol* 11:802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>
- Manen JF, Simon P, Van Slooten JC, Osterras M, Frutiger S, Hughes GJ (1991) A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *Plant Cell* 3:259–270. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.3.259>
- Mathew A, Morimoto RI (1998) Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 851:99–111. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08982.x>
- Meneses N, Taboada H, Dunn MF, del Vargas MC, Buchs N, Heller M, Encarnación S (2017) The naringenin-induced exoproteome of *Rhizobium etli* CE3. *Arch Microbiol* 199:737–755. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1351-8>
- Mohammadi PP, Moieni A, Hiraga S, Komatsu S (2012) Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *J Proteome* 75:1903–1923. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.041>
- Morel MA, Castro-Sowinski S (2013) The complex molecular signaling network in microbe-plant interaction. In: Arora NK (ed) *Plant microbe Symbiosis: fundamentals and advances*. Springer India, New Delhi, pp 169–199
- Morel MA, Ubalde MC, Braña V, Castro-Sowinski S (2011) *Delftia* sp. JD2: a potential Cr (VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Arch Microbiol* 193:63–68. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0632-2>
- Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S (2015) The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:134–142. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0229-R>
- Morel MA, Iriarte A, Jara E, Musto H, Castro-Sowinski S (2016) Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng* 3:156–175. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.2.156>
- Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Pérez-Giménez J, Torres Tejerizo GA, Pistorio M (2019) Proteomic analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress. *J Proteome Res* 18:3615–3629. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00275>
- Okon Y, Kapulnik Y (1986) Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 90:3–16. <https://doi.org/10.1007/BF02277383>
- Okutani F, Hamamoto S, Aoki Y, Nakayasu M, Nihei N, Nishimura T, Yazaki K, Sugiyama A (2020) Rhizosphere modelling reveals spatiotemporal distribution of daidzein shaping soybean rhizosphere bacterial community. *Plant Cell Environ* 43:1036–1046. <https://doi.org/10.1111/pce.13708>
- Parveen S, Gupta DB, Dass S, Kumar A, Pandey A, Chakraborty S, Chakraborty N (2016) Chickpea ferritin CaFer1 participates in oxidative stress response, and promotes growth and development. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep31218>
- Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts RJ, Poole PS (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc Natl Acad Sci* 106:12477–12482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106>
- Rehman S, Aziz E, Akhtar W, Ilyas M, Mahmood T (2017) Structural and functional characteristics of plant proteinase inhibitor-II (PI-II) family. *Biotechnol Lett* 39:647–666. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2298-1>
- Riviezzi B, Cagide C, Pereira A, Hermann C, Lombide R, Lage M, Sicardi I, Lage P, Castro-Sowinski S, Morel MA (2020) Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere* 15. <https://doi.org/10.1016/j.rhisp.2020.100219>
- Sakoh M, Ito K, Akiyama Y (2005) Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280:33305–33310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506180200>
- Salavati A, Bushelri AAS, Taleei A, Hiraga S, Komatsu S (2012) A comparative proteomic analysis of the early response to compatible symbiotic bacteria in the roots of a supermodulating soybean variety. *J Proteome* 75:819–832. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.022>
- Sebastián D, Guevara M, Tito F, Virginia T (2018) An overview of plant proteolytic enzymes. Pp 1–19
- Shamseldin A, Nyalwidhe J, Wemer D (2006) A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Curr Microbiol* 52:333–339. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-6472-7>
- Stael S, Van Breusegem F, Gevaert K, Nowack MK (2019) Plant proteases and programmed cell death. *J Exp Bot* 70:1991–1995. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz126>
- Strodtman KN, Frank S, Stevenson S, Thelen JJ, Emerich DW (2018) Proteomic characterization of *Bradyrhizobium diazoefficiens* bacteroids reveals a post-symbiotic, hemibiotrophic-like lifestyle of the bacteria within senescing soybean nodules. *Int J Mol Sci* 19:3947. <https://doi.org/10.3390/ijms19123947>
- Sun Y, Liu Y, Liu X, Dang X, Dong X, Xie Z (2020) *Azorhizobium caulinodans* c-di-GMP phosphodiesterase Chp1 involved in motility, EPS production, and nodulation of the host plant. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:2715–2729. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10404-6>
- Taboada H, Dunn MF, Meneses N, Vargas-Lagunas C, Buchs N, Andrade-Dominguez A, Encarnación S (2019) Qualitative changes in proteins contained in outer membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the nod gene inducer naringenin. *Arch Microbiol* 201:1173–1194. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01682-4>
- Tanaka K (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>
- Tsyganova AV, Kitaeva AB, Tsyganov VE (2017) Cell differentiation in nitrogen-fixing nodules hosting symbiosomes. *Funct Plant Biol* 45: 47–57. <https://doi.org/10.1071/FP16377>

- Tyanova S, Temu T, Cox J (2016a) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11:2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J (2016b) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Ubalde MC, Braña V, Sueiro F, Morel MA, Martínez-Rosales C, Marquez C, Castro-Sowinski S (2012) The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Curr Microbiol* 64:597–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0108-5>
- Volpin H, Kapulnik Y (1994) Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: *Azospirillum/plant associations*. pp. 111–118
- Wenzel M, Lang K, Günther T, Bhandari A, Weiss A, Lulchev P, Szentgyörgyi E, Kranzusch B, Göttfert M (2012) Characterization of the flavonoid-responsive regulator *frrA* and its binding sites. *J Bacteriol* 194:2363–2370. <https://doi.org/10.1128/JB.06567-11>
- Yu XQ, Yan X, Zhang MY, Zhang LQ, He YX (2020) Flavonoids repress the production of antifungal 2,4-DAPG but potentially facilitate root colonization of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Microbiol* 22:5073–5089. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15052>
- Zang X, Geng X, Wang F, Liu Z, Zhang L, Zhao Y, Tian X, Ni Z, Yao Y, Xin M, Hu Z, Sun Q, Peng H (2017) Overexpression of wheat ferritin gene TaFER-5B enhances tolerance to heat stress and other abiotic stresses associated with the ROS scavenging. *BMC Plant Biol* 17:14. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0958-2>
- Zeffa DM, Fantin LH, Koltun A, de Oliveira ALM, Nunes MPBA, Canteri MG, Gonçalves LSA (2020) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ* 8: e7905. <https://doi.org/10.7717/peerj.7905>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Comparative metabolite analysis of *Delftia-Bradyrhizobium* co-inoculated soybean plants using UHPLC-HRMS-based metabolomic profiling

Braulio Riviezz¹ · Guillem Campmajó^{2,3} · Cécilia Cagide^{1,4} · Esther Carrera⁵ · Javier Saurina^{2,3} · Susana Castro-Sowinski^{1,4} · Cristina Olivaro⁶ · Oscar Nuñez^{2,3,7} · María A. Morel^{1,8,9}

Received: 13 August 2021 / Accepted: 19 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Delftia sp. strain JD2 is a soil bacterium that produces auxins and acts as a nodulation-assisting bacterium in legumes inoculated with rhizobia. The co-inoculation of soybean (*Glycine max*) seeds with *Bradyrhizobium elkanii* and JD2 enhances plant growth, nitrogen fixation, and grain yield. This work aimed to characterize bioactive compounds in soybean plants under different inoculation treatments. Metabolomic profiling by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled with High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS) was carried out on freeze-dried rhizospheric exudates and root extracts from hydroponic or greenhouse plants experiments, respectively. The differential metabolomic profiling between treatments was analyzed by pair-wise comparisons. Statistical results showed that both root and rhizospheric samples clustered according to the inoculation treatment and the sampling time of plants. This classification derives from the different production of cinnamic acids, coumarins, benzoic acids, and flavonoids, among other discriminant compounds between treatments. We observed the over-production of *nod* genes inducers in roots from plants inoculated with JD2. In contrast, a reduction in the discriminant flavonoids occurred in co-inoculated plants. JD2 positively influences the production of auxins. These changes in the composition of flavonoids and auxins are likely to explain the differences observed in the growth and nodulation of co-inoculated plants. This study emphasizes some metabolic changes that positively affect the co-inoculation of soybean seeds with bradyrhizobia and JD2.

Keywords Soybean · Metabolomic · Co-inoculation, *Delftia*, *Bradyrhizobium*

1 Introduction

The establishment of the symbiotic process between rhizobia and legumes is precisely and highly regulated, where chemical signals are exchanged between both symbionts and trigger cellular and molecular responses with consequences at the physiological level (Morel and Castro-sowinski 2013). Flavonoid exudation by the legumes' roots towards the rhizosphere is one of the first signals exchanged between the symbionts (Badri and Vivanco 2009). Flavonoids act as chemo-attractants of bacteria towards the plant; they also interact with rhizobial transcriptional factors (NodD) and, afterward, induce the expression of nodulation genes (*nod*) in rhizobia

(Eckardt 2006). The recognition between NodD and the inducer flavonoid(s) is strictly specific (Suominen et al. 2003). The expression of *nod* genes leads to the synthesis of nodulation factors (NF). These are lipoquitoligosaccharides that trigger important signaling events, leading to the deformation of the root hairs, the formation of the infection thread that culminates in the cortex cells, and the formation of the symbiosomes, where the rhizobia cells differentiate into bacteroids and carry out the biological nitrogen fixation (BNF). Several studies have highlighted the involvement of plant hormones in the cortex's response, resulting in cortical cells' division and nodule primordium formation (Oldroyd and Downie 2008). Auxin signaling is crucial to developing lateral roots and nodule structures (Kohlen et al. 2018). Other plant hormones such as cytokinins also play a role in nodule initiation, activating cortical cell division, and leading to the formation of the nodule primordium (Oldroyd 2007). There is strong evidence that both plant hormones

✉ María A. Morel
mmorel@fcien.edu.uy; maria.morel@revetria@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

function in crosstalk, regulating the symbiotic interaction between rhizobium and legume (Boivin et al. 2016).

Soybean (*Glycine max*) plants generally form a symbiosis with *Bradyrhizobium* spp. In this association, plants may obtain 50–60% of the total nitrogen (N) necessary for their growth from the BNF (Salvagiotti et al. 2008). Recently, the co-inoculation of legumes with rhizobia and plant growth-promoting bacteria (PGPB) has gained relevance in the market. This strategy is based on the use of bacteria with multiple plant growth promotion abilities that act synergistically, improving the nutrition and/or the health of crops with a significant enhancement in the final crop yield (Hassen et al. 2016; Santos et al. 2019). Most reports about soybean co-inoculation refer to the combined use of bradyrhizobia and the well-studied bacteria from the *Azospirillum* genus (Benintende et al. 2010; Hungria et al. 2015; Cassán et al. 2020; Rondina et al. 2020). Some *Delftia* strains have also shown significant potential as co-inoculant strains (Perry et al. 2017; Cagide et al. 2018).

Delftia sp. strain JD2, isolated from a heavy metal contaminated soil, is a β -proteobacterium and a member of the family Comamonadaceae (Morel et al. 2009, 2016b; Braña et al. 2016; Jara et al. 2018). JD2 produces siderophores and auxins (indoles) in chemically defined medium supplemented with tryptophan. It promotes the symbiotic associations between *E. meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*), *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* and clover (*Trifolium repens*) and, *B. elkanii* and soybean, in co-inoculation experiments (Morel et al. 2011, 2015; Ubalde et al. 2012; Cagide et al. 2018). *Delftia* sp. JD2 increases the grain yield, root growth, and BNF in co-inoculated soybean plants (Cagide et al. 2018). Interestingly, the single inoculation of these legumes with JD2 does not promote root and shoot growth in the absence of a nitrogen source. Based on these findings, we suggested that this strain stands a good chance to promote legume growth and nodulation through the bacterial production of auxins. This class of plant hormone could be responsible for the root development and earlier nodulation observed in co-inoculation experiments (Morel et al. 2015). Recently, we characterized this tripartite interaction between soybean plants, *B. elkanii*, and *Delftia* sp. strain JD2 by a proteomic analysis performed on the symbiosome-enriched fractions from nodules. Results suggest that JD2 somehow prepares the plant to cope with stressful situations (Riviezzi et al. 2021).

This research aims to study the complex nature of this plant-bacteria interaction more in-depth using a metabolomic approach, with a particular interest in polyphenolic compounds and plant hormones. The experimental design and methodology are based on hydroponic and greenhouse experiments, which allowed us to elucidate what occurs at early stages or advanced stages of plant growth, respectively. With hydroponics, we collected the molecules directly

secreted into the growth medium, mainly at the first days of the plant–microbe interaction, in the sprout stage. We also evaluated the changes in the physiology of roots collected from greenhouse, which let us predict plant responses at vegetative and reproductive stages. The metabolomic analysis was done using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The two major strengths of this metabolomic profiling are the description of specific metabolites involved in the interaction and the analysis of their changes under different plant inoculation treatments. Overall, these changes could explain the growth promotion observed in co-inoculated plants.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains

Delftia sp. strain JD2 (Morel et al. 2011) and the microsymbionts of soybean *B. elkanii* U-1301 and U-1302 were grown in Luria-Bertoni broth (LB; 10 g of tryptone, 5 g of yeast extract, and 10 g of NaCl, per liter) and Yeast Extract Mannitol (YEM) (Vincent 1970), respectively, at 30 °C and 180 rpm. U-1301 and U-1302 are the bradyrhizobia used in commercial formulations for soybean in Uruguay (Riviezzi et al. 2020). Bacterial growth was monitored by measuring optical density at 620 nm.

2.2 Hydroponic experiments and collection of rhizospheric exudates

Hydroponic experiments were conducted to study the communication between plant and bacteria in early stages of the interaction, through the collection and concentration of secreted molecules (plant or bacterial origin) in the hydroponic liquids.

Soybean seeds (GE 590ci) were surface sterilized and pre-germinated in soft agar (0.8%), as described by Cagide et al. (2018). For the hydroponic growth, a modification of the procedure described by Hungria and Araujo (1994) was done: pieces of sterile filter paper (Whatman N°1, Millipore) were folded into packets to support the seedlings and placed in 400-mL glass transparent bottles. The pregerminated seedlings were placed in the absorbent paper, aseptically (3–6 seedlings per bottle). The bottles containing 250 mL of sterile N-free mineral solution (Somasegaran and Hoben 1985) were incubated in a growth chamber (16/8 h of light/darkness, and 18–22 °C). Two days later, the radicles were inoculated with *Delftia* sp. strain JD2 (1×10^6 Colony-Forming Units, CFU per seed) and/or *B. elkanii* U-1301 + U-1302 (1×10^7 CFU per seed, each strain), and each bottle was covered with a new inverted sterile 400-mL glass transparent

bottle (Online Resource 1, Fig. S1). Plants were incubated in the same conditions as above.

The following treatments were performed: i) seedlings co-inoculated with *Delftia* sp. JD2 and *B. elkanii* U-1301 + U-1302 (brady-delftia treatment); ii) seedlings inoculated with *B. elkanii* U1301 + U-1302 (bradyrhizobia treatment); iii) seedlings inoculated with *Delftia* sp. JD2 (delftia treatment) and; iv) non-inoculated, N-free control seedlings (control treatment). Twelve bottles per treatment and three independent experiments were performed. The bacterial viability on the experimental system after inoculation was confirmed by plating on YEM agar and TY with hexavalent chromium [Cr(VI)] as $K_2Cr_2O_7$ (2 mM). The latter was selective for the heavy metals tolerant *Delftia* sp. JD2.

The rhizospheric exudates were obtained as described in Morel et al. (2015). Briefly, the secreted molecules, without discrimination between plant roots or bacterial secreted molecules, were collected from the hydroponic liquid 5, 7, and 15 days after inoculation and filtered through Whatman N°1 cellulose filter paper (Millipore). Then, they were filtered through 0.45 μ m membranes to remove root debris and microorganisms. Filtrates were concentrated by lyophilization and stored at $-20^\circ C$ until further analysis. Roots of soybean sprouts was discarded as they were stuck to the moisture-laden filter paper.

2.3 Root samplings for metabolomic analysis

Pot experiments were conducted to evaluate the growth-promoting effects of JD2 under greenhouse conditions. The ability of *Delftia* sp. strain JD2 to improve biomass production and nodulation during co-inoculation of soybean plants was already shown by Cagide et al. (2018); thus, we focused on the effects of co-inoculation on the physiology of the plants. The root samples collected when performing the greenhouse experiments described in Cagide et al. (2018) were used for root metabolome analysis.

Briefly, surface-sterilized seeds were sown in non-sterile soil/sand/vermiculite (2:2:1) pots (3 seeds per pot, ten pots per treatment). Seeds were inoculated with *B. elkanii* U-1301 + U-1302 (1×10^7 CFU per seed, each strain) and/or *Delftia* sp. JD2 (1×10^6 CFU per seed). Similar treatments as described above (2.2 Hydroponic experiments and collection of rhizospheric exudates) were done, from now on referred to as brady-delftia, bradyrhizobia, delftia, and control treatments. Ten days later, two plants per pot were removed. Plants were grown in greenhouse conditions and harvested at V4 and R2 growth stages (fourth trifoliolate and full flowering, respectively). Nodules from roots collected in stages V4 and R2 were manually extracted. The nodule-free roots were thoroughly rinsed with water, lyophilized, and stored at $-20^\circ C$. For

more details, please see Cagide et al. (2018). Finally, roots were ground with liquid nitrogen and used for the metabolomic analysis.

2.4 Metabolomic profiling analysis

2.4.1 Sample treatment

Before the analysis, both ground roots (0.05 g) and rhizospheric exudates collected 7 and 15 days after inoculation were subjected to ultrasonic-assisted extraction (UAE) with methanol 80%. Thus, samples were suspended in the extracting solvent, stirred in a Vortex mixer (Stuart, Stone, United Kingdom) for 30 s, sonicated on an ultrasonic bath (5510 Branson ultrasonic bath, Hampton, NH, USA) for 10 min, and centrifuged (Rotanta 460 RS Centrifuge, Hettich, Germany) at 4,800 rpm for 15 min. The resulting supernatant was then filtered through a 0.22- μ m nylon filter and stored at $-20^\circ C$ in an injection vial until analysis.

2.4.2 Instrumentation

The methanolic extracts were subsequently analyzed by a metabolomic profiling approach using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The chromatographic separation was performed using an Accela UHPLC modular system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and an Ascentis® Express C_{18} porous shell reversed-phase column (150 mm \times 2.1 mm id, 2.7 μ m particle size; Supelco Bellefonte, PA, USA). Moreover, a binary system of solvents consisting of water and acetonitrile, both acidified with 0.1% (v/v) formic acid, was used to establish the elution gradient described in Barbosa et al. (Barbosa et al. 2020). The mobile phase flow rate and the injection volume were set at 0.3 mL/min and 10 μ L (full-loop mode), respectively. The UHPLC system was coupled to a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Q-Exactive Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) with a heated-electrospray ionization (HESI-II) source operating in negative-ion mode. Nitrogen, purchased from Linde (Barcelona, Spain), was used as the sheath, sweep, and auxiliary gases at flow rates of 60, 0, and 10 a.u. (arbitrary units), respectively. Besides, vaporizer and capillary temperatures were set at 350 and 320 $^\circ C$, respectively; while capillary voltage was established at -2.5 kV and the S-Lens RF level at 50 V. HRMS spectra were acquired in full-scan MS mode (m/z 100–1500) at a mass resolution of 70,000 full width at half-maximum (FWHM, at m/z 200), an automatic gain control (AGC) of 2.5×10^5 , and a maximum injection time (IT) of 200 ms.

2.4.3 Data analysis

All root and rhizospheric exudates samples were randomly analyzed with the pre-defined UHPLC-HRMS method in independent series to avoid the influence of instrumental drifts in the chemometric study. Between 9 and 12 records were obtained for each sample by including biological replicates (multiple individual samples and pools of samples), extraction replicates (repeated extractions of the same biological sample), and instrumental replicates (repeated instrumental analysis of the same biological or technical sample). In addition, a quality control (QC) sample, prepared by mixing 50 μL of each analyzed sample extract, was used to evaluate the validity of the chemometric results and ensure the lack of systematic errors during the sample sequence. Both the QC sample and an extracting solvent blank were periodically injected along the sample sequence.

UHPLC-HRMS raw data were processed using the TraceFinder™ v3.3 software (Thermo Fisher Scientific), which allowed mass detection and peak picking by applying an in-home list of 79 exact masses, mostly corresponding to polyphenolic metabolites (Online Resource 1, Table S1), and establishing certain criteria parameters (i.e., mass errors below 5 ppm and an intensity threshold of 10^5). As a result, raw chromatographic data were converted into a data matrix (one for root analysis and another for rhizospheric exudate analysis) consisting of areas of each peak detected as a function of the retention time (RT) and m/z values, with each row corresponding to a given sample and each column a given feature (RT and m/z).

For the chemometric study, both principal component analysis (PCA) and partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) were performed using the SOLO 8.6 chemometrics software (Eigenvector Research, Manson, WA, USA) for exploratory and classificatory purposes, respectively. While the data matrices obtained after using TraceFinder™ software were employed as the X-data matrix in both cases (autoscaling was applied as data pre-treatment), a Y-data matrix defining each sample class was also used in PLS-DA. Moreover, scatter plots of scores from principal components (PCs) in PCA, and latent variables (LVs) in PLS-DA, were used to study the distribution of samples. Instead, variable importance in projection (VIP) values obtained for the built PLS-DA models were used to select those variables with the greatest influence on the observed samples' distribution, using 1.2 as the cut-off value. The significant changes in the metabolite abundances were evaluated using the Volcano Plot tool of the MetaboAnalyst software (Xia et al. 2009). Fold changes (ratio of the changes between the different conditions) were compared according to samples and treatments. Finally, those variables/metabolites with VIP and fold change values greater than 1.2 and 2.0, respectively, were selected (with a p -value ≤ 0.05).

Quantitative relationships between two blocks of data were sought, so pair-wise comparisons were made between treatments (brady-delftia vs bradyrhizobia treatments; and Control vs delftia treatments).

2.4.4 Polyphenolic identification and quantification

Confirmation criteria to assess the targeted compounds in the analyzed samples included chromatographic RT, accurate mass and the use of phenolic compound standards, whose RT and exact mass were obtained under the same conditions. In this line, the following phenolic compounds were used for the identity confirmation in samples: the flavones luteolin, apigenin and quercetin, and its diglycoside rutin, the isoflavones genistein and daidzein and their glycosides genistin and daidzin, the coumestan isoflavone coumestrol, the flavanol catechin and the phenolic acids *p*-coumaric acid, ferulic acid and 4-hydroxybenzoic acid. A quantitative determination of flavonoids was performed with standards of the isoflavones genistein, genistin, daidzin, luteolin, and coumestrol (0.001–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.4.5 Quantification of plant hormones

Root samples (lyophilized, ground, and stored at 4 °C as described above) and pools of rhizospheric exudate samples (lyophilized material obtained 5 days after inoculation, as described above) were used for phytohormone quantification with three independent biological replicates of each sample or pool of samples. Plant hormones profiles for gibberellins (GAs; as gibberellic acids GA4 and GA1), cytokinins (CKs), including dihydrozeatine (DHZ), isopentenyl adenosine (iP), and tranzeatin (tZ), indole-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) were analyzed. Hormone extraction and analysis were performed at the Plant Hormone Quantification Service (IBMCP, Valencia, Spain), as described by Briegas et al. (2020). Briefly, aliquots of fresh weight lyophilized material were homogenized and suspended in 80% methanol 1% acetic acid (0.05:1, w/v). Deuterium-labeled hormones were used as internal standards ([17,17-2H]GAn, [2H5]IAA, [2H4]SA and [2H6]ABA for quantification of SA, GA, IAA, and ABA; and dhJA for quantification of JA), mixed by shaking during 1 h, at 4 °C and kept at –20 °C overnight.

For fractionation, the extracts passed through HLB (reversed-phase), MCX (cationic exchange), and WAX (ionic exchange) columns (Oasis 30 mg, Waters). The dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile–1% acetic acid, and the hormones separated chromatographically (2.6 μm Accucore RP-MS column, 100 mm length \times 2.1 mm i.d., ThermoFisher Scientific) with a 5–50% acetonitrile gradient. Plant hormone quantification was performed by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry

(UHPLC-MS) using a Thermo Scientific™ Q Exactive™ hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer as indicated above. The concentration of each hormone in the extracts was determined by targeted SIM using embedded calibration curves and the Xcalibur 2.2 SP1 build 48 and TraceFinder software.

Data from plant hormone and flavonoid quantification were subjected to statistical analysis using the InfoStat package (Di Rienzo et al. 2016), with post hoc pairwise comparison based on both Tukey and DGC tests. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$. Statistical comparisons for each plant hormone or flavonoid were done among treatments within each sampling time.

3 Results

3.1 UHPLC–HRMS methanol-soluble metabolite profiling

A metabolomic profiling analysis was performed to investigate the potential discriminant soybean chemical descriptors useful for sample classification based on sample type,

plant growth stage and inoculation treatment. The chromatographic sample raw data were processed using an accurate mass database of specific compounds (Table S1), as described in 2.4.3 (Data analysis). Thus, dimensions of the resulting data matrices were 108 (samples + QCs) \times 121 and 79 (samples + QCs) \times 53 for the root and rhizospheric exudates analysis, respectively. All these UHPLC-HRMS polyphenolic profiles were subjected to PLS-DA.

3.1.1 Analysis of root samples

The PLS-DA scores plot of roots indicated a clear separation of samples in time-dependent growth groups (Fig. 1. A). The independent analysis of each growth stage showed discrimination of samples according to each inoculation treatment (Fig. 1. B and C). Results also revealed a precise classification among root samples, regarding the plant growth stage or sampling time. Furthermore, the bradyrhizobia and brady-delftia treatments clustered separately in roots samples (Fig. S2 in Online Resource 1).

The metabolites responsible for separating root samples from delftia and control treatments (Fig. 1B and 1C) are shown in Table 1. Phenolic acids and carbohydrates were

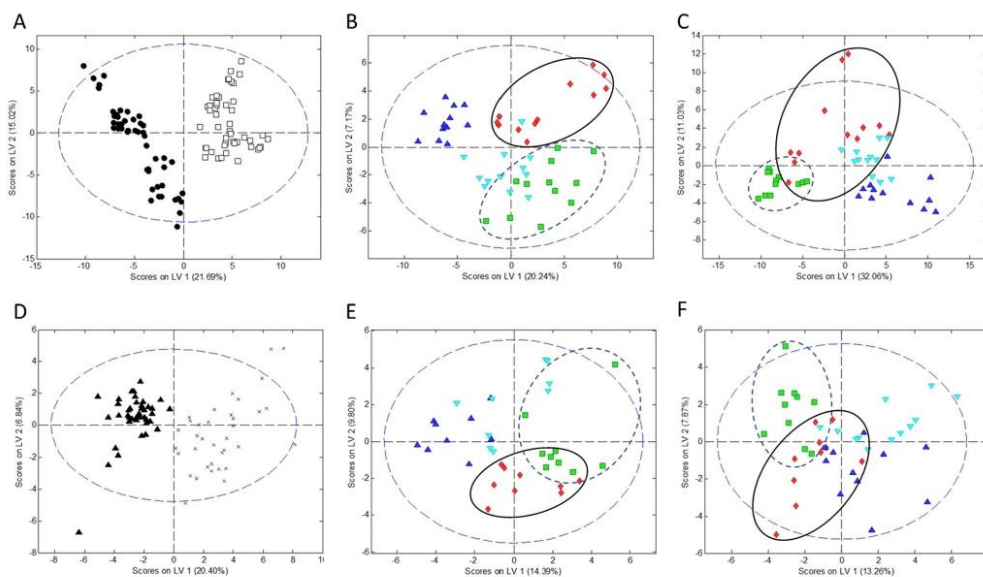


Fig. 1 Partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) scores plots for root (**A**, **B** and **C**); and rhizospheric exudate samples (**D**, **E** and **F**). (**A**), all root samples from both V4 (\square) and R2 (\bullet) growth stages; and (**B** and **C**), root samples from V4 and R2 stages, respectively. (**D**), rhizospheric exudate samples obtained at

both 7 (\times) and 15 (Δ) days after inoculation; and (**E** and **F**), rhizospheric exudates collected at 7 and 15 days after inoculation, respectively. (\blacklozenge) bradyrhizobia, (\blacksquare) brady-delftia, (\blacktriangledown) delftia and (\blacktriangle) control. Elipses indicate samples from brady-delftia (dashed) and bradyrhizobia (solid)

Table 1 Summary of the putative identified root sample metabolites significantly discriminant between plants inoculated with JD2 at V4 and R2 stages and control plants. Metabolites were selected based on the VIP scores obtained from PLS-DA (threshold of 1.15) and significant fold change (FC) ratios (p -value ≤ 0.05). $\log_2(\text{FC})$, expressed in absolute value, describes how much the quantity changes between both treatments. The change direction is expressed as trend arrows

Class ^a	Formula	RT	Presumable soybean metabolite	VIP score	$\log_2(\text{FC})^*$	Trend
V4 growth stage						
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₂ ^c	5.27	Benzoic acid/Salicylaldehyde	1.401	1.013	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₂ ^c	6.37	Benzoic acid /Salicylaldehyde	1.794	2.744	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃ ^c	6.72	Salicylic acid/Dihydroxybenzaldehyde	1.735	2.426	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₈ H ₈ O ₄	7.27	Vanillic acid/Homogentisate	1.212	1.106	↑
Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	5.86	Caffeic acid	1.332	1.602	↑
Phenol/Phenylpropanoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.62	Syringaldehyde/Dihydrocaffeate	1.794	-	A
Hydroxycinnamic acid/Cinnamaldehyde	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	9.04	Ethyl Caffeate/Sinapaldehyde	1.529	-	A
Hydroxycinnamic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	5.92	Sinapic acid	2.471	2.373	↑
Flavonoid (Flavanone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	7.06	Naringenin	1.975	1.552	↑
Flavonoid (Flavanol/Aurone)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ ^c	6.65	Kaempferol/Aureusidin	1.168	2.166	↑
Flavonoid (Flavan-3-ol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ^c	4.88	Catechins	1.973	1.688	↑
Flavonoid (Flavan-3-ol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ ^c	5.58	Catechins	1.519	1.640	↑
Flavonoid (Dihydroflavonol O-glycoside)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	4.55	Dihydrokaempferol 3-O-glucoside	1.335	1.025	↑
Carbohydrate	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.06	Xylose/Arabinose/Ribose/Xilofuranose	2.091	2.783	↑
Carbohydrate	C ₅ H ₁₀ O ₅	1.34	Xylose/Arabinose/Ribose/Xylofuranose	1.642	1.576	↑
Triterpenoid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	14.5	Asiatic acid	1.911	2.279	↑
R2 growth stage						
Flavonoid glycoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.33	Rutin ^b	2.606	2.088	↓
Coumarin	C ₉ H ₆ O ₃	4.53	Umbelliferone/4-Hydroxycoumarin	1.488	1.105	↑
Hydroxycinnamic acid and derivatives	C ₉ H ₁₀ O ₃	5.58	Dihydro <i>p</i> -coumaric acid/Caffeyl alcohol	1.877	-	A
Indole	C ₁₀ H ₉ NO ₂	5.80	Indoleacetic acid	1.824	2.368	↑
Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	5.86	Caffeic acid/Dihydroxycinnamic acid	2.049	1.198	↑
Benzoic acid and derivatives	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.62	Syringaldehyde/Dihydrocaffeic acid	1.574	-	A
Hydroxycinnamic acid/cinnamaldehyde	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	10.53	Ethyl Caffeate/Sinapaldehyde	2.188	1.756	↓
Flavonoid (Flavanol/Aurone)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6.65 ^c	Kaempferol/Aureusidin	1.388	1.387	↑
Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7.36	Isorhamnetin	1.291	1.347	↑
Terpenoid glycoside	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	11.15	Soyasaponin I	1.976	1.212	↑
Triterpenoid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	14.5	Asiatic acid	1.461	2.273	↑
Indole	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	6.00	Tryptophan	1.387	1.070	↓
Carbohydrate	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1.67	Trehalose/Maltose/Cellobiose	1.238	1.469	↓

^a Chemical taxonomy of putative compounds based on the formula and HMDB (www.hmdb.ca) or FooDB (www.foodb.ca) databases.

^b Metabolites with confirmed identity using synthetic standards. ^c 4-hydroxybenzaldehyde (C₇H₆O₂), 4-hydroxybenzoic acid (C₇H₆O₃), luteolin (C₁₅H₁₀O₆), (-)-epicatechin / (+)-catechin (C₁₅H₁₄O₆) at RT of 5.27 and 6.37; 6.72, 6.65 and, 4.88 and 5.58, respectively were discarded by synthetic standards. ^d The green and red arrows indicate up and down trends, respectively in response to JD2-inoculation. A, only detected in plants inoculated with JD2; RT, Retention Time; VIP, variable importance in projection; FC, Fold change

Table 2 Summary of the putative identified root sample metabolites significantly discriminant between co-inoculated plants at V4 and R2 stages, after pair-wise comparison (brady-delftia vs bradyrhizobia treatments). Metabolites were selected based on the VIP scores obtained from PLS-DA (threshold of 1.15) and significant fold change (FC) ratios (p-value ≤ 0.05). $\log_2(\text{FC})$, expressed in absolute value, describes how much the quantity changes between both treatments. The change direction is expressed as trend arrows

Class ^a	Formula	RT	Presumable soybean metabolite	VIP score	\log_2 (FC)	Trend ^d
V4 growth stage						
Benzoic acid and derivatives	C ₈ H ₆ O ₄	6.50	Vanillic acid/Homogentisic acid	2.663	-	A
Hydroxycinnamic acid/Cinnamaldehyde	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	7.40	Ethyl Caffeate/Sinapaldehyde	1.526	-	A
Flavonoid (O-methylated flavonol)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	8.13	Isorhamnetin/Rhamnetin	1.514	1.072	↓
Flavonoid (O-methylated isoflavone)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	12.40	Biochanin A/Glycitein	2.362	1.215	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	6.72	Salicylic acid/Hydroxybenzoic acid/Dihydroxybenzaldehyde/Sesamol	1.546	1.529	↓
Flavonoid/Pterocarpan	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.92	Naringenin/Glycinol	2.526	1.640	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	7.44	Salicylic acid/Hydroxybenzoic acid/Dihydroxybenzaldehyde/Sesamol	1.711	2.442	↓
R2 growth stage						
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₂	5.27	Benzoic acid/Hydroxybenzaldehyde	1.542	1.376	↑
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	1.73	Salicylic acid/Hydroxybenzoic acid/Dihydroxybenzaldehyde/Sesamol	1.225	2.853	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	3.49	4-hydroxybenzoic acid ^b	1.470	2.280	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	5.98	Salicylic acid/Hydroxybenzoic acid/Dihydroxybenzaldehyde/Sesamol	1.212	-	ND
Benzoic acid and derivatives	C ₇ H ₆ O ₃	6.72	Salicylic acid/Hydroxybenzoic acid/Dihydroxybenzaldehyde/Sesamol	1.291	-	ND
Benzoic acids and derivatives	C ₇ H ₆ O ₄	2.36	Dihydroxybenzoic acid/Gallaldehyde	1.359	2.994	↓
Benzoic acids and derivatives	C ₇ H ₆ O ₄	6.89	Dihydroxybenzoic acid/Gallaldehyde	1.267	-	ND
Benzoic acids and derivatives	C ₇ H ₆ O ₄	8.63	Dihydroxybenzoic acid/Gallaldehyde	1.188	1.733	↓
Coumarin	C ₉ H ₆ O ₃	4.53	Umbelliferone/4-Hydroxycoumarin	1.172	1.327	↑
Cinnamaldehyde	C ₉ H ₈ O ₃	5.90	3,4-dihydroxycinnamaldehyde ^c	1.209	1.415	↓
Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	3.71	Caffeic acid/Dydroxycinammic acid	1.237	2.567	↓
Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	5.86	Caffeic acid/Dydroxycinammic acid	1.406	2.522	↓
Benzoic acid and derivatives	C ₉ H ₁₀ O ₅	5.48	Syringic acid/Ethylgallate	1.344	-	ND
Flavonoid (Flavonol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	7.02	Morin ^e	1.161	2.888	↓
Flavonoid (O-methylated flavonol)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	7.36	Isorhamnetin/Rhamnetin	1.395	1.516	↑
Flavonoid glycosides	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	9.32	Genistein/Apigenin glycoside ^c	1.274	3.991	↓
Flavonoid glycosides	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	9.66	Genistein/Apigenin glycoside ^c	1.243	3.158	↓
Flavonoid glycosides	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	3.12	Naringenin 7-O-glucoside/Dihydrogenistin	1.342	2.278	↓
Flavonoid glycosides	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	5.56	Naringenin 7-O-glucoside/Dihydrogenistin	1.304	2.013	↓
Flavanoid (dihydroflavonol O-glycoside)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	4.55	Dihydrokaempferol 3-O-glucoside	1.320	2.322	↓
Flavanoid (Dihydroflavonol O-glycoside)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	6.12	Dihydrokaempferol 3-O-glucoside	1.279	-	ND
Flavonoid (Flavone, Dihydroisoflavone, Chalcone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	10.25	Liquiritigenin/Dihydrodaidzein/Isoliquiritigenin	1.441	1.099	↓
Carbohydrate	C ₄ H ₈ O ₅	1.06	Threonic acid	1.257	-	ND

Table 2 (continued)

^aChemical taxonomy of putative compounds based on formula and HMDB (www.hmdb.ca) or FooDB (www.foodb.ca) databases (www.hmdb.ca). ^bMetabolites with confirmed identity using synthetic standards. ^c*p*-coumaric acid (C₉H₈O₃), quercetin (C₁₅H₁₀O₇) and, genistin (C₂₁H₂₀O₁₀) identities were discarded at RT of 5.9, 7.02 and, 9.32 and 9.66, respectively, using synthetic standards. ^dThe green and red arrows indicate up and down trends, respectively in response to JD2-inoculation. A, only detected in co-inoculated plants; ND, non-detected in co-inoculated plants. RT, Retention Time; VIP, variable importance in projection; FC, Fold change

the main metabolites involved in separating non-inoculated (control treatment) from JD2 inoculated plants. Sixteen and thirteen metabolites were significantly sub- or over-produced in response to the inoculation with JD2 at V4 and R2, respectively (Table 1). Those compounds were mainly hydroxycinnamic acids and derivatives, flavonoids, and benzoic acids and derivatives, highlighting that the association between *Delftia* and soybean has a significant impact in the production of phenolic secondary metabolites from roots.

The sinapic acid and derivatives, metabolites of caffeic acid, and syringic aldehydes accumulated in *delftia* treated roots compared with the control. Some of these compounds were exclusively detected in the so-called *delftia* treatment (Table 1). Flavonoids also over-accumulated in roots from plants at the V4 stage. We also observed an increased production of the isoflavonoid precursor naringenin in soybean roots from *delftia* treatment

(Table 1). Among the discriminant compounds found between root samples of *delftia* and control treatments, we found that the phytohormone IAA over-accumulated and, its biochemical precursor tryptophan sub-accumulated in root samples from *delftia* treatment at the R2 stage (Table 1).

The clear separation between samples (either root or rhizospheric exudates) of brady-*delftia* and bradyrhizobia treatments is shown in Fig. S2. Seven and 23 discriminant metabolites were found in root samples from brady-*delftia* and bradyrhizobia treatments at V4 and R2 growth stages, respectively (Table 2). Most of them were sub-produced in roots from brady-*delftia* treatment. All the compounds tentatively identified within the flavonoid class were sub-produced or not detected in root samples from this treatment at both growth stages, except isorhamnetin/rhamnetin, which was over-produced (Table 2).

Table 3 Summary of the putative identified rhizospheric exudate sample metabolites significantly discriminant between plants at 7 and 15 days after inoculation, after pairwise comparison (*delftia* vs control treatments and brady-*delftia* vs bradyrhizobia treatments). Metabolites were selected based on the VIP scores (threshold of 1.15)

Sampling days*	Class ^a	Formula	RT	Presumable soybean metabolites	VIP score	log ₂ (FC)	Trend ^d
<i>delftia</i> vs control							
7	Flavonoid (Flavone, Dihydroisoflavone, Chalcone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	10.08	Liquiritigenin/ Dihydrodaidzein/ Isoliquiritigenin	2.045	1.839	↑
	Flavonoid (Isoflavone)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	9.65	Daidzein ^b	1.756	1.423	↑
	Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	9.67	Hydroxycinnamic acid ^c	2.393	1.174	↓
15	Hydroxycinnamic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	8.07	Sinapic acid	2.135	-	ND
	Hydroxycinnamic acid and derivatives	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	8.18	Ethyl Caffeate/Sinapaldehyde	1.951	-	A
	Flavonoid glycoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	13.37	Glycoside of daidzein or Genistein/Hispidol ^c	1.975	1.218	↓
brady-<i>delftia</i> vs bradyrhizobia							
7	Hydroxycinnamic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	8.55	<i>p</i> -Coumaric/Cinnamic acid derivatives	3.027	1.238	↓
15	Flavonoid (Isoflavone glycoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	11.39	Sissotrin/Glycitin	2.096	1.781	↓
	Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₄	9.67	Hydroxycinnamic acid ^c	2.123	2.951	↑

^aChemical taxonomy of putative compounds based on formula and HMDB (www.hmdb.ca) or FooDB (www.foodb.ca) databases (www.hmdb.ca). ^bMetabolites with confirmed identity using synthetic standards. ^ccaffeic acid (C₉H₈O₄) and daidzein 7-O-glucoside were discarded at RT of 9.67 and 13.37, respectively, by synthetic standards. ^dThe green and red arrows indicate up and down trends, respectively in response to JD2-inoculation. A, only detected in JD2-inoculated plants; ND, non-detected in JD2-inoculated plants. *Days after the inoculation of plants; RT, Retention Time; VIP, variable importance in projection; FC, Fold change

3.1.2 Analysis of rhizospheric exudates

A good sample classification was also obtained for rhizospheric exudate samples, as shown in Fig. 1D; samples also clustered in a time-dependent manner. Similarly, the independent analysis of each collection time showed a separation of rhizospheric exudate samples into clusters that comprise each inoculation treatment (Fig. 1E and F). Rhizospheric exudate samples from bradyrhizobia and brady-delftia treatments grouped separately (Fig. S2 in Online Resource 1).

These results suggest that the presence of JD2 affects the root metabolome and the secretion of molecules significantly. The analysis of loadings obtained from PLS-DA revealed the most discriminant variables among samples. Some of them were tentatively identified by comparison with the previously created database. Characteristic metabolites were selected by comparing treatments by pairs: (i) delftia vs. control, and (ii) brady-delftia vs. bradyrhizobia (as specified in 2.4.3. Data analysis) within each type of sample.

The discriminant metabolites responsible for the separation of rhizospheric exudates between delftia and control treatments included hydroxycinnamic acids and some flavonoids with pivotal roles in establishing the nodule (Table 3). Liquiritigenin was also an isoflavonoid precursor over-produced in rhizospheric exudates obtained 7 days after inoculation (Table 3). Interestingly, the daidzein aglycone (a *nod* genes-inducer flavonoid) over-accumulated in the plant rhizosphere from delftia treatment at 7 days after inoculation. A reduction in its glycoside form was observed in the rhizosphere samples collected 15 days after inoculation (Table 3). We also observed that the content of SA and related compounds decreased in roots from delftia treatment (Table 1).

Only three metabolites were found as discriminant compounds in rhizospheric exudates from brady-delftia and bradyrhizobia treatments, based on a statistically significant fold-change (p -values ≤ 0.05). A hydroxycinnamic acid, probably the *p*-coumaric or a cinnamic acid derivative,

was found sub-accumulated in exudates from co-inoculated plants, 7 days after inoculation (Table 3). On the other hand, the sub-accumulation of an isoflavone glycoside (glycitin or sissotrin) and an over-accumulation of another hydroxycinnamic acid were observed in rhizospheric exudate samples of co-inoculated in relation to bradyrhizobia-inoculated plants, 15 days after inoculation (Table 3).

3.2 Quantification of plant hormones and flavonoids

As flavonoids and phytohormones are deciding molecules in the legume-rhizobia symbiosis, they were quantified on root and rhizospheric exudate samples, as described above.

3.2.1 Analysis of root samples

The quantitative chemical analysis of flavonoids from roots collected at V4 and R2 stages showed few differences among treatments (Table 4). Notwithstanding, at the R2 stage, root samples from the control treatment presented a higher accumulation of genistein rather than the other treatments. The concentration of genistin and daidzin was also higher in control rather than in brady-delftia treatments (Table 4). Luteolin was not detected in root samples.

Several differences were estimated among root samples regarding phytohormones involved in the regulation of the plant development, such as the auxins IAA, the cytokinins iP, DHZ, tZ, and the gibberellins GA1 and GA4. Likewise, ABA, JA, and SA, frequently involved in plant stress regulation, were also analyzed.

Among the first group, we did not find differences in the cytokinin iP content between bradyrhizobia and brady-delftia treatments at V4; although, there was a significant difference with the delftia treatment. Compared with bradyrhizobia, we observed an increase of IAA and tZ in roots from brady-delftia

Table 4 Concentration (ng/g) in root samples of some polyphenols relevant in plant-legume interaction. Different letters in each column indicate a significant difference among treatments within the same growth stage ($p \leq 0.05$)

Treatment, growth stage	Coumestrol	Daidzin	Genistein	Genistin	Luteolin
V4					
control	39.4 ± 20 b	78.1 ± 30 a	19.4 ± 20 a	687.6 ± 220 a	ND
delftia	124.4 ± 50 a	109.8 ± 50 a	19.5 ± 10 a	922.6 ± 360 a	ND
bradyrhizobia	204.4 ± 150 a	67.0 ± 20 a	30.2 ± 10 a	593.4 ± 200 a	ND
brady-delftia	151.8 ± 60 a	79.2 ± 40 a	29.1 ± 20 a	698.3 ± 220 a	ND
R2					
control	283.5 ± 40 a	122.4 ± 20 a	40.7 ± 10 a	1520.7 ± 390 a	ND
delftia	264.4 ± 90 a	84.4 ± 40 b	24.6 ± 10 b	1361.1 ± 390 a	ND
bradyrhizobia	270.3 ± 60 a	50.4 ± 30 b	22.2 ± 10b	932.6 ± 740 b	ND
brady-delftia	262.0 ± 80 a	74.0 ± 50 b	13.5 ± 10 c	866.2 ± 630 b	ND

ND. Not detected. V4 and R2, vegetative and reproductive stages

Table 5 Plant hormones concentration (ng/g) in rhizospheric and root samples. Different letters in each row indicate a significant difference among treatments within the same sampling time ($p \leq 0.05$). GA4 andGA1, Gibberellic acids; ABA, Abscisic acid; JA, Jasmonic acid; SA, Salicylic acid; IAA, Indol-acetic acid; DHZ, Dihydrozeatine; *iP*, isopentenil adenosine; *tZ*, tranzeatin

Treatment, growth stage	GA4	GA1	ABA	JA	SA	IAA	DHZ	<i>iP</i>	<i>tZ</i>
5 days after inoculation rhizospheric exudates									
control	0.1±0.0 b	0.2±0.0 b	38.2±8.2 b	3.3±0.4 b	2078.4±612.8 a	74.9±24.4 b	0.3±0.1 b	0.5±0.2 b	0.3±0.2 b
delftia	0.1±0.0 b	0.4±0.0 a	33.9±17.7 b	3.3±2.0 b	2316.8±421.6 a	192.2±237.2 b	0.1±0.0 b	0.2±0.0 b	0.2±0.0 b
bradyrhizobia	0.4±0.1 a	0.3±0.0 a	88.8±62.0 a	14.5±5.9 a	557.6±383.7 b	3094.2±601.0 a	0.8±0.3 a	3.0±1.0 a	0.5±0.4 a
brady-delftia	0.21±0.0 b	0.4±0.1 a	39.4±22.2 b	13.1±5.5 a	351.5±32.9 b	1638.5±1914.5 a	0.3±0.1 b	1.4±1.6 b	0.3±0.2 b
V4 roots*									
delftia	0.4±0.1 b	0.4±0.1 a	257.0±18.2 b	903.7±776.5 b	162.8±78.3 a	127.7±44.38 a	1.2±0.6 b	2.7±1.1 a	0.3±0.1 a
bradyrhizobia	0.2±0.0 c	0.3±0.0 a	268.8±26.4 b	467.8±405.2 b	148.5±48.1 b	100.5±40.52 b	1.4±0.3 a	2.2±2.7 b	0.2±0.1 b
brady-delftia	0.8±0.1 a	0.1±0.0 b	487.0±111.0 a	2351.0±619.1 a	149.2±62.4 b	134±32.68 a	1.0±0.6 b	2.1±0.8 b	0.3±0.1 a
R2 roots									
control	0.1±0.0 c	0.2±0.0 b	156.1±23.5 b	3998.2±132.7 a	1077.1±125.4 ab	74.9±3.2 b	0.7±0.3 b	1.9±0.1 b	0.2±0.0 b
delftia	0.5±0.2 b	0.3±0.2 b	330.5±115.9 a	2745.1±590.3 b	1674.4±959.5 a	118.5±72.3 a	1.5±1.0 b	1.7±0.6 b	0.3±0.1 b
bradyrhizobia	1.2±0.2 a	0.5±0.2 a	407.2±69.9 a	2566.5±442.4 b	1019.6±541.8 ab	74.4±16.9 b	2.3±1.6 a	4.2±0.3 a	0.3±0.1 b
brady-delftia	0.2±0.0 c	0.5±0.0 a	495.5±163.2 a	1477.8±762.1 c	402.9±180.3b	126.7±97.0 a	3.4±0.4 a	1.7±0.9 b	0.5±0.1 a

*Control root samples at V4 were insufficient to fulfill all the metabolomic's needs

and delftia treatments. Brady-delftia treatment presented the lowest level of GA1 and the highest of GA4 (Table 5).

Within stress-related phytohormones, bradyrhizobia and brady-delftia treatments showed no differences in the SA content, although there was a significant difference with delftia treatment. JA levels were 2.5-fold and fivefold higher in brady-delftia rather than in delftia and bradyrhizobia treatments, respectively. Also, a ca. twofold increase in ABA levels was observed in brady-delftia treatment (Table 5).

At the R2 stage, we found a significant statistical difference in the accumulation of IAA in brady-delftia and delftia root samples as compared with the bradyrhizobia and control treatments, which agrees with the metabolomic profiling analysis shown in Sect. 3.1. A 1.7-fold increase in this auxin accumulation was observed between brady-delftia /delftia and bradyrhizobia/control (Table 5). Higher levels of GA1 and DHZ were detected in brady-delftia and bradyrhizobia treatments, without differences among them. Samples from brady-delftia presented significantly higher cytokinin *tZ* levels compared to the rest of the inoculation treatments.

The hormone JA, involved in stress plant endurance, increased 2.70-, 1.5- and 1.45-fold in control plants compared to brady-delftia, delftia, and bradyrhizobia treatments, respectively (Table 5). The accumulation of SA, in roots at R2, agreed with the results observed when we analyzed the differentially produced metabolites showed in Table 2.

3.2.2 Analysis of rhizospheric samples

Unfortunately, the remarkable low signals observed in the chromatograms did not allow us the quantification of the flavonoids present in the rhizospheric exudates.

Among rhizospheric exudates collected 5 days after inoculation, the gibberellin GA1 was detected at the lowest concentration in control plants. The highest cytokinins (DHZ, *tZ*, and *iP*) concentrations were determined in bradyrhizobia treatment. The concentration of IAA was extremely variable in exudates, even within each treatment. The statistical analysis ($p \leq 0.05$) did not show differences in the IAA concentration between brady-delftia and bradyrhizobia treatments, neither between control and delftia; although the concentration of this hormone was higher in brady-delftia and bradyrhizobia roots rather than in the two other treatments (Table 5).

The results about the identification of hormones, involved in plant stress response, results showed some interesting features. The concentration of JA and SA showed opposite trends at early stages of the symbiosis establishment. While the JA concentration was similar in brady-delftia and bradyrhizobia and higher than in delftia and control treatments, the concentration of SA was higher in delftia and control rather than in brady-delftia and bradyrhizobia treatments (Table 5). The highest ABA concentration was observed in bradyrhizobia and no differences in its levels were detected among control, brady-delftia, and delftia treatments.

4 Discussion

At a first glance, we detected a clear growth time- and inoculation treatment-dependent separation between samples, within both soybean roots and rhizospheric exudates (Fig. 1). The phenolic compounds responsible for the discrimination between inoculation treatments were mainly

hydroxycinnamic, benzoic acids, and flavonoids. Several previous reports showed that the inoculation with PGPB enhances the phenolic content (specially hydroxycinnamic and benzoic acids) in plants (Benhamou et al. 2000; Singh et al. 2003; Compant et al. 2005; Mishra et al. 2006; Ait Barka et al. 2006; Walker et al. 2011, 2012; Chamam et al. 2013). This group of secondary metabolites has diverse roles in plants, such as structural support, protection against ultraviolet radiation (acting as antioxidant molecules), and biotic or abiotic stress protection. Phenolic compounds include flavonoids, simple phenolic acids, coumarins, tannins, cinnamic acids, among many others widely found in plants.

During the interaction between plants and microbes, phenolic compounds play important roles in stimulating or inhibiting the growth and/or the physiological activity of rhizospheric microbes (Kape et al. 1991; Weston and Mathesius 2013). These compounds represent a potential source of carbon, and they act as strong chemoattractants and screening bacteria by the ability to degrade them (Chan 1986; Seneviratne and Jayasinghearachchi 2003). In legume-rhizobia symbiosis, flavonoids also play a vital role inducing the expression of rhizobial *nod* genes, affecting the production of the Nod Factor and, subsequently, inducing the nodule formation (Shaw et al. 2006; Morel and Castro-sowinski 2013). Interestingly, we recently reported that genistein up-regulates proteins from JD2 cells involved in chemotaxis (Riviezzi et al. 2021). Herein, we found differences in the dynamic of discriminant metabolite depending on the presence of bradyrhizobia on seeds. While roots from bradydelftia treatment sub-produced most of the discriminant metabolites (Table 2); in non-nodulated plants (delftia and control treatments), the plant over-produced phenolic compounds and carbohydrates to rescue root-nodulating bacteria from their surroundings (Table 1).

4.1 How does the single inoculation of soybean with *Delftia* sp. JD2 modify the profile of metabolites on plant samples?

Several phenolic metabolites (flavonoids, hydroxycinnamic and benzoic acids) were discriminant because of delftia inoculation in soybean roots and rhizospheric exudates samples, suggesting that JD2 changes the pattern of chemicals produced in both types of samples. Similarly, phenolic acids and flavonoids were also the most discriminant secondary metabolites found in rice samples when inoculated with *Azospirillum* strains (Chamam et al. 2013). The root exudation of specific flavonoids is a mechanism by which legumes search for compatible strains. Meanwhile, compatible rhizobia and non-rhizobial PGPB may elicit changes in the composition and the level of flavonoids exuded by legumes (Shaw et al. 2006; Morel et al. 2012).

Interestingly, we found that the increase in the level of naringenin and liquiritigenin in delftia treatment was responsible for the separation of rhizospheric exudates as compared with the control treatment. This increase could be linked to their participation in isoflavonoid biosynthesis, a class of flavonoids almost restricted to legume plants (Jung et al. 2000). The over-accumulation of naringenin in roots and liquiritigenin (or isoliquiritigenin) in rhizospheric exudates is relevant since naringenin and liquiritigenin are converted into the isoflavones genistein and daidzein, respectively (Jung et al. 2000; Velazquez et al. 2010). In this regard, the daidzein aglycone over-accumulated in the rhizosphere of plants inoculated with JD2. Both aglycone and glycoside chemical forms of genistein and daidzein are active *nod* genes inducers (Morel et al. 2016a). Our findings provide strong evidence to support the hypothesis that the biosynthesis of specific flavonoids in roots and their release into the rhizosphere are involved in the increase of the nodulation parameters observed in soybean co-inoculated with JD2 (Cagide et al. 2018).

As delftia and control treatments do not face a nodulation process, the synthesis of flavonoids and many other phenolic compounds could be linked to plant defense and allelopathy (Shaw et al. 2006; Velazquez et al. 2010). The accumulation of hydroxycinnamic and benzoic acids in plants is also related to a plant defense response, which could be linked to cell walls' strengthening (Zaprometov 1988; dos Santos et al. 2008; Zanardo et al. 2009; Bubna et al. 2011; Salvador et al. 2013). A series of root lignification biomarkers (sinapic acid and derivatives, metabolites of caffeic acid, and syringic aldehydes) accumulated in roots tissues of JD2-inoculated plants when compared with non-inoculated ones (control treatment). Furthermore, some of them appeared only in roots from delftia treatment (Table 1). Although lignification is essential for plant growth, several authors have shown a negative correlation between lignification and root growth in non-inoculated soybean plants (Baziramakenga et al. 1994; dos Santos et al. 2008; Zanardo et al. 2009; Bido et al. 2010; Bubna et al. 2011; Lima et al. 2013; Salvador et al. 2013). Unlike the cited reports, our results suggest that these phenolic compounds may have other roles. Even more, our previous studies on soybean show that the single inoculation with JD2 does not affect root growth (Cagide et al. 2018).

Herein, the most stressful condition for plants from delftia and control treatments could be the N deficiency (we did not N-fertilize the plants). In field conditions, the soil N should be enough to satisfy the plant N-requirement in the first vegetative stages. Still, at R3-R6 stages, an external source of N is probably needed for plants. The N deficiency could be ascribed as the stressful condition (nutrient limitation) in our greenhouse experimental conditions, concerning control and delftia treatments. However, in previous reports, the single inoculation with JD2 on soybean plants modified neither

root biomass nor total N contents of plants at the R2 stage in comparison with non-inoculated plants. Still, it promotes a higher grain yield in comparison to the control treatment (Cagide et al. 2018).

Our results showed that IAA over-accumulated in root samples of plants inoculated with JD2 (delftia treatment) at the R2 stage. At the same time, we detected a reduction in the concentration of tryptophan, the biosynthetic precursor of IAA (Table 1). Both results suggest an active auxin production, at least by plants as we did not confirm the capacity to produce IAA specifically by JD2. In the same way, an increased accumulation of IAA was detected in rhizospheric exudates from alfalfa plants inoculated with delftias (Morel et al. 2015). The accumulation of IAA in roots of plants inoculated with delftias at reproductive stages might represent an adaptation of the plant, which needs to explore for more substrate to satisfy its N demand. Thus, the bacterial produced auxins could support the auxins pool required for plant growth and root development (and soil exploration), mainly at reproductive stages.

4.2 What is the effect of the co-inoculation on the metabolite profiling of roots and exudates?

The co-inoculation and inoculation with bradyrhizobia treatments are different scenarios that imply the establishment of rhizobia-legume symbiosis. It is already known that the presence of *Delftia* sp. JD2 affects nodule formation, N₂ fixation, and, lastly, grain yield (Cagide et al. 2018). How can we explain this phenotype? We found a reduction in p-coumaric acid ethyl ester and an increase in hydroxycinnamic acid in rhizospheric exudate samples from co-inoculated plants (Table 3). An isoflavone glycoside (glycitin or sissotrin) that may act as an inducer of nodulation genes of *Bradyrhizobium* species (Smit et al. 1992) was the single discriminant flavonoid between rhizospheric exudate samples of brady-delftia and bradyrhizobia. It is intriguing how the reduction in some flavonoid levels determines the increased performance in nodulation and growth of co-inoculated plants, especially at the early stages of the interaction, as evaluated in rhizospheric exudates.

Several discriminant phenolic acids were detected in roots from co-inoculated plants at vegetative stages (Tables 3 and 2); interestingly, some phenolic acids may either stimulate or repress nodulation. Some phenolic acids can induce *nod* genes expression in a broad host range of rhizobial strains (Peters and Verma 1990). At V4, the co-inoculated plants showed visible nodules (Cagide et al. 2018). At this point, phenolic acids could act as a modifier of the legume-rhizobia symbiosis, as proposed by Seneviratne and Jayasinghearachchi (2003). The authors found that high concentrations of coumaric acid stimulate the N₂ fixation in *B. elkanii*-soybean symbiosis (Seneviratne and Jayasinghearachchi 2003). However, most phenolic

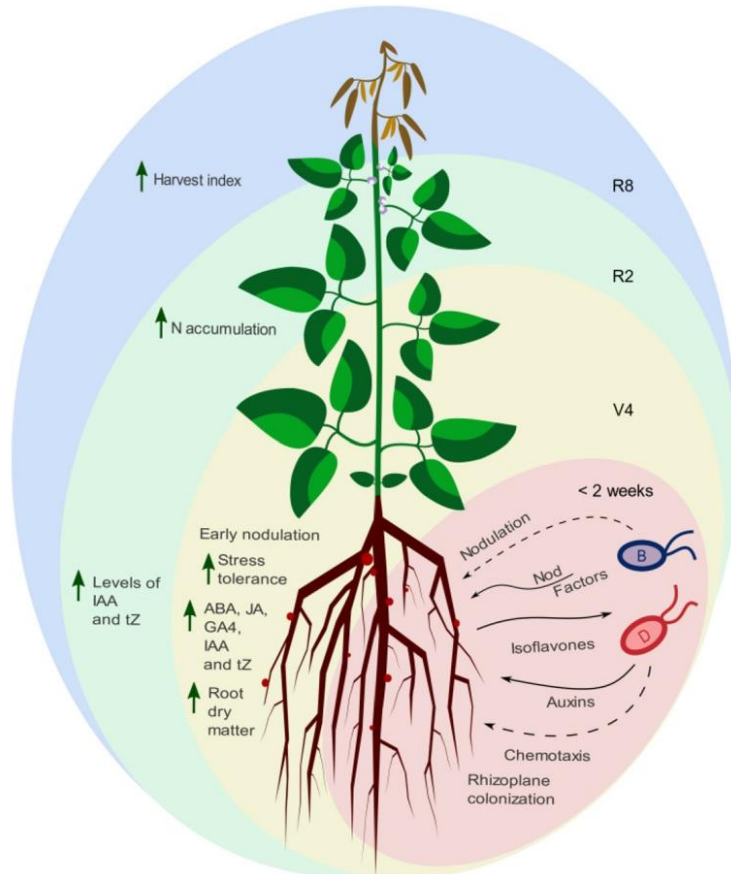
compounds that explain the difference between co-inoculated and bradyrhizobia inoculated plants were sub-produced in roots (Table 2). Furthermore, our current findings showed a decrease in specific flavonoids produced by brady-delftia roots in relation to bradyrhizobia treatment, suggesting an active biotransformation of flavonoids in the presence of JD2, thus changing the flavonoid composition of the rhizosphere towards a new balance of compounds.

Besides, we did not find differences in the composition of *nod*-genes inducers (daidzein, genistein, genistin, and coumestrol) at V4, among all treatments. The nodulation is already established at V4 and nearly at its maximum at the reproductive stage; thus, the co-inoculated plants do not need an active inducing-flavonoid production in either of these growth stages. The co-inoculation of plants leads to earlier nodulation and a higher accumulation of N in leaves, which is essential in the final stages of seed development, near the point of their physiological maturity (Cagide et al. 2018). Our data also shows that a particular compound, the umbelliferone, accumulated in roots from inoculated or co-inoculated plants at the R2 plant stage. This compound is a potential product of the degradation of the *nod*-genes inducer flavonoids (Rao and Cooper 1995).

We also found other compounds that explain the agronomic features displayed by co-inoculated plants in greenhouse conditions as previously reported (Cagide et al. 2018). For example, the allelochemical roles of caffeic, ferulic, p-coumaric, vanillic acids, coumarin, catechin, rutin, quercetin, gallic acid, and kaempferol have been reported (Weston and Mathesius 2013; Favaretto et al. 2015). Some of these compounds were discriminant in our metabolomic analysis of plant roots, including kaempferol and rutin. The presence of potential allelochemical metabolites varied in abundance according to the inoculation treatment. We detected a lower concentration of these compounds in brady-delftia treatment; therefore, allelochemicals could be prioritized in future analysis. Our results suggest that plants distinguish an associative interaction from a pathogenic invasion when JD2 is present in the rhizoplane; this is also supported by our previous proteomic analysis in which the symbiosome-enriched fraction of nodules collected from brady-delftia treatment did not over-produce proteins involved in defense (Riviezzi et al. 2021).

It is well known that SA, as well as JA and ABA, have well-defined roles in plant defense (Pieterse et al. 2009; García-Gutiérrez et al. 2013; Jiang et al. 2020). SA synthesis is induced upon pathogen infection (van Loon et al. 1998; Loake and Grant 2007), but its role in legume nodulation is not well understood (Ferguson and Mathesius 2014). For example, in soybean, Lian et al. (2000) showed that SA has negative effects on seedling development in a concentration-dependent way, and it can alter the N nutrition of plants. SA inhibits the rhizobial production of Nod factors, reduces the

Fig. 2 Temporal representation of the main changes observed during the soybean—*B. elkanii*—*Delftia* sp. JD2 interaction as compared with the single bradyrhizobial inoculation. At the early stage (< 2 weeks), the rhizoplane is colonized by JD2 and bradyrhizobia; isoflavones and other metabolites from root exudates induce chemotaxis towards the root. Isoflavones also induce the expression of *nod* genes (Nodulation Factor—NF—synthesis by bradyrhizobia). JD2 produces auxins that could contribute to the pool of this phytohormone available for the plants, inducing root growth. At V4 stage, the co-inoculation of plants promotes their nodulation (higher number of nodules and earlier nodulation). At R2 stage, the higher levels of ABA, JA and, potential allelochemicals (see Table 2) suggest that plants distinguish a beneficial interaction from a pathogenic invasion, as indicated in Riviezzi et al. (2021). The increase in auxins and cytokinins levels would explain the improved performance of soybean plants, evidenced by significantly higher plant growth and biological nitrogen fixation at R2 and the greater grain yield at R8 compared with single inoculation (Cagide et al. 2018)



number of nodules, and decreases the photosynthetic rates (Lian et al. 2000). The roles of JA and ABA in legume-rhizobia interactions depends on the legume, among other factors, and they have positive and negative roles as reported (Ferguson and Mathesius 2014). ABA positively affects nodulation and BNF mainly due to its role in assisting during an abiotic stress condition, affecting plant growth under stress (Palma et al. 2014). Herein, we found that the stress related phytohormone ABA was produced differentially, and it was higher in bradyrhizobia than in brady-delftia treatments, at an early stage of the interaction (5 days after inoculation). In roots, however, ABA levels were higher in brady-delftia rather than in bradyrhizobia, at the V4 stage. This agrees with the finding of an upregulation of proteins involved in stress tolerance in soybean symbiosomes of co-inoculated plants at V4 stage (Riviezzi et al. 2021).

On the other hand, JA levels increase in brady-delftia treatment at V4 and decrease at R2, when compared with bradyrhizobia treatment. Mabood and Smith (2005) showed that JA induces the expression of the *nod* genes in *B. japonicum* and also induces the nitrogen fixation process. In agreement, the increase of the Nod Factor production in *B. japonicum* was also reported in response to JA (Mabood et al. 2006). This concurs with the finding of a greater nodulation in co-inoculated plants at V4 stage and an established and effective BNF at R2 (Cagide et al. 2018).

CKs are required for root nodule symbiosis (Liu et al. 2018), as well as auxins, which regulate nodule development and nodule initiation (Lin et al. 2020). van Zeijl et al. (2015) and Reid et al. (2016) showed that the addition of the Nod factor or the presence of rhizobia induce the production of iP and tZ in *M. truncatula* and *Lotus japonicus*, respectively.

We found an increase in the concentration of IAA and tZ in roots from brady-delftia as compared with brady treatment at V4 and R2. Other CKs like DHZ and iP showed lower levels in brady-delftia rather than in bradyrhizobia treated plants, at V4 and R2, respectively. Lin et al. (2020) proposed a balanced antagonism in the auxin and CK effects (promotion of the infection and inhibition of epidermis infection, respectively). Therefore, both plant hormones affect nodule initiation and organogenesis. Auxins accumulate in infected root hairs, and the cortex and pericycle of young nodules (Lin et al. 2020), such as those of brady-delftia plants at V4 (the only treatment with visible nodules at this stage). They also accumulate in the vasculature and apex of mature nodules, such as nodules from brady-delftia plants at R2 (Cagide et al. 2018).

Based on our findings, the co-inoculation with an auxin-producing bacterium would change the plant hormone homeostasis, affecting the symbiotic result. Even though some *Bradyrhizobium* spp. can produce IAA (Torres et al. 2018), the experimental design used in this work allows us to credit the changes in the metabolome of co-inoculated plants to the presence of JD2. We previously showed that JD2 produces auxins in culture medium by the Salkowsky method (Morel et al. 2011) but did not confirm the IAA production by JD2 yet. We can argue that the auxins produced by JD2 may support the high level of IAA detected at the V4 and R2 stage. Undoubtedly, the production of IAA by JD2 should be confirmed by chromatographic approaches, and future work will focus on the study of some biochemical characteristics related to auxins metabolism in *Delftia* by high-performance liquid chromatography (HPLC)-MS and/or the generation of auxins mutants.

5 Conclusion

Our previous reports showed that the co-inoculation of soybean plants with *Delftia* sp. JD2 and bradyrhizobia increases nodulation and root growth by the regulation of some metabolites and proteins (Cagide et al. 2018; Riviezzi et al. 2021). Herein, the effect of co-inoculation of soybean on plant physiology was assessed also by a metabolomic approach, using a different method which allowed us to focus on specific groups of compounds.

The UHPLC-HRMS polyphenolic profiling was helpful for analyzing and searching for chemical descriptors that classified root and rhizospheric exudates samples according to both growth stages and inoculation treatments. We found a good separation among the different sampling times and treatments by the classification using PLS-DA analysis. After pair-wise comparisons between brady-delftia vs. bradyrhizobia and, delftia vs. control treatments, we found several flavonoids, hydroxycinnamic acids, benzoic acids, and their derivatives as chemicals responsible for the separation among samples.

The analysis of root samples from greenhouse allowed us to assess the effects of JD2 on plant root physiology. On the other hand, the evaluation of rhizospheric exudate samples from hydroponic experiments, allowed the identification of some metabolites implicated on the communication between the symbionts during the early stages of the interaction. The profiling analysis showed that some flavonoids were sub- or over-produced in rhizospheric exudate samples. Among them, we observed an increase in naringenin and liquiritigenin levels in rhizospheric exudates of JD2 inoculated plants, suggesting that an active biosynthesis and release of isoflavones by plants is achieved when JD2 is present in the rhizosphere.

Differences in the concentration of *nod* genes inducers (daidzin, genistein, and genistin) in plant roots were not significant among treatments at V4, but genistein showed a lower level in brady-delftia rather than in bradyrhizobia treatments, at the R2 stage. The nodulation is already established at V4, and there is no need for flavonoid production neither at V4 or later (R2) stages. The major differences in the dynamic of plant hormone changes were observed in roots from co-inoculated plants at V4 stage. We found a higher content of ABA, JA, GA4, IAA, and tZ in brady-delftia treatment at V4. High levels of IAA and tZ were also found in co-inoculated plants at R2. Both auxins and CKs are essential for nodule initiation and development. The bacterial contribution of auxins to the general pool could modulate the plant hormone homeostasis. These results suggest that soybean secretes a different pattern of crucial compounds to perform a better symbiotic process in the presence of JD2 (Fig. 2); and this is accompanied by changes in the the pattern of proteins expressed in nodules, as shown by Riviezzi et al. (2021). Although we cannot attribute the full effects on soybean growth promotion to the production of auxins by JD2, the results support the idea that the production of auxins plays a crucial role in improving the agronomic expectations observed on soybean, when its seeds are co-inoculated with *Delftia* sp. JD2 and bradyrhizobia.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00818-9>.

References

- Ait Barka E, Nowak J, Clément C (2006) Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 72:7246–7252. <https://doi.org/10.1128/AEM.01047-06>
- Badri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32:666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Barbosa S, Saurina J, Puignou L, Núñez O (2020) Targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of

- Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes. *Molecules* 25:1623. <https://doi.org/10.3390/molecules25071623>
- Baziramakenga R, Simard RR, Leroux GD (1994) Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean. *J Chem Ecol* 20:2821–2833. <https://doi.org/10.1007/BF02098391>
- Benhamou N, Gagné S, Le Quééré D, Dehbi L (2000) Bacterial-Mediated Induced Resistance in Cucumber: Beneficial Effect of the Endophytic Bacterium *Serratia plymuthica* on the Protection Against Infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 90:45–56. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.45>
- Benintende S, Uhrich W, Herrera M, Gangege F, Sterren M, Benintende M (2010) Comparación entre coinoculación con bradyrhizobium japonicum y azospirillum brasilense e inoculación simple con bradyrhizobium japonicum en la nodulación, crecimiento y acumulación de n en el cultivo de soja. *AgriScientia* 27:71–77
- Bido G de S, Ferrarese M de LL, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O (2010) Naringenin inhibits the growth and stimulates the lignification of soybean root. *Brazilian Arch Biol Technol* 53:533–542. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300005>
- Boivin S, Fonouni-Farde C, Frugier F (2016) How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Front Plant Sci* 7:1240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240>
- Braña V, Cagide C, Morel MA (2016) The Sustainable Use of Delftia in Agriculture, Bioremediation, and Bioproducts Synthesis. In: Castro-Sowinski S (ed) *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*. pp 227–247. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_11
- Briegas B, Corbacho J, Parra-Lobato MC, Paredes MA, Labrador J, Gallardo M, Gomez-Jimenez MC (2020) Transcriptome and Hormone Analyses Revealed Insights into Hormonal and Vesicle Trafficking Regulation among *Olea europaea* Fruit Tissues in Late Development. *Int J Mol Sci* 21:4819. <https://doi.org/10.3390/ijms211144819>
- Bubna GA, Lima RB, Zanardo DYL, Dos Santos WD, Ferrarese M de LL, Ferrarese-Filho O (2011) Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *J Plant Physiol* 168:1627–1633. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.03.005>
- Cagide C, Riviezz B, Minteguiga M, Morel M, Castro-Sowinski S (2018) Identification of plant compounds involved in the microbe-plant communication during the co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. JD2. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>
- Cassán F, Coniglio A, López G, Molina R, Nievas S, de Carlan CLN, Donadio F, Torres D, Rosas S, Pedrosa FO, de Souza E, Zorita MD, de-Bashan L, Mora V, (2020) Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol Fertil Soils* 56:461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Chamam A, Sanguin H, Bellvert F, Meiffren G, Comte G, Wisniewski-Dyé F, Bertrand C, Prigent-Combaret C (2013) Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry* 87:65–77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>
- Chan Y-K (1986) Utilization of simple phenolics for dinitrogen fixation by soil diazotrophic bacteria. *BT Plant Soil* 90:141–150. <https://doi.org/10.1007/BF02277393>
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2005) Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN *Appl Environ Microbiol* 71:1685–1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2016) *InfoStat*. In: Grup. Infoestat, FCA, Univ. Nav. Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O (2008) Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol* 34:1230–1241. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9522-3>
- Eckardt NA (2006) The Role of Flavonoids in Root Nodule Development and Auxin Transport in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 18:1539–1540. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044768>
- Favaretto A, Chini S, Scheffer-basso S, Sobottka A, Bertol C, Perez N (2015) Pattern of allelochemical distribution in leaves and roots of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees.). *Aust J Crop Sci* 9:1119–1125
- Ferguson BJ, Mathesius U (2014) Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. *J Chem Ecol* 40:770–790. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0472-7>
- García-Gutiérrez L, Zerriouh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A, Pérez-García A (2013) The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb Biotechnol* 6:264–274. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
- Hassen AI, Bopape FL, Sanger LK (2016) Microbial Inoculants as Agents of Growth Promotion and Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer India, New Delhi, pp 23–36. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_2
- Hungria M, Araujo R (1994) *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola*. Publisher: EMBRAPA-SPI. ISBN: 0101–9716. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2663.4727>
- Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS (2015) Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum* brasilense: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. *Am J Plant Sci* 6:811–817. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>
- Jara E, Morel MA, Lamolle G, Castro-Sowinski S, Simón D, Iriarte A, Musto H (2018) The complex pattern of codon usage evolution in the family Comamonadaceae. *Ecol Genet Genomics* 6:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.11.002>
- Jiang C, Fan Z, Li Z, Niu D, Li Y, Zheng M, Wang Q, Jin H, Guo J (2020) *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* 21:854–870. <https://doi.org/10.1111/mpp.12935>
- Jung W, Yu O, Lau S-MC, O’Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol* 18:208–212. <https://doi.org/10.1038/72671>
- Kape R, Parniske M, Werner D (1991) Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol* 57:316–319. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.1.316-319.1991>
- Kohlen W, Ng JLP, Deinum EE, Mathesius U (2018) Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *J Exp Bot* 69:229–244. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx308>
- Lian I B, Zhou X, Miransari M, Smith DL (2000) Effects of Salicylic Acid on the Development and Root Nodulation of Soybean Seedlings. *J Agron Crop Sci* 185:187–192. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00419.x>
- Lima RB, Salvador VH, dos Santos WD, Bubna GA, Finger-Teixeira A, Soares AR, Marchiosi R, de Ferrarese M, LL, Ferrarese-Filho O (2013) Enhanced lignin monomer production caused by cinnamic

- Acid and its hydroxylated derivatives inhibits soybean root growth. *PLoS ONE* 8:e80542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080542>
- Lin J, Frank M, Reid D (2020) No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Commun* 1:100104. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>
- Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E (2018) Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J Integr Plant Biol* 60:632–648. <https://doi.org/10.1111/jipb.12653>
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10:466–472. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>
- Mabood F, Smith DL (2005) Pre-incubation of Bradyrhizobium japonicum with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiol Plant* 125:311–323. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00559.x>
- Mabood F, Souleimanov A, Khan W, Smith DL (2006) Jasmonates induce Nod factor production by Bradyrhizobium japonicum. *Plant Physiol Biochem* 44:759–765. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.10.025>
- Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S (2006) Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol* 52:383–389. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0296-3>
- Morel M, Braña V, Castro-Sowinski S (2012) Legume crops, importance and uses of bacterial inoculation to increase production. In: Goyal A (ed) *Crop Plant*. pp 217–240. <https://doi.org/10.5772/37413>
- Morel MA, Cagide C, Castro-Sowinski S (2016a) The contribution of secondary metabolites in the success of bioformulations. In: Arora N., Mehnaz S. BR (ed) *Bioformulations: For sustainable agriculture*. Springer, pp 235–250. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3_13
- Morel MA, Cagide C, Minteguiga MA, Dardanelli MS, Castro-Sowinski S (2015) The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An interaction that improves plant yield. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:134–142. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0229-R>
- Morel MA, Castro-sowinski S (2013) The Complex Molecular Signaling Network in Microbe-Plant Interaction. In: *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, N. K. Aror. pp 169–199. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_6
- Morel MA, Iriarte A, Jara E, Musto H, Castro-Sowinski S (2016b) Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng* 3:156–175. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.2.156>
- Morel MA, Ubalde MC, Braña V, Castro-Sowinski S (2011) *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Arch Microbiol* 193:63–68. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0632-2>
- Morel MA, Ubalde MC, Olivera-Bravo S, Callejas C, Gill PR, Castro-Sowinski S (2009) Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett* 291:162–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01444.x>
- Oldroyd GED (2007) Plant science. Nodules and hormones. *Science* 315:52–53. <https://doi.org/10.1126/science.1137588>
- Oldroyd GED, Downie JA (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Palma F, López-Gómez M, Tejera NA, Lluich C (2014) Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Sci* 223:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.005>
- Perry BJ, Bergsveinson J, Tambalo DD, Yost CK, Khan NH, Whiting M (2017) Complete Genome Sequence of *Delftia acidovorans* RAY209, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium for Canola and Soybean. *Genome Announc* 5:e01224-e1317. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01224-17>
- Peters NK, Verma DP (1990) Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. *Mol Plant Microbe Interact* 3:4–8. <https://doi.org/10.1094/mpmi-3-004>
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Rao JR, Cooper JE (1995) Soybean nodulating rhizobia modify nod gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:855–862. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0855>
- Reid DE, Heckmann AB, Novák O, Kelly S, Stougaard J (2016) Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase 3 Maintains Cytokinin Homeostasis during Root and Nodule Development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 170:1060–1074. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00650>
- Riviezzi B, Cagide C, Pereira A, Herrmann C, Lombare R, Lage M, Sicardi I, Lage P, Castro-Sowinski S, Morel MA (2020) Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere* 15:100219. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100219>
- Riviezzi B, García-Laviña CX, Morel MA, Castro-Sowinski S (2021) Facing the communication between soybean plants and microorganisms (*Bradyrhizobium* and *Delftia*) by quantitative shotgun proteomics. *Symbiosis* 83:293–304. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00758-4>
- Rondina ABL, dos Santos Sanzovo AW, Guimarães GS, Wendling JR, Nogueira MA, Hungria M (2020) Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. *Biol Fertil Soils* 56:537–549. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>
- Salvador VH, Lima RB, dos Santos WD, Soares AR, Böhm PAF, Marchiosi R, Ferrarese M de LL, Ferrarese-Filho O (2013) Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. *PLoS One* 8:e69105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069105>
- Salvagiotti F, Cassman KG, Specht JE, Walters DT, Weiss A, Dobermann A (2008) Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *F Crop Res* 108:1–13
- Santos MS, Nogueira MA, Hungria M (2019) Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* 9:205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Seneviratne G, Jayasinghearachchi HS (2003) Phenolic acids: Possible agents of modifying N₂-fixing symbiosis through rhizobial alteration? *Plant Soil* 252:385–395. <https://doi.org/10.1023/A:1024725511783>
- Shaw LJ, Morris P, Hooker JE (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ Microbiol* 8:1867–1880. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01141.x>
- Singh UP, Sarma BK, Singh DP (2003) Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Culture Filtrate of *Sclerotium rolfsii* on Phenolic and Salicylic Acid Contents in Chickpea (*Cicer arretinum*). *Curr Microbiol* 46:131–140. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3834-2>
- Smit G, Puvanesarajah V, Carlson RW, Barbour WM, Stacey G (1992) *Bradyrhizobium japonicum* nodD1 can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the nodYABCSUIJ operon. *J Biol Chem* 267:310–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48495-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48495-5)
- Somasegaran P, Hoben HJ (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL Project and MIR-CEN, Department of Agronomy. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>

- Suominen L, Luukkainen R, Roos C, Lindström K (2003) Activation of the nodA promoter by the nodD genes of Rhizobium galegae induced by synthetic flavonoids or Galega orientalis root exudate. FEMS Microbiol Lett 219:225–232. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01206-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01206-5)
- Torres D, Benavidez I, Donadio F, Mongiardini E, Rosas S, Spaepen S, Vanderleyden J, Pěnčík A, Novák O, Strnad M, Frébortová J, Casán F (2018) New insights into auxin metabolism in Bradyrhizobium japonicum. Res Microbiol 169:313–323. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.002>
- Ubalde MC, Braña V, Sueiro F, Morel MA, Martínez-Rosales C, Marquez C, Castro-Sowinski S (2012) The versatility of delftia sp. Isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. Curr Microbiol 64:597–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0108-5>
- van Zeijl A, Op den Camp RHM, Deinum EE, Charnikhova T, Franssen H, Op den Camp HJM, Bouwmeester H, Kohlen W, Bisseling T, Geurts R (2015) Rhizobium Lipo-chitoooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in Medicago truncatula Roots. Mol Plant 8:1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.010>
- van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu Rev Phytopathol 36:453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>
- Velazquez E, Silva LR, Peix A (2010) Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. Curr. Nutr. Food Sci. 6:109–144
- Vincent JM (1970) A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. I.B.P. Handbook. Blackwell Sci Publ Oxford, UK, 1970. <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>
- Walker V, Bertrand C, Bellvert F, Moëgne-Loccoz Y, Bally R, Comte G (2011) Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus Azospirillum. New Phytol 189:494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x>
- Walker V, Couillerot O, Von Felten A, Bellvert F, Jansa J, Maurhofer M, Bally R, Moëgne-Loccoz Y, Comte G (2012) Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with Azospirillum, Pseudomonas and Glomus consortium under field conditions. Plant Soil 356:151–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0960-2>
- Weston LA, Mathesius U (2013) Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. J Chem Ecol 39:283–297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Res 37:W652–W660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>
- Zanardo DIL, Lima RB, Ferrarese M de LL, Bubna GA, Ferrarese-Filho O (2009) Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. Environ Exp Bot 66:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>
- Zaprometov MN (1988) Tannins, Lignans, and Lignins. In: I V (ed) Phytochemicals in Plant Cell Cultures. Academic Press, pp 89–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50012-1>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Braulio Riviezz¹  · Guillem Campmajó^{2,3}  · Cécilia Cagide^{1,4} · Esther Carrera⁵  · Javier Saurina^{2,3}  · Susana Castro-Sowinski^{1,4}  · Cristina Olivaro⁶  · Oscar Nuñez^{2,3,7}  · María A. Morel^{1,8,9} 

Braulio Riviezz
braulioriviezz94@gmail.com

Guillem Campmajó
gcampmajo@ub.edu

Cécilia Cagide
celicacagide@gmail.com

Esther Carrera
ecarrera@ibmcp.upv.es

Javier Saurina
xavi.saurina@ub.edu

Susana Castro-Sowinski
s.castro.sow@gmail.com

Cristina Olivaro
cristina.olivaro@cut.edu.uy

Oscar Nuñez
oscar.nunez@ub.edu

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento BIOGEM, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay

² Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E08028, Barcelona, Spain

³ Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, Edifici de Recerca (Gaudí), University of Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Recinte Torribera Barcelona, Spain

⁴ Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de La República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

⁵ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia 46022, Spain

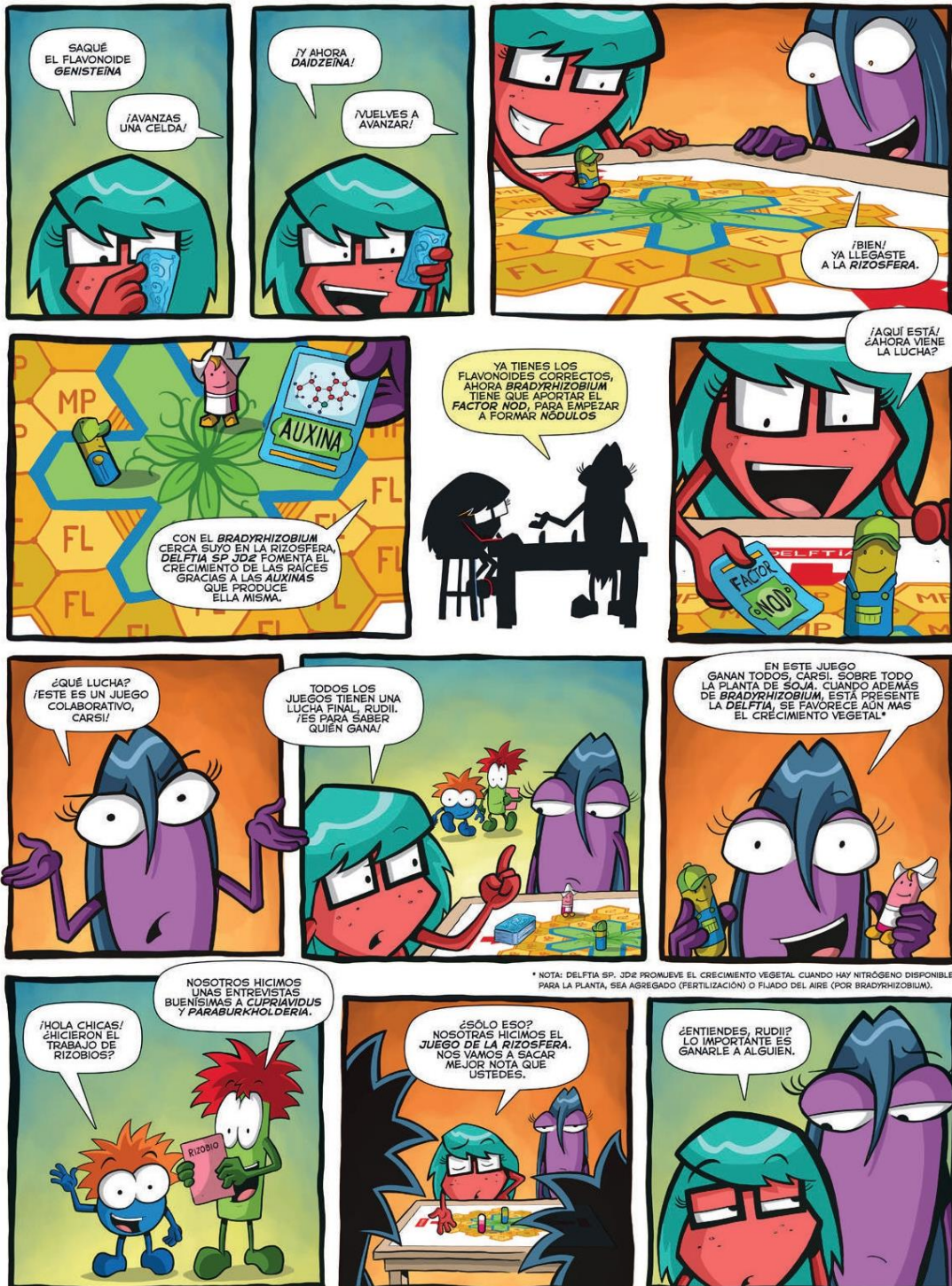
⁶ Espacio de Ciencia y Tecnología Química, Centro Universitario de Tacuarembó, Universidad de La República, Ruta 5 Km 386, Tacuarembó 45000, Uruguay

⁷ Serra Hünter Fellow, Generalitat de Catalunya, 08007 Barcelona, Spain

⁸ Laboratorio de Microbiología de Suelos, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, Montevideo 11400, Uruguay

⁹ GD Bioquímica Y Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay





SAQUÉ EL FLAVONOIDE GENISTEINA

¡AVANZAS UNA CELDA!

¡Y AHORA DAIDZEINA!

¡VUELVES A AVANZAR!

¡BIEN! YA LLEGASTE A LA RIZOSFERA.

CON EL BRADYRHIZOBIUM CERCA SUYO EN LA RIZOSFERA, DELFTIA SP. JDZ FOMENTA EL CRECIMIENTO DE LAS RAÍCES GRACIAS A LAS AUXINAS QUE PRODUCE ELLA MISMA.

YA TIENES LOS FLAVONOIDES CORRECTOS, AHORA BRADYRHIZOBIUM TIENE QUE APORTAR EL FACTOR NOD, PARA EMPEZAR A FORMAR NÓDULOS

¡AQUÍ ESTÁ! ¿AHORA VIENE LA LUCHA?

¿QUÉ LUCHA? ¡ESTE ES UN JUEGO COLABORATIVO, CARSI!

TODOS LOS JUEGOS TIENEN UNA LUCHA FINAL, RUDI!. ¡ES PARA SABER QUIÉN GANA!

EN ESTE JUEGO GANAN TODOS, CARSI. SOBRE TODO LA PLANTA DE SOJA. CUANDO ADEMÁS DE BRADYRHIZOBIUM, ESTÁ PRESENTE LA DELFTIA, SE FAVORECE AUN MÁS EL CRECIMIENTO VEGETAL*

¡HOLA CHICAS! ¿HICIERON EL TRABAJO DE RIZOBIOS?

NOSOTROS HICIMOS UNAS ENTREVISTAS BUENÍSIMAS A CUPRIAVIDUS Y PARABURKHOLDERIA.

¿SÓLO ESO? NOSÓTRAS HICIMOS EL JUEGO DE LA RIZOSFERA. NOS VAMOS A SACAR MEJOR NOTA QUE USTEDES.

¿ENTIENDES, RUDI!? LO IMPORTANTE ES GANARLE A ALGUIÉN.

* NOTA: DELFTIA SP. JDZ PROMUEVE EL CRECIMIENTO VEGETAL CUANDO HAY NITRÓGENO DISPONIBLE PARA LA PLANTA, SEA AGREGADO (FERTILIZACIÓN) O FIJADO DEL AIRE (POR BRADYRHIZOBIUM).

PROYECTO FINANCIADO POR LA AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN (URUGUAY) FWM 1-2017-136505: IMPLICANCIAS DE LA INTERACCIÓN TRIPLE SOJA-BRADIRIZOBIOS-DELFTIA SP. JDZ SOBRE LA RESPUESTA VEGETAL. / MATERIAL CIENTÍFICO/ TÉCNICO: BRAULIO RIMEZZI, CÉLICA CASIDE, SUSANA CASTRO, MARÍA MOREL / ADAPTADO POR: DANIELA ARREDONDO, VALENTINA CARRASCO, MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ, PAOLA SCAVONE / GUIÓN Y DIBUJOS: NICOLÁS PERUZZO, ALEJANDRO RODRÍGUEZ-JUELE.