



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“Respuestas morfológicas y bioquímicas de plántulas de trigo a
lipopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* Sp245”**

TESIS

Que presenta:

BIOL. ALMA ALEJANDRA HERNÁNDEZ ESQUIVEL

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Asesor: **D.C. ERNESTO GARCÍA PINEDA**

Morelia, Michoacán, febrero 2019



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado.

A mi asesor de tesis el D.C. Ernesto García Pineda por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su orientación, su paciencia y sus consejos que fueron puntos importantes para la culminación de este proyecto.

A mi comité sinodal, los doctores en ciencias: José López Bucio, Eduardo Valencia Cantero, Homero Reyes de la Cruz y Gustavo Santoyo Pizano por los aportes al presente trabajo.

A la M.C. Elda Castro mercado por sus aportaciones, su paciencia, sus consejos y por fomentar mi disciplina en el trabajo de laboratorio.

A mis padres y hermanos por su apoyo emocional.

A mi esposo Vicente Montejano Ramírez por el inefable apoyo emocional y económico que me ha brindado.

A mi hija Athena porque su alegre existencia y su amor incondicional son el motor para dar mi mejor esfuerzo.

Al M.C. Manuel Méndez Gómez por su tiempo, ayuda y orientación con las actividades dentro del laboratorio, por sus “jalones de oreja” y su gran amistad.

Al M.C. Luis María Suarez por su amistad y por el préstamo de algunos equipos de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de bioquímica y biología molecular de plantas: Juan Vallejo, Estefanía Chávez, Arturo Chávez, Celia Morales, Iñaki Duran, Ismael Ávila, Juan Pablo Gonzáles y a mis amigas del laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas: Cinthya López y Rosi Salinas. Gracias por su amistad, por los momentos compartidos y las pláticas amenas.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del trigo	3
2.1.2 Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) variedad Nana F2007.....	3
2.2 Interacción planta-bacteria	4
2.2.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	4
2.3 <i>Azospirillum brasilense</i>	5
2.4 Bacterias Gram negativas	6
2.5 Lipopolisacáridos	8
2.5.1 Estructura de los lipopolisacáridos (LPS) de <i>A. brasilense</i> Sp245	10
2.5.2 Biosíntesis de los LPS.....	11
2.5.3 Participación de los LPS en la interacción planta-bacteria.....	16
2.6 Formación de H ₂ O ₂ en plantas.....	18
2.7 Peroxidasas (POX).....	19
2.8 El calcio en las plantas.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general:.....	25
5.2 Objetivos particulares:	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Material biológico.....	26
6.2 Medio mínimo LB y mantenimiento de <i>A. brasilense</i> Sp245.....	26
6.3 Preinóculo e inóculo de <i>A. brasilense</i> Sp245.....	26
6.4 Lavado de bacterias.....	27
6.5 Extracción de lipopolisacáridos	27
6.6 Electroforesis de los LPS en gel SDS-PAGE.....	28
6.7 Tinción con nitrato de plata	28
6.8 Tinción con azul de Coomassie.....	29

6.9	Desinfección y germinación de semillas de trigo	29
6.10	Preparación de medio MS 0.2X	29
6.11	Interacción de las plántulas de trigo con <i>A. brasilense</i> Sp245	30
6.12	Interacción de plántulas de trigo con LPS de <i>A. brasilense</i> Sp245	30
6.13	Análisis de parámetros morfológicos	30
6.14	Análisis del contenido de clorofila	31
6.15	Elaboración de una curva de calibración de proteínas totales (curva estándar).....	31
6.16	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	32
6.17	Extracción de peroxidasas	33
6.18	Análisis de la actividad de peroxidasa.....	33
6.19	Inhibición enzimática de peroxidasa	34
6.20	Detección de la actividad de POX <i>in vivo</i>	34
6.21	Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno	35
6.22	Efecto del cloruro de lantano (LaCl ₃) y del ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) sobre la interacción trigo-LPS	35
6.23	Efecto del ionóforo de calcio A23187 y del cloruro de calcio (CaCl ₂) sobre la interacción trigo-lipopolisacáridos.....	36
7.	RESULTADOS	37
7.1	Efecto de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo	37
7.2	Efecto de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre la formación de pelos radicales en plántulas de trigo	38
7.3	Contenido de clorofila en plántulas de trigo	39
7.4	Efecto de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre la actividad de las peroxidasas. .	40
7.5	Análisis de LPS por SDS-PAGE.....	41
7.6	Efecto de los LPS sobre las plántulas de trigo	42
7.7	Efecto de los LPS sobre la formación de pelos radicales	43
7.8	Producción de peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) en raíces de trigo	44
7.9	Efecto de los LPS sobre la actividad de POX en la raíz en plántulas de trigo.....	45
7.10	Efecto de la inhibición de las POX sobre el crecimiento de plántulas de trigo	46
7.11	Movilización de calcio en plántulas de trigo tratadas con LPS	48
8.	DISCUSIÓN.....	54

9. CONCLUSION.....	58
10. LITERATURA CITADA	59
11. APÉNDICE	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la superficie celular de bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b)	7
Figura 2. Estructura general de los lipopolisacáridos	9
Figura 3. Esquema de la vía de biosíntesis de lipopolisacáridos.....	13
Figura 4. Reconocimiento de LPS por las plantas	15
Figura 5. Principales sitios de producción de H ₂ O ₂ en células fotosintéticas.	18
Figura 6. Doble actividad de las peroxidasas de pared celular.....	20
Figura 7. Curva estándar de albúmina	32
Figura 8. Efecto de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo.	37
Figura 9. Formación de pelos radicales	38
Figura 10. Contenido de clorofila.....	39
Figura 11. Actividad peroxidasa	40
Figura 12. Perfil electroforético de LPS revelados con nitrato de plata.....	41
Figura 13. Efecto de los LPS de <i>A. brasilense</i> Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo.	42
Figura 14. Efecto de los LPS sobre la formación de pelos radicales	43
Figura 15. Producción de peróxido de hidrogeno	44
Figura 16. Actividad de peroxidasa en plántulas tratadas con LPS	45
Figura 17. Efecto de SHAM sobre el crecimiento de plántulas de trigo	46
Figura 18. Efecto de SHAM sobre la actividad POX en plántulas de trigo.	47
Figura 19. Efecto del LaCl ₃ + LPS sobre el crecimiento de plántulas de trigo	48
Figura 20. Efecto del LaCl ₃ + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo.	49

Figura 21. Efecto del EGTA + LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo	
.....	50
Figura 22. Efecto del EGTA + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo.	
.....	50
Figura 23. Efecto del CaCl₂ + LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo.	
.....	51
Figura 24. Efecto del CaCl₂ + LPS sobre la actividad POX de plántulas de trigo	
.....	52
Figura 25. Efecto del ionóforo A23187+ LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo.	
.....	52
Figura 26. Efecto del ionóforo A23187 + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo	
.....	53
Figura 27. Modelo propuesto.	
.....	57

RESUMEN

El trigo es un cultivo de importancia económica que interactúa con diversos microorganismos presentes en la rizosfera. Estas interacciones se pueden establecer con bacterias benéficas que incrementan el crecimiento de la planta, conocidas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPRs. Una de las PGPRs más estudiadas es la bacteria *Azospirillum brasilense*, la cual emplea diversos mecanismos para promover el crecimiento vegetal, en donde participan componentes de su envoltura celular, como los lipopolisacáridos (LPS). Los LPS son moléculas abundantes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas capaces de inducir respuestas de defensa, y participar en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. En el presente trabajo se estudió el mecanismo bioquímico por el cual los LPS estimulan el crecimiento de plántulas de trigo. Inicialmente, se evaluó el efecto de una concentración de 100 µg/mL de LPS sobre el crecimiento de las plántulas de trigo, analizando la longitud de la lámina foliar y la raíz, el peso fresco total y la longitud de los pelos radiculares. Además, se analizaron parámetros bioquímicos como el contenido de clorofila y la actividad de la enzima peroxidasa. Finalmente, se evaluó la participación del ión Ca^{+2} en la actividad de peroxidasa estimulada por los LPS. Se observó que los LPS de *A. brasilense* Sp245 aumentan la longitud de la lámina foliar y raíz de las plántulas de trigo. Este crecimiento está relacionado con un incremento en la actividad de las peroxidasas y la movilización del ión Ca^{+2} .

Palabras clave: Trigo, rizobacteria, *Azospirillum brasilense* Sp245, lipopolisacáridos, peroxidasas.

ABSTRACT

Wheat is a crop with economic importance that interacts with various microorganisms present in the rhizosphere, these interactions can be established with beneficial bacteria that increase plant growth, known as Plant Growth Promoting Rhizobacteria or PGPR. One of the most studied PGPR is *Azospirillum brasilense* bacterium, which uses many mechanisms to promote plant growth, including the involvement of components of the cellular envelope such as lipopolysaccharides (LPS). LPS are abundant molecules in outer membrane of Gram-negative bacteria capable of inducing defense responses and participate in plant growth and development processes. In the present work, we studied the biochemical mechanism by which LPS stimulate wheat seedlings growth. Initially, the effect of 100 µg/mL of LPS concentration on wheat seedlings growth was evaluated, analyzing foliar leaf and root length, total fresh weight and root hairs length. In addition, biochemical parameters such as chlorophyll content and peroxidase enzyme activity were analyzed. Finally, the participation of Ca⁺² ion in the peroxidase activity stimulated by LPS was evaluated. It was observed that *A. brasilense* Sp245 LPS increase foliar leaf and root length of wheat seedlings. This growth is related with an increase in peroxidase activity and Ca⁺² ion mobilization.

Key words: Wheat, rhizobacteria, *Azospirillum brasilense* Sp245, lipopolysaccharides, peroxidases.

1. INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial, debido a que después del maíz ocupa el segundo lugar en producción y después del arroz ocupa el segundo lugar consumo (Colin *et al.*, 2016). La producción mundial anual es de 600 millones de toneladas (FAO, 2018). En México la producción de trigo alcanza cerca de 3 millones 300 mil toneladas al año. Los principales Estados productores son: Sonora, Guanajuato, Baja California, Zacatecas, Tlaxcala, Chihuahua y Michoacán, aportando un 80% de la superficie cosechada (SAGARPA, 2018). La semilla de trigo es utilizada para obtener una gran variedad de productos, tales como harina, harina integral, sémola y malta, los cuales constituyen la materia prima para la elaboración de otra gran variedad de productos alimenticios (Gómez *et al.*, 2007).

El trigo, al igual que el resto de las plantas, interactúa con una amplia diversidad de microorganismos presentes en la rizósfera (Berendsen *et al.*, 2012). Esta interacción puede ser benéfica (promoviendo el crecimiento de la planta), perjudicial (afectando la salud y crecimiento) o neutral (Zahir *et al.*, 2004).

Las bacterias que proporcionan algún beneficio se conocen como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs; por sus siglas en inglés, **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria) (Beneduzi *et al.*, 2012). Muchas de éstas han sido propagadas y usadas como inoculantes bacterianos, principalmente para mejorar la producción y el rendimiento de cultivos agrícolas. Las PGPRs promueven el crecimiento vegetal mediante dos tipos de mecanismos: indirectos y directos, o una combinación de ambos (Cote *et al.*, 2013). Aunque la diferencia entre estos dos mecanismos no siempre es obvia, los mecanismos indirectos, como regla general, son los que ocurren fuera de la planta, mientras que los mecanismos directos afectan directamente su metabolismo (Solano *et al.*, 2008).

Azospirillum es una de las PGPRs más estudiadas. Este género incluye bacterias endófitas y bacterias de vida libre, ambas fijadoras de nitrógeno (Paldi *et*

al., 2011; Vicario *et al.*, 2015). Las plantas inoculadas con *Azospirillum* mejoran su crecimiento, mostrando un incremento en la formación de raíces laterales y pelos radicales, lo que resulta en una mayor superficie para la absorción de agua y nutrientes (Spaepen *et al.*, 2014).

El género *Azospirillum* se clasifica dentro de las bacterias Gram negativas, ya que presentan una doble membrana en su envoltura celular, la membrana interna y la membrana externa. En la membrana externa se encuentran embebidos lipopolisacáridos (LPS), moléculas indispensables para la sobrevivencia y viabilidad de estas bacterias, que contribuyen al ensamblaje correcto de la membrana (Silipo y Molinaro, 2011).

Los LPS son importantes para la resistencia al estrés ambiental, y son factores de virulencia para la colonización del hospedador. En general, su arquitectura se conserva, y comprende tres dominios covalentemente enlazados: El lípido A que se encuentra anclado en la membrana, el CORE o núcleo y el antígeno O, un polisacárido de tamaño variable que sobresale de la superficie celular (Kutschera y Ranf, 2018). Los LPS forman parte de los Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs; por sus siglas en inglés de Microbe Associated Molecular Patterns), y se ha reportado que inducen respuestas relacionadas con la defensa, incluida la expresión de genes y la supresión de la respuesta hipersensible en las plantas, el influjo de calcio, y la producción de especies reactivas de oxígeno (Mohamed *et al.*, 2015). En nuestro grupo de trabajo se está estudiando el efecto de los LPS de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el crecimiento y el desarrollo de plantas de trigo. La adición de estas moléculas incrementó la longitud de la lámina foliar y aceleró el proceso de formación de espigas (Chavéz- Herrera *et al.*, 2018). Además, se observó un aumento en la actividad de la enzima peroxidasa (Vallejo-Ochoa *et al.*, 2017). Estas son hemoproteínas que además de funcionar como parte del sistema antioxidante, afectan el crecimiento (Kukavica *et al.*, 2012).

El presente trabajo se enfocó en estudiar el mecanismo bioquímico por el cual los LPS estimulan el crecimiento del trigo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del trigo

El trigo es una planta herbácea anual que, debido a su gran diversidad genética, puede crecer en diferentes ambientes. En los últimos años, el contenido de nutrientes del grano de trigo y sus componentes ha sido objeto de estudio, por lo que se ha reconocido su valor como fuente proteica (Moreno *et al.*, 2001). Después del arroz, el trigo ocupa el segundo lugar en términos de consumo humano, y después del maíz es el cereal de mayor producción (Colin *et al.*, 2016; Plana *et al.*, 2001).

El trigo es una gramínea que pertenece a la familia de las Poaceas, y al género *Triticum*, que comprende alrededor de 30 variedades, con suficientes diferencias genéticas para ser consideradas especies distintas o subespecies. De ellas, solamente se han reconocido 16 especies y el resto son silvestres (Moreno *et al.*, 2001). Existen dos especies domesticadas de trigo: *T. aestivum*, utilizada principalmente para la elaboración de pan y *T. durum*, que es menos común y para fabricación de pastas y consumo como granos enteros (Colin *et al.*, 2016).

2.1.2 Trigo (*Triticum aestivum*) variedad Nana F2007

Esta variedad fue obtenida por el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de Temporal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Pertenece al trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). Presenta un hábito de crecimiento de primavera, de 106 días a madurez fisiológica (ciclo precoz), con tallos resistentes al acame, la inclinación que sufre el tallo debido a la acción del viento. Sus espigas son de color claro, fusiformes, laxas, de posición ligeramente curvada y presentan poca serosidad durante el llenado de grano. Su grano es mediano, rojo oscuro y de consistencia dura. Es considerada de porte medio con altura promedio de 84 cm; bajo condiciones de sequía (150 mm), presenta alturas de hasta 49 cm, mientras que en lugares lluviosos (750 mm) su altura alcanza hasta

120 cm. Responde favorablemente en cualquier ambiente de producción en condiciones de temporal, sobre todo en ambientes de sequía (Mir *et al.*, 2014).

2.2 Interacción planta-bacteria

Las plantas y las bacterias pueden interactuar entre sí de diferentes maneras. La interacción puede ser benéfica, perjudicial o neutral para la planta (Cheng *et al.*, 2010). Esta interacción tiene lugar en la rizosfera, definida como el volumen del suelo adyacente que está influenciado por las raíces de la planta. La rizosfera puede contener hasta 10^{11} células microbianas por gramo de raíz y más de 30,000 especies procariontas (Berendsen *et al.*, 2012). Las plantas invierten un porcentaje significativo de su carbono fijado fotosintéticamente en el mantenimiento de la microbiota presente en la rizosfera, vía exudación de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, mucilago y celulosa (rizodepositos). A cambio las bacterias benéficas modifican la arquitectura radicular para mejorar la toma de nutrientes y la protección contra patógenos (Pieterse *et al.*, 2016). La cantidad y diversidad de microorganismos dañinos y benéficos está relacionado con la cantidad y calidad de los rizodepositos y el resultado de las interacciones microbianas que se producen en la rizosfera (Somers *et al.* 2004).

2.2.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) fue acuñado por Kloepper y Schroth (1978) para referirse al grupo de bacterias presentes en la rizosfera, capaces de mejorar la salud y el crecimiento de las plantas (Montaño *et al.*, 2014). Las bacterias que promueven el crecimiento son típicamente de tres tipos: 1) Las que forman una relación simbiótica que implica la formación de estructuras especializadas o nódulos en las raíces. 2) Las que son endófitas y colonizan los tejidos internos sin causar daño y 3) Las bacterias de vida libre, que colonizan la superficie de las raíces (Cheng *et al.*, 2010).

Las PGPRs pueden influir sobre el crecimiento de manera directa o indirecta. La promoción directa implica la producción de fitohormonas como las auxinas, citocininas, giberelinas, o facilitar la absorción de nutrientes del medio ambiente (Beneduzi *et al.*, 2012), a través de la fijación biológica de nitrógeno y/o la solubilización de fósforo (Saharan y Nehras, 2011). La bioestimulación indirecta ocurre cuando las PGPRs disminuyen o previenen los efectos nocivos de uno o más organismos fitopatógenos (Beneduzi *et al.*, 2012), a través de la inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés “Induced systemic resistance”) y la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés “Acquired systemic resistance”), activadas por moléculas de microorganismos denominadas "elicitores" (Montaño *et al.*, 2013). Las PGPRs más estudiadas pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Azospirillum* (Zelicourt *et al.*, 2013).

2.3 *Azospirillum brasilense*

El género *Azospirillum* pertenece a la clase de las alfa proteobacterias y comprende un gran número de simbiontes (Paldi *et al.*, 2011). Se han descrito 16 especies, la mayoría de estas se han aislado de raíces de plantas silvestres y cultivadas, de suelos de regiones templadas, subtropicales y tropicales (Young *et al.*, 2015). Son bastones curvados, algunas presentan forma de espirilo y pueden llegar a medir de 0.8-1.0 x 2.5 μm , son bacterias Gram negativas, móviles, con un flagelo polar y se han observado numerosos flagelos laterales cortos en *A. lipoferum* y *A. brasilense*, (Hartmann y Baldani, 2006). *Azospirillum brasilense* fue una de las primeras especies descritas y ha sido utilizada en la agricultura de muchos países desde su descubrimiento en 1978 (Reis *et al.*, 2015). Puede fijar nitrógeno en asociación con plantas, pero aparentemente, la fijación de nitrógeno no es su principal mecanismo de promoción del crecimiento (Spaepen *et al.*, 2009; Helman *et al.*, 2011). Este efecto se le ha atribuido a la producción y secreción de reguladores de crecimiento (fitohormonas) como auxinas (ácido indol-3-acético, AIA), citocininas, y giberelinas

(Paldi *et al.*, 2011). Según el National Center for Biotechnology Information (NCBI), su clasificación taxonomica es la siguiente:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Subclase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhodospirillales

Familia: Rhodospirillaceae

Género: *Azospirillum*

Especie: *brasilense*

2.3.1 Colonización de raíces por *A. brasilense*

El anclaje de *Azospirillum* a las raíces es esencial para una asociación eficiente. Este proceso se desarrolla en dos etapas completamente independientes (Michiels *et al.*, 1991). El primer paso es débil, reversible y de unión inespecífica, participando proteínas de superficie bacteriana y los flagelos. Los flagelos polares de *A. brasilense* contienen una proteína llamada adhesina que está involucrada en la fijación bacteriana a las raíces de trigo. La segunda fase de fijación parece ser irreversible, ocurre de 8 a 16 horas después de la inoculación y participan polisacáridos de la superficie bacteriana (Zhu *et al.*, 2002). Los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radiculares (Levanony y Bashan, 1991). Además, algunas cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense*, colonizan el interior de las raíces de trigo (Bashan *et al.*, 2004).

2.4 Bacterias Gram negativas

El procedimiento de tinción desarrollado Hans Christian Gram (1884) creó una herramienta para dividir el mundo bacteriano. La tinción de Gram refleja las diferencias en la estructura y composición de la célula bacteriana. La estructura de la envoltura típica de una bacteria Gram negativa se ilustra en la Fig.1.

A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram positivas, que típicamente están rodeadas por la membrana citoplásmica y por una pared celular compuesta de múltiples capas de peptidoglucano, un polímero lineal de unidades alternadas de

N-acetil glucosamina y N-acetil ácido murámico, las bacterias Gram negativas están rodeadas de forma única por dos membranas lipídicas: la membrana citoplásmica (o interna) y la membrana externa, separadas por el espacio periplásmico. La membrana interna es una bicapa de fosfolípidos con proteínas incrustadas con hélices hidrofóbicas que abarcan la membrana. En el espacio periplásmico de las Gram negativas reside una capa de peptidoglucano, un componente estructural rígido químicamente único de la pared celular, que confiere a la célula su forma y preserva su integridad en entornos de baja osmolaridad (Sperandeo *et al.*, 2010).

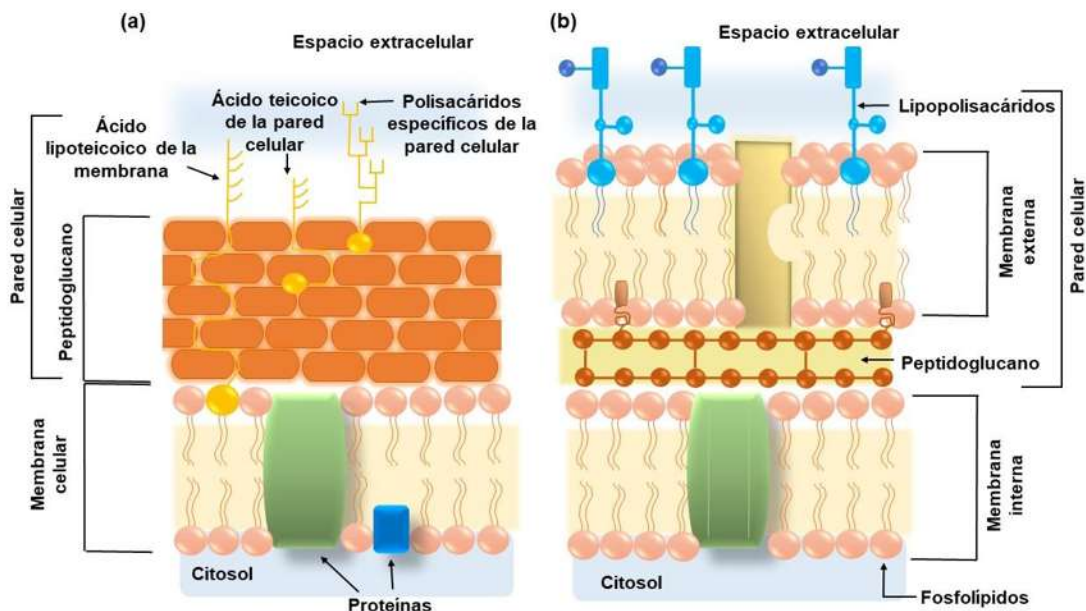


Figura 1. Comparación de la superficie celular de bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b)

Las bacterias Gram positivas están rodeadas por la membrana citoplásmica y capas adicionales de pared celular de complejidad variable, mientras que las bacterias Gram negativas presentan una doble membrana dividida por una pared muy delgada de peptidoglucano y presentan un alto contenido de lipopolisacáridos en su membrana externa. Imagen modificada de: <https://biotechmind.wordpress.com/2015/04/01/la-tincion-de-gram-stain>.

La membrana externa es una bicapa de fosfolípidos asimétrica en su lámina interior, mientras que la parte externa es rica en lipopolisacáridos (Silipo *et al.*, 2010). Las proteínas que se encuentran en la membrana externa están implicadas en varias

funciones: absorción de nutrientes, transporte y secreción de varias moléculas (proteínas, polisacáridos, fármacos, etc.) (Sperandeo *et al.*, 2010).

2.5 Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas producidas por bacterias Gram negativas. Son componentes mayoritarios de la superficie celular, ocupando aproximadamente un 75%, y representan un 15% del total de moléculas presentes en la membrana externa (Silipo *et al.*, 2010). Son indispensables para la viabilidad y supervivencia de estas bacterias, y contribuyen al ensamblaje correcto de la membrana externa. Proporcionan una barrera de permeabilidad extraordinaria a diferentes moléculas, incluyendo detergentes, antibióticos, tintes tóxicos y metales (Molinero *et al.*, 2009).

Los LPS son moléculas anfifílicas, con una composición que presenta variaciones intra- e interespecie, y en la mayoría de las bacterias muestran una arquitectura estructural común (Figura 2). Su organización estructural incluye tres regiones: El lípido A, es la región hidrofóbica y la biológicamente activa del LPS. Es una estructura altamente conservada y responsable de la mayoría de las patologías severas asociadas a infecciones producidas por bacterias Gram negativas. Se encuentra formada por dos unidades de D-glucosamina fosforiladas, unidas por enlaces β (1 \rightarrow 6) y esterificadas con diferentes ácidos grasos (Molinero *et al.*, 2009; Silipo y Molinero, 2011). El núcleo del LPS es una cadena corta de azúcares que puede dividirse en una región interna (núcleo interno) y una externa (núcleo externo). La parte interna está compuesta por un azúcar muy poco común, exclusivo de estas moléculas, el ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (KDO) que se encuentra unido directamente al lípido A, y un número variable de L-glicero-D-mano-heptosas. En general, ambos azúcares pueden estar sustituidos con grupos fosfatos, pirofosfato, sulfato y/o etanolamina. El núcleo externo está compuesto por un número variable de hexosas. El antígeno O es la región más variable del LPS en términos de composición y estructura. Se encuentra unido al núcleo externo y se

proyecta hacia el exterior. Está compuesto por unidades repetidas de oligosacáridos compuestos por hasta cinco monosacáridos. El largo de las cadenas puede ser muy variable, llegando a encontrarse hasta 40 repeticiones, y representa la parte hidrofílica del LPS. Las variantes estructurales del antígeno O contribuyen a la formación de distintos serotipos entre diferentes especies, e incluso dentro de la misma especie (Knirel, 2011).

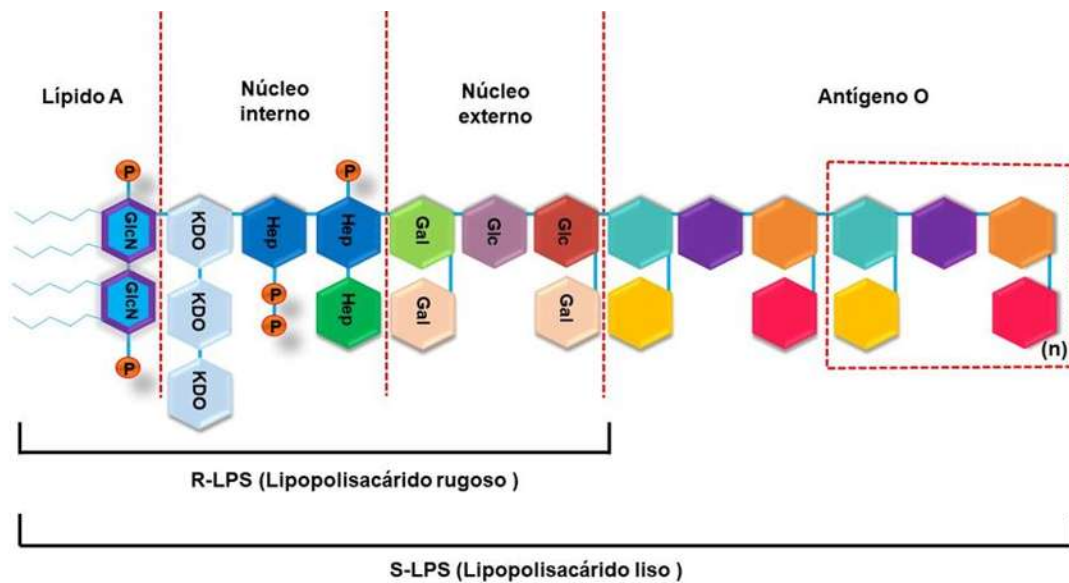


Figura 2. Estructura general de los lipopolisacáridos. Son moléculas compuestas por tres regiones: el lípido A que representa la parte hidrofóbica de la molécula, y a través del cual se inserta en la membrana externa de la bacteria; un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O, y uniendo ambas partes un hetero-oligosacárido no repetitivo conocido como *core* o núcleo. GlcN: glucosamina, P: fosfato, Hep: Heptosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa. Modificado de Silipo *et al.*, 2011.

Los LPS completos, que están compuestos por las tres regiones: lípido A, núcleo y antígeno O, son llamados “lisos” o de tipo S del inglés “Smooth”, por el fenotipo liso que muestran las colonias de bacterias crecidas en placas de agar. Mientras tanto, aquellas bacterias que han perdido la capacidad de sintetizar el antígeno O y sus LPS solo constan de un núcleo, completo o truncado, forman colonias con bordes rugosos cuando crecen en placas de agar. Estas moléculas

incompletas forman colonias con aspecto “rugoso” o de tipo R del inglés “Rough” (Silipo y Molinaro, 2011).

2.5.1 Estructura de los lipopolisacáridos (LPS) de *A. brasilense* Sp245

La estructura del lípido A es la región más conservada de un LPS, pero puede presentar diversas modificaciones entre los diferentes géneros, y algunas veces también dentro de las especies del mismo género, con respecto a las sustituciones de fosfato, así como el número, tipo y distribución de los ácidos grasos (Silipo y Molinaro 2011).

Los primeros estudios sobre la purificación y caracterización de los LPS de *Azospirillum* fueron publicados entre 1985-1987. Al parecer, el género *Azospirillum* produce LPS de tipo S, es decir, la molécula contiene todos los componentes estructurales característicos (Fedoneko *et al.*, 2015). Aún no se ha reportado la estructura del lípido A para los LPS de *A. brasilense* Sp245, pero en *A. lipoferum* SpBr17 se ha descrito con detalle, el cual está compuesto de un disacárido de D-glucosamina con enlaces beta-(1,6) pero carece de residuos de fosfato característicos de las enterobacterias. Por lo tanto, se sugiere que el lípido A de *Azospirillum* es menos tóxico para las células eucariotas. Además, el extremo del esqueleto carbonado en posición C-1 está sustituido con ácido D-galacturónico. Los residuos de 3-hidroxi palmitoil están conectados exclusivamente a grupos amino del disacárido glucosamina. Los hidroxilos en las posiciones C-3 y C-3' están esterificados con ácidos 3-hidroxi mirísticos. Los ácidos grasos polares primarios están parcialmente sustituidos por ácidos grasos no polares (18:0, 18:1 o 16:0), formando restos aciloxiacil (Choma *et al.*, 2009).

El antígeno O de *A. brasilense* Sp245 es un homopolímero lineal de D-ramnosa y presenta la siguiente estructura:

β -D-Rhap^I(1→3)- α -D-Rhap^{II}-(1→3)- α -D-Rhap^{III}-(1→3)- α -D-Rhap^{IV}-(1→3)- α -D-Rhap^V (Fedoneko *et al.*, 2002).

En general, la estructura química de la región del *core* es menos variable que la región del antígeno O. En muchas bacterias analizadas hasta ahora la región del *core* contiene: L-glicero-D-manno-heptosa y una L- α -D Hep (1 \rightarrow 3)-L- α -D Hep (1 \rightarrow 5)-[α -Kdo-(2 \rightarrow 4)]- α -Kdo tetrasacárido. También podría tener sustituyentes como otros tipos de azúcares, residuos fosfato, algunos grupos acilo o aminoácidos.

2.5.2 Biosíntesis de los LPS

La complejidad en la estructura de los LPS es debida a los procesos utilizados para su biosíntesis y exportación. Estos procesos ocurren en varios compartimentos celulares, dando inicio con la síntesis del lípido A en la interfase entre el citosol y la membrana interna. La vía de biosíntesis del lípido A o vía Raetz es altamente conservada entre las bacterias Gram negativas, y consta de nueve pasos (Whitfield y Trent, 2014). El primer paso es la transferencia del ácido 3-hidroxi mirístico (3-OH-C14:0) anclado a una proteína acarreadora de acilo (APC) a un metabolito intermediario central, la uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP- GlcNAc) este paso es llevado a cabo por la enzima LpxA, una aciltransferasa específica, codificada por el gen *lpxA* que es parte de un grupo de 11 genes organizados en un operon complejo, llamado operon de síntesis macromolecular II, en cual incluye otros genes vitales para la bacteria (Schanaitman y Klena, 1993). El segundo paso es catalizado por LpxC, una metaloenzima que deacetila a UDP-3-Oacil-N-acetilglucosamina. La desacetilación provee un grupo amino libre para la adición de una segunda cadena de ácido graso por LpxD en la posición 2 de UDP-monoacilglucosamina formando UDP-2,3, diacilglucosamina, llevando a la formación de 2,3 diacilglucosamina-1-fosfato (también llamado lípido X) y Uridina monofosfato (UMP) por LpxI o LpxH. De esta reacción de condensación resulta la formación de un tetraacetilado-12-6 unido a glucosamina- 1- fosfato disacárido, realizado por LpxB. La formación del característico β 1-6 glicosídico unido al lípido A es catalizado por LpxB. La enzima condensa una molécula de UDP-2,3 diacilglucosamina con una molécula del lípido X, liberando UDP (difosfato de uridina). La reacción del lípido X con un derivado activado del lípido X (UDP-2,3 diacilglucosamina) produce un

precursor disacárido con cuatro grupos acilo, el lípido IVA. El lípido IVA es sustituido con dos unidades de Kdo para formar Kdo2-IVA. Los dos residuos de Kdo son incorporados por la enzima WaaA, la cual usa Citidina monofosfato CMP-KDO como el sustrato donador. El Kdo2IVA es acilado completamente en forma de grupos aciloxiacil en los ácidos grasos de las posiciones 2' y 3' del disacárido, transformándose en la endotoxina Re (Gronow y Brade, 2010).

Los pasos subsecuentes son catalizados por proteínas de membrana que requieren de factores citosólicos para su activación. La síntesis de Kdo se inicia con la condensación de arabinosa-5-fosfato con fosfoenolpiruvato. Luego, el Kdo recién sintetizado es activado a Kdo-CMP (monofosfato de citidina), un nucleótido-azúcar que sirve como precursor para el LPS. Los residuos de heptosa que son añadidos al LPS naciente se derivan probablemente de sedoheptulosa-7-fosfato, y son activados como isómeros de configuración L-glicero-D mano. Otra serie de enzimas son responsables de la adición de sustituyentes polares, tales como fosfatos y etanolamina. Cada una de las hexosas del núcleo externo es añadida una a una en forma independiente. La síntesis de esta región involucra una serie de glicosiltransferasas unidas a la membrana, las cuales catalizan la transferencia secuencial de azúcares provenientes de donadores nucleótido-azúcar al extremo no reductor (distal) de la cadena de polisacárido creciente. Derivados de UDP (difosfato de uridina) funcionan como donadores de azúcares activados.

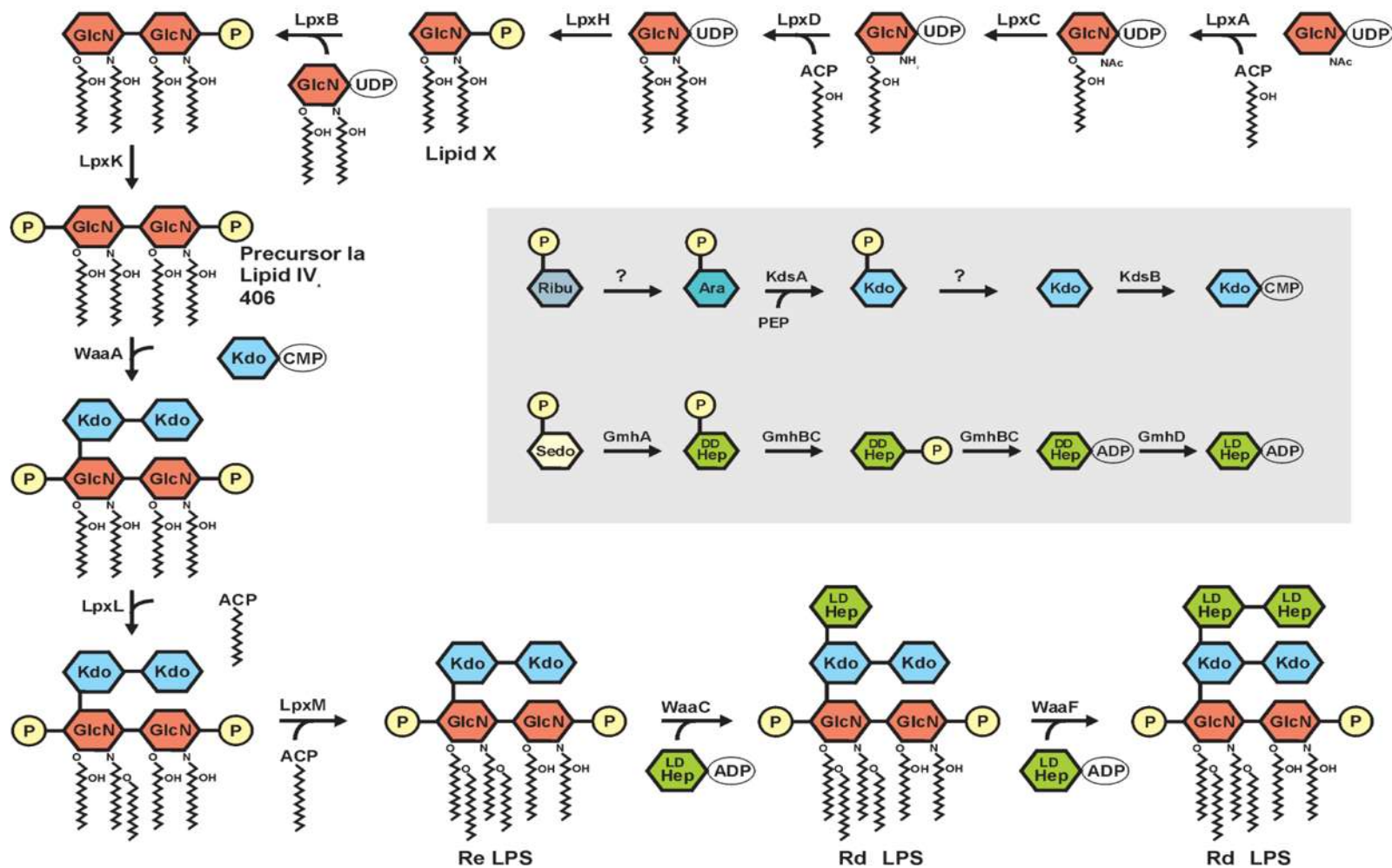


Figura 3. Esquema de la vía de biosíntesis de lipopolisacáridos. Se presentan todos los pasos que conducen a Rd1LPS, nombrando intermediarios principales. En el cuadro azul se muestra la ruta que generan los azúcares de nucleótidos requeridos. ACP: Proteína portadora de acilo, PEP:Fosfoenolpiruvato, DD Hep: D-glicero-mmano-Heptosa. LD Hep: L-glicero-mannp-Heptosa. Tomado de Gronow y Brade (2001).

El antígeno O es sintetizado independientemente del lípido A y del núcleo. Su biosíntesis ocurre en el lado citoplasmático de la membrana interna. El polisacárido O es ensamblado como un polímero unido a un lípido de membrana y transferido posteriormente a la glucosa terminal no reductora del núcleo completo. La formación cíclica de las unidades requiere dos moléculas de bactoprenol pirofosfato, un poliisopreno de 55 carbonos que es también esencial para la síntesis del peptidoglicano. Al finalizar la síntesis de una unidad del antígeno O, o del antígeno O completo, un transportador transloca esta molécula al lado periplasmático de la membrana interna. Si se han transportado unidades, estas son polimerizadas por la enzima Wzy. Finalmente, una ligasa se encarga de unir el antígeno O al lípido A-Kdo para completar una molécula de LPS (Ormeño-Orillo, 2005).

2.5.3 Reconocimiento de los LPS por las plantas

Los LPS son considerados como Patrones Moleculares Asociados a Microbios o a Patógenos (MAMPs o PAMPs; por sus siglas en inglés de “Microorganism Associated Molecular Pattern o Pathogen Associated Molecular Pattern), y son reconocidos por el sistema inmune de organismos de diferentes reinos (Kutschera y Ranf, 2018). Los MAMPs tales como los lipopolisacáridos, los peptidoglucanos, el ácido lipoteicoico (LTA), la flagelina, y el factor de elongación termoinestable (EF-Tu), son estructuras esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos, por esa razón se encuentran conservados entre patógenos y microorganismos saprofitos (Newman *et al.*, 2013).

Las plantas son capaces de reconocer a los MAMPs para establecer relaciones simbióticas e inmunidad. El reconocimiento de los MAMPs involucra un complejo de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), estos receptores pueden ser de tipo cinasa, los cuales poseen un dominio extracelular que está involucrado en la percepción del ligando, un dominio transmembranal y un dominio cinasa intracelular (Boutrot y Zipfel, 2017).

Recientemente, en la planta *Arabidopsis thaliana* se identificó un receptor para lipopolisacáridos de *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, llamado LORE (SD1-29) “*lipooligosaccharide-specific reduced elicitation*”. LORE pertenece a un grupo de proteínas cinasa transmembranales llamadas de tipo bulbo, con un dominio S-Lectina, y se encuentra localizada en la membrana plasmática. LORE requiere toda la molécula del lipopolisacárido o la región del lípido A para inducir la respuesta inmune (Figura 4), la cual incluye el flujo de calcio citosólico, la producción de especies reactivas de oxígeno, el aumento de pH extracelular, y la inducción de la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PR*), o la Inmunidad Desencadenada por Patrones (PTI, por sus siglas en inglés “*Pattern-triggered immunity*”) (Ranf *et al.*, 2015).

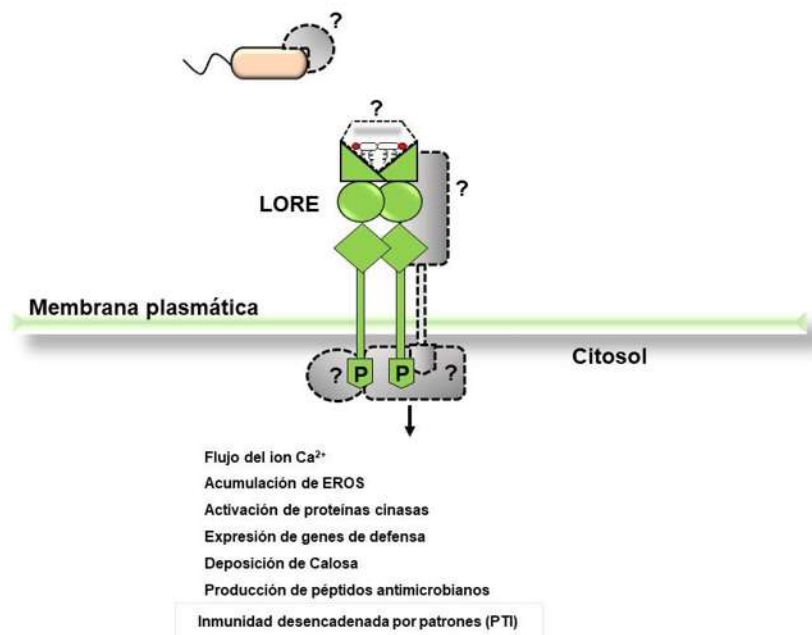


Figura 4. Reconocimiento de LPS por las plantas. En plantas, el reconocimiento del lípido A del LPS (al menos de las bacterias *Pseudomonas* y *Xanthomonas*), y la inducción de una respuesta inmune, requieren al receptor cinasa transmembranal, LORE. Sin embargo, otros detalles de este proceso de reconocimiento, tales como si LORE se une directamente a LPS o si se requiere la actividad de una proteína de unión a LPS y / o proteínas que extraen LPS, faltan por aclararse. Tomado de Ranf (2016).

Los análisis filogenéticos y fisiológicos indican que el reconocimiento de lipopolisacáridos por LORE está restringido a plantas de la familia *Brassicaceae*, ya que plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana* o *Nicotiana tabacum*), que pertenecen a la familia *Solanaceae*, no responden (o responden débilmente) a LPS derivados de *Pseudomonas* o de *Xanthomonas*, pero la sobreexpresión constitutiva de LORE en estas plantas confiere una fuerte sensibilidad a LPS (Zipfel, 2015).

2.5.3 Participación de los LPS en la interacción planta-bacteria

Debido a su ubicación externa, las moléculas de LPS pueden interactuar con otros organismos, participando así en la interacción planta-bacteria (Molinaro *et al.*, 2009). Una vez percibidos por las plantas, los LPS son responsables de respuestas de defensa (Ranf *et al.*, 2016). En células en suspensión de *A. thaliana* se comparó el efecto de los LPS de las bacterias patógenas *Pectobacterium atrosepticum* y *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* con los LPS de bacterias no patógenas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* serotipo 10 en las respuestas de defensa. Los LPS de ambos tipos de bacterias inducen respuestas comunes como la transcripción de genes de defensa (genes *PR*), y su capacidad para limitar la muerte celular. Sin embargo, la producción de especies reactivas de oxígeno en el citosol fue mayor con los lipopolisacáridos de bacterias patógenas (Mohamed *et al.*, 2015).

Adicional a esta función de los LPS en el establecimiento de la respuesta de defensa, estudios recientes han reportado su participación en procesos relacionados al desarrollo. Evseeva *et al.*, (2011), analizaron el efecto de los LPS (10 µg/ml) de *Azospirillum brasilense* Sp245 en la actividad funcional de células meristemáticas en raíces de trigo, a través de la determinación del índice mitótico y de la estimación inmunoquímica del contenido de antígeno proliferativo de iniciales (PAI, por sus siglas en inglés “Initial proliferative antigen”), un marcador de células meristemáticas de trigo, mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

(ELISA). Además, analizaron parámetros fisiológicos como longitud y peso fresco de parte aérea y la raíz. Los LPS de *A. brasilense* Sp245 aumentaron la longitud y el peso fresco de la raíz de plántulas de trigo, e incrementaron el índice mitótico y el contenido de PAI. Este efecto fue similar al producido por la bacteria completa.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se analizó, bajo condiciones de invernadero, el efecto de los LPS de *A. brasilense* Sp245 en el desarrollo de plantas de trigo (*Triticum aestivum*, variedad NANA), incluyendo la formación y el tamaño de las espigas, el tamaño, peso y composición química del grano de trigo y la senescencia de la planta. Las plantas fueron asperjadas dos veces por semana con dos concentraciones de LPS (2 µg/ml y 5 µg/ml) durante 3 meses. Se observó un aumento de la longitud de la lámina foliar, pero una disminución en el contenido de clorofila en plantas tratadas con lipopolisacáridos, además, la formación de espigas se aceleró, y el tamaño y número de granos por espigas disminuyó con respecto al control. Estas respuestas fueron dependientes de las concentraciones de lipopolisacáridos utilizadas (Chavéz-Herrera *et al.*, 2018).

Vallejo-Ochoa *et al.*, (2017) analizaron el efecto de la procianidina B2, en el crecimiento de las plántulas de trigo y en las respuestas bioquímicas tempranas inducidas por los LPS de *A. brasilense* Sp245. La procianidina B2 es un compuesto polifenólico presente en las plantas, con propiedades para inhibir la adhesión microbiana (Johnson-White *et al.*, 2006) por su interacción con los LPS, neutralizando la endocitosis de los LPS, y bloqueando su interacción con sus receptores (Delehanty *et al.*, 2007). El incremento en el crecimiento de las plántulas de trigo y de las respuestas bioquímicas como la producción de EROs, y la actividad de la enzima peroxidasa (POX), fueron inhibidas por la adicción de la procianidina B2. Estos resultados sugieren que las enzimas POX de la pared celular podrían ser un blanco molecular de los LPS de *A. brasilense*, y que el reconocimiento de LPS por las células vegetales es requerido para activar las respuestas de la planta.

2.6 Formación de H₂O₂ en plantas

El oxígeno molecular (O₂) constituye el 21% de la atmósfera, el 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utilizan el oxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas reactivas conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) (Macedo-Márquez, 2012). Las EROs incluyen a los radicales libres como el superóxido (O₂⁻), y el radical hidroxilo (OH[·]), pero también a los no radicales como el singulete de oxígeno (¹O₂) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Mhamdi *et al.*, 2010).

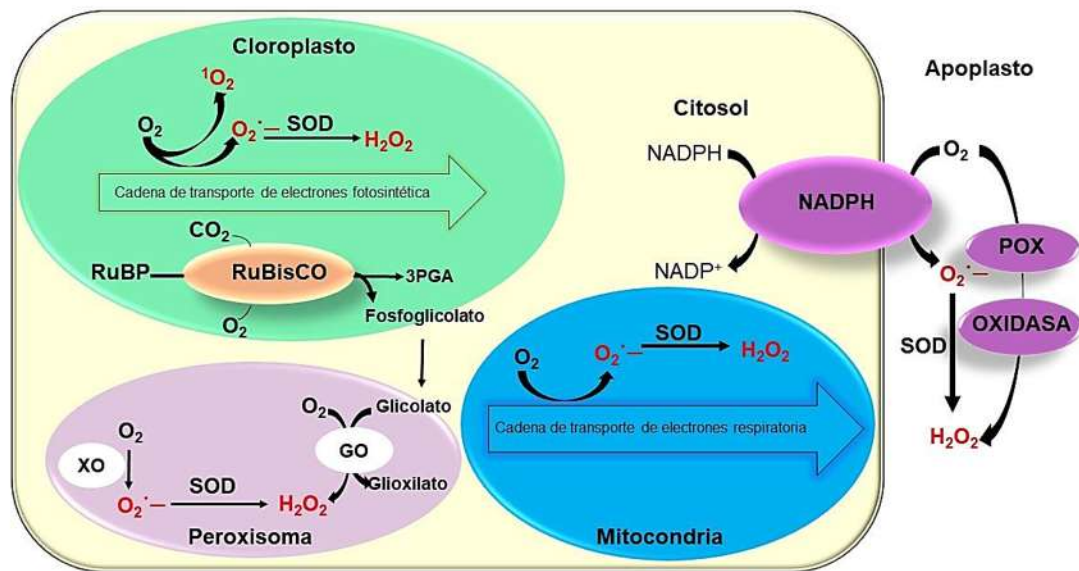


Figura 5. Principales sitios de producción de H₂O₂ en células fotosintéticas. GO, glicolato oxidasa. 3PGA, 3-fosfoglicerato. POX, Peroxidasa. RuBisCO, ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. RuBP, ribulosa 1,5-bisfosfato. SOD, superóxido dismutasa. XO, xantina oxidasa. Tomado de Mhamdi *et al.*, (20109).

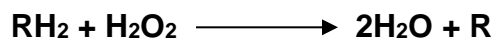
El H₂O₂ ha recibido particular atención como molécula señal involucrada en la regulación de procesos biológicos específicos como las interacciones planta-patógeno. La generación del H₂O₂ es debida a una reducción de dos electrones del O₂, catalizada por oxidases o indirectamente a través de la reducción o dismutación del anión superóxido catalizado por la enzima superóxido dismutasa (Mhamdi *et al.*,

2010). Se considera a la mitocondria como la mayor productora de EROs (Macedo-Márquez, 2012). Estas moléculas se generan como un subproducto inevitable del metabolismo celular, además, existe una red de enzimas que producen especies reactivas de oxígeno, entre ellas las NADPH oxidasas (NOXs) y peroxidasas clase III. Las NOXs de las plantas son conocidas como homólogos de las oxidasas que generan la explosión oxidativa en mamíferos (Respiratory Burst Oxidase Homologues-RBOH), y específicamente, son homólogos de la subunidad catalítica gp91phox de las NOXs del fagocito animal (Sagi y Fluhr, 2006). Los peroxisomas también son sitios importantes de producción de EROs (Figura 5). En este orgánulo, el H₂O₂ puede formarse directamente a partir del O₂ mediante la glicolato oxidasa fotorrespiratoria, o por otro tipo de enzimas tales como la xantina oxidasa acoplada a superóxido dismutasa (Mhamdi *et al.*, 2010).

Se ha reportado que el H₂O₂ actúa como segundo mensajero debido a que tiene un tiempo de vida prolongado, y puede atravesar libremente las membranas. En plantas, participa en procesos metabólicos y puede activar respuestas de defensa ante diferentes tipos de estrés. Sin embargo, el exceso de H₂O₂ conduce a un estrés oxidativo que daña la integridad de las células. Por lo tanto, puede jugar un doble papel: a bajas concentraciones como moléculas de señalización y a altas concentraciones desencadenan la muerte celular programada (Neill *et al.*, 2008).

2.7 Peroxidasas (POX)

Las POX son enzimas, la mayoría hemoproteínas, que catalizan la reducción del H₂O₂ y son capaces de oxidar varios sustratos. La reacción general es la siguiente:



Estas enzimas están presentes en animales, microorganismos y plantas, y se clasifican basándose en su estructura y propiedades catalíticas (Hiraga *et al.*, 2001). Todas contienen la misma estructura general, que consiste en una ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y diez α -hélice. Las POX de la clase I, como la ascorbato peroxidasa, la glutatión peroxidasa, la citocromo peroxidasa y la catalasa peroxidasa, son proteínas intracelulares presentes en procariotas y eucariotas. Las POX de la clase II se encuentran exclusivamente en hongos, y se clasifican en manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y peroxidasa versátiles que pueden ser secretadas, y tienen un papel importante en la degradación de lignina (Passardi *et al.*, 2004).

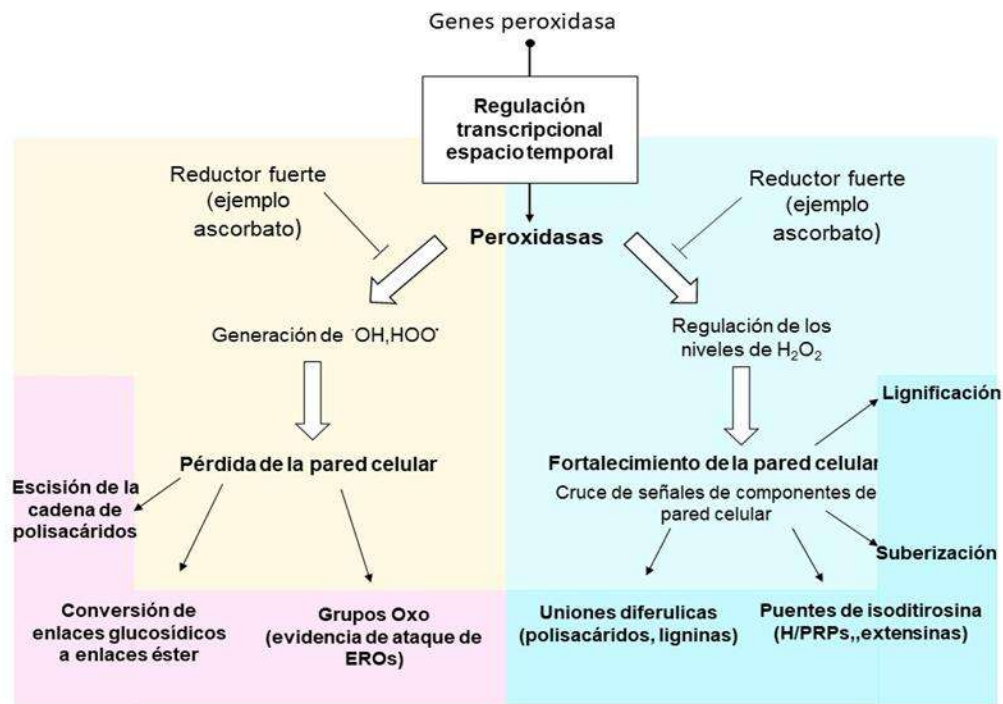


Figura 6. Actividad de las peroxididasas de pared celular. Las peroxididasas de la clase III generan EROs, como el $\text{OH}\cdot$ y el $\text{HOO}\cdot$, pero también pueden regular el nivel de H_2O_2 . Por lo tanto, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento celular al controlar el equilibrio entre la pérdida de la pared celular (Izquierda) y la síntesis de novo/fortalecimiento de la pared celular (derecha). H/RPRs: Hidoxiprolina/Proteínas Ricas en Prolina. Tomado de e Francoz *et al.*, (2015).

Las POX de la clase III son enzimas presentes en las plantas, y están implicadas principalmente en procesos de desarrollo y en respuestas a estrés

biótico y abiótico (Almagro *et al.*, 2009). Se caracterizan por conservar residuos de aminoácidos necesarios para la unión del grupo hemo, la transferencia de electrones y la estabilidad de la estructura 3D. Además, contienen dominios variables en relación con su diversidad de sustratos (Francoz *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se ha reportado que participan en la formación de la lignina y la suberina, componentes de la pared celular, y en la síntesis de fitoalexinas. Además participan en el metabolismo de EROs, activando la respuesta de hipersensibilidad (HR), una forma de muerte celular programada en el sitio de infección asociado con el desarrollo limitado de patógenos (Almagro *et al.*, 2009). Las funciones de las peroxidasas de esta clase pueden explicarse por su afinidad por diversos sustratos, y por la regulación de la expresión de genes espacio-temporal (Francoz *et al.*, 2015). Se encuentran principalmente en el citosol, la vacuola, el apoplasto, o la pared celular (Mura *et al.*, 2005). Estas últimas, regulan procesos de expansión celular, controlando la pérdida y el fortalecimiento de la pared celular (Figura 6), a través de la formación de enlaces y oxidación de compuestos aromáticos presentes en la pared celular como los monolignoles, ácidos cinámicos, ácidos aromáticos, entre otros, en presencia de H₂O₂. Además, regulan concentraciones locales de H₂O₂, o pueden generar EROs, como el OH[•], que rompe los enlaces covalentes de polímeros presentes en la pared celular. El proceso de expansión celular es controlado por diferentes isoformas, que a su vez están reguladas a nivel transcripcional (Francoz *et al.*, 2015). De acuerdo con la base de datos de las POX (The peroxidase database), hasta junio del 2018 se habían reportado 142 tipos en trigo.

2.8 El calcio en las plantas

En plantas, el calcio juega un papel central como segundo mensajero en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos (Mura *et al.*, 2005). Participa en la estructura y función de la membrana celular mediante la unión a fosfolípidos, estabiliza la bicapa lipídica, proporcionando integridad estructural. Las

concentraciones de Ca^{2+} necesarias para mantener la integridad de la membrana son de entre 0.1 y 1.0 mM (Hepler, 2005). Las concentraciones de calcio en el citosol son de 0.1 a 0.2 μM , mientras que en las vacuolas se encuentra 10^5 veces más concentrado, en el cloroplasto presenta un rango de 6.5 a 15 nM, y en el estroma 2.4 a 6.3 μM (Marschner, 1986; Díaz *et al.*, 2007).

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua receptora de Ca^{2+} que se encuentra en todos los eucariotes. Participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos dependientes de calcio. En respuesta a las fluctuaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} , la CaM se une a un conjunto de proteínas no relacionadas y modula su actividad. En las plantas, se ha identificado un número creciente de proteínas de unión a CaM (como las peroxidasas) que aparentemente no tienen una contraparte en animales. Algunas de estas proteínas activadas por Ca^{2+} / CaM específicas de plantas sincronizan la interacción entre el calcio y el H_2O_2 , en la respuesta de la defensa de las plantas contra los factores bióticos y abióticos (Mura *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Los lipopolisacáridos son los componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y son estructuras clave para el establecimiento y desarrollo de la interacción planta-bacteria. Se ha reportado que los LPS de *Azospirillum brasilense* promueven el crecimiento de la planta e inducen varias respuestas relacionadas con la defensa. Sin embargo, poco se conoce sobre su mecanismo de acción como molécula reguladora del crecimiento y del desarrollo en plantas.

4. HIPÓTESIS

La actividad de la enzima peroxidasa es incrementada durante el crecimiento de plántulas de trigo estimulado por los lipopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* Sp245.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de los lipopolisacáridos provenientes de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el crecimiento y la actividad de peroxidasa en plántulas de trigo.

5.2 Objetivos particulares:

1. Analizar la actividad de las peroxidasas en plántulas de trigo inoculadas con *A. brasilense* Sp245.
2. Evaluar el efecto de los LPS de *A. brasilense* sobre el crecimiento de plántulas de trigo.
3. Analizar el efecto de los LPS de *A. brasilense* Sp245 sobre la actividad de las peroxidasas de las plántulas de trigo.
4. Estudiar el papel del calcio en las respuestas de las plántulas de trigo a los LPS.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

La bacteria *A. brasilense* Sp245 fue donada por la Dra. Gladys Alexandre, del Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Universidad de Tennessee, Knoxville, Tennessee USA.

Las semillas de trigo, variedad NANA, fueron proporcionadas por el Dr. Mario Martín González Chavira, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, Guanajuato México.

6.2 Medio mínimo LB y mantenimiento de *A. brasilense* Sp245

La bacteria fue crecida en cajas Petri conteniendo medio estéril LB (Luria-Bertani) mínimo (Peptona, 10 g/L; Extracto de levadura, 5 g/L; NaCl, 5 g/L; MgSO₄, 0.186 g/L CaCl₂, 0.2775 g/L; Agar, 15 g/L), pH 7.0 ajustado con NaOH al 10% ,suplementado con Tetraciclina a una concentración de 10 µg/mL. Se sembró cada tercer día en medio mínimo LB sólido, incubando a 37 °C, durante 24 horas, y posteriormente se mantuvo a 4 °C hasta su resiembra.

6.3 Preinóculo e inóculo de *A. brasilense* Sp245

Para el preinóculo, se tomó una azada de *A. brasilense* Sp245 y se inoculó en 3 mL de medio mínimo LB líquido suplementado con Tetraciclina, a una concentración de 10 µg/mL. Posteriormente se incubó a 28 °C durante 16 horas en agitación a 180 rpm (incubadora: Labnet 211DS). Para preparar el inóculo, se partió de un volumen de 50 mL de medio mínimo LB, al que se le adicionaron 150 µL del preinóculo con una D.O. de 0.900, a una $\lambda=600$ nm. Se incubó bajo las mismas condiciones que el

preinóculo. Lo anterior fue realizado bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

6.4 Lavado de bacterias

Las bacterias crecidas en el medio LB líquido fueron lavadas de la siguiente manera: A partir de 1 mL del cultivo bacteriano con una D.O. de 0.900, a una $\lambda=600$ nm se llevó a cabo una centrifugación a 3893 g, durante 12 min, a temperatura ambiente (centrifuga Eppendorf 5415D). Se eliminó el sobrenadante, y la pastilla de bacterias se re-suspendió en 1 mL de NaCl al 0.85%, se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente a 3893 g, durante 12 min. Se eliminó el sobrenadante, y finalmente se re-suspendió en 1 mL de buffer de $MgSO_4$ 0.01 M.

6.5 Extracción de lipopolisacáridos

La extracción de lipopolisacáridos se realizó de acuerdo con el método reportado por Renukadevi *et al.*, (2012). Las bacterias se crecieron en 150 mL de medio mínimo LB líquido durante 24 h, a 30°C, en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 3,200 rpm, durante 10 min (centrifuga Centra CL2, rotor 800) para obtener un paquete celular, al cual se le adicionaron 5 mL de agua destilada estéril y 5 mL de fenol equilibrado con Tris-HCl 10 mM, pH 8, y se incubó a 65°C durante 20 min, en agitación (80 rpm). La muestra se dejó en reposo a 4°C, durante 24 h. Pasado ese tiempo se centrifugó a 4,300 rpm, durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se colocó en una membrana de diálisis de celulosa (Flat width 33 mm). La muestra se dializó en agua desionizada durante 72 h (cambiando el agua cada 24 h). La muestra dializada se centrifugó a 12,000 rpm, durante 10 min. Al sobrenadante (muestra dializada) se le adicionó etanol al 96% y acetato de sodio, a una concentración final de 0.15 M, en una proporción de 1:4. Se dejó en reposo por 24 h a -20°C. Finalmente, se centrifugó durante 20 min a 4,300 rpm. Se eliminó

el sobrenadante y la pastilla (precipitado) se disolvió en 250 μ L de agua destilada estéril. Los lipopolisacáridos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.6 Electroforesis de los LPS en gel SDS-PAGE

Los LPS se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), preparado de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli (1970). El gel concentrador al 5% se preparó de la siguiente manera: 1.785 mL de agua desionizada, 0.402 mL de acrilamida al 30 %, 0.75 mL de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 0.03 mL de SDS al 10% (w/v), 0.03 mL de persulfato de amonio, y 0.003 mL de TEMED (Tetrametiletilendiamina). Para el gel separador al 12 % se adicionaron: 1.28 mL de agua desionizada, 1.6 mL de acrilamida al 30 %, 1.04 mL de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 0.04 mL de SDS al 10 % (w/v), 40 μ L de persulfato de amonio y 4 μ L de TEMED. La electroforesis se desarrolló a 150 voltios para el gel concentrador, y 80 voltios para el gel separador, durante 90 min.

6.7 Tinción con nitrato de plata

Para revelar la presencia de LPS en el gel de poliacrilamida se utilizó el método reportado por Tsai y Frasch, 1981. El gel fue incubado en 100 mL de una solución de fijación (etanol 40%, ácido acético 5% y agua destilada estéril) durante toda la noche. Posteriormente, el gel se colocó en 100 mL de una solución de oxidación (ácido peryódico 0.7%, etanol 40%, ácido acético 5% y agua destilada) durante 5 min, y en agitación constante (40 rpm). Se realizaron 3 lavados de 15 min con 100 mL de agua destilada. Después el gel se sumergió en 100 mL de una solución de tinción (hidróxido de sodio 0.1 M, 1.33 mL de hidróxido de amonio, nitrato de plata 20% y agua destilada), durante 10 minutos, a 70 rpm. Se realizaron 3 lavados con 100 mL de agua destilada, durante 10 minutos. Se adicionaron 100 mL de la solución reveladora (0.005 g de ácido cítrico, 50 μ L de formaldehído al 37%, y agua

destilada), durante 15-20 min (hasta observar bandas color marrón que corresponden a los lipopolisacáridos). El gel se lavó con agua desionizada durante 10 min.

6.8 Tinción con azul de Coomassie

Se preparó de forma paralela un gel para tinción con azul de Coomassie de la siguiente manera: El gel de poliacrilamida se incubó en 100 mL de una solución de tinción (Coomassie Blue R-250 0.1% [w/v], etanol 40% [v/v], ácido acético glacial 10 % [v/v]), durante 10 a 20 min en agitación suave (30 rpm). Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno, en agitación. El gel fue colocado en 100 mL de una solución decolorante (etanol 40% y ácido acético glacial 10%), hasta desteñir el gel.

6.9 Desinfección y germinación de semillas de trigo

Las semillas fueron seleccionadas por homogeneidad de tamaño. Se sumergieron en una solución de SDS al 1%, durante 3 min, en agitación constante. Se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en una solución de cloro al 1%, durante 5 min, y se enjuagaron con agua destilada estéril hasta quitar el olor del cloro (aprox. 3 veces). Las semillas desinfectadas se colocaron en cajas Petri conteniendo papel filtro y algodón húmedo, previamente esterilizados (15 mL de agua destilada estéril) (20 semillas por caja). Las cajas fueron incubadas en oscuridad durante 3 días, a 26 °C.

6.10 Preparación de medio MS 0.2X

Para llevar a cabo la interacción planta-bacteria o planta-LPS, se preparó medio MS (Murashige y Skoog) 0.2X líquido (0.9 g/L y sacarosa 6 g/L), se ajustó el pH a 7.0 con KOH 10%, se esterilizó durante 15 min, a 15 lb de presión y 121°C.

6.11 Interacción de las plántulas de trigo con *A. brasilense* Sp245

Las semillas de trigo de 3 días de germinación se transfirieron a frascos cilíndricos de cristal (10x20 cm), conteniendo 30 mL de medio MS al 0.2X. Después se inocularon con *A. brasilense* Sp245 a una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC), previamente lavadas con buffer de fosfatos. Como control se colocaron semillas de trigo de 3 días de germinación en medio MS al 0.2X sin inocular. Posteriormente, se incubaron en una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 2 000 Lux, 26°C, y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, durante 4 días.

6.12 Interacción de plántulas de trigo con LPS de *A. brasilense* Sp245

Las semillas de trigo germinadas durante 3 días se transfirieron a frascos cilíndricos de cristal (10x20 cm) conteniendo 30 mL de medio MS al 0.2X. Se adicionaron dos concentraciones de lipopolisacáridos (10 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$). Como control se colocaron semillas de trigo de 3 días de germinación en medio MS al 0.2X sin la adición de LPS. Se incubaron en una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 2 000 Lux, 26°C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, durante 96 h.

6.13 Análisis de parámetros morfológicos

Después de 4 días de crecimiento, se midió con una regla graduada la longitud de la lámina foliar y de la raíz (midiendo la raíz seminal primaria). Se registró el peso fresco y peso seco de las plántulas, utilizando una balanza analítica (Voyager OHAUS N. V14130). Además, utilizando el programa image J, se midió la longitud

de 500 pelos radicales por tratamiento, con tres repeticiones, en una sección de 4 mm a una distancia de 1 cm del meristemo apical de la raíz seminal primaria.

6.14 Análisis del contenido de clorofila

Se obtuvo el peso fresco de la lámina foliar y posteriormente el material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de metanol, se re-suspendió por medio de agitación en vortex durante 15-30 segundos, en condiciones de oscuridad. Para eliminar los restos de tejido vegetal; se realizó una centrifugación (centrifuga Eppendorf 5415D) a 3000 rpm, durante 15 min, a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf protegido de la luz. Se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU 530) a longitudes de onda de 665 y 652 nm, utilizando metanol como blanco. La concentración de clorofila se obtuvo aplicando las siguientes ecuaciones reportadas por Lichenthaler, 1987:

$C_a=16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$ para el contenido de clorofila A, $C_b=34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$ para el contenido de clorofila B y $C_{a+b}= 1.44A_{665.2}+24.93A_{652}$ para el contenido de clorofila total. Los resultados obtenidos fueron ajustados al peso de la lámina foliar.

6.15 Elaboración de una curva de calibración de proteínas totales (curva estándar)

A partir de un stock de BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración de 1 mg/ml se prepararon diferentes concentraciones: 2µg, 5µg, 10µg, y 15µg. Cada concentración se mezcló con 200 µL de reactivo de Bradford y agua destilada (para tener un volumen final de 1 mL), como blanco se utilizaron 800 µL de agua destilada más 200 µL de Bradford. Una vez preparadas las concentraciones se agitaron en vortex durante 10 segundos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se registró la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman DU 530), a una

longitud de onda de 595 nm. Este procedimiento fue realizado por triplicado. Se graficó la absorbancia obtenida en contra de la concentración conocida de la proteína (Figura 7).

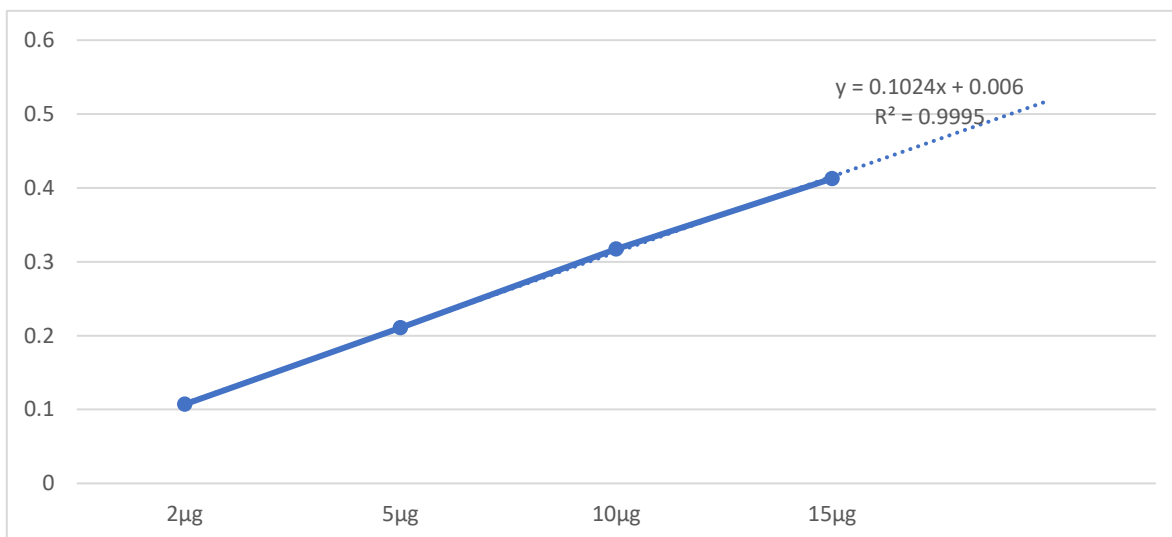


Figura 7. Curva estándar de albúmina. En el eje de las “X” se encuentra la concentración de proteína conocida y en el eje de las “Y” la absorbancia obtenida.

6.16 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El contenido de proteína en las muestras se obtuvo de la siguiente manera: Se tomaron 10 µL del extracto crudo de proteínas y se agregaron a un tubo que contenía 790 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford (Bradford BIO RAD). Se agitó en el vortex durante 10 s, y se incubó a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 5 min. Como blanco se utilizó agua destilada estéril y 200 µL del reactivo Bradford. Se registró la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Beckman DU 530), a una longitud de onda de 595 nm. La cantidad de proteína se determinó basándose en la curva estándar BSA, previamente descrita.

6.17 Extracción de peroxidasas

Para la extracción de la enzima, se obtuvo el peso fresco de la raíz y posteriormente se maceró con nitrógeno líquido hasta tener un polvo fino, el cual fue transferido en 1 mL de buffer de NaH_2PO_4 , 100 mM, pH 7, se homogenizó en vortex durante 20 s. La muestra se centrifugó (centrifuga Eppendorf 5415D) a 12 000 rpm, a 4 °C, durante 30 min. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, protegido de la luz, y se almacenó a 4 °C (por un tiempo máximo de 2 h) para los diferentes ensayos.

6.18 Análisis de la actividad de peroxidasa

La actividad de la enzima peroxidasa fue determinada por espectrofotometría, utilizando un buffer de guayacol (guayacol 0.25%, preparado en NaH_2PO_4 , 100 mmol, pH 6, y H_2O_2 al 0.125% v/v). El ensayo enzimático se realizó adicionando 1 μl del extracto de la enzima a 999 μl de buffer de guayacol. La actividad se analizó por espectrofotometría a 470 nm (Beckman DU 530), registrando la absorbancia de la muestra, a intervalos de 30 segundos, durante 3 min (Donald y Cipollini, 1998). La actividad se calculó utilizando la siguiente formula: $V = \Delta A / \epsilon L \Delta t$.

V = velocidad de reacción

ΔA = diferencia entre la absorbancia final – la absorbencia inicial.

ϵ =26600mol/cm

L = longitud del paso de la luz a través de la celda (1 cm).

t = tiempo de medición

Adicionalmente, se analizó la actividad de la enzima en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas, cargando 20 μg de proteína total. El gel concentrador al 5% se preparó adicionando: 1.785 mL de agua desionizada, 0.402 mL de acrilamida al 30 %, 0.75 mL de buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 0.03 mL de persulfato de amonio, y 0.003 mL de TEMED (Tetrametiletilendiamina). Para el gel separador al 12 % se agregó: 1.28 mL de agua desionizada, 1.6 mL de acrilamida al 30 %, 1.04 mL de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8. La electroforesis se desarrolló a 100 voltios durante 90 min. Posteriormente, el gel fue sumergido en 100 mL de citrato de sodio 50 mM,

pH 5.5, durante 30 min en agitación constante y fue revelado en 100 mL de una solución de diaminobenzidina (DAB 1Mm y H₂O₂ 0.03%, en citrato de sodio 50 mM, pH 5.5), hasta la aparición de bandas color café (Christensen *et al.*, 1998).

6.19 Inhibición enzimática de peroxidasa

Las plántulas de trigo con 3 días de germinación se transfirieron a frascos cilíndricos de cristal que contenían 30 mL de medio MS, y se les adicionó 50 ó 100 µM del inhibidor ácido salicilhidroxámico (SHAM) más 100 µg/mL de lipopolisacáridos. Como control se usaron tratamiento con las mismas concentraciones de SHAM, pero sin lipopolisacáridos. Las plántulas fueron tratadas durante 96 h, en cámara de crecimiento. Posteriormente se analizaron parámetros morfológicos, así como la actividad de la peroxidasa.

6.20 Detección de la actividad de POX *in vivo*

Las plántulas de trigo se trataron con ácido salicilhidroxámico (SHAM), y lipopolisacáridos (100 µg/mL) durante 4 días, pasado ese tiempo, las raíces se transfirieron a una solución para revelar actividad de peroxidasa (0.1 M de TRIS-acetato, pH5, 0.1 mM de 2,6-Diclorofenolindofenol (2,6-DCPI) y 0.9 mM de H₂O₂) (Córdoba-Pedregosa *et al.*,2004). Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Finalmente, se analizaron en un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) a 0.63 x, y se tomaron fotografías con el programa TV@Anywhere plus de MSI.

6.21 Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno

Para la detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se utilizó el procedimiento descrito por Thordal-Christensen *et al.*, 1997. Las raíces de plántulas de trigo de 3 días de germinación, y con 24 horas de tratamiento con LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se sumergieron durante 2 h en una solución de 3,3 diaminobenzidina (DAB 0.1%, pH 3.8, ajustando con HCl 10%) Después, se colocaron en agua destilada hasta su análisis en un microscopio estereoscópico (Leica MZ6), a 0.63 X, y se tomaron fotografías con el programa TV@Anywhere plus de MSI.

La cuantificación de H_2O_2 se realizó por espectrofotometría utilizando POX como catalizador y guayacol como sustrato (Tiedemann, 1997). El tejido de la raíz se pulverizó con nitrógeno líquido y se incubó en 1.5 ml de agua destilada estéril durante 2 h. Posteriormente se tomaron 500 μL de la muestra y se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía 500 μL de la siguiente mezcla de reacción: 0.05% de guayacol (440 $\mu\text{L}/\text{L}$) y peroxidasa de rábano (350 $\mu\text{L}/\text{L}$; 2500U/mL) disueltos en buffer fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0), la mezcla fue incubada en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas a una longitud de onda de 450 nm, usando como blanco agua destilada estéril. Este procedimiento fue realizado por triplicado. La concentración de H_2O_2 fue calculada con base en la concentración preestablecida por una curva patrón, donde: 0.056 λ equivale a 250 μM de H_2O_2 .

6.22 Efecto del cloruro de lantano (LaCl_3) y del ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) sobre la interacción trigo-LPS

Plántulas de trigo de 3 días de germinación se trataron con 0.5 y 1 μM de cloruro de lantano (LaCl_3), un bloqueador de los canales de calcio, y con 100 y 200 μM de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), un agente quelante de iones de calcio. Adicionalmente, se realizaron tratamientos con LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de las dos concentraciones de LaCl_3 y de EGTA. Los tratamientos se realizaron en frascos cilíndricos de cristal que contenían 30 mL de medio MS. Se incubaron

durante 4 días en cámara de crecimiento. Posteriormente se analizaron parámetros de crecimiento, y la actividad de las peroxidases.

6.23 Efecto del ionóforo de calcio A23187 y del cloruro de calcio (CaCl₂) sobre la interacción trigo-lipopolisacáridos

Plántulas de trigo de 3 días de germinación se trataron con 10 y 100 μM del ionóforo A23187, y con 100 y 1000 μM de cloruro de calcio (CaCl₂), una fuente de iones de calcio. Adicionalmente, se realizaron tratamientos con LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de las dos concentraciones de A23187 y de CaCl₂. Los tratamientos se realizaron en frascos cilíndricos de cristal que contenían 30 mL de medio MS. Se incubaron durante 4 días en cámara de crecimiento. Posteriormente se analizaron parámetros de crecimiento, y la actividad de las peroxidases.

6.24 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con la prueba *t* de Student para comparar dos tratamientos, o un análisis de ANOVA y la prueba de *Tukey* para comparar varios tratamientos con el control, con una $\alpha = 0.05$, utilizando el programa Statistica 7.0. Los experimentos se realizaron con tres repeticiones, variando el número de muestras dependiendo del experimento realizado.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo

Inicialmente se procedió a establecer *in vitro* el sistema de interacción de la bacteria con las plántulas de trigo. Plántulas de tres días de germinación se colocaron en medio líquido MS 0.2X. Posteriormente se inocularon con *A. brasilense* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Como control se utilizaron plántulas sin inocular. Después de cuatro días de interacción, se analizó el efecto sobre el crecimiento de las plántulas de trigo, cuantificando los siguientes parámetros de crecimiento: longitud de la lámina foliar, longitud de la raíz, peso fresco y peso seco de las plántulas (Figura 8).

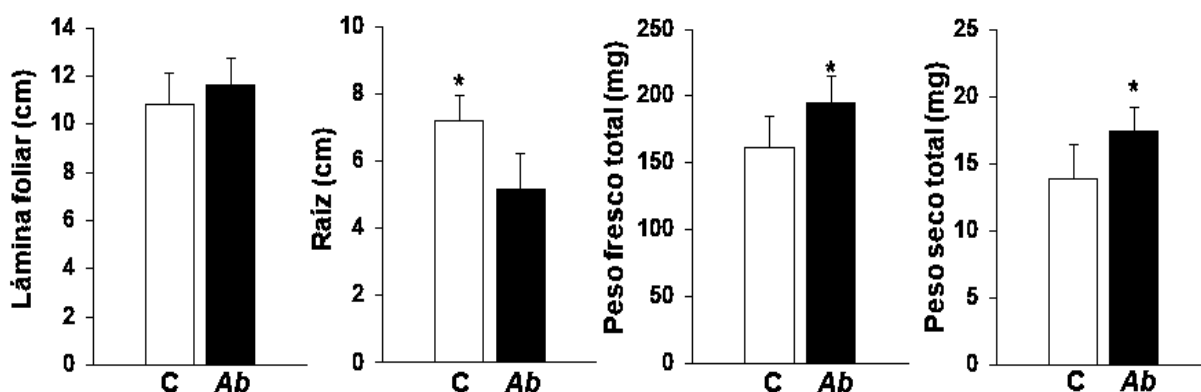


Figura 8. Efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo. C=control (plántulas no inoculadas), Ab=*A. brasilense* (plántulas inoculadas) (1×10^6 UFC /ml). El asterisco indica diferencia estadística significativa, de acuerdo con t-test $p < 0.05$. Las barras denotan desviación estándar. $n=10$.

Cuatro días después de la interacción con la bacteria no se observó diferencia en la longitud de la lámina foliar, pero se distinguió una disminución en la longitud de la raíz y un incremento en el peso fresco y en el peso seco de la planta.

7.2 Efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre la formación de pelos radicales en plántulas de trigo

Puesto que *A. brasilense* Sp245 modifica la arquitectura de la raíz al disminuir su longitud, se analizó su efecto sobre la formación de pelos radicales, a una distancia de un centímetro después del meristemo apical (figura 9). Después de 4 días de interacción, las raíces de las plántulas mostraron un incremento en formación y en la longitud de pelos radicales, en comparación con las plántulas control, las cuales no fueron tratadas.

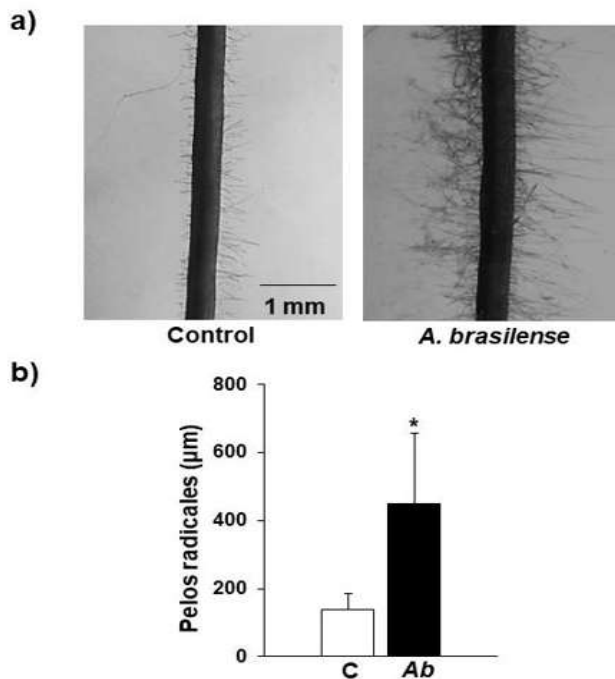


Figura 9. Formación de pelos radicales. a) Imagen representativa de la formación de pelos radicales 4 días después de la inoculación. C=control (plántulas no inoculadas), Ab=*A. brasilense* (plántulas inoculadas) (1×10^6 UFC /ml). b) En el eje Y: Longitud de los pelos radicales. El asterisco indica diferencia estadística significativa de acuerdo con *t*-test $p < 0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=500$.

7.3 Contenido de clorofila en plántulas de trigo

La clorofila es el pigmento fotosintético absorbente de luz más importante, el cual puede ser utilizado para medir de manera indirecta el estado nutricional de las plantas. Los organismos fotosintéticos contienen varias clases de clorofila que difieren entre sí por los grupos laterales unidos al anillo de porfirina: la clorofila *a*, contiene un grupo metilo en el tercer carbono porfirínico, mientras que la clorofila *b*, contiene un grupo formilo (Mathews, 2002; Vallero, 2016). El contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total fue cuantificado en plántulas, 4 días después de la interacción.

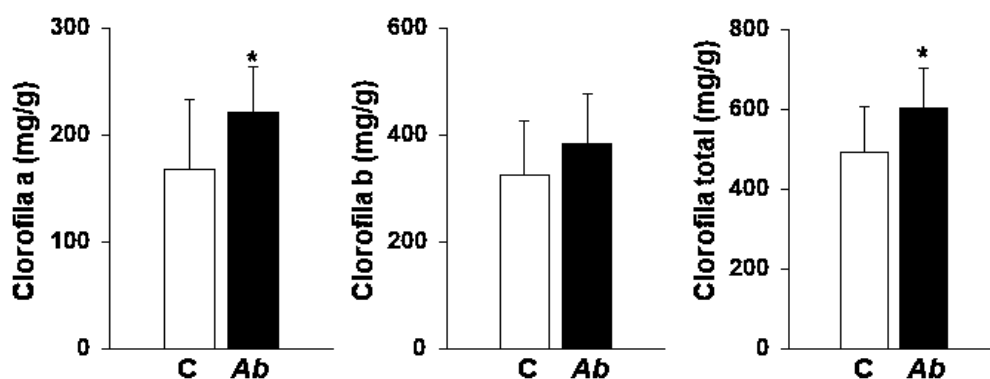


Figura 10. Contenido de clorofila. El contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total se cuantificó en plántulas 4 días después de la inoculación con la bacteria. C=control (plántulas no inoculadas), Ab=*A. brasilense* (plántulas inoculadas) (1×10^6 UFC /ml). El asterisco indica diferencia estadística significativa de acuerdo con t-test $p < 0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

Se observó un incremento en el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total en las plántulas inoculadas (Figura 10), lo que sugiere que la bacteria activa procesos metabólicos de la planta, tales como el aumento en el contenido de clorofila.

7.4 Efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre la actividad de las peroxidadasas.

En plantas, las POX están involucradas en diferentes funciones tejido-específicas, participando principalmente en aspectos de regulación del crecimiento vegetal, y como parte del sistema antioxidante. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando peróxido como oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido (Francoz *et al.*, 2015).

Después de 4 días de interacción con la bacteria, se analizó la actividad de POX en raíces de trigo, puesto que este órgano es modificado por *A. brasilense*.

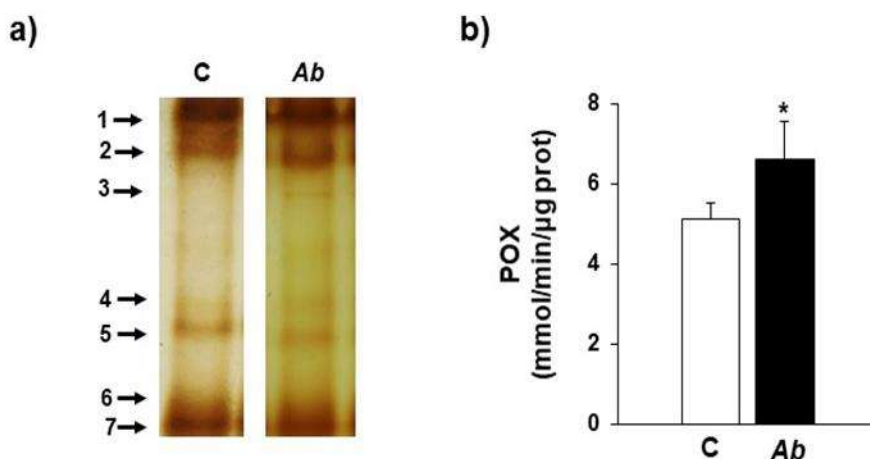


Figura 11. Actividad peroxidasa. a) Análisis por PAGE de la actividad de POX en raíces de plántulas de trigo inoculadas con la bacteria *A. brasilense* Sp245. Las flechas indican la presencia de isoenzimas. b) Análisis por espectrofotometría de la actividad de POX. C=control (plántulas no inoculadas), Ab=*A. brasilense* (plántulas inoculadas) (1×10^6 UFC /ml). El asterisco indica diferencia estadística significativa de acuerdo con t-test $p < 0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar.

Inicialmente, la actividad se analizó por electroforesis en condiciones nativas, y después por espectrofotometría, esto último cuantificando la formación del tetraguiacol, el cual se forma por la oxidación del guayacol catalizado por la enzima, reduciendo al peróxido de hidrógeno.

En el análisis por electroforesis se identificaron al menos siete isoenzimas, todas mostraron alta actividad en las raíces de las plantas control (plantas que no fueron inoculadas). Estas isoenzimas también estuvieron presentes en las raíces de

plántulas inoculadas, observándose un incremento en la actividad en las isoenzimas 3, 4 y 5 (Figura 11a). Asimismo, el análisis por espectrofotometría mostró un incremento en la actividad total mayor en las raíces de las plántulas inoculadas con *A. brasilense* (Figura 11b).

7.5 Análisis de LPS por SDS-PAGE.

Se evaluó el efecto de los LPS sobre el crecimiento de las plántulas de trigo. Para ello, se realizó su extracción de la rizobacteria. Después de su extracción, su pureza y su integridad se analizaron por SDS-PAGE, revelando su presencia con nitrato de plata (Figura 12). Se observó un patrón de bandas característico de la presencia de diferentes tamaños de los LPS.

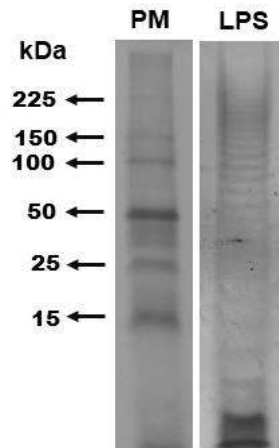


Figura 12. Perfil electroforético de LPS revelados con nitrato de plata. Carril 1; M: marcador de peso molecular, Carril 2: LPS de *A. brasilense* Sp245. KDa: kilodaltones.

Cada una de las bandas representa a una molécula de LPS, pero de diferente longitud, con diferente peso molecular debido a la longitud creciente del antígeno O. Con este análisis se comprobó que los LPS se obtuvieron de forma pura, y que además mostraron una probable integridad estructural, conteniendo todos los componentes característicos de la molécula.

La pureza de los LPS se confirmó por la tinción con Coomassie de un gel desarrollado de forma paralela, para detectar la presencia de proteínas, las cuales son los contaminantes más comunes durante su extracción. No se observó la presencia de proteínas en los carriles correspondientes a las muestras de LPS.

7.6 Efecto de los LPS sobre las plántulas de trigo

Se procedió a analizar el efecto los LPS sobre el crecimiento de las plántulas de trigo, 4 días después de su aplicación.

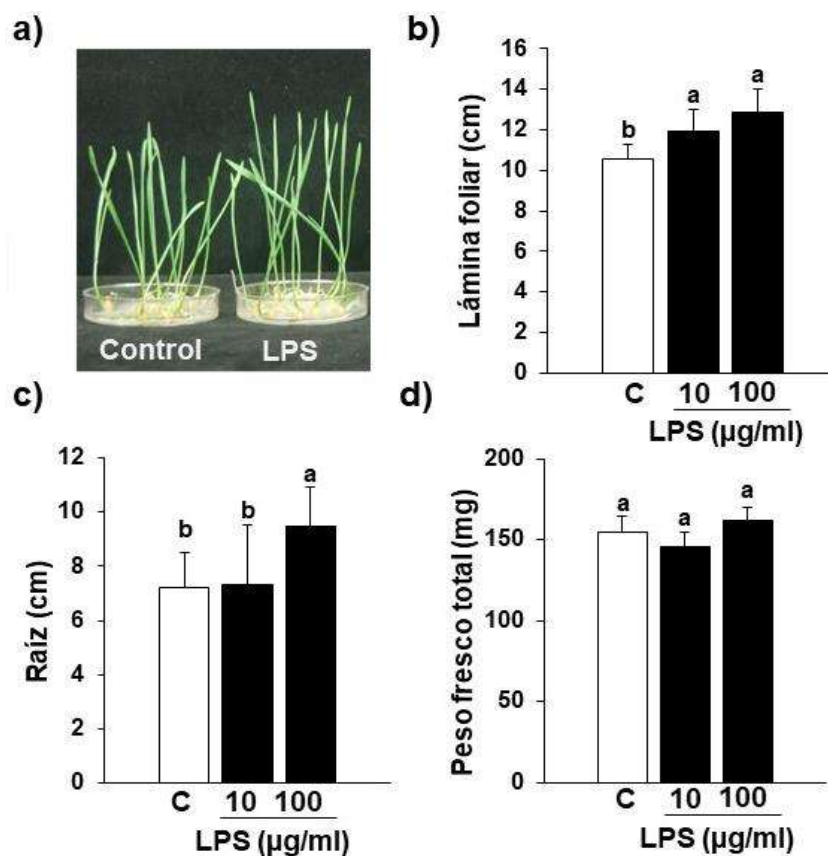


Figura 13. Efecto de los LPS de *A. brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de trigo. a) imagen representativa del crecimiento de las plántulas de trigo tratadas durante 4 días con 100 µg/ml de LPS. b) Longitud de la lámina foliar. c) Longitud de la raíz. d) Peso fresco total de la planta. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm desviación estándar. $n=10$.

Se utilizaron dos concentraciones, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, con la finalidad de seleccionar la concentración que muestre la mejor estimulación sobre el crecimiento.

A la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se observó un incremento en la longitud de la lámina foliar y de la raíz, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el peso fresco total.

7.7 Efecto de los LPS sobre la formación de pelos radicales

Posteriormente, se evaluó el efecto de los LPS sobre la formación de pelos radicales (Figura 14).

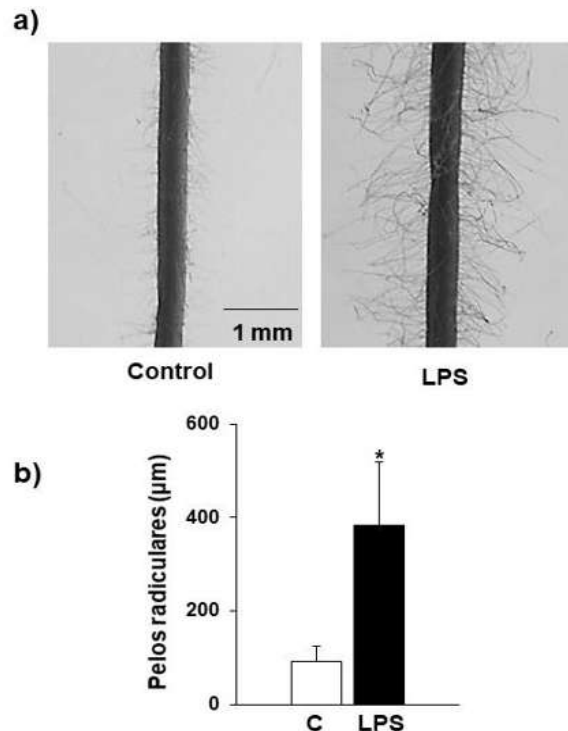


Figura 14. Efecto de los LPS sobre la formación de pelos radicales. Imagen representativa de la formación de pelos radicales, 4 días después de la adición 100 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Barra= 1mm. **b)** En el eje Y: Longitud de los pelos radicales. El asterisco indica diferencia estadística significativa de acuerdo con t-test $p < 0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=500$.

Para esto, las plántulas se trataron con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, durante 4 días, y se analizó un centímetro después del meristemo apical de la raíz,

utilizando un microscopio estereoscópico. Las plántulas tratadas con los LPS aumentaron la longitud de los pelos radicales, de manera similar al efecto producido por la bacteria.

7.8 Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en raíces de trigo

De acuerdo con los resultados anteriores, las raíces de las plántulas de trigo son modificadas al interactuar con la bacteria o con los LPS, por lo que se realizó una comparación de su efecto sobre la producción de H₂O₂, el cual está involucrado en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo, y es necesario para la formación de pelos radicales (Foreman *et al.*, 2003). También participa en la formación de lignina regulada por peroxidasas (Ros Barceló, 2005).

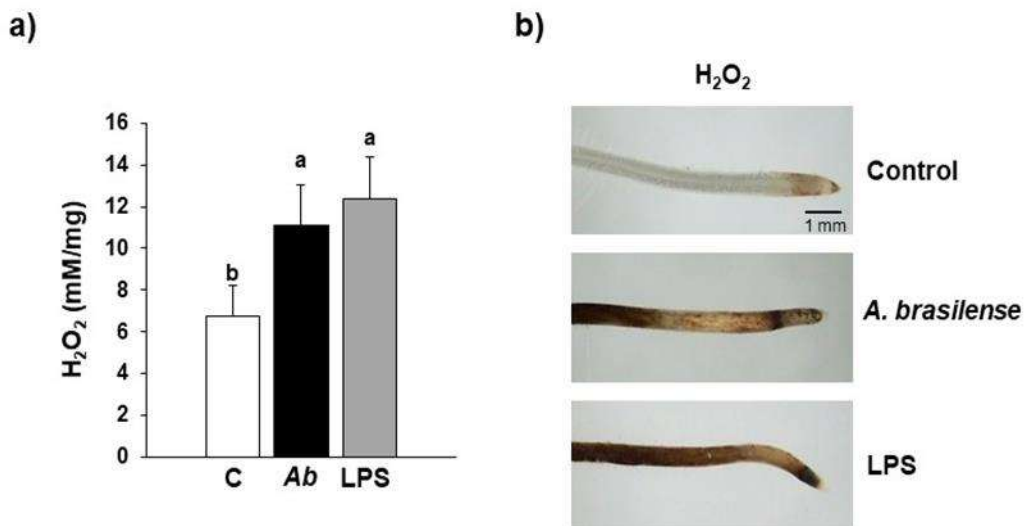


Figura 15. Producción de peróxido de hidrógeno. a) Cuantificación de H₂O₂ de plántulas de trigo. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. n=10. **b)** Imagen representativa de la raíz principal de plántulas de trigo teñidas con DAB. n=5. El color café indica la producción de H₂O₂. C=control, Ab=*A. brasilense*, LPS=lipopolisacáridos.

Para la cuantificación y detección de H₂O₂, se utilizaron raíces de plántulas de 3 días de germinación y 24 horas de inoculación con la bacteria o tratadas con LPS. En la cuantificación por espectrofotometría se reportó un aumento significativo en la

producción de H₂O₂ tanto en las raíces de las plántulas inoculadas con *A. brasilense* como en aquellas que fueron tratadas con los LPS, en relación con el control. En la detección de la producción de H₂O₂ con 3,3 diaminobenzidina (DAB), se observó un incremento de H₂O₂ en la zona del meristemo y en la zona de diferenciación, con ambos tratamientos (Figura 15). El aumento en los niveles de H₂O₂ posiblemente se encuentre relacionado con el aumento en la longitud de los pelos radiculares.

7.9 Efecto de los LPS sobre la actividad de POX en la raíz en plántulas de trigo.

Se realizó el análisis de la actividad de peroxidasa en raíces de plántulas de trigo, tratadas durante 4 días con 100 µg/mL de LPS, por SDS-PAGE, y por espectrofotometría (Figura 16). Se identificaron siete isoenzimas las cuales, también estuvieron presentes en las raíces de las plántulas infectadas con la bacteria. Se observó un incremento en la intensidad de las isoenzimas 4 y 5 en las raíces de las plántulas tratadas con LPS.

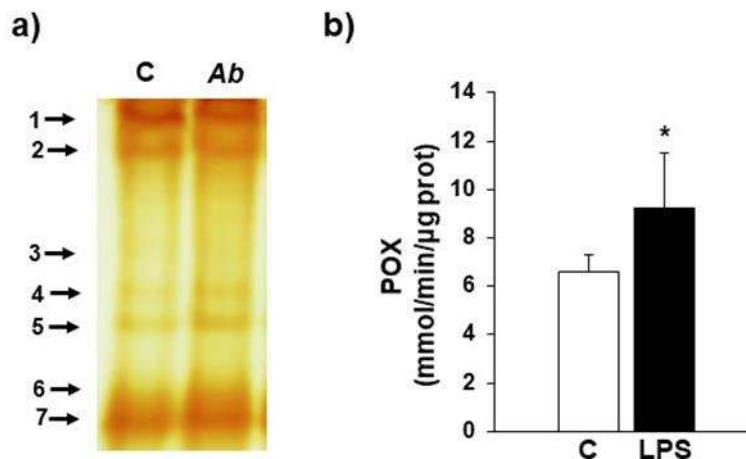


Figura 16. Actividad de peroxidasa en plántulas tratadas con LPS. a) Análisis por SDS-PAGE de la actividad POX en raíces de plántulas. Las flechas indican las isoenzimas presentes en el gel. b) Análisis por espectrofotometría de la actividad POX. C=control, Ab=*A. brasilense*, LPS=lipopolisacáridos. El asterisco indica diferencia estadística significativa de acuerdo con t-test $p < 0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar.

El análisis espectrofotométrico de la actividad total de POX de raíces de plántulas de trigo tratadas con LPS, también mostró un incremento significativo con respecto a la actividad peroxidasa de las plántulas control.

7.10 Efecto de la inhibición de las POX sobre el crecimiento de plántulas de trigo

Para analizar el efecto de las POX sobre el crecimiento de las plántulas de trigo estimulado por los LPS, se realizaron experimentos con un enfoque farmacológico utilizando ácido salicilhidroxámico (SHAM), un inhibidor alostérico de peroxidasas, el cual inhibe el sitio de unión del ligando al grupo hemo presente en muchos tipos de peroxidasas (Ikeda-Saito *et al.*, 1990).

Las dos concentraciones de SHAM utilizadas, 50 y 100 μM , disminuyeron el crecimiento de las plántulas, sin embargo, se observó un efecto más notable en la longitud de la raíz (Figura 17).

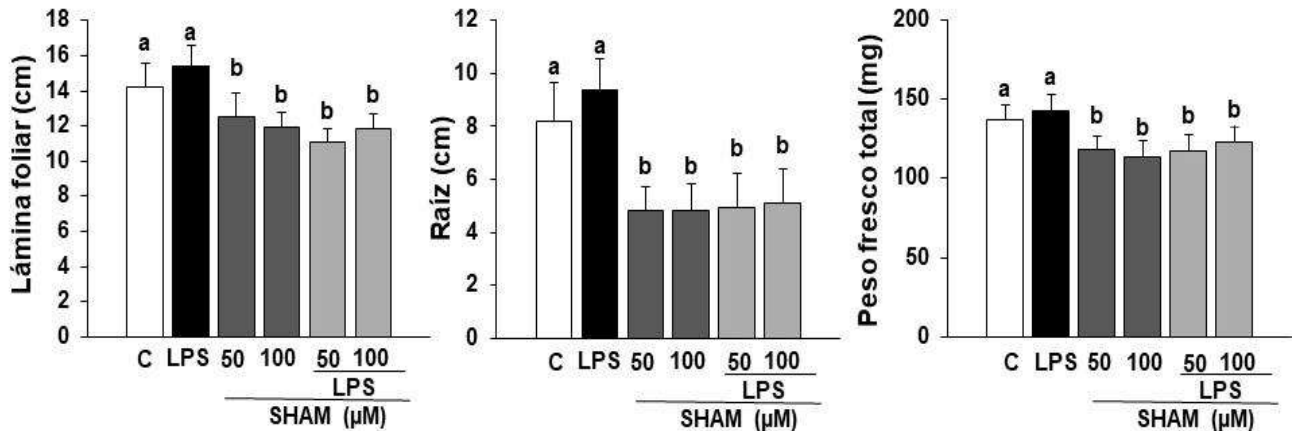


Figura 17. Efecto de SHAM sobre el crecimiento de plántulas de trigo. C=control, LPS=lipopolisacáridos. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$

La actividad de las POX disminuyó de manera dependiente de la concentración del inhibidor utilizada, y no se observó una recuperación de la actividad con la adición de LPS (Figura 18a).

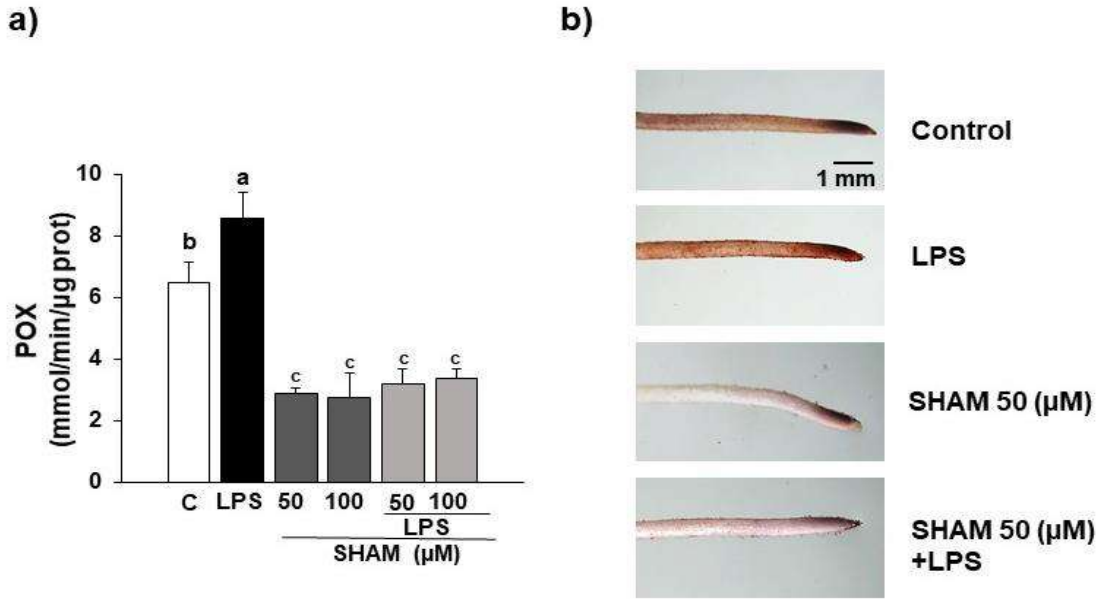


Figura 18. Efecto de SHAM sobre la actividad POX en plántulas de trigo. a) Análisis de la actividad POX por espectrofotometría. C=control, LPS=lipopolisacáridos. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. **b)** Detección in vivo de POX en raíces de trigo. El color café indica la actividad de POX. n=5.

Para analizar el efecto del inhibidor SHAM sobre la actividad de las POX en la raíz, se realizaron experimentos para detectar la actividad de la enzima *in vivo*, 4 días después del tratamiento, utilizando 2, 6 diclorofenol indofenol y H_2O_2 . Se observó una disminución de la actividad con la aplicación de SHAM, la cual no fue recuperada con la aplicación de LPS (Figura 18 b). Lo anterior sugiere que la actividad de las POX está relacionada con el crecimiento de las plántulas estimulado por los LPS.

7.11 Movilización de calcio en plántulas de trigo tratadas con LPS

Debido a que muchas POX requieren el calcio para su activación (Mura *et al.*, 2005), se analizó la participación de este ión en la interacción de los LPS con las plántulas de trigo. Para esto, las plántulas fueron incubadas durante 4 días con cloruro de lantano (LaCl_3), un inhibidor de canales de calcio; ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), un agente quelante del ion calcio; A23187 un ionóforo de calcio, y cloruro de calcio (CaCl_2) como fuente directa de iones calcio.

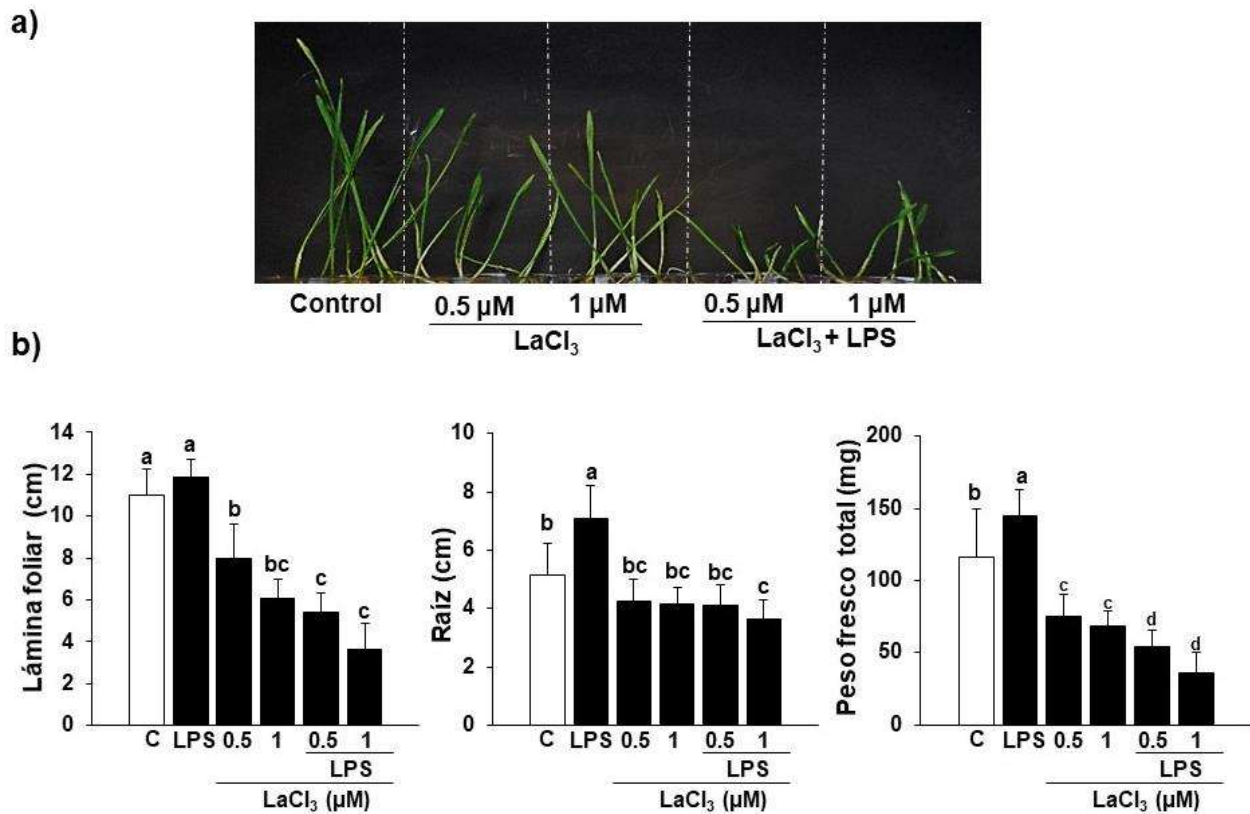


Figura 19. Efecto del LaCl_3 + LPS sobre el crecimiento de plántulas de trigo. a) Imagen representativa del crecimiento de plántulas de trigo. b) Parámetros de crecimiento. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

Primero se analizó el efecto del LaCl_3 , solo y en presencia de LPS (Figura 19) sobre el crecimiento de las plántulas de trigo. Las plántulas que fueron tratadas con el

LaCl₃ visualmente mostraron un crecimiento menor que las plántulas control. El crecimiento no se recuperó con la adición de LPS.

Los parámetros de crecimiento evaluados mostraron una disminución de aproximadamente el 50% en las plántulas tratadas con LaCl₃, en comparación con el control. Este porcentaje de inhibición se conservó en las plántulas tratadas con ambas moléculas.

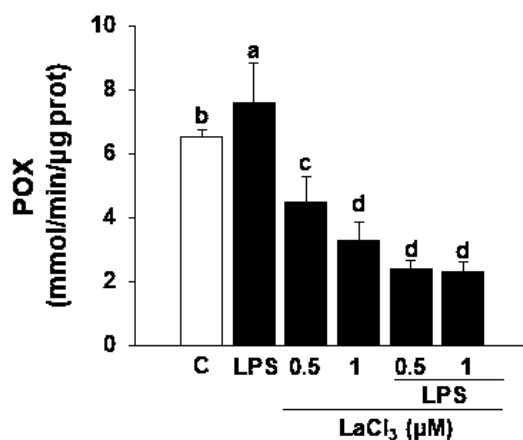


Figura 20. Efecto del LaCl₃ + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo. Actividad POX medida por espectrofotometría en raíces de plántulas de trigo, 4 días después del tratamiento con LaCl₃ y LPS. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar.

Un efecto similar con la adición de LaCl₃ se observó cuando se cuantificó la actividad enzimática en las raíces de las plántulas de trigo (Figura 20).

Cuando las plántulas fueron tratadas con el quelante de calcio, EGTA, también se observó una inhibición en su crecimiento, y una disminución en la actividad de las POX, en relación con el control (Figuras 21 y 22).

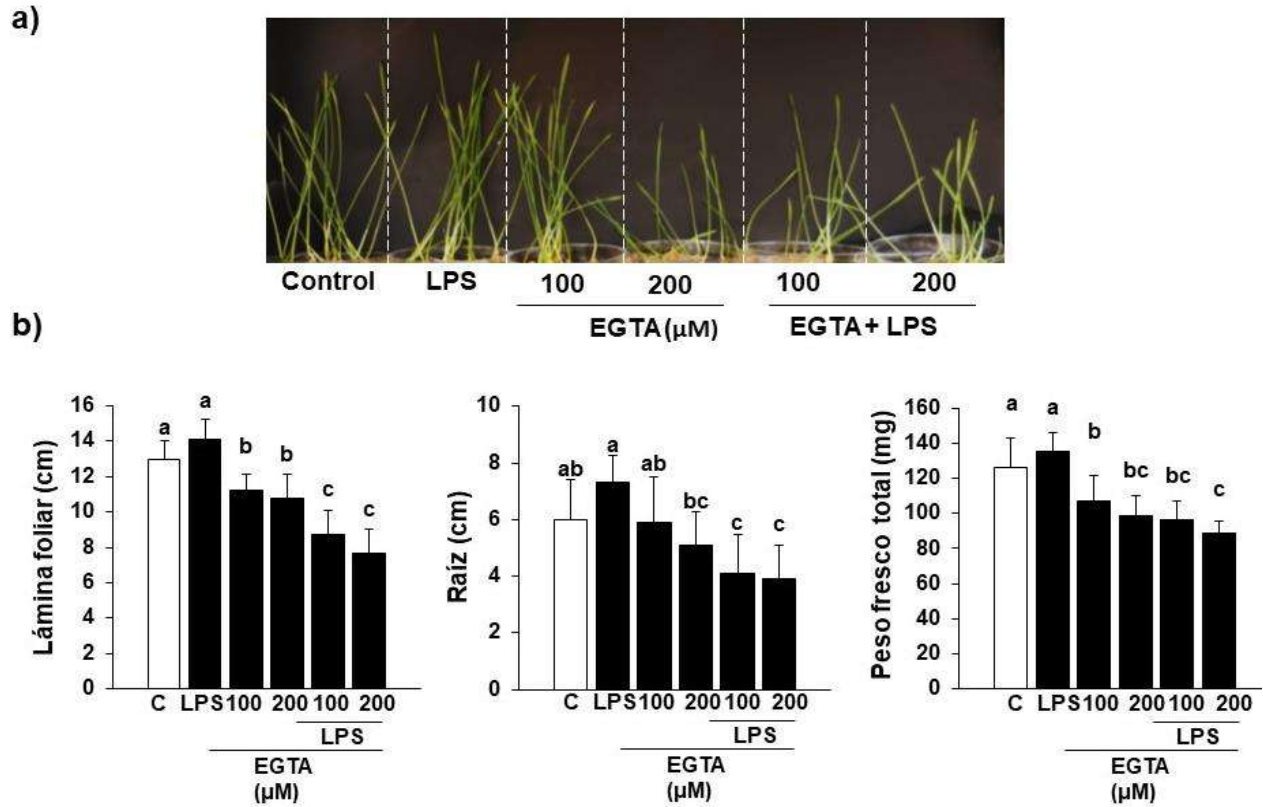


Figura 21. Efecto del EGTA + LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo. a) Imagen representativa del crecimiento de plántulas de trigo. b) Parámetros de crecimiento. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

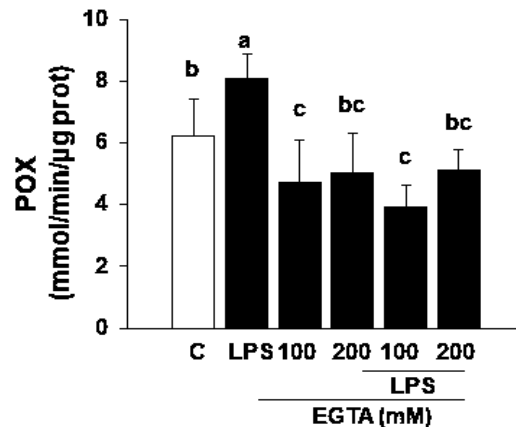


Figura 22. Efecto del EGTA + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo. Actividad de las POX medida por espectrofotometría de raíces de plántulas de trigo, 4 días después del

tratamiento con EGTA y LPS. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

Adicionalmente, al tratar las plántulas de trigo solo con cloruro de calcio (CaCl_2), estas mostraron un aumento en la longitud de la lámina foliar y en el peso fresco total. Interesantemente, cuando el CaCl_2 se adiciono en combinación con LPS no se observó un incremento en el crecimiento de las plántulas (Figura 23), sugiriendo una posiblemente sobreestimulación del sistema.

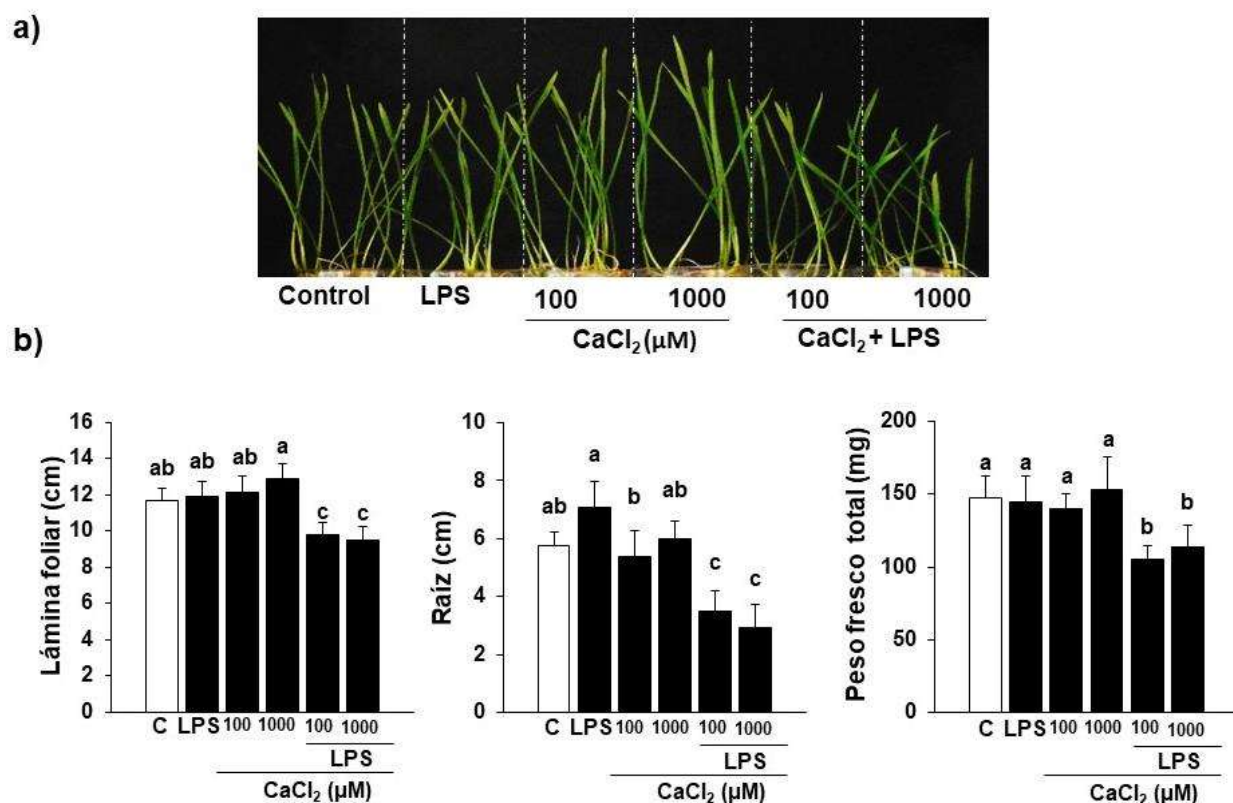


Figura 23. Efecto del CaCl_2 + LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo. a) Imagen representativa del crecimiento de plántulas de trigo. b) Parámetros de crecimiento. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

La actividad enzimática se incrementó por arriba de los niveles observados en plántulas tratadas con LPS, con una concentración de CaCl_2 de 100 μM , sin embargo, este efecto no se observó cuando el CaCl_2 se adicionó en combinación con los LPS (Figura 24).

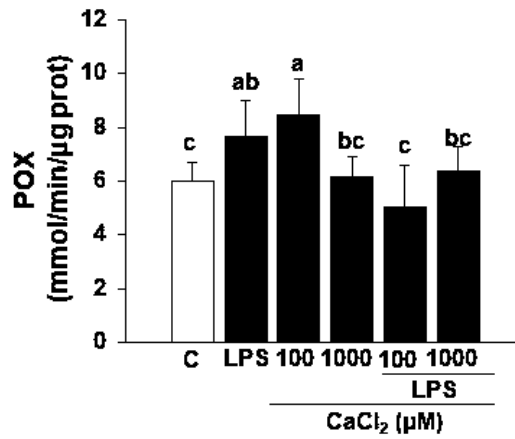


Figura 24. Efecto del CaCl₂ + LPS sobre la actividad POX de plántulas de trigo. a) Actividad de POX en raíces de plántulas de trigo, 4 días después del tratamiento con CaCl₂ y LPS. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. n=10.

La adición del ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 10 mM incrementó el crecimiento de las plántulas.

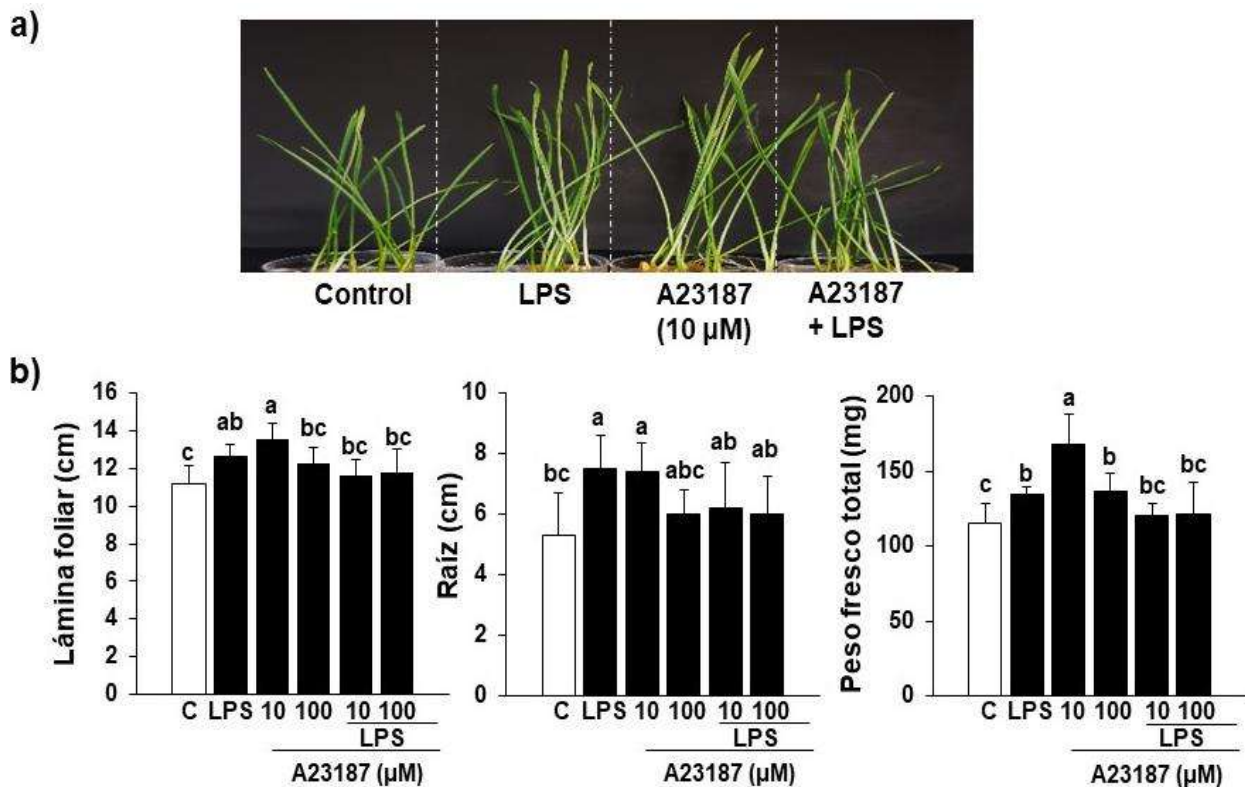


Figura 25. Efecto del ionóforo A23187+ LPS sobre el crecimiento en plántulas de trigo. a) Imagen representativa del crecimiento de plántulas de trigo. b) Parámetros de crecimiento. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. n=10.

La actividad de la enzima se incrementó con una concentración de 10 mM del ionóforo de calcio A23187, pero no se observaron cambios en la actividad cuando se adicionó en combinación con los LPS, en relación con el control (Figura 26).

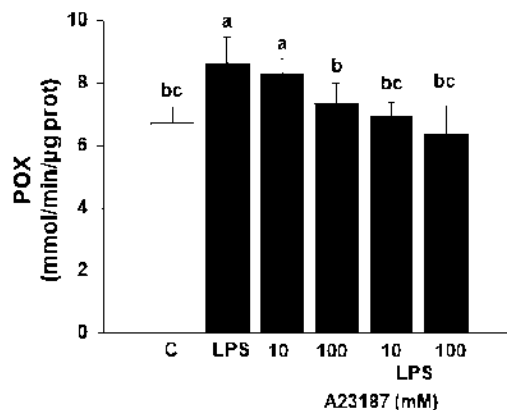


Figura 26. Efecto del ionóforo A23187 + LPS sobre la actividad POX en plántulas de trigo.

Actividad de POX en raíces de plántulas de trigo, 4 días después del tratamiento con el ionóforo A23187 y LPS. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo con *Tukey* $\alpha=0.05$. Las barras representan la media, \pm la desviación estándar. $n=10$.

Los resultados obtenidos con la aplicación de los diferentes compuestos químicos sugieren que la movilización de este ion hacia el interior de la célula es necesaria para la promoción del crecimiento vegetal, estimulado por los LPS, posiblemente afectando la actividad de la POX involucradas con el crecimiento vegetal.

8 DISCUSIÓN

El efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de las plántulas de trigo, y sobre la modificación de la arquitectura de la raíz se ha reportado previamente en nuestro grupo de trabajo (Méndez-Gómez *et al.*, 2015). Además, otros autores han mostrado que las plantas inoculadas con esta rizobacteria desarrollan un sistema radical más corto que las plantas control no inoculadas, y un aumento en la formación de raíces laterales y pelos radicales (Spaepen *et al.*, 2014).

En cultivos de trigo, la fertilización con *A. brasilense* Sp245 incrementa el rendimiento del grano y el peso seco de las plantas en un 17.8% (Veresoglou y Menexes, 2010). Además, es una de las PGPRs más estudiadas y utilizadas en la agricultura (Reis *et al.*, 2015). En el sur de América, se ha desarrollado un próspero negocio de inoculantes que contienen *A. brasilense*, posiblemente debido a la gran área dedicada a la agricultura y a los resultados favorables y reproducibles bajo condiciones de campo (Cassán *et al.*, 2014). Nuestros resultados también mostraron un aumento significativo en el peso fresco y peso seco total de las plántulas, después de 4 días de inoculación con *A. brasilense*.

Los LPS, presentes en la membrana externa de *A. brasilense*, son moléculas de gran importancia en la interacción con otros sistemas biológicos (Molinaro *et al.*, 2009). Las plantas son capaces de percibir las tres regiones que componen la molécula del LPS. Sin embargo, los mecanismos subyacentes que usan las plantas para detectar estos componentes aún son desconocidos (Newman *et al.*, 2013). En *A. thaliana*, el reconocimiento de los LPS de *P. aeruginosa* PAO1 y de *Xanthomonas campestris*, se realiza a través del receptor cinasa transmembranal LORE (*lipooligosaccharide-specific reduced elicitation*). Este receptor requiere de toda la molécula de LPS, o la región del lípido A, para inducir una respuesta inmune (Ranf *et al.*, 2015). Una pregunta importante es ¿cómo se liberan las moléculas de LPS de la membrana externa, y llegan a los respectivos receptores de respuesta inmunes de la superficie celular en las plantas? Debido a las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de los LPS se cree que su detección por las plantas

implica la des-agregación activa de los LPS de la membrana externa similar al sistema de los mamíferos (Kutschera y Ranf, 2018). En mamíferos, la proteína LBP presente en el suero, es la encargada de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando, de esta manera, la asociación del LPS con el receptor CD14, una glicoproteína que se encuentra en forma soluble o anclada a la superficie celular y tiene como función principal transferir el LPS al complejo TLR4/MD-2 encargado de su reconocimiento (Zipfel, 2015). Una diferencia notable entre su detección inmune en mamíferos y en las plantas es que usualmente se requieren concentraciones muy altas para activar la defensa en plantas, en contraste con concentraciones picomolares en mamíferos. En las plantas, la matriz de la pared celular podría dificultar su acceso a los receptores de la superficie celular y, por lo tanto, solo una parte de la molécula se podría percibir (Kutschera y Ranf, 2018).

Por otra parte, se ha estudiado la participación de los LPS de *A. brasilense* Sp245 en el crecimiento y desarrollo de las plantas de trigo, y se sabe que tienen un efecto promotor, aumentando la longitud de la raíz y de la parte aérea, así como el peso seco de la planta (Evseeva *et al.*, 2011). En nuestro grupo de trabajo se reportó, además, que en condiciones de invernadero las plantas de trigo tratadas con LPS de *A. brasilense* Sp245 aceleran la formación de espigas (Chavéz- Herrera *et al.*, 2018), e incrementan los niveles de producción del anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), principalmente, en la zona meristemática y en la zona de elongación. También, que la actividad de las POX no se estimula cuando los LPS se mezclan con la proantocianidina B2, un compuesto fenólico que se une a las moléculas de LPS bloqueando su efecto (Vallejo-Ochoa *et al.*, 2017).

La pared celular de la planta es una estructura muy dinámica, que controla tanto la forma como el alargamiento de la célula. Varios procesos enzimáticos, donde participan las POX, rompen y vuelven a ensamblar los componentes de la pared durante la extensión celular (Passardi *et al.*, 2004). Los cambios en la arquitectura de la pared celular pueden lograrse mediante las POX de clase III a través de sus dos ciclos catalíticos: peroxidativo e hidroxílico. Además, las POX

pueden detener la elongación formando enlaces dentro de la pared o favorecerla regulando la concentración local de H_2O_2 o EROs que rompen los enlaces de la pared celular (Passardi *et al.*, 2004). Al inhibir las peroxidasas con el ácido salicilhidroxámico (SHAM) las plántulas tratadas con LPS disminuyeron su longitud de la lámina foliar y de la raíz en comparación con las plantas control, este resultado nos sugiere que la actividad de las POX tiene un importante papel en la estimulación del crecimiento mediado por los LPS.

El análisis farmacológico que se realizó durante nuestra investigación para estudiar la función del calcio en la promoción del crecimiento vegetal, y en la actividad de las POX, sugiere que la movilización del calcio es una parte importante del mecanismo bioquímico utilizado por los LPS para promover el crecimiento vegetal. En respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo luz, gravedad, estrés abiótico y biótico, y hormonas, la concentración de calcio citosólico en las plantas se eleva rápidamente a través de una mayor afluencia de calcio (Yang y Poovaiah, 2003), nuestros resultados con la aplicación de LPS sugieren que también estas moléculas son capaces de modificar la concentración de calcio al interior de la célula.

Interesantemente, existen reportes en la literatura que indican que los LPS tienden a formar interacciones con diversos cationes entre ellos el calcio (Kucerka *et al.*, 2008). Esto explicaría los resultados que se obtuvieron cuando fueron aplicados en combinación con el EGTA y el ionóforo de calcio, en donde no se observó un incremento en el crecimiento vegetal, ni en la actividad de las POX. Quizás la mayor disponibilidad de calcio promovida por la adición exógena o por su liberación del interior de la célula permitió la formación de complejos calcio-LPS imposibilitando su reconocimiento adecuado por la célula.

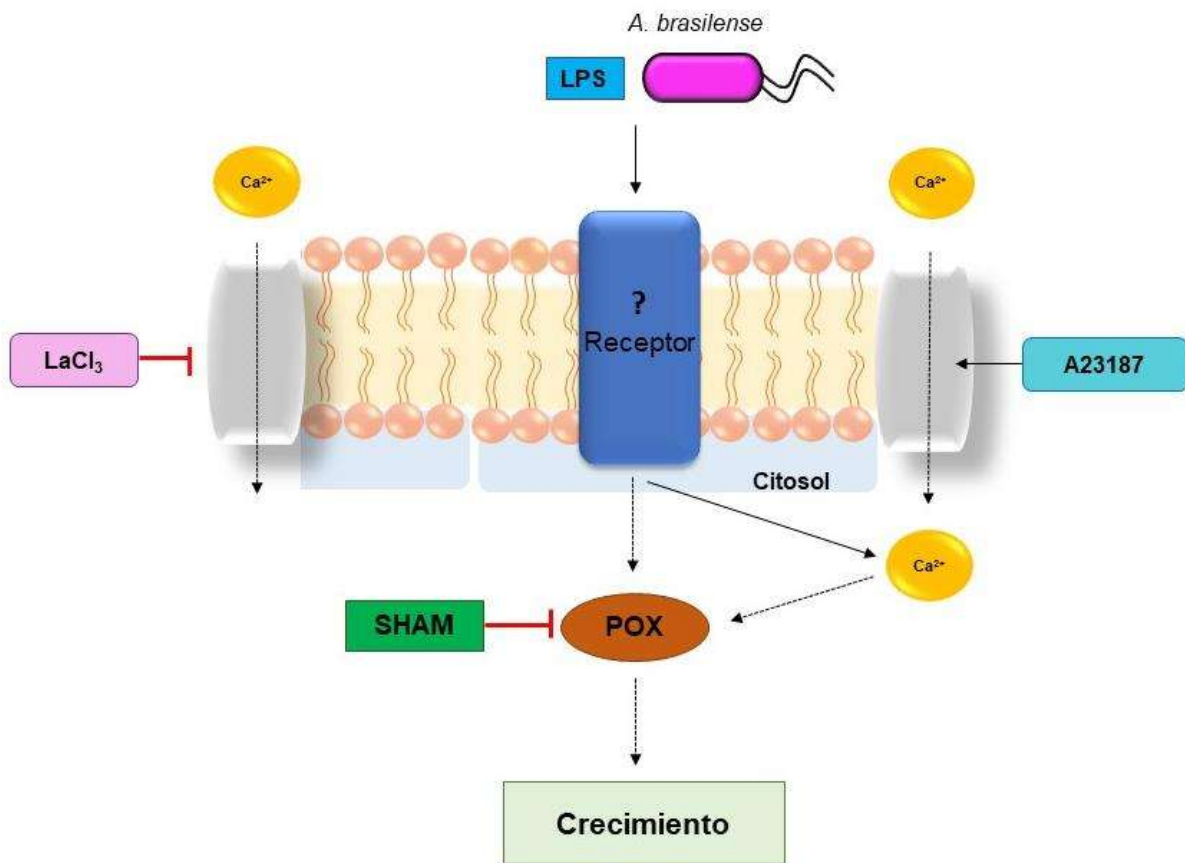


Figura 27. Modelo propuesto. Los LPS presentes en la membrana externa de *A. brasilense* son reconocidos por un receptor localizado en la membrana e incrementan la actividad POX involucradas en el crecimiento de las plantas. Además, esta activación requiere la entrada de calcio al interior de la célula. LPS: lipopolisacáridos, POX: Peroxidasa, $LaCl_3$: Cloruro de lantano, A23187: ionóforo de Calcio, SHAM: ácido salicilhidroxámico.

9 CONCLUSION

Los lipopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* Sp245 promueven el crecimiento de las plántulas de trigo a través de un incremento en la actividad de la enzima peroxidasa y cambios en los niveles de calcio intracelular.

10 LITERATURA CITADA

- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Barceló Ros A, Pedreño MA (2009)** Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* 60: 377-390.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004)** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia MP (2012)** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR); Their potential as antagonist and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 34: 1049-1051.
- Berendsen LR, Piterse MJ, Bakker AHM (2012)** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17: 478-486.
- Boutrot A, Zipfel C (2017)** Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:257-286.
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S (2014)** Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.* 33:440-459.
- Cardon Z, Whitbeck G, Lynn J (2007)** The rhizosphere: an ecological perspective. Elsevier Academic Press. San Diego California, USA. Pág. 212.
- Chavez-Herrera E, Hernández-Esquivel AA, Castro-Mercado E, García-Pineda E (2018)** Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. *J Plant Growth Regul.* 37:859-866.
- Cheng Z, McConkey J, Glick B (2010)** Proteomic studies of plant-bacterial interactions. *Soil Biology and Biochemistry.* 42: 1673-1684.
- Choma A, Komaniecka I, Sowinski P (2009)** Revised structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Azospirillum lipoferum* strain SpBr17. *Carbohydr. Res.* 344: 936-939.

- Christensen HJ, Bauw G, Welinder KG, Montago MV, Boerjan W (1998).** Purification and Characterization of Peroxidases Correlated with Lignification in Poplar Xylem. *Plant Physiol.* 118: 125-135.
- Colin W, Corke H, Seetharamon K, Faubion J (2016).** The World of Food Grains. Encyclopedia of food grains. Second edition. Elsevier. Academic Press. Capítulos 1 y 2, págs. 1-209.
- Córdoba-Pedregosa MC, Córdoba F, Villalba JM, González-Reyes JA (2003)** Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa* L. and its possible relationship with cell growth and differentiation. *Protoplasma* 221:57–65.
- Cote R, Ruiz M, Ortega R, Huante P (2013)** Agrobiotechnological importance of the ACC desaminase in rhizobacteria, a review. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 251-258.
- Delehanty JB, Johnson BJ, Lin B, Ligler FS (2007)** Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J Na Prod* 70:1718–1724.
- Díaz A, Cayón G, Mira J (2007)** Metabolismo del calcio y su relación con la “mancha de madurez “del fruto de banano. Una revisión. *Agronomía colombiana.* 25: 280-287.
- Donald F, Cipollini JR (1998)** The induction of soluble peroxidase activity in vean leaves by wind induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* 85:1586-1591.
- Evseeva NV, Matora LYu, Burygin GL, Dmitrienko VV, Schchyogoley SYu (2011)** Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil* 346:181–188.
- Fedoneko YP, Zatonsky GV, Konnova SA, Zdorovenko EL, Ignatov V V (2002)** Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Carbohydr. Res.* 337: 869-872.
- Fedoneko YP, Konnova SA, Sigida EN, Ignatov V V (2015)** Structure and serology of O antigens of nitrogen fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *Russ Chem Bull, International Edition* 64: 1024-1031.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA (2003)** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422: 442–6.

- Francoz E, Ranocha P, Nguyen-Kim H, Jamet E, Burlat V, Dunand C (2015)** Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*. 112: 15-21.
- Gómez M, León AE, Rosell CM (2007)** Trigo. De tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Córdoba, Argentina: Ediciones Báez. Capítulo 1, 17-72.
- Gronow S, Brade H (2010)** Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J. Endotoxin Res.* 7: 3 – 23.
- Gunarto L, Adachi K, Senboku T (1999)** Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils*. 28: 129-135.
- Hartmann A, Baldani JI. (2006)** The Genus *Azospirillum*. In: *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, ed. M Dworkin. Springer Science Business Media, LLC. New York, USA. 5:115-140.
- Helman Y, Burdman S y Okon Y (2011)** Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms* (Rosenberg E & Gophna U, eds). Springer Verlag, Berlin. 89–103.
- Hepler PK (2005)** Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. *The Plant Cell*. 17: 2142–2155.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001)** A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42:462–468.
- Ikeda-Saito M, Shelley DA, Lu L, Booth KS, Caughey SW, Kimura S (1990)** Salicylhydroxamic Acid Inhibits Myeloperoxidase Activity. *J. Biol. Chem.* 266:3611 – 3616.
- Jetiyanon K, Plianbangchang P, Hartmann A, Baldani JI. (2006).** The Genus *Azospirillum*. In: *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, ed. M Dworkin, pp. 115–140. Springer Science Business Media, LLC. New York, USA.

- Johnson-White B, Buquo L, Zeinali M, Ligler FS (2006)** Prevention of nonspecific bacterial cell adhesion in immunoassays by use of cranberry juice. *Anal Chem* 78:853–857.
- Knirel YA (2011)** Structure of O-Antigens. *Bacterial lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cell*. Springer Wien New York. Cap 3: 41-116.
- Kukavica BM, Veljovic-Jovanovic SD, Menckhoff L, Luthje S (2012)** Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *J Exp Bot* 63:4631–4645.
- Kutschera A, Ranf S. (2018)** The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. *Biochimie. En pensa.*
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.028>.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Levanony H, Bashan Y. (1991).** Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil*. 137:91-97.
- Lichenthaler HK (1987)** Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic Biomembranes. *Method Enzymol*. 148:350-382.
- Macedo- Márquez A (2012).** The reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Scielo. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 5: 97-103.
- Marschner H. (1986)** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, Londres. pp. 7-73, 285-299.
- Mathews CK; Van Holde KE, Ahern KG (2002)** *Bioquímica*. 3° Edición. Pearson educación. S. A. Madrid España. 1,368 pp.
- Méndez- Gómez M, Castro- Mercado E, Alexandre G, García- Pineda E (2015)** Oxidative and antioxidative responses in the wheat-*Azospirillum brasilense* interaction. *Protoplasma*. 253:477-486.

- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. (2010)** Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61:4197–4220.
- Michiels K.W, Croes C.L, Vanderleyden J (1991)** Two diferente modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol.* 137: 2241-2246.
- Mir-Villaseñor H.E, Rangel-Espitia E, Espino-Huerta J, Moya-Solís E, Moreno-Ireta J (2014)** Nana F2007, cultivar de trigo para siembra de temporal en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 7. 1363-1368.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M. y Van Breusegem F (2004)** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490–498.
- Mohamed K. H, Daniel T, Aurélien D, El-Maarout-Bouteauc H, Rafick E, Arbelet Bomin D, Biligui B, Florence V, Mustapha E, Francois B (2015)** Deciphering the dual effect of lipopolysaccharides from plant pathogenic *Pectobacterium*. *Plant Signal Behav.* 10:3 e1000 1601- e1000 16010.
- Montaño-Pérez F, Villegas-Alías C, Belloín RA, Del cerro P, Espuny MR, Guerrero-Jimenez I, Baena-López FJ, Ollero FJ, Cubo I (2014)** Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res.* 169: 325-336.
- Molinaro A, Newman MA, Lanzetta R, Parrilli M (2009)** The Structures of Lipopolysaccharides from Plant-Associated Gram-Negative Bacteria. *Eur. J. Org. Chem.* 2009: 5887-5896.
- Moreno I, Ramírez A, Plana R, Iglesias L (2001)** El cultivo de trigo. Algunos resultados de su producción en cuba. *Cultivos tropicales.* 22: 55-57.
- Mura A, Medda R, Longu S, Floris G, Rinaldi A, Padiglia A (2005)** A Ca²⁺/Calmodulin-Binding Peroxidase from *Euphorbia* Latex: Novel aspects of calcium-hydrogen peroxide cross-talk in the regulation of plant defenses. *Biochemistry.* 44: 14120-14130.

National Center for Biotechnology Information, (NCBI) consultado en junio del 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Neill S.J, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59:165–176.

Newman MA, Dow M, Molinaro A, Parrilli M (2007) Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* 13:69-84.

Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci.* 4:139.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) consultada en junio del 2018. <http://www.fao.org/home/es/>

Ormeño-Orillo E (2005) Lipopolisacáridos de *Rhizobiaceae*: estructura y biosíntesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 165 - 175.

Paldi-Fibach S, Burdman S, Okon Y (2011) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMSE. Microbiology Letters.* 326: 99-108.

Parra Y, Cuevas F (2002) Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales.* 23:31 – 41.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry.* 65, 1879 – 1893.

Plana R, Álvarez M, Moreno I, Ramírez A, Caballero A (2001) Comunicación corta, Evaluación de una colección de variedades de trigo (*Triticum aestivum*) resistentes a *Helminthosporium* en el occidente de Cuba. *Cultivos Tropicales.* 22:29 - 31.

Pieterse CMJ, Jonge R, Berendsen RL (2016) The soil-borne supremacy. *Trends Plant Sci.* 21:171 - 173.

- Ranf S, Gich N, Schäffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA (2015)** A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Immunol.* 16:426 – 33.
- Ranf S (2016)** Immune Sensing of Lipopolysaccharide in Plants and Animals: Same but Different. *Plos Pathog.* 12: e1005596.
- Reis VM, Baldani VL, Baldani JI (2015).** Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols.* Springer Argentina. Cap 1:3-26.
- Renukadevi KP, Angayarkanni J, Karunakaran G (2012)** Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Serratia rubidaea* and its cytotoxicity on lung cancer cell line-nci-h69. *Acta Tech Corviniensis* 2:97–101.
- Rivera M, MCGroarty, E (1989)** Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 171: 2244-2248.
- Ros Barceló A (2005)** Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *A. Planta.* 220:747-756.
- Sagi M, Fluhr R (2006)** Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141: 336–340.
- Saharan B, Nehra V (2011)** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 2011. 1-30.
- Sanabria NMA, Huang JC, Dubery IA (2010).** Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. *Self/Non-Self Imm. Recog. Signal* 1, 40-45.
- Schnaitman, CA, Klena, JD (1993)** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* 57:655-682.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)** consultada en junio del 2018. <https://www.gob.mx/sagarpa>
- Silipo A, De Castro C, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A (2010)** Lipopolysaccharides. In: König H, Claus H, Varma A (eds) *Prokaryotic cell wall compounds – structure and biochemistry.* Springer, Heidelberg, pp 133–154

Silipo A, Molinaro A (2011) Lipid A Structure. Bacterial lipopolysaccharides: Structure, Chemical synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cell. Springer Wien New York. Cap 1:1-20.

Solano B, Barruso J, Mañero J (2008) Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques Promote Plant Growth. 41-54.

Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240.

Spaepen S, Van Derleyden J, Okon Y (2009) Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* 51:283–320.

Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K y Vanderleyden J (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytol.* 201: 850–861.

Sparandeo P, Dehò G, Polissi A. (2010) Lipopolysaccharide Export to the Outer Membrane. Bacterial lipopolysaccharides: Structure, Chemical synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cell. Springer Wien New York. Cap 10:311-338.

The peroxidase database, consultada en junio del 2018

: <http://peroxidase.toulouse.inra.fr/index.php>

Thordal-Christensen H, Zhang Z, We Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley- powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187- 1194.

Tiedemann AV (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean 6 Estrés oxidativo en frutos de aguacate leaves with *Botrytis Cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 50:151–166.

Tsai CM, Frasch CE (1981) A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.

- Vallejo-Ochoa J, López-Marmolejo M, Hernández- Esquivel A. A., Méndez-Gómez M, Castro-Mercado E, García- Pineda E. (2017).** Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2. *Protoplasma*. 255: 685-694.
- Vallero DA (2016)** Environmental biotechnology A biosystems Approach. London Elsevier. 2 Edition. 746 p.
- Veresoglou SD, Menexes G (2010)** Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil* 337:469–480.
- Vicario JC, Gallarto LA, Paulucci NS, Perrig DS, Bueno MA, Dardanelli MS (2015).** Co-inoculation of legumes with *Azospirillum* and Symbiotic Rhizobia. *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*. Springer Argentina Cap 22: 411-418.
- Whitfield C, Trent SM (2014)** Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 83:99-128.
- Yang T, Poovaiah BW (2003)** Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* 8:505 – 512.
- Young CC, Lin SY, Shen FT, Lai WA (2015)** Molecular Tools for Identification and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria with Emphasis in *Azospirillum* spp. *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*. Springer Argentina. Cap 2: 27-44.
- Zahir A.Z, Muhammad A, William T (2004)** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.* 81:97-168.
- Zelicourt A, Al-Yousif M, Hirt H (2013)** Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance. *Mol. Plant.* 6:242 – 245.
- Zipfel Cyril (2015)** A new receptor for lipopolysaccharides. *Nat. Immunol.* 16: 340-341.
- Zhu JK (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plant. *Annu Rev Plant Biol.* 53:247-273.

11 APÉNDICE

PROTOCOLOS

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TRIGO

MATERIAL:

- Pinzas.
- Pipetas volumétricas 5 y 10 mL.
- Papel filtro y algodón estériles.
- Cajas Petri.

EQUIPO:

- Campana de flujo laminar.
- Incubadora 26-28°C.

REACTIVOS:

- Agua destilada estéril.
- Etanol al 70%.

PROCEDIMIENTO:

1. Con una pinza estéril poner el algodón y papel filtro en cajas Petri.
2. Adicionar 10 mL de agua destilada estéril.
3. Acomodar las semillas previamente desinfectadas dentro de la caja Petri con distancia entre ellas y en una misma posición. (la ranura hacia arriba).
4. Cubrir las semillas con papel filtro estéril.
5. Adicionar 5 mL de agua destilada estéril.
6. Sellar la caja Petri con papel parafilm.
7. Colocar en la incubadora a 26°C en oscuridad durante 3 días o dependiendo del experimento.

REALIZACIÓN DE INÓCULO BACTERIANO

MATERIAL:

- (02) Matraz Erlenmeyer (50 mL).
- Probeta.
- Micropipetas 20 μ L, 100 μ L.
- Mechero.
- Puntas para micropipetas.
- Vaso desechable.

EQUIPO:

- Campana de Flujo.
- Incubadora con agitación.

REACTIVOS:

- Medio LB mínimo líquido pH 7.0.
- Etanol 70%
- Antibiótico TC.
- Sol. Hipoclorito de sodio.
- Pre-inoculo.

PROCEDIMIENTO:

1.- Preparar (02) dos matraces con 20 mL de medio LB líquido y a cada uno adicionarle TC como antibiótico según la cantidad y concentración deseada.

2.- Añadir al matraz marcado con "Bacteria" "X μ L" de pre-inoculo.

X= 150 μ L por cada 50 mL de medio LB.

Al marcado con control no se le adiciona pre-inoculo.

3.- Incubar durante 16 horas a 28 °C en agitación constante 180 r.p.m.

4.- Despues de la incubación, tomar 1 mL aproximadamente de inoculo para medir la D.O. a 600 nm. La cual deberá resultar de 0.900.

5.- Proceder con el protocolo de Lavado de células bacterianas.

NOTA:

Azospirillum brasilense sp 245, se resiembrada cada 3 días y se mantiene a 4°C. Se mide la absorbancia de las muestras, tanto control y muestra con bacteria. D.O. = 0.900 = 1×10^8 U.F.C.

LAVADO DE CÉLULAS BACTERIANAS

MATERIAL:

- Micropipetas
(1000 µL, 100 µL).
- Celdillas desechables.
- Puntas para micropipeta.
- Vaso desechable.
- Tubos eppendorf.

EQUIPO:

- Centrifuga eppendorf.
- Mechero.
- Vortex.
- Campana de flujo.

REACTIVOS:

- Cultivo bacteriano D.O.= 0.9
- Sol. Hipoclorito de Sodio.
- Sol. NaCl 0.85%.
- Sol. MgSO₄ 0.01 M.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- 1 mL de cultivo bacteriano de 16–20 hrs de crecimiento se deposita en un tubo Eppendorf.
- 2.- Centrifugar 3893 g (3.8 rpm) durante 12 min a T° Ambiente.
- 3.- Eliminar el sobrenadante (Realizar en campana de Flujo).

4.- Re-suspender el pellet con 1 mL de NaCl 0.85% y agitar por 30 seg.

5.- Centrifugar nuevamente a 3893 g por 12 minutos a T° Ambiente.

6.- Eliminar sobrenadante (Realizar en campana de Flujo).

7.- Re-suspender en 1 mL de MgSO₄ 0.01 M.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

NaCl 0.85%, Pesar 0.85 gramos de NaCl y disolver en H₂O destilada y aforar a 100 mL.

MgSO₄ 0.01 M, pesar 1.20366 gramos de MgSO₄ en H₂O destilada y aforar a 100 mL.

NOTAS:

- ✓ Las soluciones se disuelven en agua destilada estéril.
- ✓ Se esterilizan las soluciones a 15 lb de presión 15-20 min. para asegurar que no contengan microorganismos y prevenir contaminación.
- ✓ No es necesario Ajustar el pH.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

MATERIALES:

- Espectrofotómetro
- Celdas de plástico.
- Micropipetas (1000µL y 10 µL).
- Tubos Eppendorf.

- Gradilla chica.

REACTIVOS:

- Reactivo de Bradford.
- Agua destilada estéril.
- Extracto de proteína.

PROCEDIMIENTO:

1.- Preparación del BLANCO: En un tubo Eppendorf agregar 800 µL de agua destilada estéril y 200 µL del reactivo Bradford.

2.- Para la cuantificación de la proteína: En un tubo Eppendorf que contenga 790 μl de agua destilada estéril, adicionar 10 μL del extracto de proteína y 200 μL del reactivo Bradford.

3.- Re-suspender durante 10 seg e incubarlos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 5 min.

4.- Leer la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a 595 nm en celdas de plástico.

5.- Basarse en la curva estándar de proteínas para conocer la cantidad de proteínas totales.

Ejemplo:

Si tenemos 0.580 de absorbancia de la muestra y queremos conocer la cantidad de proteína en esta muestra, realizamos una regla de tres:

λ	[]
0.107	2 μg
0.580	10.8 μg

Finalmente dividimos los 10.8 μg de proteína por la cantidad de muestra tomada (10 μl).

Entonces: 10.8 μg /10 μL = **1.08 $\mu\text{g}/ \mu\text{L}$**

EXTRACCIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDOS DE *Azospirillum brasilense* Sp245

MATERIAL:

- Tubos de cristal con tapa metálica
- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitados
- Probeta
- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Hilo
- Membrana para dializar
- Varilla
- Bala magnética (mosca de agitación)
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta

EQUIPO:

- Incubadora
- Centrifuga Central CL
- Centrifuga Eppendorf

REACTIVOS:

- Antibiótico: Tetraciclina
- Fenol equilibrado con Tris-HCL, pH 8.0
- Alcohol absoluto
- Agua desionizada estéril
- Acetato de Sodio 3M
- Agua destilada estéril.

PROCEDIMIENTO:

a) Preinóculo

1.- En un tubo de tapa metálica agregar 3 mL de LB mínimo (LBm) con el antibiótico tetraciclina (Tc) a una concentración de 10 µg/mL inocular una colonia de la cepa bacteriana: *Azospirillum brasilense* Sp245.

2.- Incubar por 16 horas a 30°C en agitación constante. No olvidar el control negativo (un tubo de tapa metálica solo con 3ml de medio mínimo LB).

b) Inóculo

1.- En un matraz Erlenmeyer agregar 100 mL de medio de cultivo LBm con TC 10 µg/mL e inocular 300 µL del preinóculo.

2.- Incubar por 24 horas a 30°C en agitación constante. No olvidar el control negativo (un matraz Erlenmeyer solo con 100ml de medio LBm).

***Medir densidad óptica (opcional)**

c) Extracción de Lipopolisacáridos

1.- Obtención de un solo paquete celular

1.1.- Colocar el cultivo en 4 tubos Falcón (25 mL en cada tubo).

1.2.- Centrifugar el cultivo a 3200 rpm (Usar la centrifuga CENTRA CL) x 10 minutos.

1.3.- Eliminar 15 mL de sobrenadante, dejando 10 mL de medio para resuspender (en el vortex) el paquete celular.

1.4.- Juntar los paquetes celulares en un solo tubo Falcón (40 mL de volumen final).

1.5.- Centrifugar a 3200 rpm x 5min más (No olvidar el contrapeso para centrifugar: otro tubo Falcón con un volumen de agua igual que el del cultivo 40 mL).

*Si se desea conocer el peso del paquete celular se deberá pesar el tubo falcón antes de juntar los paquetes celulares y después de centrifugarlos, obteniéndolo por la diferencia de pesos.

2.- Extracción

2.1.- Adicionar al paquete celular obtenido 5 mL de agua destilada estéril y resuspender (en el vortex) el paquete celular.

2.2.- Adicionar 5 mL de fenol y mezclar perfectamente.

2.3.- Incubar a 65°C en agitación constante por 20 min. (Este paso se realiza utilizando el horno de secado y el rocker).

2.4.- Incubar a 4°C por toda la noche.

3.- Diálisis

3.1.- Centrifugar a 4300 rpm x 10 min (Centrifuga CENTRA CL).

3.2.- Colocar la fase acuosa en una membrana de diálisis, cerrando la base de la misma con hilo de algodón. (Antes de agregar el dializado se recomienda agregar agua destilada estéril para confirmar que ésta se encuentra bien cerrada).

3.3.- Cerrar ambos lados de la membrana de diálisis (formando un dulce), y colocarla en un vaso de precipitado que contenga agua destilada estéril.

3.4.- Dejar por 3 o 4 días la membrana de diálisis cambiando el agua destilada estéril cada 24 horas, hasta eliminar las trazas de Fenol. A lo obtenido se le llama "Dializado".

4.- Precipitación

4.1.- Colocar el dializado en los tubos Eppendorf

4.2.- Centrifugar a 12000 rpm x 10 min (En la centrifuga Eppendorf).

4.3.- Pesar tubos Falcon.

4.4.- Colocar la fase acuosa en un tubo Falcon previamente pesado.

4.5.- Agregar al dializado Acetato de Sodio 0.15M pH 8.0.

4.6.- Agregar Etanol Absoluto en una proporción de 1:4.

4.7.- Incubar a -20°C x 24horas.

5. Dilución

5.1.- Centrifugar a 4200 rpm x 20 min.

5.2.- Eliminar el sobrenadante y secar a temperatura ambiente x 20 min (para el secado colocar el tubo Falcón boca abajo sobre una sanita, teniendo mucho cuidado con el pellet obtenido para que éste no resbale).

5.3.- Pesar el tubo con el pellet seco para que por diferencia se calcule la cantidad de los LPS obtenidos.

5.4.- Resuspender el pellet obtenido de LPS en agua destilada estéril.

5.5.- Guardar a 4°C hasta su uso.

ELECTROFORESIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS

REACTIVOS:

- Acrilamida, (acrylamide) grado electroforesis
- Bis-acrilamida (N, N'-methylenebisacrylamide)
- Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- TEMED (N, N, N',N'-Tetramethylethylenediamine)
- Persulfato de amonio
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- Glicina
- Ácido clorhídrico (HCl)

Soluciones STOCK

1. 2M Tris-HCl (pH 8.8), 100 mL

-Pesar 24.4 g de Tris base.

-Adicionar 50 mL de agua destilada

-Adicionar concentrado de HCl para bajar el pH a 8.8

2. 1M Tris-HCl (pH 6.8), 100 mL

- 4 mL SDS 10% 0.4%
- 21 mL H₂O
- Estable por meses en el refrigerador

3. **Solucion C** (4x Stoking Gel Buffer) 100ml

- 50 mL 1M Tris-HCl (pH 6.8) 0.5M
- 4 mL SDS 10% 0.4%
- 46 mL H₂O
- Estable por meses en el refrigerador

4. **Persulfato de amonio**

- 0.5 g de persulfato de amonio
- 5 mL H₂O
- Estable por meses en un tubo tapado en el refrigerador.

5. **Buffer Electroforesis**, 1 litro

- 3 g Tris
 - 14.4 g glicina
 - 1 g SDS
 - H₂O para hacer un litro
- pH podría ser aproximadamente 8.3
- Puede hacer también una solución STOCK 10x
- Estable indefinidamente a temperatura ambiente

6. **2x Buffer Muestra para LPS (Buffer de Solubilizacion)**, 1ml

- 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8)
 - 0.04 mL glicerol
 - 2 mL SDS 2 %
 - Azul de bromofenol 0.01%
 - H₂O para hacer 1 mL
- Estable por semanas o meses en el refrigerador a -20° C

Preparación del GEL.

Para 3 mL gel concentrador (stoking gel) 5%

H2O desionizada esteril	1.785 mL	1 ml-785µL
0.5M Tris-HCl, pH 6.8 (SOL. C)	0.75 mL	75 µL
10% (w/v) SDS	0.03 mL	30 µL
Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8% w/v) (SOL. A)	0.402 mL	402 µL
Persulfato de Amonio 10% (w/v) AP	0.03 mL	30 µL
TEMED	0.003 mL	3 µL

Nota: De esta solución se preparan 3 mL y se utilizan 1.4 mL

Para 4 mL gel separador (separiting gel)

Acrilamida 12%

H2O desionizada estéril	1.28 mL	1 mL-280µL
Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8% w/v) (SOL. A)	1.6 mL	1 mL-600 µL
1.5M Tris-HCl, pH 8.8 10% (w/v) (SOL.B)	1.04 mL	1 mL-40 µL
SDS 10%(w/v)	0.04 mL	40 µL
Persulfato de Amonio 10% (w/v) AP	40 µL	
TEMED	4 µL	

Nota: De esta solución se preparan 4 mL y se utilizan 3 mL.

PROCEDIMIENTO:

1.- Primero se prepara el gel de separación en un frasco pequeño se mezclan las cantidades señaladas que se requieren para el gel separador respetando el orden

señalado en la tabla, es decir, primero el agua desionizada estéril luego la acrilamida, luego tris, SDS y al final se adicionan el persulfato de amonio y TEMED.

Una vez lista la solución del gel tomar la cantidad apropiada con una micropipeta y punta estéril, Agregar un volumen (1mL) de la solución entre las placas de vidrio en este caso hasta completar 3ml. Evitando en cada caso el burbujeo. Después de completar los 3ml se adiciona 1ml de agua desionizada estéril.

2.- Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 40 min a 1 hora, usando como control de polimerización lo que quedo de resto en el frasco de la solución observando cuando este se polimeriza. Una vez polimerizado se retira el mililitro de agua desionizada estéril con cuidado.

3. Después se prepara gel concentrador y en un frasco se adicionan las cantidades señaladas que se requieren para el gel concentrador respetando el orden señalado en la tabla, es decir, primero el agua desionizada estéril, enseguida el tris, el SDS, luego acrilamida, y al final el persulfato de amonio y el TEMED.

Una vez lista la solución del gel tomar la cantidad apropiada con una micropipeta y punta estéril, Agregar un volumen (1mL) de la solución entre las placas de vidrio en este caso hasta completar 1.4 mL. Evitando en cada caso el burbujeo.

4.- Colocar el peine entre ambos vidrios cuidadosamente secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse.

5.- Dejar polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente durante 30 a 40 min usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el frasco.

5.- Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS LIPOPOLISACÁRIDOS

MATERIAL:

- Plancha de agitación
- Vaso de precipitados
- Soporte para tubos eppendorf
- Tubos eppendorf.

REACTIVOS:

- Buffer de carga 5x:
0.6 ml de 1M Tris-HCL pH6.8
5ml 50% glicerol
2ml 10% SDS
1ml de azul de bromofenol 1%
0.9 ml de H₂O

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Dependiendo de la concentración de LPS obtenidos en la extracción, realizar cálculos para mezclar con buffer de carga 5x recién preparado.
- 2.- Los tubos que contienen las muestras de los LPS se hierven en baño de agua durante 5 min a 95°C.
- 3.- Cargar las muestras en el gel de acrilamida.

CORRIDA DEL GEL DE LIPOPOLISACÁRIDOS

- 1.- Cargar en cada uno de los pozos del gel cuidadosamente.

2.- Las muestras se migran con un voltaje de 150 para el gel concentrador y para el gel separador se cambia el voltaje a 80.

3.- Cuando las muestras se separan en la parte inferior del gel se detiene la corrida del gel. Sacar cuidadosamente el gel y colocar en un recipiente para su revelado y tinción.

TINCIÓN Y REVELADO DE LIPOPOLISACÁRIDOS

MATERIAL:

Plancha de agitación

(02) Refractario con tapa

Agua destilada estéril

SOLUCIONES:

*Cada una de las soluciones fue de 100ml. Todas las soluciones se preparan en el momento.

La solución 4 o solución reveladora se prepara durante el paso 3 y 4 del procedimiento.

Solución 1 (Solución de FIJACIÓN): 55 mL de agua destilada estéril, etanol 40% (40 mL), y ácido acético 5% (5 mL).

Solución 2 (Solución de OXIDACION): 55 ml agua destilada estéril, ácido peryódico 0.7% (0.7 g); etanol 40% (40 mL), y ácido acético 5% (5 mL).

Solución 3 (Solución de TINCIÓN): 76.66ml de agua destilada estéril, 1.33 mL de hidróxido de amonio, 18.66 mL de hidróxido de sodio 0.1M, Nitrato de plata 20% 3.33 mL.

Solución 4 (Solución REVELADORA): 100 mL de agua destilada estéril, ácido cítrico 0.005 g y 0.05 mL (50 µL) de formaldehído 37%.

Solución 5 (Solución de PARA DETENER EL REVELADO): 100 mL de agua destilada estéril, 350 µL ácido acético.

PROCEDIMIENTO:

1.- En un recipiente que contiene la solución de fijación sumergir el gel durante toda la noche en agitación constante.

2.- Colocar el gel en la solución de oxidación durante 5 min en agitación constante.

3.- Realizar 4 lavados de 15 min, cambiando el agua en cada ocasión con agua destilada, manteniendo el gel en agitación (40 rpm).

Nota: en este momento se prepara la solución reveladora y se calienta a 37° C.

4.- Para teñir el gel adicionar la solución 3, y agitar a 70 rpm durante 10 min.

5.- Lavar el gel en tres ocasiones con agua destilada, haciendo 3 cambios de agua cada 15 min.

5.- En otro recipiente con solución reveladora preparada previamente colocar el gel durante 15 a 30 min, agitando el gel a 40 rpm.

6.- Para parar la reacción colocar el gel en una solución 5 durante 15 a 30 min.

7.- Al final el gel se mantiene en Agua destilada.

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

- Reactivos:**
- Metanol
- Equipo:**
- Balanza analítica digital
 - Pistilo
 - Mortero
 - Tubos Eppendorf 1.5 mL cubiertos con papel aluminio.
 - Centrifuga para tubos eppendorf
 - Espectrofotómetro
 - Celdas para espectrofotómetro

Procedimiento:

1. Colectar el material vegetal fresco y cortar en piezas pequeñas, colocarlas en un mortero, adicionar nitrógeno líquido y moler hasta convertir en polvo.
2. Transferir el polvo en un tubo eppendorf que contenga 1 mL de metanol y resuspender en el vortex en condiciones de obscuridad durante 15-30 seg (la clorofila se degrada con la luz).
3. Para eliminar los restos de material vegetal, centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a 4°C y transferir el sobrenadante a otro tubo fotoprotegido desechando el precipitado.
4. Calibrar el espectrofotómetro utilizando el metanol como blanco.
5. Medir la absorbancia del contenido de clorofila usando el espectrofotómetro. (a 665 - b 652).
6. Las concentraciones de clorofila se calculan aplicando las siguientes ecuaciones, teniendo en cuenta que el disolvente empleado es metanol:
 - $C_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$ para el contenido de clorofila A
 - $C_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$ para el contenido de clorofila B
 - $C_{a+b} = 1.44A_{665.2} + 24.93A_{652.4}$ para el contenido de clorofila total (Lichenthaler, 1987).

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PEROXIDASAS

Extracción de la enzima:

MATERIALES:

- Mortero
- Espátula
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
-

EQUIPO:

- Vortex
- Microcentrífuga Eppendorf

SOLUCIONES:

- Buffer NaH_2PO_4 100 mM, pH7
- Nitrogeno líquido.

PROCEDIMIENTO:

1. Pulverizar 0.5g de tejido con nitrógeno líquido en un mortero frío.
2. Resuspender en el vortex, durante 20 segundos, el macerado en 1 mL de NaH_2PO_4 100 mM, pH7.
3. Centrifugar 10,000 g por 30 min a 4°C. utilizar el sobrenadante para los diferentes ensayos.

a.- ANALISIS POR ESPECTROFOTOMETRIA

EQUIPO:

- Espectrofotómetro.

MATERIAL:

- Celdas de plástico de 1mL
Micropipetas (1000 μL y 10 μL)

REACTIVOS:

- Buffer de guaiacol: 0.25% de guaiacol (v/v), preparado en NaH_2PO_4 10 mM, pH6, 0.125% de H_2O_2 (v/v).

PROCEDIMIENTO:

1.- Tomar 999 μL de buffer de guaiacol y adicionarle 1 μL del extracto de la enzima.

2.- Leer absorbencia a 470 nm, durante 3 min a intervalos de 3 seg.

Calcular la actividad de la enzima con la fórmula:

$$V = \Delta A / \epsilon L \Delta t$$

$\epsilon = 26600 \text{ mol/cm.}$

$L =$ Longitud del paso de la luz a través de la celda (1 cm).

$t =$ Tiempo de medición.

$\Delta A =$ Diferencia en la absorbencia durante 3 min

b.-ACTIVIDAD EN GEL NO DESNATURALIZANTE

EQUIPO:

- Cámara de electroforesis vertical.
- Fuente de poder.
- Agitador orbital o vertical.

- Transiluminador de luz blanca.
- Cámara digital.

REACTIVOS:

- Reactivo de Bradford
- Citrato de Sodio 50 mM, pH 5.5

SOLUCIONES DE REVELADO:

Preparar diaminobenzidina 1 mM más H_2O_2 , 0.03% en Citrato de Sodio 50 mM, pH 5.5.

PROCEDIMIENTO:

1.- Cuantificar proteína del extracto crudo por el método de Bradford (Utilizar una curva estándar de proteína).

2.- Cargar la proteína en un gel de acrilamida no desnaturalizante.

- 3.- Correr el gel a 80 voltios por aproximadamente 2 horas y media.
- 4.- Sumergir el gel en Citrato de Sodio 50 mM, pH 5.5, durante 30 min en agitación constante.
- 5.- Eliminar la solución.
- 6.- Incubar con Citrato de Sodio conteniendo DAB 1 mM y H₂O₂ 0.03% hasta que aparezcan bandas de color café.
- 7.- Documentar fotográficamente el resultado

