



**Universidad Michoacana de San  
Nicolás de Hidalgo**



**Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas**

**Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno y de  
los sistemas antioxidantes en raíces de trigo inoculadas con  
*Azospirillum brasilense* Sp245**

Tesis que presenta:

**Manuel Méndez Gómez**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

Asesor:

**Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas  
Ernesto García Pineda**

Morelia, Michoacán Febrero del 2015

LA PRESENTE INVESTIGACION SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO-BIOLÓGICAS (IIQB) DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO (UMSNH), BAJO LA ASESORIA DEL **D.C ERNESTO GARCÍA PINEDA**



TESIS APOYADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) CON NUERO DE BECA: 276783 Y LA COORDINACION DE LA INVESTIGACION CIENTIFICA (CIC) DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres, Manuel y Gerónima**

**A mis hermanos, Alfredo, Teresa, Aurora, Ceci, Francisca, Ana, Laureano  
y Anahí**

**A mi esposa Raquel Montserrat**

**A mi hijo Leonardo Emmanuel**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** que me ha dado la oportunidad de vivir y por estar conmigo en todo momento.

A los seres que más quiero en este mundo: mis padres, **Manuel** y **Gerónima**, por el amor que me han dado y por todo el esfuerzo que han hecho para concluir esta etapa de mi vida profesional, mil gracias.

A mis hermanos, **Alfredo**, **Tere**, **Aurora**, **Ceci**, **Francisca**, **Ana**, **Laureano** y **Anahí** por el cariño, todos los momentos felices compartidos y por el apoyo económico proporcionado durante toda mi carrera.

A mi asesor el **DC Ernesto García Pineda** y a la **MC Elda Castro Mercado** por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación. Además, por asesorarme y apoyarme para concluir este trabajo.

A mi esposa **Raquel Montserrat** por todo el amor, regaño (que no se cual es la diferencia), cariño y apoyo que me ha brindado día con día.

A mi hijo **Leonardo Emmanuel** por su sonrisa, por jugar conmigo después del trabajo de laboratorio, por que cuando estoy con el no existe el estrés, por ser el motivo de lo que quiero ser y por muchas cosas más, gracias mi amor.

A la **familia Moreno Franco** por todo el cariño el apoyo que me han brindado.

A mis compañeros de laboratorio, **Rosy**, **Tere**, **Luis Felipe**, **Luis María** y **Sarai** por toda su sincera amistad.

A mis sinodales: **DC Eduardo Valencia Cantero**, **DC. Ernesto García Pineda**, **DC Homero Reyes de la Cruz**, **DC José López Búcio** y a la **DC Elda Beltrán Peña**, por las aportaciones realizadas para mejorar este proyecto.

A la **DC Gladys Alexandre** de departamento de bioquímica y biología celular molecular de la universidad de Tennessee, USA. Por la sepa proporcionada de *A. brasilense* Sp245.

Al **DC Mario González** del INIFAP Celaya, por las semillas de trigo variedad NANA proporcionada.

Al grupo de trabajo **del laboratorio de biología del desarrollo vegetal y laboratorio de fisiología molecular de plantas** por el equipo proporcionado para realizar parte de este trabajo.

A la **DC Alma Lilia Fuentes** por el microtomo y microscopio de fluorescencia proporcionado para concluir parte de este trabajo

Al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** por abrirme las puertas de sus aulas para mi desarrollo profesional.

Al **Consejo de Ciencia y Tecnología** y a la **Coordinación de la Investigación Científica** por la beca otorgada para llevar a cabo este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<i>iv</i>
	<b>RESUMEN.....</b>	<i>vi</i>
	<b>SUMMARY.....</b>	<i>vii</i>
		<b>pg.</b>
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
	2.1 Interacción planta-bacteria.....	5
	2.2 Rizósfera.....	6
	2.3 PGPR.....	8
	2.4 <i>Azospirillum</i> .....	9
	2.4.1 Taxonomía.....	9
	2.4.2 Características generales.....	10
	2.4.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.....	10
	2.4.3.1 Fijación de nitrógeno.....	10
	2.4.3.2 Producción de fitohormonas.....	11
	2.4.3.3 Inducción de resistencia en contra de patógenos y estrés abiótico.....	14
	2.5 Importancia en la agricultura.....	15
	2.6 Trigo.....	16
	2.7 Características de las interacciones planta-bacterias benéficas.....	16
	2.8 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	17
	2.8.1 Anión superóxido.....	17
	2.8.2 Peróxido de hidrógeno.....	18
	2.8.3 Radical hidroxilo.....	18

2.8.4	Óxido nítrico.....	19
2.9	Mecanismos de producción de las ERO en plantas.....	19
2.9.1	Cloroplastos.....	20
2.9.2	Peroxisomas.....	21
2.9.3	Mitocondrias.....	21
2.9.4	Apoplasto.....	22
2.10	ERO en el desarrollo vegetal.....	23
2.11	Especies reactivas de oxígeno durante la interacción planta-rizobacteria.....	25
2.12	Sistema enzimático.....	27
2.12.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	27
2.12.2	Catalasas.....	28
2.12.3	Peroxidasas.....	29
2.13	Sistema no enzimático.....	31
2.14	Calcio en el desarrollo de plantas.....	32
2.15	Calcio durante la simbiosis.....	34
III	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	35
IV	<b>HIPÓTESIS</b> .....	36
V	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
5.1	Objetivo general.....	37
5.1.1	Objetivos particulares.....	37
VI	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
6.1	Material biológico.....	38
6.2	Medio LB mínimo y mantenimiento de <i>A. brasilense</i> Sp245	38
6.3	Preinóculo e inóculo de <i>A. brasilense</i> Sp245.....	38
6.4	Proceso de lavado de bacterias.....	38
6.5	Desinfección y germinación de semillas de trigo.....	39
6.6	Proceso de infección de plántulas de trigo con <i>A.</i> <i>brasilense</i> .....	39
6.7	Análisis del efecto de <i>A. brasilense</i> sobre la raíz de trigo...	39
6.8	Tinción de raíz con DAPI.....	40
6.9	Aclareo de raíz.....	40
6.10	Análisis de la producción de anión superóxido.....	40



6.11	Preparación de la muestra, para determinar la actividad de SOD y peroxidasas.....	41
6.12	Efecto del ácido indol acético (AIA) sobre la raíz de trigo...	41
6.13	Efecto del cloruro de lantano (LaCl <sub>3</sub> ) sobre el crecimiento de <i>A. brasilense</i> Sp245.....	41
6.14	Efecto del cloruro de lantano (LaCl <sub>3</sub> ) sobre el crecimiento de trigo.....	42
6.15	Análisis estadístico.....	42
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
7.1	Efecto de <i>A. brasilense</i> sobre el sistema radical de trigo....	43
7.2	Producción de anión superóxido.....	49
7.3	Actividad de las superóxido dismutasas y peroxidasas.....	53
7.4	Efecto del ácido indol acético sobre a raíz de trigo.....	58
7.5	Papel del calcio durante la interacción.....	61
<b>VIII</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
<b>X</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>74</b>
<b>XI</b>	<b>APÉNDICE.....</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

		pg.
<b>Fig. 1</b>	Interacción planta-microorganismo.....	6
<b>Fig. 2</b>	Rizósfera.....	7
<b>Fig. 3</b>	Producción de ERO en plantas.....	20
<b>Fig. 4</b>	Sistema radical de trigo.....	43
<b>Fig. 5</b>	Longitud de la raíz seminal principal de trigo.....	44
<b>Fig. 6</b>	Formación de raíces laterales.....	45
<b>Fig. 7</b>	Formación de pelos radicales.....	46
<b>Fig. 8</b>	Efecto de <i>A. brasilense</i> sobre la zona meristemática de la raíz...	47
<b>Fig. 9</b>	Efecto de <i>A. brasilense</i> sobre el tamaño celular de la raíz.....	48
<b>Fig. 10</b>	Distribución de anión superóxido en la raíz de trigo.....	50
<b>Fig. 11</b>	Efecto de <i>Azospirillum</i> sobre la producción de anión superóxido en plantas de trigo.....	51
<b>Fig. 12</b>	Producción de anión superóxido en plantas inoculadas con <i>Azospirillum</i> a diferentes tiempos.....	52
<b>Fig. 13</b>	Producción de anión superóxido en meristemo de raíces laterales.....	53
<b>Fig. 14</b>	Actividad de sistemas antioxidantes de trigo durante la interacción con <i>Azospirillum</i> .....	54
<b>Fig. 15</b>	Actividad de la superóxido dismutasa en meristemo radical.....	56
<b>Fig. 16</b>	Actividad de las peroxidasas en el meristemo radical de plántulas de trigo.....	57
<b>Fig. 17</b>	Efecto del AIA sobre el sistema radical de trigo.....	59
<b>Fig. 18</b>	Concentración de anión superóxido en presencia de ácido indol acético (AIA).....	60
<b>Fig. 19</b>	Actividad de SOD y peroxidasas durante el tratamiento con ácido indol acético (AIA).....	61
<b>Fig. 20</b>	Participación del calcio en el crecimiento y formación de raíces laterales.....	63
<b>Fig. 21</b>	Participación del calcio sobre la concentración de anión	

	superóxido.....	65
<b>Fig. 22</b>	Participación del calcio sobre la actividad de SODs y Prxs durante la interacción <i>Azospirillum</i> -Trigo.....	66
<b>Fig. 23</b>	Modelo de la interacción <i>Azospirillum</i> -trigo.....	72

## RESUMEN

El género *Azospirillum* pertenece al grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, que mejoran el crecimiento de varias plantas de importancia económica, tal como el trigo. Las rizobacterias inducen cambios en los procesos metabólicos de la planta que conducen a cambios en la arquitectura del sistema radical. Uno de los primeros procesos que es afectado durante la interacción planta-microorganismo, es la producción de especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas están involucradas en varios procesos biológicos como el crecimiento, desarrollo, señalización y defensa. Por lo tanto, los niveles son estrictamente mantenidos por sistemas antioxidantes. En este trabajo, la producción de anión superóxido fue analizada durante la interacción trigo-*Azospirillum*, así como algunas actividades enzimáticas antioxidantes como la superóxido dismutasa y peroxidasa. Encontramos que *Azospirillum* reduce la longitud de la raíz de trigo; incrementa la formación de raíces laterales y pelos radicales. La concentración de anión superóxido en el meristemo de la raíz disminuye durante la interacción, probablemente debido a la alta actividad de las superóxido dismutasas y peroxidasas presentes en esta región. El tratamiento con ácido indol acético mimetiza los efectos inducidos por *Azospirillum*. Por otro lado, las plantas tratadas con cloruro de lantano (un inhibidor de canales de calcio) disminuyen la producción raíces laterales, sugiriendo que el calcio es involucrado en su formación inducido por *Azospirillum*. En base a nuestros resultados, concluimos que *Azospirillum* modifica la concentración de anión superóxido en el meristemo de la raíz a través del incremento de la actividad de enzimas antioxidantes.

**Palabras clave:** *Interacción, Especies reactivas de oxígeno, Antioxidantes, Calcio, Raíz.*

## SUMMARY

The genus *Azospirillum* belongs to the plant growth-promoting rhizobacteria, which improves the growth of several economic important plants, such as wheat. Rhizobacteria induce changes in metabolic processes of the plant leading to changes in the architecture of the radical system. One of the first processes which is affected during plant-microorganism interaction is the reactive oxygen species production. These molecules are involved in several biological processes as growth, development, signaling and defense. Therefore, levels are maintained strictly by antioxidants systems. In this work, the production of superoxide anion was analyzed during wheat-*Azospirillum* interaction, as well as some antioxidative enzyme activities like superoxide dismutase and peroxidase. We found that *Azospirillum* reduces the length of wheat root; increase the formation of lateral roots and root hairs. The concentration of superoxide anion in the root meristem decreases during the interaction, probably due to the high activity of the superoxide dismutases and peroxidases present in this region. Treatment with indol acetic acid mimics the effects induced by *Azospirillum*. Moreover, plants treated with lanthanum chloride (an inhibitor of calcium channels) decrease lateral roots production, suggesting that calcium is involved in its formation induced by *Azospirillum*. Based on our results, we conclude that *Azospirillum* modify the superoxide anion concentration in the root meristem through the increase of the antioxidative enzymes activity.

**Keyword:** *Interaction, Reactive oxygen species, Antioxidants, Calcium, Root.*

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son un grupo diverso de organismos con diferentes adaptaciones a una multiplicidad de condiciones medioambientales. Como organismos sésiles, las plantas interactúan con una gran diversidad de organismos y microorganismos de manera positiva ó negativa. Esta interacción tiene lugar en la parte aérea así como en la rizósfera, una pequeña porción del suelo que rodea la raíz de una planta, cuya característica depende de los exudados de la raíz (Cardón et al., 2007).

Dentro de las interacciones positivas, existen microorganismos mejor conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR: por su siglas en ingles), que mejoran el crecimiento de las plantas. Las PGPR tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico o secretar fitohormonas como parte de su metabolismo natural. La utilización de bacterias benéficas como el género *Azospirillum* en las prácticas agrícolas modernas, han abierto un sin número de posibilidades para la promoción directa del crecimiento vegetal y el control biológico de enfermedades. Las plantas inoculadas con *Azospirillum* mejoran su crecimiento, promoviendo mayor formación de raíces laterales y pelos radicales lo que les permite mayor superficie para la absorción de agua y nutrientes (Spaepen et al., 2008; 2014). Además, este tipo de microorganismos se consideran amigables para el ambiente al implicar una menor necesidad de fertilización química y reducción en el uso de pesticidas, disminuyendo así los costos de producción (Creus et al., 2008). Para que las bacterias puedan mejorar el crecimiento vegetal, deben colonizar eficazmente el sistema radical de la planta. Se sabe que durante los primeros minutos de la interacción entre plantas y microorganismos, un diálogo molecular toma lugar en la rizósfera y en la superficie celular, que involucra varias moléculas señales dando como resultado una interacción física (Nanda et al., 2010). De acuerdo a lo anterior, las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el calcio como moléculas de señalización en la planta, juegan un papel importante durante la interacción, modulando diversos procesos biológicos como crecimiento, desarrollo, defensa y respuestas a estrés (Foreman et al., 2003; Miller, 2009; Swanson y Gilroy, 2010; Torres, 2010).

El sistema de interacción *Rhizobium*-leguminosa es el más conocido. Dicho proceso involucra un dialogo molecular entre los dos organismos, en donde la raíz de las leguminosas secretan flavonoides que inducen la expresión de genes de nodulación bacterial, que codifican para proteínas implicadas en la síntesis y secreción de lipoquitooligosacaridos llamados factores Nod (Haag et al., 2013). La señal de los factores Nod es percibida por la planta, induciendo varias respuestas en la raíz, tales como el intercambio de iones, alcalinización citoplásmica, oscilación del calcio citosólico y de las especies reactivas de oxígeno y expresión de genes que conducen a la invasión bacterial y formación de nódulos (Cárdenas et al., 2000, 2008; Haag et al., 2013). Cárdenas et al., (2008), demostraron que los pelos radicales tratados con factores Nod, sufren un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno en la parte apical de estas células y este regresa a su estado basal después de 3 min. Esta oscilación en los niveles de las especies reactivas de oxígeno podría ser una señal para distinguir a las bacterias benéficas de las patógenas. Por otra parte, la concentración del calcio también se modifica durante la interacción. A los pocos segundos del reconocimiento de los factores Nod, se presenta una oscilación en la concentración del calcio en el nucleoplasma y citoplasma asociado al núcleo son inducidos, que a su vez induce la expresión de genes llamados nodulinas (Haag et al., 2013). Sin embargo, la relación entre ERO y calcio durante diferentes tipos de estrés e interacción planta patógeno aún se está dilucidando (Steinhorst y Kudla, 2013; Dubiella et al., 2013; Gilroy et al., 2014).

En plantas, las ERO participan en procesos biológicos tales como crecimiento, desarrollo, ciclo celular, muerte celular programada y respuestas a estrés biótico y abiótico. La atenuación en la producción de ERO por la mutación de una NADPH oxidasa en *Arabidopsis thaliana*, conduce al descenso en la formación de pelos radicales (Foreman et al., 2003). Por lo tanto, se ha concluido que las ERO regulan la arquitectura del sistema radical de una planta.

Un resultado contradictorio a lo mencionado anteriormente, fue el obtenido por Lohar et al., (2007), donde observaron un decremento en la producción de ERO en *M. truncatula* en respuesta a factores Nod. Sin embargo, estos

resultados fueron obtenidos varios minutos después de la adición de los factores Nod. No obstante, los niveles de ERO deben de estar estrictamente controlados para una buena asociación con los microorganismos y en el desarrollo de las plantas. Los niveles de ERO son mantenidos por una gran cantidad de enzimas, entre los que se encuentran, las superóxido dismutasas y peroxidasas (Mittler et al., 2004). El incremento en la actividad de estas enzimas en las plantas, es esencial para la regulación intracelular de ERO durante el establecimiento de la interacción con las bacterias y posterior a ella, regulando el desarrollo.

En base a los estudios antes mencionados, se podría pensar que durante la interacción planta-microorganismo se modifica la concentración de ERO en la planta y sus niveles son regulados por sistemas antioxidantes que mantienen la concentración adecuada para un buen desarrollo.

La mayoría de los estudios realizados sobre la producción de ERO, calcio y sistemas antioxidantes, se han realizado en el modelo *Rhizobium*-leguminosa. Donde la bacteria induce la formación de un nuevo órgano conocido como nódulo, el cual lleva a cabo la fijación del nitrógeno. Sin embargo, escasamente se conoce sobre los mecanismos moleculares durante la interacción de una bacteria de vida libre y una planta que no forme nódulos, como es el caso de la interacción *Azospirillum*-trigo. Los análisis bioquímicos y moleculares sobre esta asociación son pobremente conocidos. Spaepen et al., (2014), demostraron que *Azospirillum* induce cambios en la expresión de genes relacionados a defensa y hormonas, así como genes relacionados a la formación de la pared celular en *Arabidopsis thaliana*. Además ellos observaron que la bacteria mutante en la producción de ácido indol acético no induce estos cambios. Los autores concluyen que las auxinas producidas por *Azospirillum* son factores importantes durante la interacción planta-*Azospirillum*, y posiblemente en otras interacciones planta bacteria.

Debido a la escasa información sobre la bioquímica de la asociación *Azospirillum*-trigo, en el presente estudio se investigará el papel que juegan las especies reactivas de oxígeno, específicamente el anión superóxido durante la interacción y la actividad de los sistemas antioxidantes como las superóxido

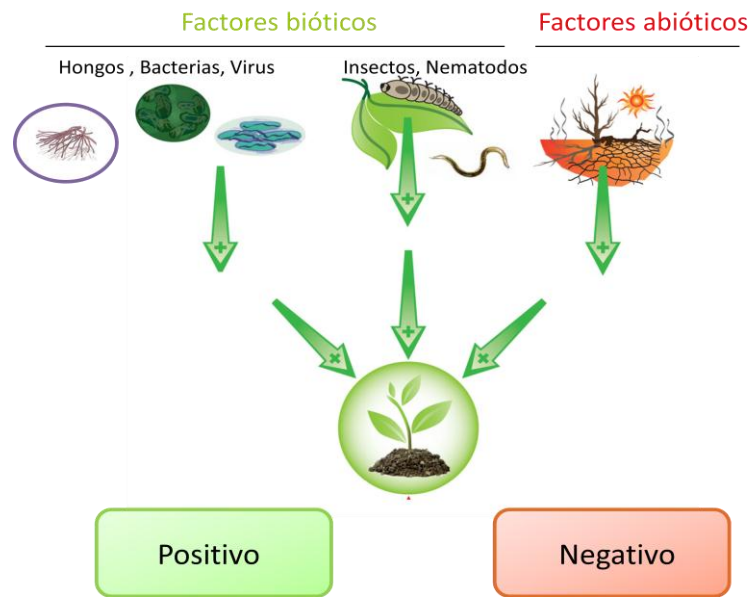


dismutasas y peroxidasas que regulan los niveles de estas moléculas. Además, analizaremos la importancia del calcio en la formación de las raíces laterales inducida por *Azospirillum*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Interacción planta-bacteria

Las plantas como organismos sésiles interactúan con una gran variedad de factores bióticos y abióticos. En estos últimos tenemos a la incidencia de la luz, pH del suelo, la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de agua y nutrientes, entre otros. En los factores bióticos se presenta la interacción de la planta con microorganismos u organismos superiores, que afectan su crecimiento y desarrollo (Fig.1). Debido a que las plantas son organismos autótrofos con capacidad de fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico y sintetizar un gran número de compuestos carbonados, representan la mayor fuente de carbono, nitrógeno y energía para los microorganismos heterótrofos (Badri et al., 2009). Como bien sabemos, las plantas y los microorganismos como las bacterias han coexistido durante millones de años en la tierra. Como un resultado de éste fenómeno, las bacterias han desarrollado relaciones benéficas y perjudiciales con las plantas. El sistema radical, tradicionalmente conocido como un medio de anclaje, captación de nutrientes y agua, es un sistema que media numerosas interacciones. Éstas incluyen asociaciones mutualistas con microbios benéficos, tales como rizobia, micorrizas, endófitos, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles), interacciones parasíticas con otras plantas, bacterias patógenas y herbívoros.



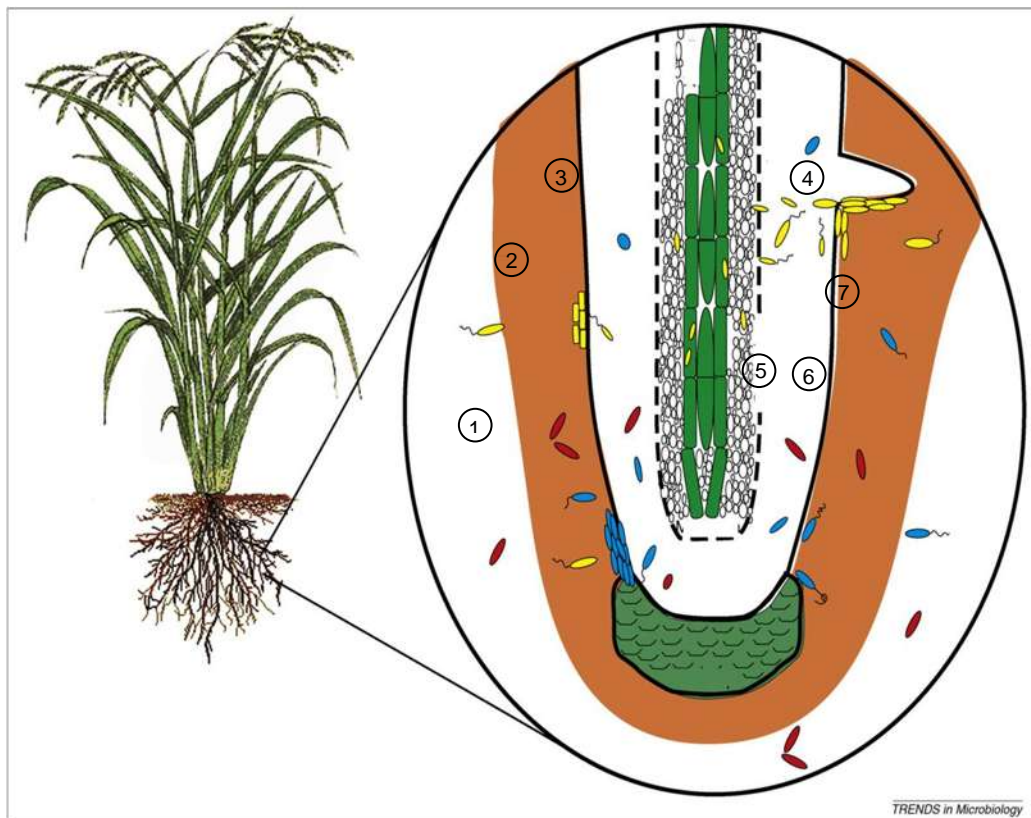
**Fig. 1. Interacción planta-(micro) organismo.** Las interacciones afectan de diferente manera el desarrollo de las plantas. Los factores abióticos son: pH del suelo, incidencia de luz, estrés hídrico, temperatura, entre otros.

## 2.2. Rizósfera

Una de las zonas de gran interés para la interacción planta-microorganismo es conocida como la rizósfera, un centro de actividades físicas, químicas y biológicas con apenas 1 mm de espesor, que rodea la arquitectura del sistema radical de una planta (Cardón et al., 2007). En años recientes, la definición de rizósfera ha sido redefinida para incluir tres zonas que son especificadas en base a su relativa proximidad e influencia sobre la raíz: i) La endorizósfera incluye porciones del córtex y endodermis donde los microbios y cationes pueden ocupar el espacio libre entre células (espacio apoplástico); ii) El rizoplano es la zona media directamente adyacente a la raíz, que comprende la epidermis de la raíz y el mucílago; iii) La zona más exterior es la ectorizósfera, que se extiende desde el rizoplano hacia el suelo. Como puede verse, debido a la complejidad y diversidad del sistema radical de la planta, la rizósfera no es sólo una región de tamaño y forma definida, sino además, consiste de un gradiente de propiedades químicas, físicas y biológicas que cambian tanto radial como longitudinalmente a lo largo de la raíz. Se ha estimado que sobre el 10-40% del carbono fijado fotosintéticamente por la planta, es liberado en forma orgánica e inorgánica que en conjunto son llamados rizodepositos,

siendo las primeras las más variadas y las que influencia más en los procesos biológicos dentro de la rizósfera. Los compuestos orgánicos liberados, pueden dividirse en compuestos de alto peso molecular que no son fácilmente usados por microorganismos (mucílago y celulosa) y los de bajo peso molecular, que son más diversos y un amplio rango de funciones y son generalmente categorizados en ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, azúcares, fenoles y otros metabolitos secundarios (McNear Jr, 2013).

Los rizodepósitos hacen de la rizósfera un nicho deseable para la proliferación de una gran cantidad de comunidades microbianas. Por lo tanto, la rizósfera puede albergar de  $10^{10}$ - $10^{12}$  células por gramo de suelo rizosférico. La relación rizósfera-microorganismo que ha recibido más atención incluye la *Rhizobium*-leguminosa, asociaciones con hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, que abordaremos en la siguiente sección.



**Fig.2 Rizósfera.** Representación de los componentes de la rizósfera. 1: Suelo. 2: Rizósfera. 3: Rizoplasma. 4: Raíz lateral en emergencia. 5: Periciclo. 6: Córtex. 7: Epidermis

### 2.3. PGPR

Los microorganismos que colonizan la rizósfera pueden ser clasificados de acuerdo a su efecto sobre las plantas, en patógenos y benéficos. Entre los microorganismos que habitan en la rizósfera, varias especies de bacterias, conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), son capaces de promover el crecimiento vegetal. Algunas PGPRs promueven el crecimiento de la planta directamente por producir y secretar sustancias que estimulan el crecimiento vegetal (auxinas, citocininas, giberelinas), por suplementar a las plantas de macro y micro elementos, por la fijación biológica de nitrógeno (diazótrofos) y/o solubilización del fosforo, entre otros procesos (Saharan y Nehra, 2011). Otras rizobacterias, como *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, promueven el crecimiento vegetal al liberar compuestos volátiles como el 2,3-butanediol y acetoina (Lugtenberg y Kamilova, 2009). También se ha demostrado que las rizobacterias benefician el crecimiento de la planta a través de efectos indirectos, principalmente asociados con la reducción del daño causado por patógenos, debido a la activación de la resistencia sistémica inducida en la planta (Van Loon, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009). La resistencia sistémica inducida (ISR), es manifestada como una reducción del daño provocado por patógenos en toda la planta. La ISR es efectiva contra un amplio espectro de patógenos y puede sobrelaparse de alguna manera con la resistencia sistémica adquirida (SAR), inducida por patógenos. Tanto la ISR y la SAR representan un estado de resistencia basal de las plantas que depende de la señalización del ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico respectivamente (Van Loon, 2007).

Varios géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* han sido reportados que incrementan el crecimiento de las plantas (Saharan y Nehra, 2011). Actualmente, algunos de estos géneros se están comercializando como inoculantes de biocontrol, biofertilizantes, bioinoculantes

para mejorar el rendimiento del cultivo en campo, reducir la contaminación y los gastos por fertilizantes a base de compuestos nitrogenados.

Un ejemplo claro es la aplicación de *A. brasilense* en cultivos de importancia económica como el maíz, trigo y sorgo para mejorar el rendimiento de estas plantas. *Azospirillum* posee una gran cantidad de cualidades para ser considerado como PGPR y es uno de los biofertilizantes más usados en todo el mundo. Por lo tanto, se describirá a continuación algunos de los aspectos de *Azospirillum*.

## **2.4 *Azospirillum***

### **2.4.1 Taxonomía**

*Azospirillum* pertenece a la subclase  $\alpha$ -proteobacteria, que alberga un gran número de bacterias simbiotes asociadas a plantas. *Azospirillum sp*, ha sido aislado en todo el mundo colonizando la rizósfera de muchas gramíneas, particularmente de cultivos de importancia económica como el maíz, trigo y arroz, desde climas tropicales hasta templados (Patriquin et al., 1983).

El género *Azospirillum* fue estudiado primero por J. Döbereiner debido a su capacidad de fijar el nitrógeno y su presencia en la rizósfera. En la actualidad se han encontrado muchas especies del género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978) siendo estas las más estudiadas.

De acuerdo al National Center for Biotechnology Information (NCBI) la clasificación taxonómica de *Azospirillum* es la siguiente:

**Reino:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Subclase:** Alphaproteobacteria

**Orden:** Rhodospirillales

**Familia:** Rhodospirillaceae

**Género:** *Azospirillum*

## 2.4.2 Características generales

Las especies de *Azospirillum* son bastones curvados de 0.8-1.0 X 25  $\mu\text{M}$  de tamaño, con gránulos de polihidroxibutirato (PHB), que cuando está fijando nitrógeno, alcanzan el 50% del peso seco de la célula. Las bacterias son gram negativas, móviles con un simple flagelo polar y se han observado numerosos flagelos laterales cortos en *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Hartmann y Baldani, 2006).

*Azospirillum* presenta una distribución mundial, frecuentemente en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Bashan y Holguin, 1997). Aparece en grandes cantidades (hasta  $10^7$  UFC/g de suelo) en la rizósfera, asociadas a raíz, tallos y hojas de una gran variedad de plantas (Hartmann y Baldani, 2006). Las plantas inoculadas con *Azospirillum* incrementan la longitud del sistema radical, presentan un mayor número de raíces laterales, de pelos radicales e incrementa el peso seco de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Spaepen et al., 2008). El mecanismo exacto para promover el crecimiento es aún desconocido, sin embargo, se ha atribuido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico durante la asociación con las plantas, aunque algunos en condiciones de campo e invernadero indican que este mecanismo no juega un papel importante en la promoción del crecimiento vegetal (Spaepen et al., 2009). Por otro lado, *Azospirillum* es capaz de producir y excretar reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas) tales como auxinas (ácido indol 3 acético, AIA), citocininas y giberelinas (Tien et al., 1979; Molina-Favero et al., 2008; Spaepen et al., 2008, 2009).

## 2.4.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

### 2.4.3.1 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, pero estas no lo pueden asimilar de manera directa. Sólo algunas procariontas son capaces de usar el  $\text{N}_2$  a través de un proceso llamado fijación biológica de nitrógeno, que es la conversión del  $\text{N}_2$  atmosférico, a una forma en que puedan usar las plantas (nitratos y amonio). Por lo tanto, los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal, se relaciona

con el metabolismo del nitrógeno y una gran cantidad de los trabajos sobre la fijación de ésta molécula fue realizada con *Azospirillum brasilense*.

Originalmente la fijación de nitrógeno fue propuesta como el principal mecanismo por el cual *Azospirillum* afecta el crecimiento de las plantas (Okon et al., 1983), debido a que el género *Azospirillum* posee la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico tanto como bacteria de vida libre, como en asociación con la planta. *A. brasilense* posee el operón *nifHDK*, que codifica ambos componentes nitrogenasas, aislado en base a su similitud con genes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae*. Posteriormente se aislaron genes involucrados en la fijación del nitrógeno tales como *nifH*, *D*, *A*, *K* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Sin embargo, en la mayoría de los cultivos bajo diferentes condiciones, la contribución en la fijación del nitrógeno por *Azospirillum* se ha estimado en no más de 10 kg de N<sub>2</sub> por hectárea al año, mientras que la fertilización del maíz en la agricultura moderna está en el orden de 200-300 kg de N<sub>2</sub> por hectárea. De acuerdo con este dato, parece que la contribución de la fijación biológica de nitrógeno por *A. brasilense* es baja para los cultivos y que no jugaría un papel importante en la promoción del crecimiento vegetal (Helman et al., 2011).

#### **2.4.3.2 Producción de fitohormonas**

Además de la fijación de nitrógeno, la promoción del crecimiento vegetal por la inoculación con *Azospirillum* puede ser explicada por la acción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal producidas por ésta bacteria. Varios tipos de fitohormonas han sido identificadas en el cultivo bacteriano que incluyen a las auxinas (Tien et al., 1979; Spaepen et al., 2008). El AIA es la principal auxina producida por *Azospirillum*. Esta fitohormona regula varios procesos fisiológicos en las plantas, y aquellas inoculadas con *Azospirillum* presentan un incremento en el crecimiento, en el número de raíces laterales y pelos radicales. El papel central del AIA producido por *Azospirillum* en la proliferación del sistema radical, fue directamente demostrado con el uso de una cepa mutante que produce sólo el 10% del AIA comparado con la silvestre, al



observar una reducción sobre el efecto estimulador en el crecimiento vegetal (Dobbelaere et al., 1999).

Se han descrito numerosas vías para la síntesis del AIA (Prinsen et al., 1993; Spaepen et al., 2007). El género *Azospirillum* sintetiza esta hormona vía indol-3-piruvato dependiente del triptófano (Spaepen et al., 2007), siendo la enzima clave la indol-3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*) (Van de Broek et al., 1999). En *A. brasilense* también se ha descrito una vía independiente de triptófano, esta vía es predominante activada cuando no se adiciona triptófano al medio de cultivo (Prinsen et al., 1993), sin embargo no se han identificado las enzimas involucradas en esta vía.

Otro de los papeles que juegan las auxinas, es la de señalización durante la interacción planta-bacteria. Esto ha sido demostrado recientemente por Spaepen et al., (2014), en donde plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *A. brasilense* Sp245 tipo silvestre, inducen cambios en la expresión de genes relacionados a defensa y a la síntesis pared celular, mientras que la inoculación con *A. brasilense* defectuoso en la síntesis del AIA no induce estos cambios en la planta.

Aunque la producción del AIA en *Azospirillum* es la más documentada, la bacteria también presenta la capacidad de producir otros reguladores de crecimiento como giberelinas, citocininas, ácido absísico y etileno a una concentración suficiente para provocar cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas. El efecto de promoción sobre el crecimiento vegetal por *Azospirillum* parece ser parcialmente debido a la producción de giberelinas, como ocurre con otras PGPR (Bottini et al., 2004). En este sentido se ha demostrado la producción de los precursores inmediatos de las giberelinas GA9 y GA19, en *A. lipoferum* (Piccoli y Bottini, 1996).

El ácido absísico (ABA), conocido como una molécula de estrés debido a que se incrementa cuando la planta está en situación de estrés abiótico, también se ha encontrado en este género. Se ha reportado que la inoculación con *A. lipoferum* revierte el efecto de fluoridona que afecta la síntesis del ABA en plántulas de maíz, sugiriendo que esta bacteria puede producir este tipo de hormona (Cohen et al., 2001). Recientemente, se demostró que *A. brasilense*

Sp245 sintetiza ABA en el medio de cultivo y que esta producción se incrementa cuando 100 mM de NaCl es incorporado al medio (Cohen et al., 2007). En este mismo trabajo, la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* Sp245 indujo dos veces la cantidad de ABA en la planta (Cohen et al., 2007). Estos trabajos sugieren que este género mejora el crecimiento vegetal en condiciones de estrés a través de la producción e inducción de la síntesis del ABA.

La mayoría de los microorganismos rizosféricos son capaces de sintetizar citocininas en cultivos. Sin embargo, son escasos los estudios sobre la síntesis de esta molécula en *Azospirillum*. Se han encontrado moléculas parecidas a las citocininas en cultivos de *Azospirillum* (Tien et al., 1979) que estimulan el crecimiento vegetal. Además, en presencia de diferentes fuentes de carbono también sintetizan moléculas semejantes a citocininas (Strzelczyk et al., 1994). Esto abre un nuevo campo de investigación para conocer como estas bacterias pueden producir moléculas tipo citocininas y como estas pueden afectar la arquitectura del sistema radical de las plantas.

El etileno es otra fitohormona que regula varios procesos biológicos. La enzima que sintetiza esta hormona no se ha encontrado en el género *Azospirillum*, sin embargo, se ha observado que pueden producir etileno o sustancias parecidas a éste. Strzelczyk et al., (1994), analizaron la capacidad de este género para producir esta molécula, y encontraron que pueden sintetizar etileno bajo diferentes fuentes de carbono y en presencia de metionina en el medio. En otro estudio, el efecto de la aplicación exógena de etileno a la planta fue similar al efecto de la inoculación, y la aplicación de inhibidores de la actividad o síntesis del etileno bloquea completamente la promoción del crecimiento vegetal inducido por *A. brasilense* (Ribaudó et al., 2006). Si bien, no hay estudios claros sobre la síntesis de etileno en *Azospirillum*, no se descarta que la promoción del crecimiento vegetal también sea por etileno, o incluso la combinación de todas las fitohormonas.

### 2.4.3.3 Inducción de resistencia a patógenos y estrés abiótico

La inducción de resistencia a patógenos fue demostrada cuando plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* presentaron resistencia contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bashan y de-Bashan, 2002). Plantas de *Oryza sativa* cv. *Nipponbare* inoculadas con *Azospirillum* B510 exhiben un incremento en la resistencia en contra del hongo *Magnaporthe oryzae* y de la bacteria *Xanthomonas oryzae*, a través de la activación de un mecanismo de defensa independiente de la señalización por ácido salicílico (Yasuda et al., 2009). Aunque *Azospirillum* no es bien conocido como un agente de biocontrol típico, algunos aislados producen bactericidas que inhiben el crecimiento de varias bacterias (Tapia-Hernández et al., 1990). El ácido fenilacético es una molécula con actividad antibacteriana y antifúngica aislada de un cultivo de *A. brasilense* (Somers et al., 2005). La producción de sideróforos por *Azospirillum* también es un mecanismo de biocontrol que se ha venido estudiando. Bajo condiciones limitadas de hierro, *A. brasilense* tiene la capacidad de producir sideróforos tipo catecol, los cuales tienen actividad antifúngica *in vitro* en contra de *Colletotrichum acutatum* M11, previniendo la antracnosis provocada por este hongo (Tortora et al., 2011).

Además, una gran cantidad de cepas de *Azospirillum* pueden tolerar altos niveles de salinidad como *Azospirillum halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), que tolera el 2% de NaCl cuando son co-cultivadas con *Staphylococcus* sp (Holguín y Bashan, 1996). En otro trabajo se reporta que *Azospirillum lipoferum* JA4::ngfp15 fue capaz de colonizar la raíz de trigo y de reducir los efectos negativos bajo condiciones de 160 mM de NaCl (Bacilio et al., 2004).

*Azospirillum* también favorece el crecimiento de las plantas bajo condiciones de sequía debido a la producción de poliaminas. Moléculas que regulan el crecimiento vegetal, entre ellas, la cadaverina se ha correlacionado con el crecimiento del sistema radical ó por la mitigación del estrés osmótico en algunas especies de plantas. Cassán et al., (2009), demostraron que *A. brasilense* Az39 promueve el crecimiento radical y ayuda a contrarrestar el estrés osmótico en plántulas de arroz, debido en gran parte a la producción de cadaverina.

El género *Azospirillum* posee diversos mecanismos, por los cuales mejora el crecimiento vegetal, el estudio detallado de cada uno de los mecanismos daría una idea clara de cómo estos se interrelacionan para mejorar el crecimiento de las plantas.

## 2.5 Importancia en la agricultura

Debido al incremento en los costos de fertilizantes a base de nitrógeno y la promoción de una agricultura sustentable, en los últimos años, se han desarrollado y ensayado inoculantes comerciales, comúnmente conocidos como biofertilizantes (Helman et al., 2011).

El género *Azospirillum* es una de las bacterias PGPR mejor estudiadas y más usada a escala comercial como biofertilizante. La formulación de concentrados a base de *Azospirillum* se ha investigado, dando como resultado un incremento en el rendimiento de los cultivos (Díaz-Zorita y Fernandez-Canigia., 2009). Se ha reportado que los biofertilizantes que contienen esta rizobacteria incrementan en aproximadamente un 9 % la producción de semillas y en 18% el peso seco de trigo (Veresoglou y Menexes, 2010). Además, incrementan el rendimiento entre un 5 y 30% en maíz, trigo, sorgo, arroz y leguminosas (Dobbelaere et al., 2001; Díaz-zorita et al. 2006; Hungria et al., 2010). De esta manera, la inoculación de cultivos con biofertilizantes puede reducir hasta en un 20 a 50% la aplicación de fertilizantes a base de nitrógeno (Helman et al., 2011). Debido a su uso potencial como biofertilizante, su aplicación en el campo va incrementándose. Tan sólo en 2006, México aplicó inoculantes comerciales aproximadamente a 200 000 ha, mientras que Brasil lo realizó en un millón de ha de cultivo aproximadamente (Helman et al., 2011).

La capacidad de *Azospirillum* para mejorar el crecimiento vegetal se considera que es a través de la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, inducción de resistencia sistémica y a estrés abiótico, lo que hace de esta bacteria uno de los mejores candidatos para el estudio y mejoramiento en la formulación de biofertilizantes en combinación con otros microorganismos. El efecto inducido por *Azospirillum*, da como resultado una disminución en los costos de producción que beneficia directamente al agricultor.

## 2.6 Trigo

El trigo es uno de los cultivos más importantes en todo el mundo y el segundo en importancia en México. La mayoría de los estudios realizados sobre el efecto promotor del crecimiento vegetal de *Azospirillum*, se ha hecho con trigo. Este género mejora el crecimiento y rendimiento de trigo de manera significativa, incrementando el rendimiento de semillas y peso seco, aumento al contenido de nitrógeno y la resistencia a estrés abiótico (Bacilio, 2004; Veresoglou y Menexes, 2010). Se ha reportado que la inoculación de plantas de trigo con *Azospirillum* en condiciones de campo, aumenta significativamente la biomasa aérea, la longitud de la raíz, el número de espigas y granos, un equivalente del 6.5 % de aumento comparadas con las no inoculadas (Díaz-Zorita et al., 2006). La formulación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* se ha realizado y muestra un efecto sobre el rendimiento de este grano, se ha considerado que *Azospirillum* es un buen candidato para mejorar el crecimiento y rendimiento de trigo (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009).

## 2.7 Características de las interacciones planta-bacterias benéficas

Durante los primeros minutos de la interacción entre plantas y microorganismos, un dialogo molecular involucrando varias moléculas señales toma lugar en la rizósfera y en la superficie celular llevando a la interacción física entre los dos organismos. Por ejemplo, en el caso de la interacción *Rhizobia*-leguminosa, los flavonoides de los exudados de la raíz de la planta inducen la síntesis de factores de nodulación en *Rhizobia* (Hagg et al., 2013). Ambas moléculas son las responsables para que se lleve a cabo las primeras etapas de interacción y el establecimiento de un nuevo órgano, el nódulo (Nanda et al., 2010). Durante la interacción, las bacterias inducen varias respuestas en la raíz de la planta: como alcalinización citoplásmica, oscilación del calcio, producción de ERO, cambios en el metabolismo, expresión de genes que llevan a la invasión bacteriana (Cárdenas et al., 2000; 2008). Por consiguiente, la simbiosis induce cambios metabólicos y de desarrollo tanto como para los microorganismos, como para la planta. Estas bacterias afectan

el desarrollo del sistema radical, indicando que el microorganismo altera las vías de desarrollo del hospedante (Desbrosses y Stougaard, 2011).

## **2.8 Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

ERO, es un término usado para describir una variedad de moléculas y radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) derivadas del oxígeno molecular. En su estado biradical, el oxígeno molecular posee dos electrones desapareados en su última orbita teniendo el mismo giro, por lo tanto, sólo puede reaccionar con un electrón a la vez. Si uno de estos electrones es excitado y cambia su giro, las especies resultantes se convierten en un poderoso oxidante (Turrens, 2003). La reducción secuencial del oxígeno a través de la adición de electrones, lleva a la formación de un número de ERO incluyendo al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), ion hidroxilo ( $OH^-$ ) y óxido nítrico (ON). En plantas, estas ERO tienen un papel importante en procesos de crecimiento, desarrollo, señalización y defensa ante diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

### **2.8.1 Anión superóxido**

El proceso de reducción del oxígeno molecular da lugar a una serie de intermediarios: el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), es el primer producto de la reducción de un electrón del oxígeno y precursor de la mayoría de las ERO. La producción de esta molécula se debe a la enzima NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática de las células vegetales. Debido al sitio donde se producen, reacciona con facilidad con componentes de la membrana celular (lípidos) generando daños irreversibles. El tiempo de vida del anión superóxido es de 1  $\mu s$ , posteriormente es transformado a peróxido de hidrógeno. Estas moléculas participan en la proliferación celular y reacciones de defensa (Sarsour et al., 2008; Torres, 2010).

### 2.8.2 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno surge de la dismutación del anión superóxido catalizado por la superóxido dismutasa o de manera espontánea, aunque hay que resaltar que no es la única manera en la que se produce. La xantina oxidasa, amino oxidasa y peroxidasas de la pared celular también pueden producir peróxido de hidrógeno (Corpas et al., 2001; Bolwell et al., 2002).

Bajo condiciones normales, la vida media del  $H_2O_2$  es de aproximadamente 1 ms, a diferencia de las otras ERO (Bhattacharjee, 2005). El exceso de  $H_2O_2$  conduce a un estrés oxidativo que daña la integridad de las células. Por lo tanto, el  $H_2O_2$  puede jugar un doble papel: a bajas concentraciones como moléculas de señalización y a altas desencadena la muerte celular programada (Neill et al., 2008.). Para que el peróxido de hidrógeno actúe como una molécula señal debe de tener una síntesis regulada, una respuesta específica y blancos celulares específicos.

Varios estudios sugieren que el  $H_2O_2$  funciona como una señal móvil, pero aún no se conoce a detalle si esta molécula actúa como una sola señal o es parte de una respuesta sistémica (Neill et al., 2002a). Se ha demostrado que el  $H_2O_2$  participa en varios procesos metabólicos de la planta y activa respuestas de defensa ante diferentes tipos de estrés. Y se ha aceptado como un segundo mensajero debido a que tiene un tiempo de vida prolongado y puede atravesar libremente las membranas (Neill et al., 2008.)

### 2.8.3 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es una molécula altamente tóxica y se genera por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno teniendo una vida media de 1 ns. Debido a que los derivados reactivos de oxígeno son tóxicos, son muy importantes durante las reacciones de defensa en las plantas. Estas moléculas se forman a partir del peróxido de hidrógeno por la reacción de Fenton que requiere metales en transición (Barceló y Ros, 2009). Las peroxidasas de la pared celular también pueden producir radicales hidroxilo a través del peróxido de hidrógeno (Liszkay et al., 2003; Kukavica et al., 2009). Un papel fisiológico

del radical hidroxilo es romper los polímeros de polisacáridos de la pared celular, permitiendo el crecimiento vegetal (Kukavica et al., 2009).

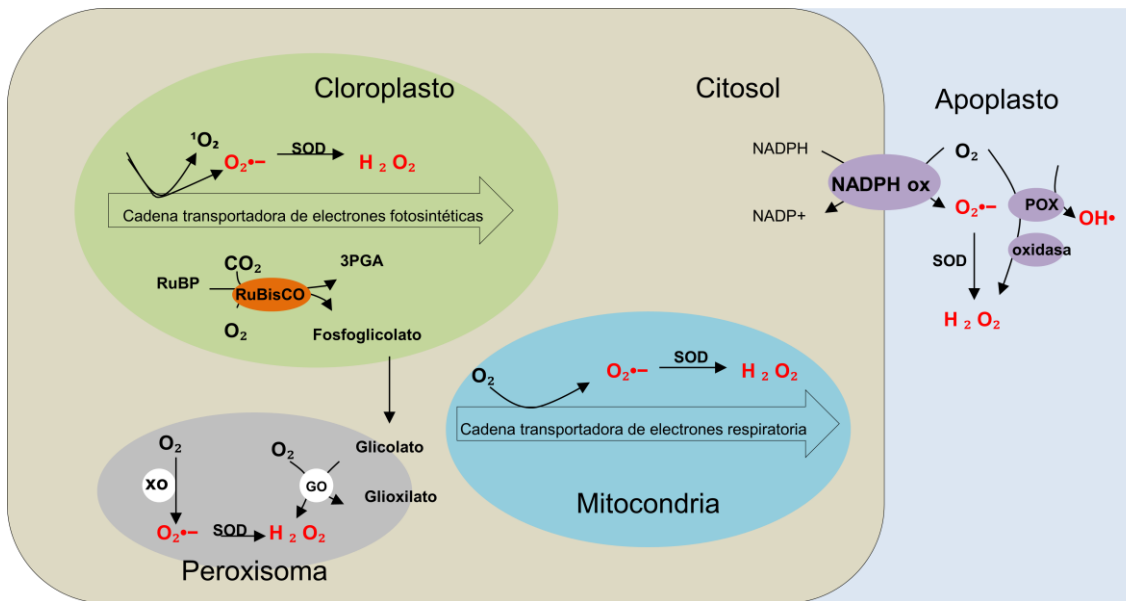
#### **2.8.4 Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es una molécula bioactiva que ejerce diversos papeles en los sistemas biológicos. Fue primeramente descrito en animales como un mensajero en el sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Mur et al., 2012). Esta molécula tiene la característica de ser pequeña, por lo tanto, la convierte en una molécula altamente difusible a través de la membrana y provocar diferentes procesos en períodos de tiempo corto. La función del óxido nítrico en la planta no está del todo dilucidada, sin embargo, se ha mostrado que actúa en la interacción planta-microorganismo, en las respuestas a estrés abiótico, en la regulación de la apertura de estomas y en un amplio rango de procesos biológicos como molécula de señalización (Neill et al., 2002a; 2003; Planchet y Kaiser, 2006; Mur et al., 2012). Así el óxido nítrico es requerido para la organogénesis de la raíz, la formación de raíces adventicias, el desarrollo de raíces laterales y la formación de pelos radicales (Pagnussat et al., 2002; Pagnussat et al., 2003; Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006). Los resultados de la interacción *Azospirillum*-tomate apoyan fuertemente la participación del óxido nítrico en la formación de raíces laterales inducida por esta bacteria (Creus et al., 2005).

#### **2.9 Mecanismos de producción de las ERO en plantas**

Debido a su importancia, la producción de ERO están confinados a sitios específicos de las células. Los organelos con una alta actividad metabólica oxidativa o gran flujo de electrones, tales como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, son las principales fuentes de ERO en plantas, sin descartar al compartimento conocido como apoplasto (Fig. 3).





**Fig.3. Producción de ERO en plantas.** 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. Modificado de Mhamdi et al., 2010.

### 2.9.1 Cloroplastos

El centro de reacción del fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) en tilacoides de cloroplastos son las principales fuentes de ERO. La fotoproducción de ERO es afectada por factores fisiológicos y medioambientales y su velocidad de producción es incrementada bajo condiciones donde la intensidad de fotón es excesiva a la requerida para la asimilación del  $CO_2$  bajo condiciones de estrés hídrico, la baja disponibilidad de  $CO_2$  debido al cierre de estomas y un continuo exceso de luz, que transfiere el electrón directamente al oxígeno molecular generando anión superóxido en el PSI por la reacción de Mehler (Asada, 2006). Este anión superóxido es convertido a  $H_2O_2$  por una superóxido dismutasa de cobre/zinc adherido a la membrana muy cerca del PSI, y una ascorbato-peroxidasa unido a la membrana del tilacoide que convierte al peróxido de hidrógeno en agua, proceso denominado ciclo del agua-agua (Miller et al., 2010).

El singulete de oxígeno es generado por el PSII clorofil triple excitado al centro de reacción del P680 (Asada, 2006). La citotoxicidad del singulete de oxígeno causa peroxidación de lípidos y daños en el tejido en hojas bajo condiciones fotooxidativas que puede llevar directamente a la muerte celular (Miller et al., 2010).

### **2.9.2 Peroxisomas**

Las peroxisomas producen peróxido de hidrógeno y anión superóxido a altas cantidades a través de varios procesos metabólicos. La baja disponibilidad de agua y cierre de estomas disminuye la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en células mesófilas e incrementa la fotorespiración y la producción de glicolatos en cloroplastos (Miller et al., 2010). La oxidación de glicolatos por la glicolato oxidasa en peroxisomas da lugar a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la fotorespiración (Noctor et al., 2002). Una fuente adicional de peróxido de hidrógeno incluye la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, vía la flavin oxidasa y dismutación de anión superóxido. Por su parte el anión superóxido es generado por la xantina oxidasa en la matriz de los peroxisomas de hojas y este a su vez es convertido por la SOD en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Miller et al., 2010)

### **2.9.3 Mitocondria**

La mitocondria es una fuente de producción de ERO, pero generan pequeñas cantidades comparado con los cloroplastos y peroxisomas (Foyer y Noctor, 2005). El complejo I y complejo III en la cadena transportadora de electrones son los principales sitios de producción de ERO. El intermediario ubisemiquinona formado entre el complejo I y III dona electrones al oxígeno y genera ERO (Rhoads et al., 2006). Un incremento de la respiración en la mitocondria durante condiciones de estrés puede contribuir a la generación de ERO al transferir electrones desde el citocromo al sistema transportador de electrones al O<sub>2</sub> (Norman et al., 2004). Por lo tanto, la perturbación de la función de la cadena transportadora de electrones resulta en la sobre-reducción de ubiquinona e incrementa la producción de ERO, sugiriendo que la velocidad

de respiración incrementa bajo condiciones de estrés, por lo tanto la demanda por el ATP mitocondrial incrementa, causando una sobreproducción de ERO en la mitocondria (Miller et al., 2010).

#### 2.9.4 Apoplasto

El apoplasto es un sitio importante para la producción de ERO ante diferentes tipos de estímulos. Además de la producción de ERO en la mitocondria y en los cloroplastos como un subproducto inevitable del metabolismo celular, existen un 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 homólogas de la explosión oxidasa respiratoria (respiratory burst oxidase homologues-RBOH) y son homólogos a la subunidad catalítica (gp91<sup>phox</sup>) de las NOXs del fagocitos animales (Sagi y Fluhr, 2006).

Las *Rboh* constituyen una familia multigénica con 10 genes *AtRboh* en la planta modelo *Arabidopsis*. Todas la proteínas RBOH presentan la misma estructura, con una región C terminal central que contiene los dominios transmembranales y el dominio oxidasa funcional responsable de la generación de anión superóxido. Sin embargo, las RBOHs tienen una región N-terminal, ausente en la oxidasa gp91<sup>phox</sup> del fagocito, pero presente en otras NOXs animales. Esta extensión N terminal contiene regiones regulatorias tales como el brazo EF de unión a calcio y dominios de fosforilación importante para la función de las oxidasas de las plantas (Suzuki et al., 2011).

Las ERO dependientes de RBOHs han sido asociadas con respuestas a estímulos abióticos (calor, frío, estrés hídrico, salinidad y heridas) y bióticos (interacciones planta-patógeno, relaciones simbióticas). Además, las NADPH oxidasas regulan programas de desarrollo como el crecimiento polarizado en la formación de pelos radicales y crecimiento de tubos polínicos (Suzuki et al., 2011).

Estudios de inmunolocalización indican que las proteínas RBOHs se localizan en la membrana plasmática. Por lo tanto, la distribución de las NADPH

oxidasas restringen la producción de especies reactivas de oxígeno para regular el papel de estas moléculas.

## 2.10 ERO en el desarrollo vegetal

Las ERO tienen un papel de señalización durante el desarrollo de la planta y juegan una función importante en regulación del crecimiento a través de varios efectos sobre la elasticidad de la pared celular (Bell et al., 2009). Uno de los papeles más estudiados de las ERO, ha sido su regulación sobre el crecimiento apical de los pelos radicales y los tubos del polen (Swanson y Gilroy, 2010). En este proceso se necesita una señalización coordinada y procesos con la regulación de los componentes de la pared celular para inducir el crecimiento. Para definir el papel de las ERO en este proceso, Foreman et al., (2003), analizaron el crecimiento de mutantes *rhd2* (*root hair defective*) de *Arabidopsis thaliana*. En la mutante *rhd2* de no acumula ERO en la parte apical, se afecta las primeras etapas de la formación de pelos radicales. Lo cual *RHD2* codifica para una NADPH oxidasa (AtrbohC) transmembranal (Foreman et al., 2003) que transfiere electrones al espacio apoplástico, que posteriormente son donados al oxígeno molecular para formar el anión superóxido. Este último puede ser rápidamente dismutado a  $H_2O_2$  que es transformado por peroxidasas o difundir hacia el citosol actuando como una molécula de señalización. El anión superóxido también puede ser transformado a radical hidroxilo por la reacción de Fenton o por las peroxidasas. La AtrbohC se ha localizado en la membrana de las células epidermales de la zona donde se forman los pelos radicales, lo que concuerda con la localización de las ERO (Swanson y Gilroy, 2010). Además, ha sido mostrado que la acumulación de ERO en los pelos radicales oscilan junto con el pH y velocidad del crecimiento (Monshausen et al., 2007). El fenotipo de la mutante *rhd2* se ha observado también cuando las plantas son tratadas con DPI (diphenylene iodonium chloride), un inhibidor de las proteínas que contienen flavina como las NADPH oxidasas (Foreman et al., 2003). Por lo tanto, alteraciones en la producción de ERO juegan un papel importante en el desarrollo de los pelos radicales y la formación de curvaturas

en los pelos radicales durante la interacción *Rhizobium*-leguminosa (Lohar et al., 2007; Cárdenas et al., 2008).

La producción localizada de ERO en los pelos radicales, ocurre al igual que en los tubos polínicos y dicha producción es inhibida por el DPI sugiriendo que las ERO son producidas por NADH oxidasas (Potocký et al., 2007). En conjunto, estas observaciones indican que las ERO tienen una función universal en el crecimiento polarizado de pelos radicales y tubos polínicos.

Por otra parte, las paredes celulares de las plantas son estructuras dinámicas formadas de polisacáridos, fenoles y proteínas. La pared celular no sólo es importante para mantener la forma celular, sino también para responder a señales endógenas y externas (Barceló y Ros, 2009). Además de la producción interna de ERO por cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, las NADPH oxidasas generan anión superóxido en la pared celular y se conoce que una de las funciones de las ERO en este sitio, es modificar los componentes de la pared celular por relajación y entrecruzamiento entre componentes de la pared celular, lo que finalmente controla el crecimiento y morfogénesis de la planta (Schopfer, 2001; Cosgrove, 2005; Swanson y Gilroy, 2010; Liskay et al. 2003). Se ha propuesto que los componentes de la pared celular están sujetos a rupturas no enzimáticas mediadas por radicales hidroxilo, dando como resultado la relajación de la pared celular (Fry, 1998). Los polisacáridos de la pared son fácilmente fragmentado por radicales hidroxilo *in vitro* y pueden ser generados a partir del peróxido de hidrógeno por la reacción de Fenton en la pared celular, proceso que requiere un metal de transición como el  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^{2+}$  (Barceló y Ros, 2009). Los radicales hidroxilos también pueden ser producidos por peroxidasas de la pared celular del anión superóxido y peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Haber-Weiss (Liskay et al., 2003). Así, en células en crecimiento, las NADPH oxidasas generan anión superóxido que posteriormente es dismutado a peróxido de hidrógeno y ambos pueden directa o indirectamente, ser fuentes de radical hidroxilo y promover la relajación de la pared celular.

Además de la relajación de la pared celular por ERO, la formación de redes de extensinas insolubles (proteínas que forman parte de la pared) es un proceso

dependiente de  $H_2O_2$  y mediada por peroxidasas. Estas enzimas catalizan la reducción de  $H_2O_2$  al tomar electrones de varias moléculas donadoras como compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas o metabolitos secundarios (Passardi et al., 2004). Por lo tanto, las ERO, específicamente el peróxido de hidrógeno son importantes para la formación de paredes celulares o diferenciación celular mediada por peroxidasas.

Como se mencionó anteriormente, las ERO también tienen un papel en la regulación del crecimiento en el sistema radical específicamente en la parte apical. La raíz de la mutante *rhd2* es aproximadamente 20% más cortas que la silvestre (Foreman et al., 2003) lo que muestra una alteración general en el crecimiento. Experimentos con inhibidores (DPI), sugieren que el crecimiento de la raíz está bajo el control de las NADPH oxidasas, que producen el anión superóxido y subsecuentemente las otras ERO que regulan la elongación celular (Liszky et al., 2004). La correcta distribución de las especies reactivas de oxígeno en la raíz es importante para un buen crecimiento: donde el peróxido de hidrógeno ha sido localizado en la zonas de diferenciación celular ya que son involucradas en restringir el crecimiento y formación de pelos radicales, a diferencia del anión superóxido que se localiza principalmente en la zona meristemática de la raíz, donde hay una alta proliferación celular (Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2010). Esta distribución es regulada indirectamente por un factor de transcripción UPB1 que regula la expresión de un conjunto de peroxidasas que modulan el balance de las especies reactivas de oxígeno entre las zonas de proliferación y diferenciación celular (Tsukagoshi et al., 2010). La modificación de la distribución de ROS en la raíz, da como resultado cambios en la arquitectura del sistema radical.

### **2.11 Especies reactivas de oxígeno durante la interacción planta-rizobacteria.**

Durante la interacción se lleva a cabo un diálogo molecular entre la planta y el microorganismo, que involucra moléculas señales. Se ha observado que tanto en las interacciones patogénicas como en la simbiótica, ocurre un incremento en la producción de ERO que parece ser una respuesta común en las plantas

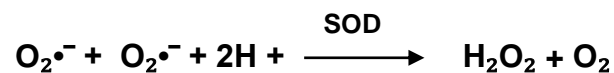
(Nanda et al., 2010). Dentro de las interacciones simbióticas, en el caso particular de *Rhizobium*-leguminosa, las leguminosas secretan flavonoides, que son específicamente reconocidos por un receptor de la bacteria, que a su vez inducen la expresión de genes de nodulación (Nod) que son esenciales para la señalización del desarrollo del nódulo (Haag et al., 2013). La percepción de factores Nod inducen varias respuestas en la raíz, como intercambio de iones, alcalinización citoplásmica, oscilaciones del calcio citosólico y de especies reactivas de oxígeno y expresión de genes que llevan a la invasión bacteriana y formación de nódulos (Cárdenas et al., 2000, 2008, Nanda et al., 2010; Haag et al., 2013). Así, durante las interacciones simbióticas se puede observar la producción de anión superóxido en los hilos de infección (Santos et al., 2001). Esta producción no es observada cuando las plantas de *Medicago truncatula* fueron inoculadas con bacterias incapaces de producir factores Nod (Ramu et al., 2002). En otro trabajo realizado por Cárdenas et al., (2008), observaron un incremento en los niveles de ERO intracelular en los pelos radicales, 15 segundos después de la adición de factores Nod. La producción de las ERO en este caso, es diferente a las inducidas por elicitores de patógenos. Un resultado contradictorio es reportado por Lohar et al., (2007), donde una disminución en la producción de ERO es observada durante la simbiosis y esta reducción de las ERO es la responsable de la deformación de los pelos radicales inducida por factores Nod (Lohar et al., 2007). La diferencia puede ser debido a que estos resultados fueron obtenidos varios minutos después de la adición de factores Nod. En trabajos recientes se ha resaltado la importancia de las enzimas NADPH oxidasas productoras de ERO durante la interacción *Rhizobium*-leguminosa (Montiel et al., 2012). La regulación de las *PvRbohB* por RNA de interferencia en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* redujo la producción de ERO, densidad de raíces laterales y la formación de nódulos (Montiel et al., 2012). Un efecto opuesto resultó en la sobreexpresión de las *PvRbohB*, al observar mayor producción de ERO, formación de hilos de infección, actividad fijadora de nitrógeno, mayor número de nódulos, entre otros (Arthikala et al., 2014). Estos resultados indican que las ERO producidas por las NADPH oxidasas son cruciales para una exitosa colonización rizobial y probablemente del mantenimiento propio del crecimiento y formas de hilos de infección (Montiel et al., 2012).

Por lo tanto, una modificación en la concentración y distribución de las ERO inducida por las rizobacterias puede ser importante para una buena asociación y modificación de la arquitectura del sistema radical del hospedante.

## 2. 12 Sistema enzimático

### 2. 12. 1 Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es la primera línea de defensa ante el estrés oxidativo en todos los microorganismos. La SOD convierte el anión superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y oxígeno.



Por lo tanto, es esencial que estas enzimas estén presentes en compartimentos donde el anión superóxido es formado (Alscher et al., 2002). Las SODs se clasifican en tres grupos basado en el co-factor que utilizan: superóxido dismutasa de hierro (SOD Fe) localizada en cloroplastos, de manganeso (SOD Mn) que se encuentra en mitocondrias y peroxisomas, el de cobre y zinc (SOD Cu-Zn) presente en cloroplasto, citosol y en espacios extracelulares. La razón por la que estas enzimas utilizan diferentes tipos de cofactores, probablemente está relacionada a la diferente disponibilidad de compuestos solubles de metales de transición en la biosfera en diferentes eras geológicas (Bannister et al., 1991).

La SODs Fe constituye el grupo más ancestral, encontrándose tanto en procariontas y eucariontas. En todas las plantas estudiadas su localización es el cloroplasto. Existen dos grupos de SODs Fe: el primero es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 20 kDa, presentes en bacterias y en algunas plantas. El segundo grupo encontrado en plantas superiores y algunas bacterias, es un tetrámero de cuatro subunidades iguales con un peso molecular de 80-90 kDa (Alscher et al., 2002).



La SODs de Mn es tanto una enzima homodimérica como homotetramérica con un átomo de Mn (III) por subunidad. Aunque es conocida como enzima mitocondrial de eucariotas, también se han encontrado en peroxisomas de plantas superiores.

Las SODs de Cu-Zn han sido encontradas principalmente en eucariontas. Sin embargo, también han sido encontradas en algunas bacterias. Existen dos grupos de SOD Cu-Zn: primero consiste de formas citoplásmicas y periplásmicas que son homodiméricas; el segundo comprende las SODs Cu-Zn del cloroplasto y extracelular, que son homotetramérica (Bordo et al., 1994)

Por último, se ha reportado la existencia de una enzima conocida como SOD Fe/Mn que puede acomodar ambos metales. Algunas especies de bacterias pueden usar una SOD común que utiliza los dos metales como cofactor, acorde a la disponibilidad del metal en su medio ambiente (Alscher et al., 2002).

## **2. 12. 2 Catalasas**

Las catalasas son enzimas ubicuas entre los organismos aeróbicos. La típica reacción de la catalasa es la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno (Feierabend, 2005):



El tipo mejor caracterizado de catalasa dependiente del grupo hemo se encuentra en diversos organismos, incluyendo procariontas, hongos, animales y plantas, y es una catalasa mono funcional (Chelikani et al., 2004). Estas enzimas están compuestas de polipéptidos de 50-70 kDa en masa organizadas en tetrámeros, cada monómero con un grupo prostético (Regelsberger et al., 2002).

La localización subcelular de las catalasas es principalmente en peroxisomas. De los dos genes encontrados en levaduras, uno codifica una isoforma citosólica y otra peroxisomal. El único gen encontrado en animales peroxisomal, pero la actividad también se presenta en mitocondrias. En

plantas, estudios de fracción subcelular clásica, así como tinción de actividad *in situ*, han establecido que las peroxisomas tienen una alta actividad catalasa (Mhamdi et al., 2010).

En numerosos estudios de respuesta en plantas ante diferentes tipos de estrés han reportado un incremento en la actividad o expresión del gen. Así, plantas con alta actividad de catalasa son más resistentes a diferentes tipos de estrés (Mhamdi et al., 2010).

Aunque el  $H_2O_2$  es menos reactivo comparado con otras ERO, su acumulación puede ser dañina para las células. El  $H_2O_2$  puede dar lugar a otras ERO como el radical hidroxilo en presencia de metales de transición como el Hierro y cobre, a través de la reacción de Fenton (Feierabend, 2007). Por lo tanto, la simultánea presencia de catalasas y  $H_2O_2$  es crucial para evitar la formación de radicales libres.

### **2. 12.3 Peroxidasas**

Las peroxidasas son proteínas que contienen un grupo hemo, capaces de catalizar la oxidación de una gran variedad de sustratos utilizando  $H_2O_2$ . Todas las enzimas peroxidasas tienen la misma estructura general, que consiste de ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y diez  $\alpha$ -hélice. Las peroxidasas clase III poseen tres  $\alpha$ -hélices extras (Passardi et al., 2004a), y son clasificadas basándose en su estructura particular (Welinder, 1992). Las peroxidasas clase I, como las ascorbato peroxidasas, glutatión peroxidasas, citocromo peroxidasas y catalasa peroxidasas, son proteínas intracelulares presentes en procariontas y eucariontas. La clase II es codificada exclusivamente por hongos, y se dividen en manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas y peroxidasas versátiles que pueden ser secretadas y presenta una función principal en la degradación de lignina (Passardi et al., 2004b).

Por último, las clase III están codificadas por familias multigénicas con 138 genes en *Oryza zativa* (Passardi et al., 2004b), 73 en *A. thaliana* (Tognolli et al., 2002), 113 en trigo (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), presentes solamente en plantas y son secretadas en el apoplasto. En un ciclo peroxidativo estándar, las enzimas catalizan la reducción del  $H_2O_2$  al tomar electrones de varias

moléculas donadoras como compuestos fenólicos, precursores de lignina, metabolitos secundarios o auxinas. En otro caso en el ciclo hidroxílico, las peroxidasas nativas pueden ser convertidos a oxiferropoxidasas (también conocido como compuesto III) en dos diferentes vías, que pueden llevar a la formación de varias especies reactivas de oxígeno. Las peroxidasas por lo tanto pueden ser consideradas como enzimas bifuncionales que pueden oxidar varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también producir ERO (Passardi et al., 2004ab).

Por lo tanto, debido a su complejidad las peroxidasas clase III pueden ser detectadas en todo el ciclo de vida de las plantas (Passardi et al., 2004) involucrándose en un amplio rango de procesos fisiológicos. Por ejemplo, en el metabolismo de la pared celular, en el catabolismo de auxinas, en la síntesis de fitoalexinas, en la eliminación de  $H_2O_2$ , en la oxidación de reductantes tóxicos, en la defensa contra ataques de patógenos, en la simbiosis y en el crecimiento normal de las células (Cosio y Dunand, 2009).

Se ha mostrado que expresión y actividad de las peroxidasas son inducidas por diferentes tipos de estrés bióticos (hongos, bacterias) y abióticos. Estas enzimas pueden crear barreras físicas para limitar la invasión del patógeno al tejido hospedante al catalizar el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular en respuesta a diferentes estímulos. Así en muchos casos, la rigidez de la pared celular, es el resultado del entrecruzamiento de los componentes de la pared celular dependiente de  $H_2O_2$  y mediado por peroxidasas (Almagro et al., 2009).

Mittler et al., (1999), usando plantas transgénicas de tabaco deficientes en peroxidasas/catalasa, mostraron que estas fueron hipersensibles a ataques de patógenos, proporcionando la evidencia de que las peroxidasas son componentes importantes durante el ataque de patógeno.

### 2.13 Sistema no enzimático

Los antioxidantes no enzimáticos son de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, glutatión, carotenoides y tocoferol.

El ácido ascórbico está presente en todos los tejidos de la planta, usualmente alto en células fotosintéticas y en el meristemo de la raíz. En plantas, la mitocondria juega un papel importante en el metabolismo de este compuesto. El ácido ascórbico es considerado como el antioxidante más importante debido a su habilidad para donar electrones en un gran número de reacciones enzimáticas y no enzimáticas y puede proteger directamente a la membrana al eliminar al anión superóxido, al radical hidroxilo y generar  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical tocoferoxil (Gill y Tuteja, 2010).

El glutatión es uno de los metabolitos de la planta más importante para la defensa contra las ERO. Se encuentra mayormente en forma reducida en los tejidos vegetales y se localiza en todos los compartimentos como el citosol, retículo endoplásmico, vacuola, mitocondria, cloroplastos, peroxisomas y apoplasto (Smirnoff, 2005). Está bien establecido que el glutatión juega un papel importante en procesos relacionados al crecimiento, desarrollo, transducción de señales y en la expresión de genes relacionados a estrés. Además, el glutatión juega un papel importante en el sistema de defensa antioxidativa al generar otros antioxidantes solubles en agua como el caso del ácido ascórbico (Foyer, 1976). La importancia del glutatión en sistemas antioxidantes se debe a que proporciona una base como marcador de estrés y una fuerte evidencia ha indicado que una alta concentración de glutatión es correlacionado con la habilidad de las plantas para reducir el daño provocado por estrés oxidativo inducido a la vez por metales (Gill y Tuteja, 2010).

Como un osmolito, la prolina es ahora considerada como un antioxidante, e inhibe la muerte celular programada. La prolina puede considerarse como un antioxidante no enzimático que las plantas necesitan para vencer los efectos de las ERO. La capacidad del sorbitol, manitol, mio-inositol y prolina para eliminar al radical hidroxilo se ha probado y se ha determinado que la prolina elimina efectivamente a este radical. Por lo tanto, la prolina no sólo es una molécula de señalización, sino también un barredor efectivo de las ERO que se sintetiza

durante diferentes condiciones de estrés en todas las plantas (Gill y Tuteja, 2010).

El tocoferol, un lípido soluble, también es considerado un eliminador de ERO y lípidos radicales. Es conocido como antioxidante en biomembranas, donde juegan un papel de antioxidante y no antioxidante. Los tocoferoles son localizados en la membrana de los tilacoides del cloroplasto de las plantas; de los cuatro isómeros de tocoferoles en plantas, el  $\alpha$ -tocoferol tiene una alta actividad antioxidante debido a la presencia de tres grupos metilo en su estructura molecular (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

En todos los organismos fotosintéticos, los carotenoides  $\beta$ -caroteno y zeaxantina sirven para proteger a las células tanto por disipar el exceso de excitación de energía y eliminar ERO. Los carotenoides son pigmentos encontrados en plantas y microorganismos ejerciendo una multitud de funciones, desde el metabolismo de la planta hasta la tolerancia a estrés oxidativo (Gill y Tuteja, 2010).

Por último, los flavonoides presentes ampliamente en todo el reino vegetal también poseen la capacidad de ser antioxidante. La habilidad de actuar como antioxidante depende del potencial de reducción de sus radicales; los flavonoides y otros compuestos fenólicos absorben la luz UV y las plantas que tienen la capacidad de sintetizar estos compuestos, son más resistentes a la radiación UV (Clé, et al., 2008). Se ha reportado que muchos genes relacionados a la síntesis de flavonoides son inducidos bajo condiciones de estrés biótico y abiótico como herida, sequía y escasez de nutrientes (Winkel-Shirley, 2002).

Así, existen diversas moléculas no enzimáticas que regulan de diferente manera los niveles de las ERO para un buen funcionamiento celular.

## **2.14 Calcio en el desarrollo de plantas**

A través de su ciclo de vida, las plantas continuamente responden a diversas señales alterando su fisiología, morfología y desarrollo. Por consiguiente la integración de varias de señales es crucial para determinar la respuesta final. La capacidad de las plantas para dar una respuesta, refleja la presencia de un

sistema complejo para reconocer la señal y transducirla en células vivas (Taiz y Zeiger, 2003). Dos de los elementos principales en la ruta de transducción de señales de las células, son las ERO y el calcio (Steinhorst y Kudla, 2013).

El calcio representa uno de los iones más versátiles y esenciales para las plantas. Está involucrado en casi todos los aspectos de desarrollo (White y Broadley, 2003). En plantas, los incrementos en calcio citosólico inducido por diferentes estímulos es percibido y transducido por efectores específicos que involucran proteínas de unión a calcio y proteína cinasas que inician los eventos río abajo que llevan a cambios en la expresión de genes, en el metabolismo, la división y elongación celular (Lanteri et al., 2006). Dichas proteínas son conocidas como sensores, por descifrar las concentraciones del calcio específicos de algún estímulo (Kudla, 2012). Las calmodulinas, proteínas parecidas a calmodulinas y proteína cinasas dependientes de calcio forman redes de señalización para transducir las concentraciones de calcio en respuestas río abajo (Kudla, 2012).

Uno de los sistemas donde se puede apreciar la participación del calcio en el desarrollo, son los tubos polínicos y pelos radicales. En los tubos polínicos, el calcio se localiza en el ápice y el gradiente de calcio oscila y corresponde al del crecimiento, sugiriendo que algunos canales de calcio están involucrados en el mantenimiento de los gradientes de calcio (Dutta y Robinson, 2004). La participación del calcio en la formación de pelos radicales también se ha confirmado (Foreman et al., 2003). Al igual que el polen, los pelos radicales exhiben gradientes de calcio presentes en el ápice (Monshausen et al., 2008). Además, la oscilación del calcio es seguida por una oscilación de especies reactivas de oxígeno producido por las NADPH oxidasas (Monshausen et al., 2007, 2008). Las NADPH oxidasas (RBOHC) se han localizado en la membrana plasmática del ápice de los pelos radicales y son requeridos para un apropiado crecimiento (Takeda et al., 2008). Las NADPH oxidasas poseen un dominio de unión a calcio y sitios de fosforilación que parecen ser blancos de proteínas cinasas dependientes de calcio (Takeda et al., 2008). Consiguientemente, el calcio es un componente importante para mantener el crecimiento polarizado de los pelos radicales y tubos polínicos. En otros trabajos se ha observado el papel del calcio en la formación de raíces laterales.

Las plantas de trigo tratadas con cloruro de lantano poseen menor formación de raíces laterales (Zhi-xia et al., 2006; Huabo et al., 2013). Además, la formación de raíces adventicias en explantes de pepino inducida por auxinas y óxido nítrico, dependen en gran parte de la disponibilidad intra y extracelular del calcio (Lanteri et al., 2006).

### **2.15 Calcio durante la simbiosis**

El establecimiento de la interacción planta-rizobacteria involucra procesos de reconocimiento y señalización donde participa el calcio. Durante la interacción de leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno, la planta desarrolla una única estructura llamada, nódulo. Después de reconocimiento de factores Nod, ocurre una oscilación en la concentración del calcio en el nucleoplasma que a su vez induce la expresión de genes específicos conocidos como nodulinas (Oldroyd y Downie, 2008; Capoen et al., 2011). Para decodificar la oscilación del calcio, la planta posee proteínas con capacidad de unirse al calcio, localizados en el citoplasma y nucleoplasma (Capoen et al., 2011).

El calcio también es importante en la simbiosis de leguminosas con hongo micorrízicos. La incubación con micorrizas, inducen la oscilación del calcio citosólico, en pelos radicales de leguminosas. La oscilación del calcio no se observa en la mutante de *M. truncatula dmi1* y *dmi2*, sugiriendo que la infección por *rhizobium* y micorriza involucra componentes de señalización común. A pesar de la semejanza, la oscilación del calcio inducido por micorrizas exhiben un corto periodo y pequeñas amplitudes comparado con la respuesta a factores Nod (Kosuta et al., 2008). Esto implica que la señalización del calcio es una característica común dentro de las interacciones planta-bacteria, teniendo un papel importante para una buena asociación y desarrollo de la planta.

### III. JUSTIFICACION

La producción y distribución de las especies reactivas de oxígeno en el sistema radical, son de gran importancia para una buena asociación entre planta y microorganismo. *A. brasilense* Sp245 es capaz de promover el crecimiento de varias plantas de importancia económica como el trigo. El estudio de la producción de las ERO en la planta durante la interacción con esta rizobacteria es importante para conocer el mecanismo molecular de la asociación.



#### **IV. HIPOTESIS**

Los cambios en la morfología de la raíz inducidos por *A. brasilense* Sp245, están asociados con en los niveles del anión superóxido.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- ❖ Estudiar la producción del anión superóxido y la actividad de enzimas antioxidantes en la raíz de trigo inoculadas con *A. brasilense* Sp245.

#### 5.1.1 Objetivos particulares

- ❖ Analizar el efecto de *A. brasilense* sobre la longitud y número de raíces laterales en la raíz de trigo.
- ❖ Determinar la producción de anión superóxido en la raíz de trigo durante la interacción con *A. brasilense*.
- ❖ Evaluar la actividad de las superóxido dismutasas y peroxidasas del sistema radical de plántulas de trigo durante la interacción con *A. brasilense*.
- ❖ Analizar el papel del calcio sobre la morfología de la raíz, producción de anión superóxido y actividad antioxidativa durante la interacción a través de inhibir los canales de calcio.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Material biológico**

La bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 fue donada por la D.C Gladys Alexandre de la Universidad de Tennessee USA.

Las semillas de trigo variedad NANA fueron donadas por el D.C. Mario Gonzales del INIFAP Celaya, Guanajuato.

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

El cultivo de *A. brasilense* Sp245 se mantuvo en medio LB mínimo estéril (Peptona, 10g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 5 g/l; MgSO<sub>4</sub>, 0.186 g/l; CaCl<sub>2</sub>, 0.2775 g/l; Agar, 15 g/l), suplementado con Tetraciclina a una concentración de 10 µg/ml. Se resembro la bacteria cada tercer día en medio LB mínimo solido 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 LB mínimo liquido 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 (28°C)). En cuanto al inóculo, se partió con 50 ml de medio LB mínimo al que se adicionó 150 µl del preinóculo con una densidad óptica de 0.900 a 600 nm. Se mantuvo en las mismas condiciones que el preinóculo pero con 20 horas de incubación.

### **6.4 Proceso de lavado de bacterias**

Para lavar las bacterias, se centrifugó 1 ml del inóculo (OD<sub>600 nm</sub>: 0.900) a 12 000 rpm por 3 min. Se resuspendió en 1 ml de buffer de fosfatos estéril (0.39 gr de fosfato de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.80 gr de NaCl/para 1 litro sin ajustar pH), se agitó en vortex y se centrifugó como se menciona anteriormente. Se repite 2 veces el proceso y por último se resuspende en un volumen final de 1 ml de buffer. Para infectar a las plantas con 1x10<sup>6</sup> UFC se tomó 40 µl de este inóculo ya lavado. Para las concentraciones 1x10<sup>8</sup> y 2x10<sup>8</sup> se tomó 1 y 2 ml del inóculo

respectivamente, se lavaron y se concentraron en un volumen final de 100  $\mu$ l de buffer de fosfatos.

### **6.5 Desinfección y germinación de semillas de trigo**

Las semillas fueron seleccionadas para homogenizar el tamaño. Se trataron con una solución de SDS al 1% por 3 minutos en agitación. Posteriormente se sumergieron en una solución de cloro al 1% durante 5 minutos. Entre tratamientos y al final se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril hasta quitar el olor del cloro. Las semillas desinfectadas se colocaron en papel filtro y algodón húmedo (20 ml de agua destilada estéril) contenidos en cajas de petri (15 semillas por caja). Las cajas fueron incubadas en oscuridad durante 3 días a 26 °C.

### **6.6 Proceso de infección de plántulas de trigo con *A. brasilense***

Las semillas germinadas durante 3 días se trasladaron a tubos de ensayo conteniendo 4 ml de medio Murashige y Skoog (MS). Después se inocularon con  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$ , y  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *A. brasilense* previamente lavadas con buffer de fosfatos. Como control se usó el mismo volumen de buffer de fosfatos para inocular a las plantas. Se incubaron en una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 2 000 Lux, 26°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad durante el tiempo necesario dependiendo del experimento.

### **6.7 Análisis del efecto de *A. brasilense* sobre la raíz de trigo**

Las plántulas de trigo fueron infectadas con *A. brasilense* y se incubaron en una cámara de crecimiento por 4 días. Los parámetros analizados fueron longitud de la raíz, número de raíces laterales y de pelos radicales. Las plantas fueron teñidas durante 2 horas con una solución de cristal violeta (0.075% en 70% de etanol) y lavadas tres veces con agua para facilitar la observación de los pelos radicales.

### **6.8 Tinción de raíz con DAPI**

La raíz de trigo fue fijada con una solución de paraformaldehído 4%, luego se lavaron tres veces con buffer de fosfato de potasio 50 mM pH: 7. Se tiñó el núcleo con 1 µg/ml de DAPI por 30 minutos a 30 °C, seguido de tres lavados con buffer de fosfatos. Para el análisis, se montó el tejido en portaobjetos con glicerol al 50% y se analizó en microscopia de fluorescencia (Leica DM3000 con cámara de DFC310FX) para registrar las raíces teñidas en fotografías.

### **6.9 Clareo de raíz**

Las raíces fueron clareadas de acuerdo a Malamy y Benfey, 1997. La raíz fue sumergida en una solución de 0.24 N HCl en 20% metanol e incubada a 62°C por 1 h. Esta solución fue reemplazada con 7% NaOH, en 60% etanol por 30 minutos a temperatura ambiente. Las raíces fueron luego rehidratadas por 5 minutos con etanol al 40%, 20% y 10% para cada caso. Las raíces fueron montadas en porta objetos con glicerol al 50%. El análisis fue realizado con un microscopio.

### **6.10 Análisis de la producción de anión superóxido**

Para detectar la producción de anión superóxido en las plántulas de trigo, se sumergió la raíz completa en una solución de Nitroazul de Tetrazolio (NBT) al 0.1% disuelto en buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH: 7.5, por 15 minutos. Posteriormente se mantuvo en agua a 4°C y se observaron con un estereoscopio 25 x (Leica MZ6).

La cuantificación de anión superóxido se realizó de manera indirecta, cuantificando el azul de formazán formado por la reducción del NBT por el anión superóxido (Ramel et al., 2009). Se cortó 2 cm de la parte apical de la raíz y se molió con nitrógeno líquido, el contenido de Azul de formazán de la muestra se solubilizó en 1 ml de la solución: 2 M KOH-Dimetyl Sulfoxide (DMSO) (1:1.16, v/v) y posteriormente se centrifuga por 10 minutos a 12 000 g. Se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbencia por espectrofotometría a 630 nm (se cuantifica el azul de formazán formado en presencia de anión superóxido). Las concentraciones se obtuvieron a partir de una curva estándar

previamente realizada con concentraciones conocidas de NBT disuelto en KOH-DMSO como se indica en el apéndice.

### **6.11 Preparación de la muestra para determinar la actividad de SOD y peroxidasas**

Se cortó todo el sistema radical para analizar la actividad de enzimas totales. Para el análisis de las secciones se cortaron 5 mm del ápice de la raíz y los siguientes 5 mm que corresponde a la zona de diferenciación. Posteriormente, se pesaron para homogenizar la muestra y se molieron con nitrógeno líquido. La muestra se mantuvo en 200 µl de buffer de fosfato de potasio 50 mM a 4 °C. Se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm para recuperar el sobrenadante. En seguida, se cuantificó la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford. La actividad de la SODs se detectó por espectrofotometría mediante la inhibición de la reducción del NBT, se ocuparon 50 µg de proteína. También se analizó la actividad de la SOD en geles de poliacrilamida al 10%, cargando 60 µg de proteínas totales. La actividad de las peroxidasas se realizó con geles de poliacrilamida a la misma concentración cargando 50 µg de proteína. El procedimiento completo correspondiente a estos experimentos se encuentra en el apéndice.

### **6. 12 Efecto del ácido indol acético (AIA) sobre la raíz de trigo**

Las plantas en tubos de ensaye fueron inoculadas con 1 µM de AIA (disuelto en DMSO). Se incubaron a las condiciones mencionadas arriba por 24 y 96 horas. Posteriormente se analizó la longitud de la raíz, el número de raíces laterales, concentración de anión superóxido, actividad de SODs y peroxidasas.

### **6.13 Efecto del cloruro de lantano (LaCl<sub>3</sub>) sobre el crecimiento de *A. brasilense* Sp245**

Se analizó en efecto del cloruro de lantano sobre el crecimiento de *A. brasilense*. El inóculo (25 ml) fue crecido durante 24 horas en las condiciones antes mencionadas, en presencia de 10 µM de cloruro de lantano (LaCl<sub>3</sub>: disuelto en agua destilada estéril). Como control para el tratamiento de LaCl<sub>3</sub>

se usó 25  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se registró el crecimiento de la bacteria cuantificando la densidad óptica a 600 nm (espectrofotómetro: Beckman DU 530).

#### **6.14 Efecto del cloruro de lantano ( $\text{LaCl}_3$ ) sobre el crecimiento de trigo**

Las plántulas de 3 días de germinación se pasaron a tubos de ensaye con 4 ml de medio MS y 10  $\mu$ M de cloruro de lantano para inhibir los canales de calcio. Para analizar el papel del calcio durante la interacción con la bacteria, las plantas fueron inoculadas con *A. brasilense* en presencia de  $\text{LaCl}_3$ . Se incubaron durante 24 y 96 h en la cámara de crecimiento. Posteriormente se analizó, longitud de la raíz, número de raíces laterales, producción de anión superóxido, la actividad de las SODs y Prxs.

#### **6.15 Análisis estadístico**

Para ver diferencias entre el tratamiento y el control se utilizó el programa *statistic*. El análisis se hizo con la prueba de *Tukey* con una  $\alpha = 0.05$ .

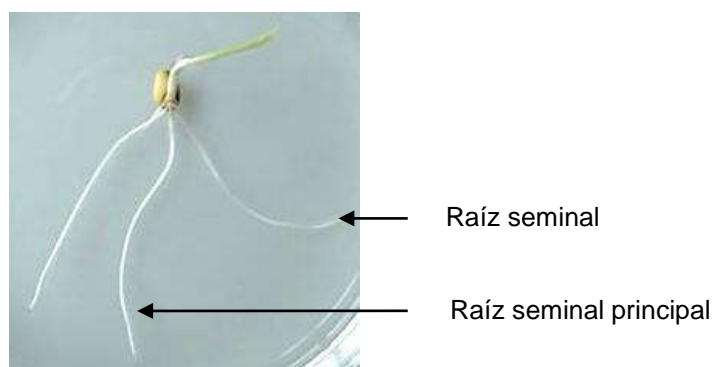
## VII. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de *A. brasilense* sobre el sistema radical de trigo

Como parte del establecimiento del sistema, se analizó el efecto de *A. brasilense* sobre la arquitectura de la raíz de trigo. Para ello se germinaron semillas de trigo en camas de algodón húmedo durante 3 días, posteriormente se sembraron en tubos de ensaye conteniendo 4 ml de medio MS y las plantas fueron infectadas con  $1 \times 10^6$  ufc de esta bacteria. Cuatro días después se analizó la longitud la raíz seminal principal, el número de raíces laterales y la formación de pelos radicales, la longitud y número de células en el meristemo de la raíz seminal principal.

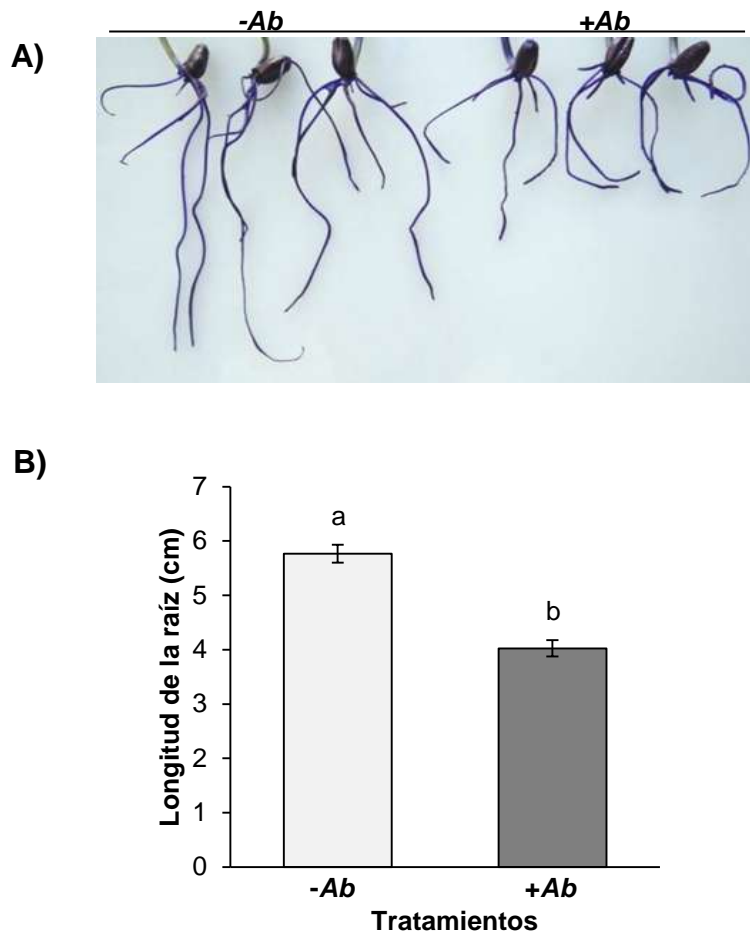
El sistema radical del trigo es de tipo fasciculada donde no existe una raíz principal, típica de las gramíneas. Durante la germinación emergen las primeras raíces conocidas como raíces seminales, que a su vez se dividen en seminal y seminal principal. Por lo antes mencionado, el análisis de la longitud del sistema radical se realizó con la raíz seminal principal (Fig. 4).

Las plantas inoculadas con *A. brasilense* presentaron una longitud del sistema radical más corta que las control con un promedio de 5.7 y 4 cm respectivamente (Fig. 5 A, B). Este mismo resultado había sido reportado por Spaepen et al., (2008), donde plántulas de trigo infectadas con diferentes concentraciones de la bacteria reducen la longitud de la raíz de plantas de trigo e inducen la formación de pelos radicales.



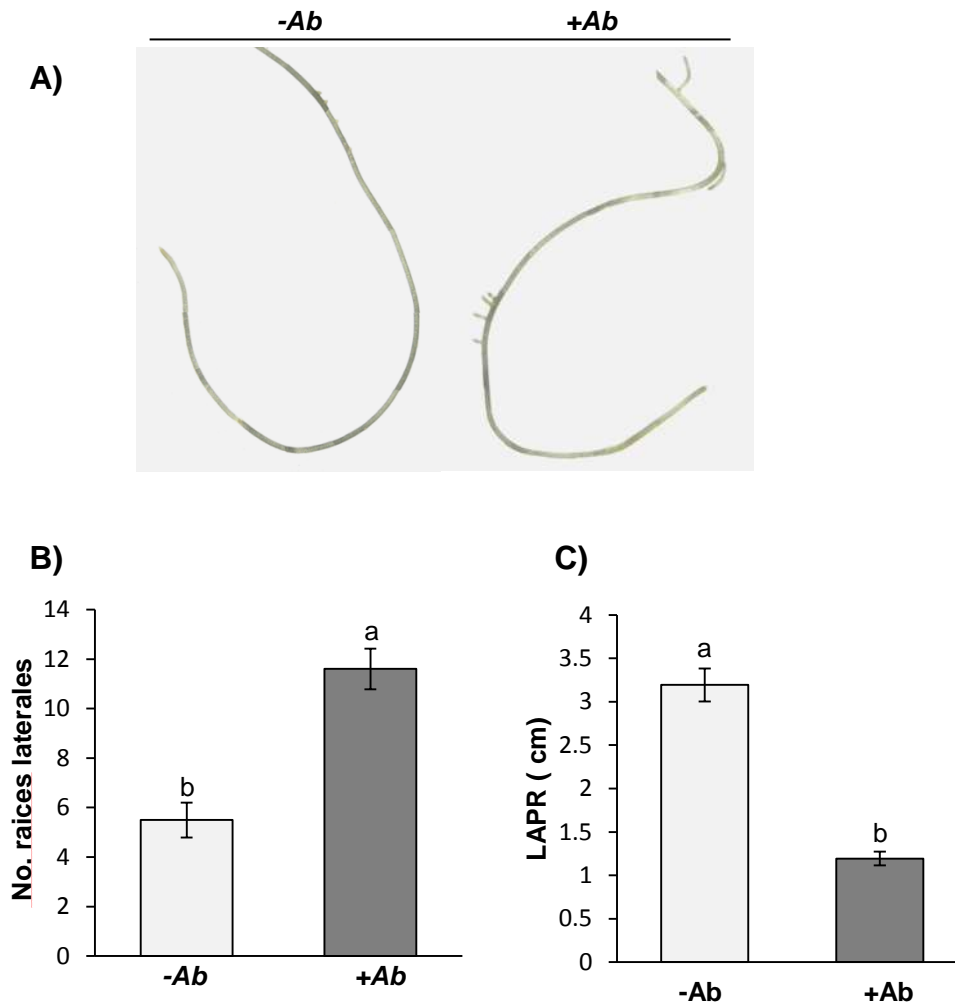
**Fig. 4. Sistema radical de trigo.** Planta de trigo con tres días de germinación





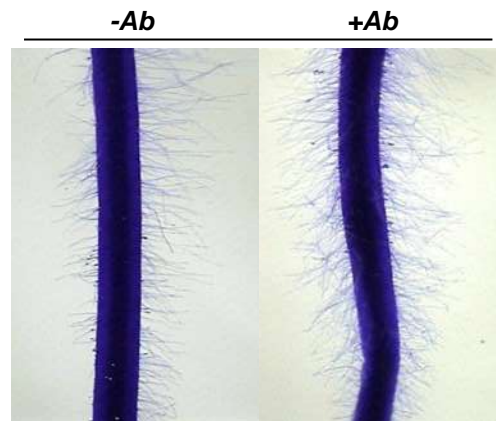
**Fig. 5. Longitud de la raíz seminal principal de trigo.** **A.** Imágenes representativas del sistema radical de plántulas de trigo de 4 días después de la inoculación. **B.** Medición de la longitud de la raíz. -Ab: sin inocular. +Ab: inoculado con  $1 \times 10^6$  ufc de *A. brasilense*. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.  $n=30$  plantas.

El conteo de número de raíces laterales mostró un incremento en la formación de raíces laterales en plantas inoculadas con *Azospirillum*. Además, la formación de la raíz lateral se localizó más cercanamente al ápice de la raíz y a lo largo de toda la raíz en plantas inoculadas (1.4 cm aprox). Mientras que las plantas control mostraron un número menor de raíces laterales, más pequeñas y más alejadas del ápice (3.2 cm aprox) (Fig. 6).



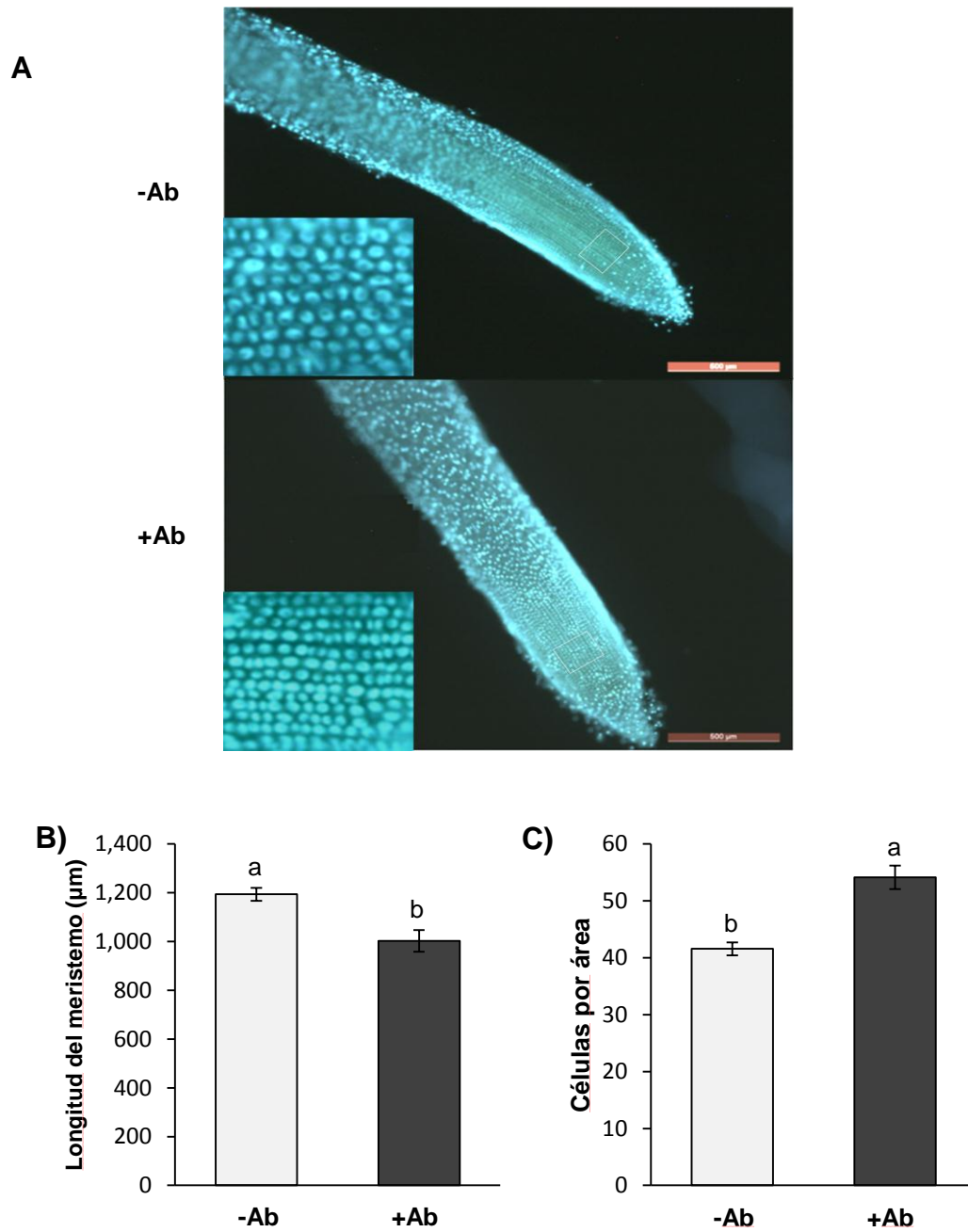
**Fig. 6. Formación de raíces laterales.** **A.** Imágenes representativas de la formación de raíces laterales de plántulas de 4 días después de la inoculación. **B.** Numero de raíces laterales. n=20 plantas. **C:** Longitud entre el ápice y la primera raíz formada (LAPR). n=15. -Ab: sin inocular. +Ab: inoculado con  $1 \times 10^6$  ufc de *A. brasilense*. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a *Tukey*  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.

Las plantas inoculadas con *Azospirillum* también incrementaron la formación de pelos radicales fenómeno que ocurre en la mayoría de los reportes donde se trabaja con esta bacteria. Sin embargo, no se evaluó el número de pelos radicales formados debido a la gran cantidad formada como se puede observar en la figura 7.



**Fig. 7. Formación de pelos radicales.** Imagen representativa de la formación de pelos radicales 4 días después de la inoculación. –Ab: sin inocular. +Ab: inoculado con  $1 \times 10^6$  ufc de *A. brasilense*. n=20.

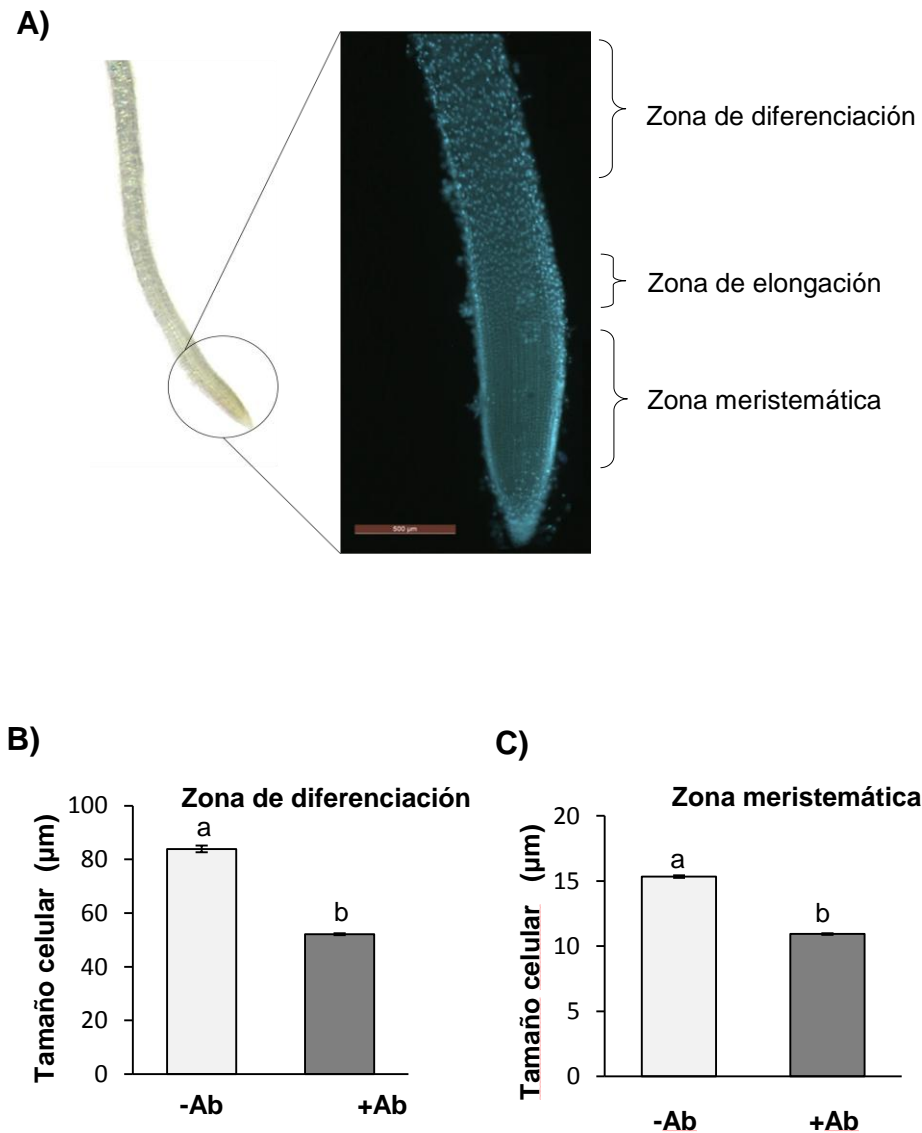
Debido a que *Azospirillum* reduce la longitud del sistema radical de trigo, decidimos analizar más a detalle cual sería el efecto sobre el meristemo de la raíz seminal principal de estas plántulas, debido a que e menor división celular reduce el crecimiento de la raíz. Para ello, raíces de trigo de 4 días de infección fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 24 horas y después se tiñeron con DAPI, que tiñe el material genético de las células. Las plantas tratadas con esta bacteria muestran un meristemo más corto que las control, además, se puede apreciar un incremento en el número de células en esta zona. Por último, también se puede observar una reducción en el tamaño del núcleo y probablemente en el tamaño de las células dando como resultado un mayor número de células por área (Fig. 8. A, B y C).



**Fig. 8. Efecto de *A. brasilense* sobre la zona meristemática de la raíz.** **A.** Imágenes representativas de la zona meristemática y en el recuadro el número de células en raíz de trigo. **B.** Longitud del meristemo de la raíz. **C.** Conteo de células en un área determinada. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a *Tukey*  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.  $n=8$  y  $7$  respectivamente. Barra =  $500 \mu\text{M}$ .

Como otra manera de reducir el crecimiento de un órgano vegetal es disminuir el tamaño de la célula, se aclaró la raíz de acuerdo a Malamy y Benfey (1997), y se analizó el tamaño celular en la zona meristemática y en la zona de

diferenciación. El tamaño de las células en ambas zonas de las plantas inoculadas fue menor comparada con las del control. Los resultados hasta aquí, sugieren que *Azospirillum* afecta el sistema radical reduciendo el tamaño celular de la raíz (Fig. 9).



**Fig. 9. Efecto de *A. brasilense* sobre el tamaño celular de la raíz. A.** Imagen representativa la zona meristemática y de diferenciación de la raíz de trigo. **B.** Tamaño celular de la zona de diferenciación. **C.** Tamaño celular de la zona meristemática. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a *Tukey*  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.  $n=5$  y  $6$  raíces con  $100$  células para cada caso respectivamente. Barra =  $500 \mu\text{M}$ .

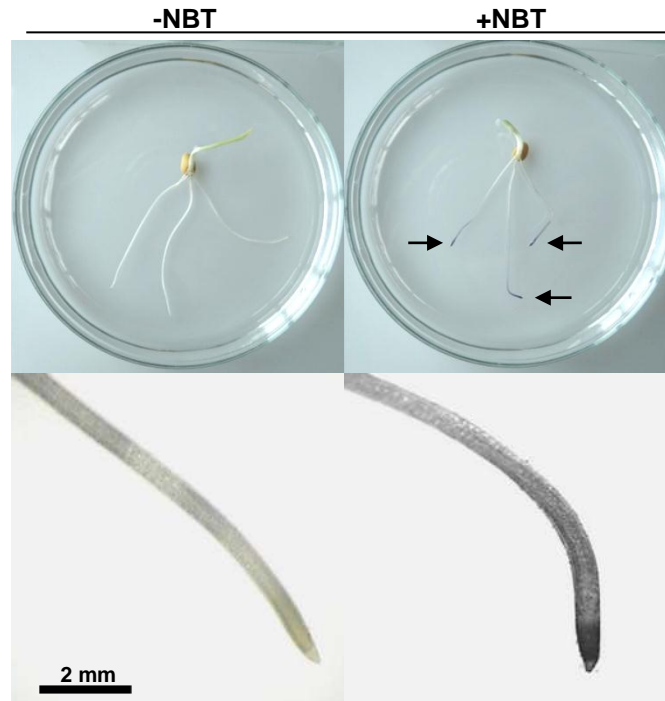
## 7.2 Producción de anión superóxido

Una gran cantidad de estudios han reportado el efecto de *Azospirillum* sobre la arquitectura de la raíz de varias plantas de importancia económica, como se puede confirmar en este trabajo. Por lo tanto, esta bacteria afecta varios procesos de la raíz, como cambios en la expresión de genes, rutas metabólicas y rutas de señalización que están involucradas en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

Las ERO son moléculas involucradas en el crecimiento y desarrollo normal de las plantas y recientemente se ha demostrado la importancia de la distribución de estas moléculas sobre el crecimiento de la raíz. Al observarse que el anión superóxido se localiza principalmente en la zona de división y elongación celular, mientras que el peróxido de hidrógeno es encontrado en la zona de diferenciación (Dunand et al., 2007).

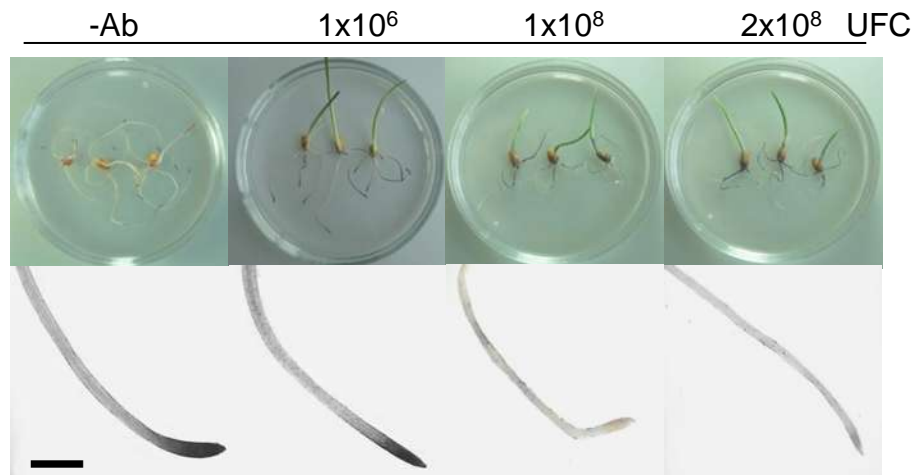
Debido a que en este estudio se observó que *Azospirillum* afecta la arquitectura de la raíz, se decidió analizar del anión superóxido en la raíz de estas plantas durante la interacción con *Azospirillum*.

Primeramente, se localiza el sitio de producción del anión superóxido en la raíz de trigo. Las plántulas de tres días de germinación fueron teñidas con NBT, un compuesto que es reducido a azul de formazán al reaccionar con anión superóxido. En la figura 10, se puede observar que la producción de estas moléculas se localiza principalmente en la parte apical del sistema radical, lo que concuerda con la zona de división y elongación celular reportada para *Arabidopsis thaliana* (Dunand et al., 2007).



**Fig. 10. Distribución del anión superóxido en la raíz de trigo.** Plántulas de trigo de 3 días de germinación fueron teñidas con NBT (Nitroazul de Tetrazolio) durante 15 minutos. La coloración azul representa la tinción con NBT. Las flechas indican la parte apical de la raíz.

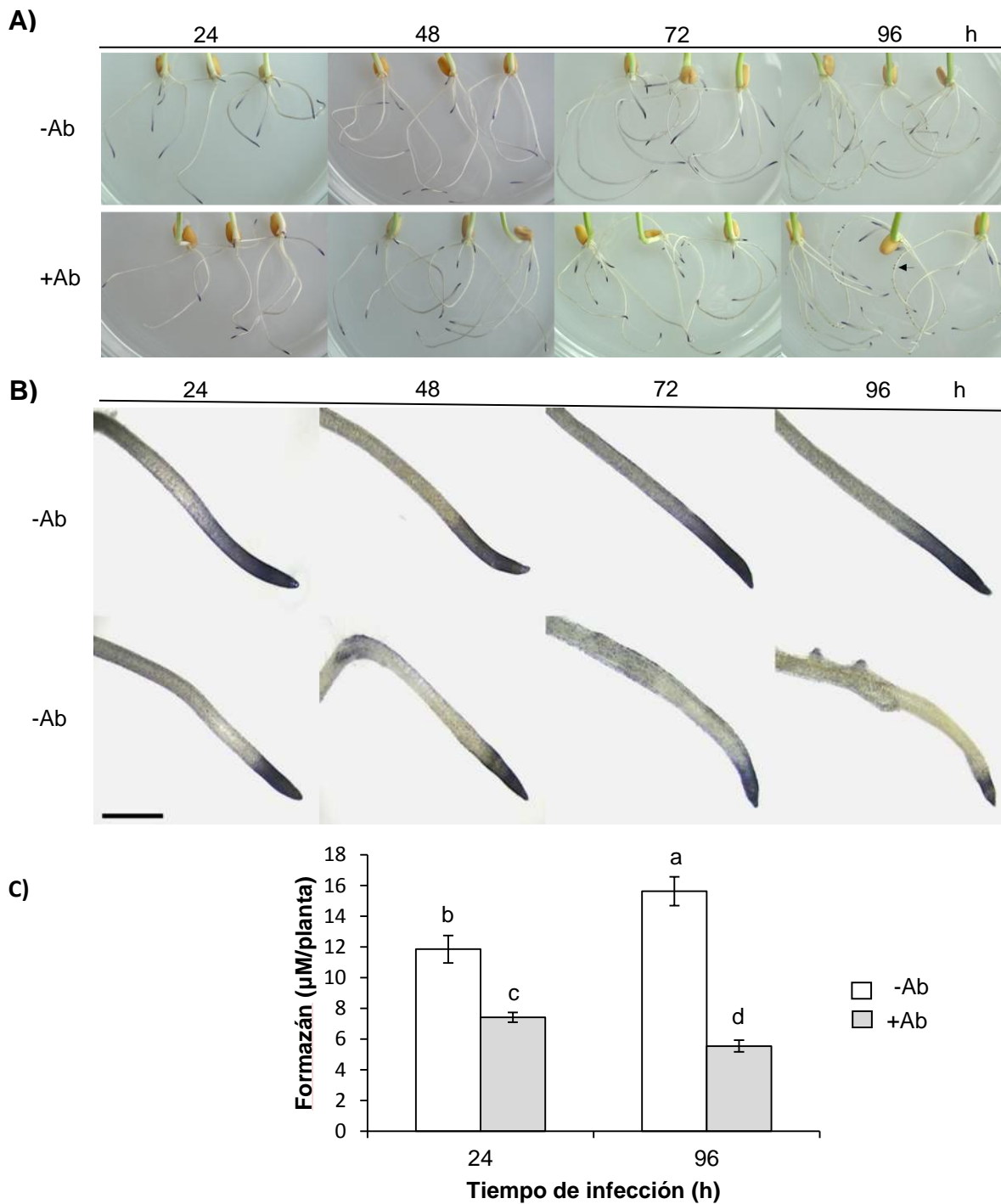
Posteriormente se indagó sobre la producción de estas moléculas durante la interacción con la bacteria. En plantas infectadas con  $1 \times 10^6$  ufc se redujo ligeramente la producción del anión superóxido en la parte apical de la raíz, este efecto fue más notable cuando las plantas fueron tratadas con  $1 \times 10^8$  y  $2 \times 10^8$  ufc en donde la producción de esta molécula se redujo completamente. Esta reducción en la producción es dependiente de la concentración de la bacteria, además, en las plantas tratadas con  $1 \times 10^6$  ufc, la producción del anión superóxido se desplaza hacia la parte apical de la raíz.



**Fig. 11. Efecto de *Azospirillum* sobre la producción del anión superóxido en plantas de trigo.** Plántulas de trigo inoculadas con diferentes concentraciones de *Azospirillum* y teñidas con NBT durante 15 minutos. La coloración azul representa la tinción con NBT. – Ab: plantas no inoculadas; UFC: unidades formadoras de colonias. Barra: 2 mm

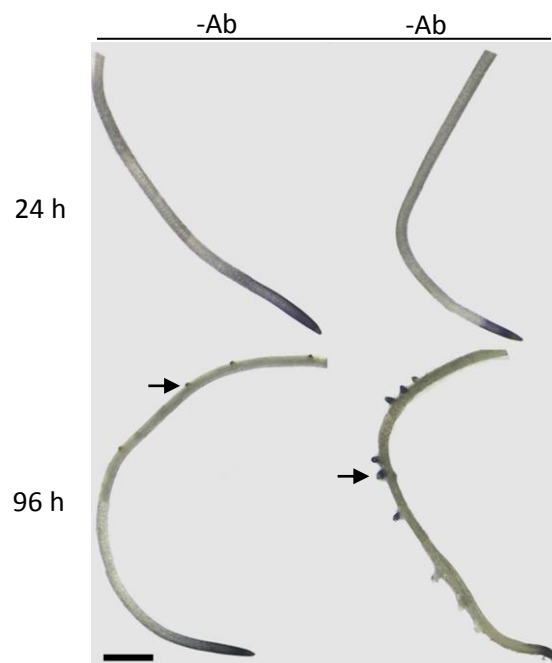
Las concentraciones de bacterias antes utilizadas ya han sido reportadas y en todas se ha observado un efecto sobre el sistema radical. Para descartar que la reducción en la producción de anión superóxido observado en la raíz de trigo se deba a un efecto tóxico de *A. brasilense*, se decidió analizar la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC a diferentes tiempos de infección. Como se observa en la figura 12 A, B y C, en las plantas control, la producción de anión superóxido se mantiene en el meristemo hasta las 72 horas e incrementa ligeramente a 96 horas. Mientras que en las plantas tratadas con *A. brasilense* se observa una reducción en la concentración del anión superóxido en la parte meristemática, dependiente del tiempo de infección, debido a que a 96 horas se ve una reducción mayor en la concentración de esta molécula. La localización del anión superóxido concuerda con la localización de la zona de división y elongación celular. Estos resultados sugieren que *A. brasilense* altera la producción y distribución del anión superóxido (ó de ROS) afectando así las zonas de división, elongación y diferenciación celular que controlan la arquitectura de la raíz.





**Fig. 12. Producción de anión superóxido en plantas inoculadas con *Azospirillum* a diferentes tiempos. A.** Imágenes representativas de la producción del anión superóxido en el sistema radical. **B.** Producción de anión superóxido en el ápice de la raíz seminal principal,  $n=20$ . **C.** Cuantificación indirecta de la producción de anión superóxido,  $n=10$ , Tukey  $\alpha=0.05$ . Plántulas de trigo inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum* y teñidas con NBT durante 15 minutos. La flecha indica formación de raíces laterales. La coloración azul representa la tinción con NBT. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. Barra: 2 mm

Además de la producción de anión superóxido en la parte apical de la raíz, también se observó la producción de esta molécula en el ápice de las raíces laterales (Fig. 13). La producción parece ser mayor en las plantas inoculadas con la bacteria debido a que las raíces laterales de esta planta son más grandes que las no infectadas. Este resultado confirma que las ERO, en particular el anión superóxido, participa en la formación de raíces laterales. Sin embargo, en este trabajo no se analizó a detalle la producción de anión superóxido en estas raíces laterales.



**Fig.13. Producción del anión superóxido en los meristemos de las raíces laterales.** Plántulas de trigo inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum* y teñidas con NBT durante 15 minutos. La flecha indica formación de raíces laterales. La coloración azul representa la tinción con NBT. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. Barra: 2 mm. n=20

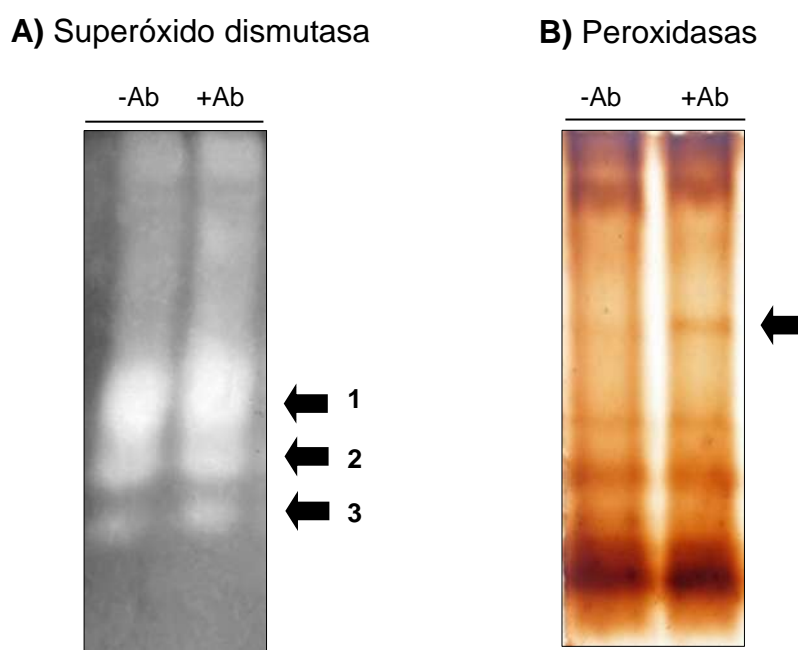
### 7.3 Actividad de las superóxido dismutasas y peroxidasas

En la planta, el balance en la producción y eliminación de las ERO es de gran importancia para el adecuado desarrollo. Este balance es mantenido por enzimas que producen ERO, como la NADPH oxidasa y enzimas que eliminan

o convierten a las ERO en otras moléculas menos reactivas como las SODs, Cat, Prxs).

Debido a que *Azospirillum* induce una disminución en la concentración del anión superóxido en el ápice de la raíz de trigo, fue de gran interés analizar si la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasas y peroxidasas estaban involucradas en dicho fenómeno. Las plantas fueron infectadas con  $1 \times 10^6$  UFC de la bacteria durante 24 horas, posteriormente se analizó la actividad de estas enzimas.

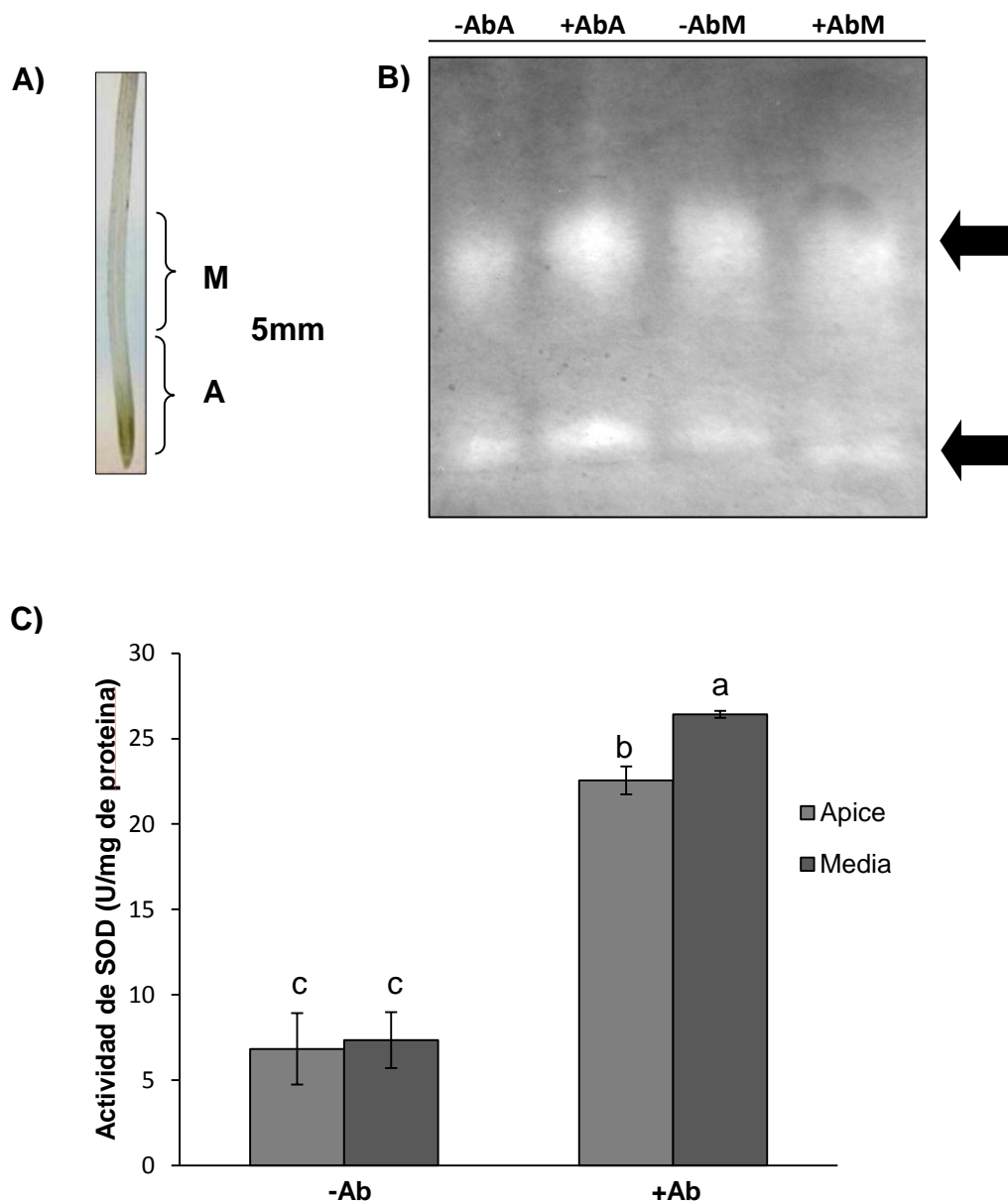
Se detectaron 3 bandas de actividad de superóxido dismutasas, donde solo las bandas 1 y 3 incrementaron su actividad durante el tratamiento con *Azospirillum* (Fig. 14 A). Mientras que en la actividad de las peroxidasas se observó un aumento en la actividad de todas las bandas detectadas y particularmente en una banda durante el tratamiento con la bacteria (Fig. 14 B).



**Fig. 14. Actividad de sistemas antioxidantes de trigo durante la interacción con *Azospirillum*.** A. Actividad de la superóxido dismutasa. 90  $\mu$ g de proteína. B. Actividad de las peroxidasas. 30  $\mu$ g de proteína. Plántulas de trigo inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum* durante 24 h. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. Las flechas indican bandas con incremento en actividad.

La actividad de las enzimas mostradas en la figura 14 es el resultado en todo el sistema radical. Por lo tanto, para correlacionar a detalle la reducción en la concentración de anión superóxido con la actividad de estas enzimas, se analizó solamente el meristemo de la raíz. Se disectaron 5 mm del ápice y los 5 mm más arriba que correspondían a la zona apical (A) y zona media (M) respectivamente (Fig. 15 A).

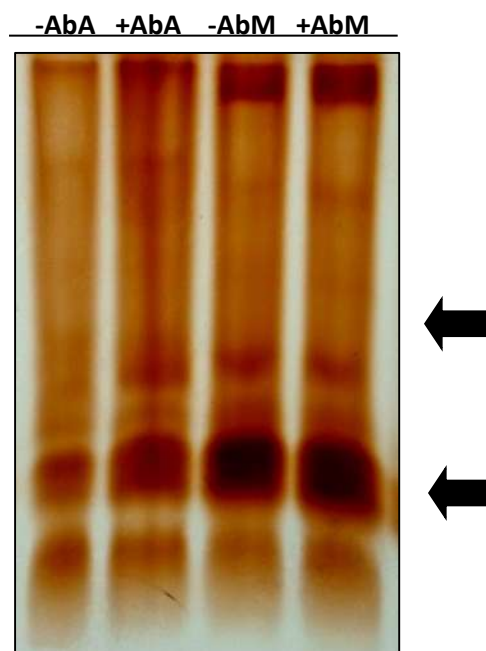
En estas dos secciones no se observó la actividad de la banda 2 observada en la figura 14 A. La actividad de las SODs de las bandas 1 y 3 es baja en la parte meristemática de las plantas control, contrario a la parte media donde hay una alta actividad de estas enzimas. En ambas secciones, esta actividad fue incrementada durante el tratamiento con *Azospirillum*, sugiriendo que estas enzimas regulan los niveles del anión superóxido en la parte meristemática de la raíz (Fig. 15 B y C).



**Fig. 15. Actividad de la superóxido dismutasa en meristemo radical.** A. Imagen representativa de las secciones de la raíz de trigo. B. Actividad de superóxido dismutasa, 60 µg de proteína. C. Cuantificación espectrofotométrica de la actividad de la superóxido dismutasa, n=10. Plántulas de trigo inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum* durante 24 h. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. Las flechas indican bandas con incremento en actividad. -AbA: meristemo de plantas no inoculadas. +AbA: meristemo de plantas inoculadas. -AbM: parte media de plantas no inoculadas. +AbM: parte media de plantas inoculadas. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.

La actividad de las peroxididasas que utilizan el  $H_2O_2$  en las plantas control, al igual que en la SODs mostraron una baja actividad en la parte meristemática comparada con la sección media. Sin embargo, se observa que la parte media posee una alta actividad de peroxididasas. Esta alta actividad en la sección media podría deberse a que las peroxididasas están relacionadas con diferenciación celular que se encuentra en esta sección.

Durante el tratamiento de trigo con *Azospirillum*, la actividad de las peroxididasas se incrementa en la zona apical como en la zona media. Además, bandas de peroxididasas que tienen una baja actividad en la zona apical se incrementa durante la interacción con la bacteria (Fig.16) Esto demuestra que *Azospirillum* afecta el sistema radical de las plantas de trigo a través de la regulación en la distribución y concentración del anión superóxido en la parte apical de la raíz de estas plantas, mediante el control de la actividad de las SODs y Prxs inducidas por la bacteria.



**Fig. 16. Actividad de las peroxididasas en el meristemo radical de plántulas de trigo.**

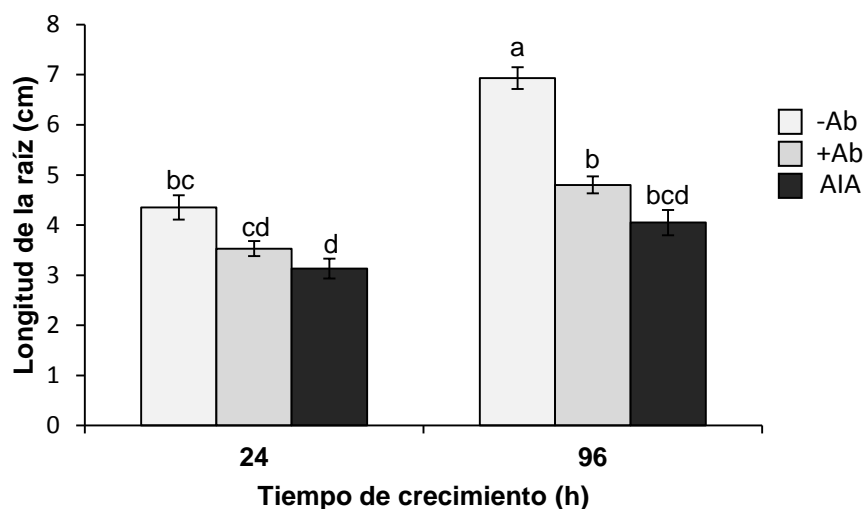
Actividad de las peroxididasas con 50  $\mu$ g de proteína. Plántulas de trigo inoculadas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum* durante 24 h. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. Las flechas indican bandas con incremento en actividad. -AbA: meristemo de plantas no inoculadas. +AbA: meristemo de plantas inoculadas. -AbM: parte media de plantas no inoculadas. +AbM: parte media de plantas inoculadas.

#### **7.4 Efecto del ácido indol acético sobre la raíz de trigo**

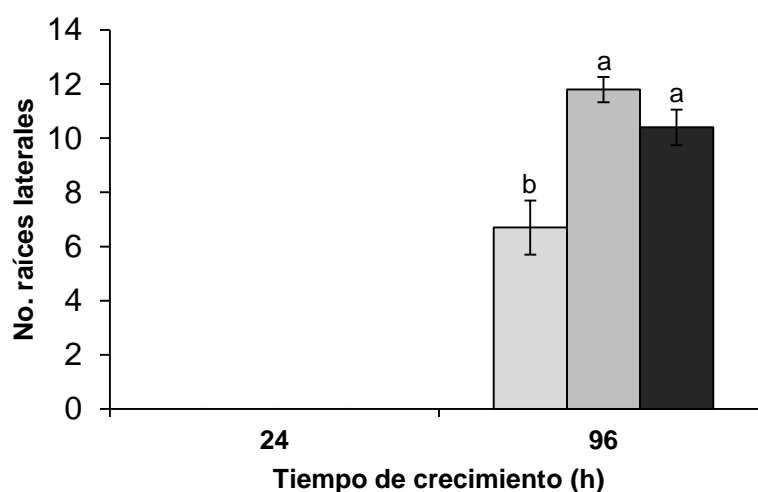
El ácido indol acético es una de las hormonas que regulan una gran cantidad de procesos biológicos en la planta. Se ha reportado que plantas tratadas con AIA exógeno reducen la longitud de la raíz e incrementan el número de raíces laterales. Debido a que esta hormona es producida por *Azospirillum brasilense*, se ha sugerido en algunos reportes que es la responsable de modificar la arquitectura del sistema radical de las plantas de trigo y posiblemente la concentración de ERO.

Para confirmar esta idea, las plantas fueron tratadas con 1  $\mu$ M de AIA durante 24 y 96 horas; a 24 horas, se observó que el AIA acorta la raíz de las plantas de trigo, semejante a lo que sucede con las plantas tratadas con *Azospirillum* (Fig. 17). Este efecto se observó más claramente a 96 horas, donde las plantas control presentaron una longitud de la raíz seminal principal 6.39 cm en promedio, mientras que las tratadas con AIA y *Azospirillum* las longitudes fueron de 4.05 y 4.8 cm.

A)



B)



**Fig. 17. Efecto del AIA sobre el sistema radical de trigo.** A. Longitud del sistema radical. B. Formación de raíces laterales. Las plantas fueron inoculadas con  $1 \mu\text{M}$  de AIA (disuelto en DMSO) y  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum*. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar. . -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas.  $n=10$ .

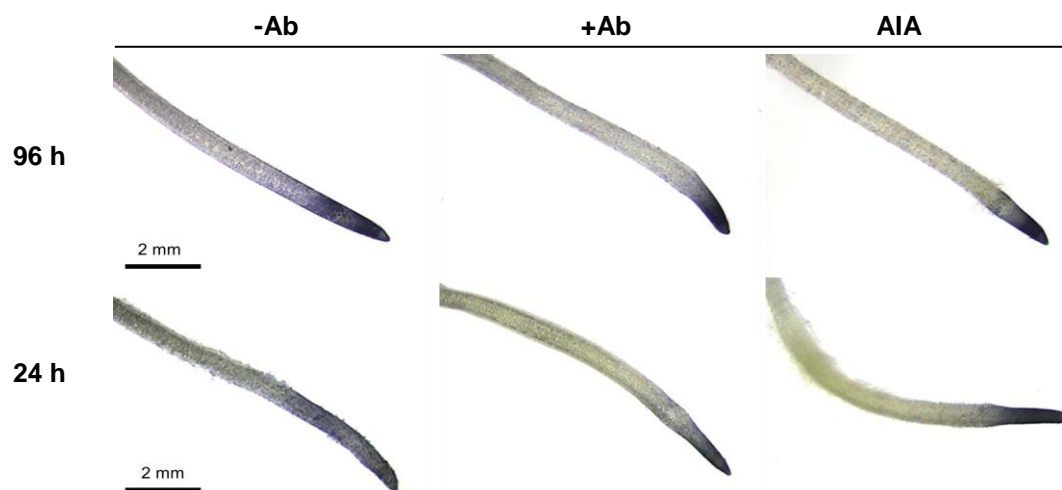
El análisis en el número de raíces laterales durante el tratamiento con AIA, muestra que esta hormona lo incrementa (Fig. 17 B). Las plantas tratadas con *Azospirillum* presentaron 11.8 raíces laterales por planta y las tratadas con AIA, 10.4, no habiendo una diferencia entre ellas, pero si respecto al control con 6.7 raíces laterales por planta. Otra observación que hay que resaltar, es que los



pelos radicales se forman más cerca del ápice. Estos resultados confirman la capacidad del AIA para modificar el sistema radical de las plantas.

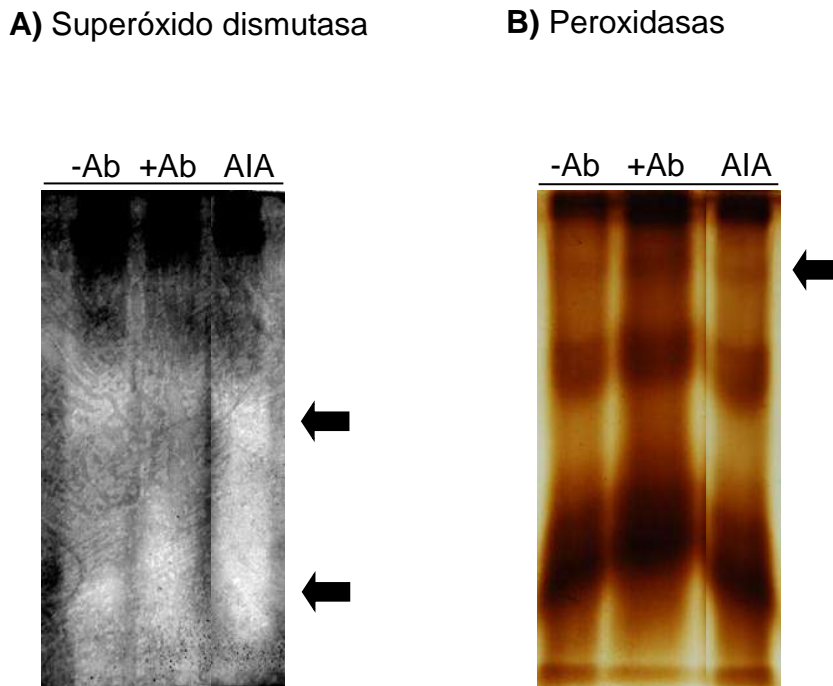
Además, la concentración de anión superóxido en la parte apical de las plantas con el AIA se reduce al igual que en presencia de *Azospirillum* (Fig. 18). Posiblemente la baja concentración de anión superóxido conlleva a un meristemo más corto y consecuentemente a todo el sistema radical.

Esta reducción podría deberse al incremento de la actividad de la superóxido dismutasa y peroxidasas en el meristemo de la raíz de estas plantas, como se ha observado con *Azospirillum*. Para confirmar las actividades de las SODs y Prxs fueron analizadas en geles de poliacrilamida. Los resultados muestran que esta fitohormona induce la actividad de estas dos enzimas. Siendo las bandas 1 y 2 de las SODs las que incrementan su actividad al igual que en las plantas inoculadas con *Azospirillum*. Para el caso de las peroxidasas, se observó un ligero incremento en la actividad, sin embargo, esta actividad parece no diferir del control (Fig.19).



**Fig. 18. Concentración de anión superóxido en presencia de ácido indol acético (AIA).** Las plantas fueron inoculadas con 1  $\mu$ M de AIA (disuelto en DMSO) y  $1 \times 10^6$  UFC de *Azospirillum*. . -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. La coloración azul representa presencia de anión superóxido. n=10 plantas.

Estos resultados sugieren que el AIA sintetizado por *Azospirillum* es el responsable de modificar el sistema radical de las plantas de trigo, reduciendo la longitud de la raíz, incrementando el número de la raíz lateral, reduciendo en la producción de anión superóxido e incrementando la actividad de los sistemas antioxidantes.



**Fig. 19. Actividad de SOD y peroxidasas durante el tratamiento con ácido indol acético (AIA).** A. Superóxido dismutasa, 60  $\mu$ g. B. Peroxidasas, 50  $\mu$ g. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. AIA: ácido indol acético 1 $\mu$ M. Las flechas indican bandas con incremento en actividad.

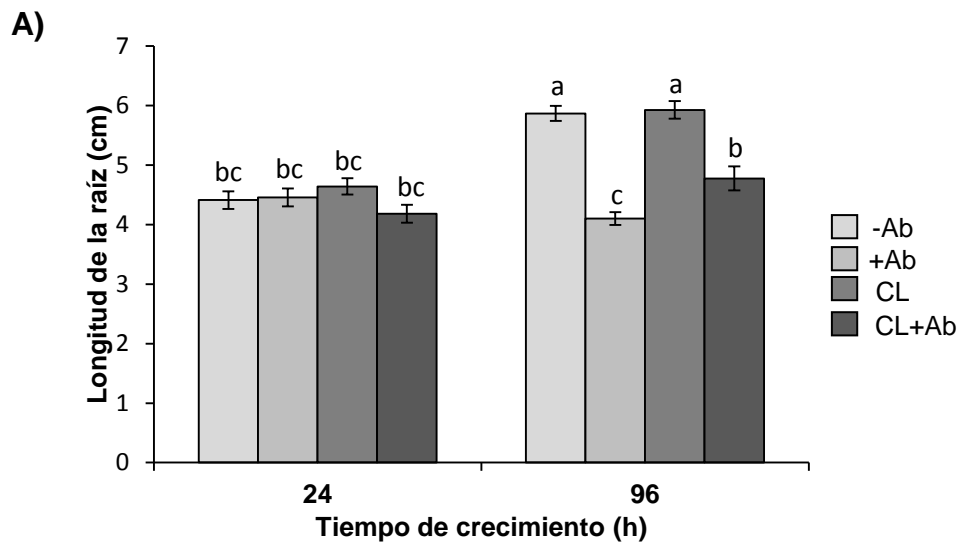
### 7.5 Papel del calcio durante la interacción

El calcio es conocido como un segundo mensajero que transduce las señales inducidos por algún estímulo. Se ha demostrado que el calcio es de suma importancia para el desarrollo de la planta junto con las ERO. La participación del calcio durante la interacción planta-microorganismo se ha estudiado extensamente en *Rhizobium*-leguminosas (Kosuta et al., 2008).

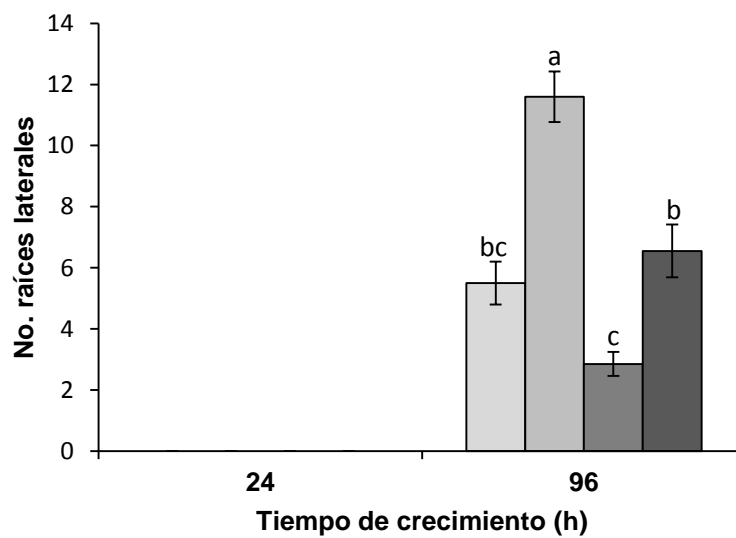
En este trabajo, se analizó la importancia del calcio durante la interacción trigo-*Azospirillum*. Para esto, las plantas fueron incubadas con cloruro de lantano, un inhibidor de canales de calcio.

Los resultados obtenidos indican que el calcio no está involucrado en la reducción de la longitud de la raíz de trigo inducido por la bacteria. Las plantas tratadas con cloruro de lantano al igual que el control, presentó 5.9 cm de longitud de la raíz en promedio. Mientras que las plantas tratadas con cloruro de lantano junto con la bacteria presentaron una raíz principal más corta que las control (Fig. 20 A).

Sin embargo, el número de raíces laterales se ve afectado con el cloruro de lantano, incluso cuando las plantas fueron tratadas con *Azospirillum*. La formación de raíces laterales en plantas tratadas con cloruro de lantano junto con *Azospirillum* se revierte ligeramente, pero no es comparable con las plantas inoculadas sólo con la bacteria. Todas las diferencias se pueden observar a 96 horas después de la inoculación, comprobando que el calcio es importante para la formación de raíces laterales (Fig. 20 B).



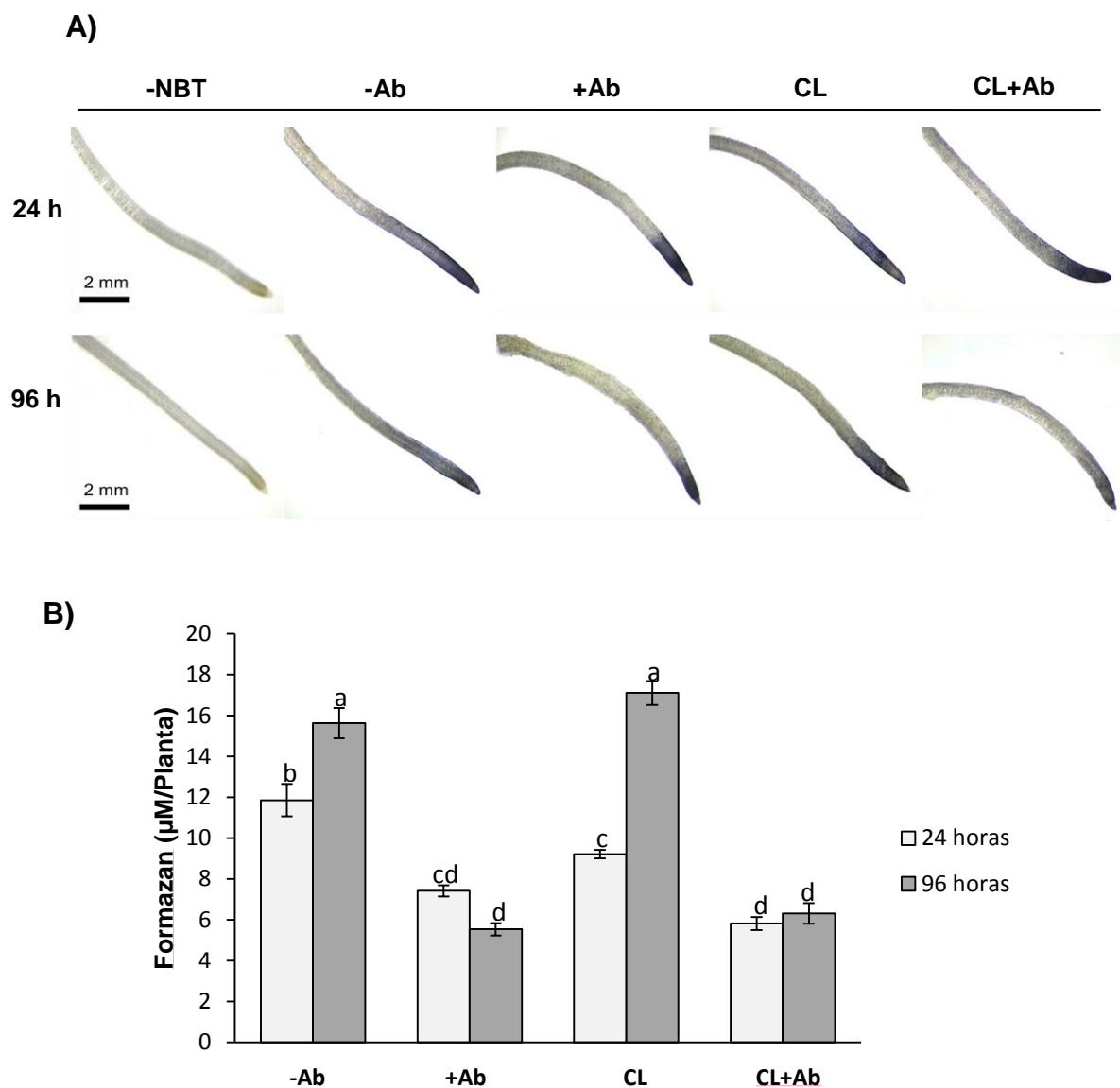
**B)**



**Fig. 20. Participación del calcio en el crecimiento y formación de raíces laterales.** A. longitud del sistema radical. B. Formación de raíces laterales. -Ab: sin inocular. +Ab: inoculado con  $1 \times 10^6$  ufc de *A. brasilense*. CL: cloruro de lantano  $10 \mu\text{M}$ . CL+Ab: cloruro de lantano + *A. brasilense*. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.  $n=20$  plantas.

La producción de anión superóxido en estas plantas también fueron analizadas, donde las plantas tratadas con cloruro de lantano durante 24 h, reduce la concentración de anión superóxido en la parte meristemática de la raíz sin afectar la distribución de estas moléculas. A 96 h de tratamiento, la concentración no tuvo diferencias significativas comparadas con el control a este tiempo. En cambio las plantas tratadas con  $\text{LaCl}_3$  junto con *Azospirillum* reducen la concentración de anión superóxido afectando la distribución al igual que las plantas tratadas sólo con *Azospirillum* (Fig. 21 A y B).

Por lo tanto, el calcio participa en la producción de anión superóxido, como se observa en plantas tratadas durante 24 h con el inhibidor. Pero no participa en la modificación de la distribución de anión superóxido inducido por *Azospirillum*. Ya que en presencia de  $\text{LaCl}_3$ , *Azospirillum* afecta la producción de anión superóxido en el meristemo de la raíz (Fig. 21 A y B).



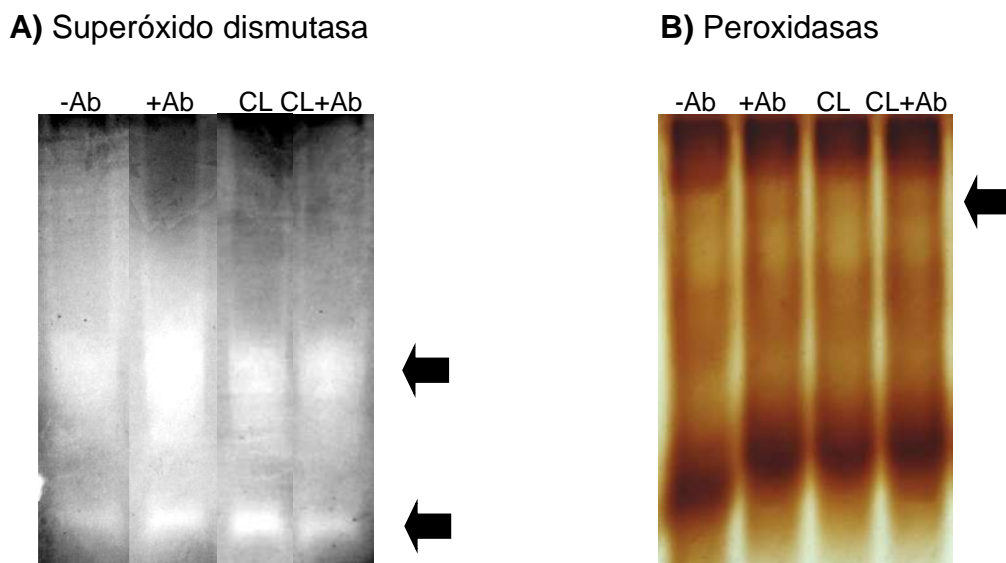
**Fig. 21. Participación del calcio sobre la concentración de anión superóxido.** A. Producción de anión superóxido. B. Cuantificación de la concentración de anión superóxido. –NBT: sin teñir con Azul de tetrazolio. –Ab: sin inocular. +Ab: inoculado con  $1 \times 10^6$  ufc de *A. brasilense*. CL: cloruro de lantano  $10 \mu\text{M}$ . CL+Ab: cloruro de lantano + *A. brasilense*. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a *Tukey*  $\alpha=0.05$ . Las barras denotan errores estándar.  $n=10$  plantas.

La participación del calcio sobre la actividad de los sistemas antioxidantes inducido por *Azospirillum* fue analizada (Fig. 22). En las plantas no inoculadas, se observa la actividad normal de las bandas 1 y 3 de las SODs. Durante la interacción trigo-*Azospirillum*, estas bandas incrementan la actividad como se

mencionó en resultados anteriores. Al tratar las plantas con cloruro de lantano, la actividad de la SOD no se ve alterada, aunque se observa un ligero incremento de la actividad de la banda 3. Cuando las plantas fueron tratadas con cloruro de lantano en combinación con *Azospirillum*, el incremento en la actividad inducido por esta bacteria, no se observa claramente, sin embargo se ve un ligero incremento en la actividad de estas dos bandas (Fig. 22).

La actividad de las peroxidasas en plantas tratadas con *Azospirillum* se ve incrementada comparado con el control. Por lo tanto, el cloruro de lantano no afecta la actividad de las peroxidasas en plantas control y tratadas con la bacteria.

El papel del calcio para mediar respuestas celulares es muy reportado. Con estos resultados, el calcio es un componente importante para inducir la actividad de la superóxido dismutasa en plantas de trigo durante la interacción con *Azospirillum*. En el caso de las peroxidasas parece no depender de la señalización del calcio, por lo menos a estos tiempos de experimentación.



**Fig. 22. Participación del calcio sobre la actividad de SODs y Prxs durante la interacción *Azospirillum*-Trigo.** A. Superóxido dismutasa, 60  $\mu$ g. B. Peroxidasas, 50  $\mu$ g. -Ab: plantas no inoculadas; +Ab: plantas inoculadas. CL: cloruro de lantano 10  $\mu$ M. CL+Ab: cloruro de lantano + *A. brasilense*. 24 h de inoculación. Las flechas indican bandas con incremento en actividad.

## VIII. DISCUSIÓN

El sistema radical de las plantas es colonizado por una gran variedad de microorganismos, siendo una de ellas las rizobacterias que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento vegetal mediante la fijación del nitrógeno, producción de fitohormonas, biocontrol o proteger a las plantas ante diferentes tipos de estrés abiótico. El caso más documentado de fitoestimulación al crecimiento vegetal, es la producción de auxinas con la bacteria del género *Azospirillum*, siendo una de las PGPR las más estudiadas en este campo. Por esta razón, *Azospirillum* se está comercializando y aplicando en una gran variedad de plantas de importancia económica dando un alto rendimiento (Helman et al., 2011).

En trabajos previos, se ha reportado que las plantas inoculadas con *Azospirillum* muestran una longitud de la raíz más corta que las no inoculadas y un incremento en la formación de raíces laterales y pelos radicales, lo que permite a la planta una mayor área para la absorción de agua y nutriente (Spaepen et al., 2008). Se ha sugerido que el factor por el que *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal se debe principalmente a que la bacteria produce auxinas (Spaepen et al., 2007, 2008, 2014). Sin embargo, el mecanismo molecular y bioquímico de cómo *Azospirillum* afecta la arquitectura del sistema radical de las plantas es aún desconocido.

En este trabajo, la inoculación de plantas de trigo con *A. brasilense* Sp245 provocó una disminución en la longitud del sistema radical, un incremento la formación de raíces laterales y pelos radicales. Ha sido ampliamente documentado que el efecto benéfico de las rizobacterias se debe a través de modificar el sistema radical (Spaepen et al., 2008, 2014; Zamioudis et al., 2013). Zamioudis et al., (2013), observaron que la reducción en la longitud de la raíz primaria de *A. thaliana* es respuesta a *Pseudomonas fluorescens* WCS417 fue debido a efectos en la expansión celular más que en la organización y función del meristemo. En este estudio, las plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum* presentaron un meristemo de menor tamaño. Análisis más detallado demuestra que el tamaño celular de la zona meristemática y de diferenciación es más pequeño, lo anterior sugiere que



*Azospirillum* afecta el sistema radical a través de modificar el tamaño celular, posiblemente incrementando la rigidez de la pared celular lo que evita la elongación celular o inducir la diferenciación celular más cercanamente al meristemo. Esta última posibilidad, puede ser más acertada, ya que la formación de pelos radicales y raíces laterales ocurrió más cerca al meristemo de la raíz.

Durante las primeras etapas de la interacción, las rizobacterias inducen cambios en el metabolismo y expresión de genes en el hospedante, donde involucra una gran cantidad de moléculas señales como las especies reactivas de oxígeno y el calcio como segundo mensajero (Nanda et al., 2010). Dentro del modelo *Rhizobium*-leguminosa, la percepción de factores Nod induce un incremento en la producción de ERO en los pelos radicales a los primeros 15 segundos y disminuye posteriormente a los 3 minutos (Cárdenas et al., 2008). Un resultado contradictorio fue mostrado por Lohar et al., (2007), donde la producción de estas moléculas disminuyen después de la adición de los factores Nod, modificando la estructura de los pelos radicales para la asociación. Así que los cambios en la concentración y sitios de producción de las ERO inducen cambios morfológicos en los pelos radicales o en la raíz (Lohar et al., 2007; Tsukagoshi et al. 2010). Las especies reactivas de oxígeno están distribuidas en distintas zonas de la raíz modulando la proliferación y diferenciación celular (Tsukagoshi et al. 2010). Se ha reportado que el anión superóxido se localiza en el meristemo de la raíz, mientras que el peróxido de hidrógeno se observa en la zona de diferenciación de plantas de *A. thaliana* (Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al. 2010). Esta distribución, respecto al anión superóxido observado en el reporte anterior, es semejante a la que se observa en plantas de trigo. Por lo tanto, las ERO regulan varios procesos relacionados al crecimiento y desarrollo de la raíz. Así que los cambios en la arquitectura del sistema radical de trigo inducido por *Azospirillum* podrían estar asociados con la producción del anión superóxido. Al analizar la producción de esta molécula en la raíz de trigo durante la interacción con *Azospirillum*, se observa que, *Azospirillum* modifica la concentración y distribución de las ERO. La presencia de anión superóxido se recorre más hacia el ápice de la raíz que co-localiza con el tamaño del meristemo. Ya que el anión superóxido está

relacionado con proliferación celular, que en este caso se localiza en el meristemo de la raíz, mientras que el peróxido de hidrógeno es localizado en zonas de diferenciación celular (Dunand et al., 2007). Estos resultados sugieren que esta bacteria modifica la producción y distribución de las ERO en la raíz y cómo estas moléculas controlan la proliferación y diferenciación celular, afectan el tamaño del meristemo y tamaño celular, consecuentemente toda la arquitectura del sistema radical.

Por otra parte, como la acumulación excesiva o mala distribución de las ERO afectan la integridad celular, las plantas están equipadas con una gran cantidad de genes relacionados con ERO que controlan la producción y eliminación de estas moléculas (Mittler et al., 2004). Algunos de estos genes codifican para sistemas antioxidantes como las superóxido dismutasas y peroxidasas. Los cambios en la distribución y concentración de anión superóxido en la raíz de trigo inducidos por *Azospirillum*, debe ser estrictamente regulada. La actividad de las superóxido dismutasas y peroxidasas en el meristemo de la raíz de trigo se incrementa durante la interacción con la bacteria. La actividad de dos bandas de SOD en el meristemo de la raíz se ve incrementada. Este efecto podría ser el responsable de la modificación de la concentración de anión superóxido en el meristemo de la raíz, debido a que la SOD convierte el anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Por otro lado, respecto a la actividad de todas las bandas de peroxidasas en el meristemo de la raíz también se incrementan, en particular una banda de actividad que es exclusivamente para el meristemo. En algunos reportes se ha remarcado la importancia de las enzimas antioxidantes durante la interacción Rhizobium-leguminosa (Matamoros et al., 2003). La participación de SODs, ascorbato peroxidasas, glutatión peroxidasas es crucial para el establecimiento de la interacción y desarrollo del nódulo (Matamoros et al., 2003). Además, se ha reportado el incremento en la actividad de ascorbato peroxidasas, glutatión reductasas, catalasas y lipooxigenasas en alfalfa durante las primeras etapas de la interacción con *S. meliloti* (Bueno et al., 2001). Así que los autores sugieren que el incremento en la actividad de los antioxidantes durante la interacción podría estar relacionado con la diferenciación del tejido en el caso del nódulo y lo mismo podría suceder en el cambio en la arquitectura de la raíz en trigo, a

través de la regulación de los niveles de las ERO. Sin embargo, sería interesante conocer el mecanismo por el cual *Azospirillum* regula la actividad de los sistemas antioxidantes y la producción del anión superóxido, para que pudiese cambiar la morfología de la raíz.

Las auxinas, son una de las hormonas más importantes en la vida de las plantas y están implicadas en muchos aspectos de desarrollo, tales como la modificación de la arquitectura de la raíz (Vanneste y Friml, 2009). Reportes recientes han señalado que esta hormona funciona como una molécula de señalización durante la interacción planta-microorganismo. Se estima que un 80% de las rizobacterias tienen la habilidad de producir auxinas (Patten y Glick, 1996). Recientemente, se ha reportado que las auxinas producidas por *Azospirillum brasilense* actúa como una molécula señal durante la interacción con *A. thaliana* (Spaepen et al., 2014). La inoculación de plantas de *A. thaliana* con *Azospirillum* induce cambios en la expresión de genes relacionados a hormonas y a defensa, así como también en genes relacionados a la modificación de la pared celular. Sin embargo, la mutante que sólo produce el 10% de las auxinas, no induce cambios transcripcionales en la planta. Este reporte ilustra el papel de las auxinas en la interacción *Azospirillum-Arabidopsis* y posiblemente ocurra lo mismo durante la interacción con plantas de trigo.

La aplicación exógena de auxinas induce cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno en plantas de *A. thaliana*, sugiriendo que las ERO funcionan como un componente río abajo de la vía de transducción de señal mediada por auxinas (Joo et al., 2001). Además, la exposición de raíces de tomate a auxinas exógenas, es seguido por cambios en la distribución de las especies reactivas de oxígeno en el ápice de la raíz (Tyburski et al., 2009). El efecto de estas auxinas es mediada por un incremento en la actividad y expresión de genes de las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas que regulan la concentración de ERO (Tyburski et al., 2009). De acuerdo a estos antecedentes, nosotros encontramos que la aplicación de 1  $\mu$ M de ácido indol acético a las plantas de trigo, mimetiza los efectos inducidos por *Azospirillum brasilense*. El tratamiento con auxinas, reducen la longitud del sistema radical e incrementan la formación de raíces laterales y pelos radicales. La distribución del anión superóxido en la raíz se modifica durante el tratamiento y se observa

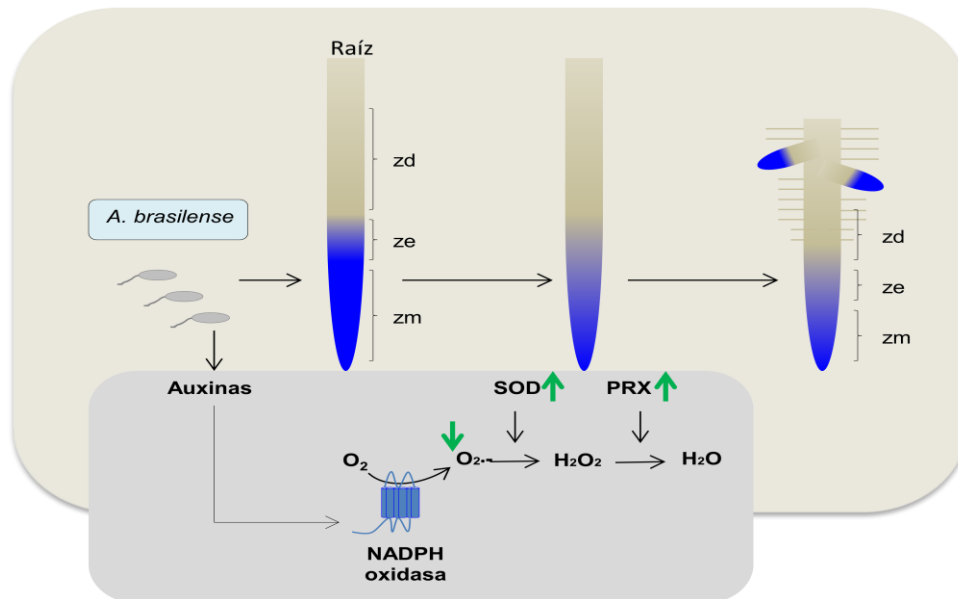
un incremento en la actividad de las SODs y peroxidasas. Con este resultado podemos pensar que *Azospirillum* modifica el sistema radical de trigo a través de la señalización mediada por auxinas.

Otro de los componentes en la transducción de señales durante la interacción planta-microorganismo, es el calcio. La oscilación en la concentración del calcio citológico se ha observado durante la interacción *Rhizobium*-leguminosa. Esta oscilación es una firma importante que son reconocidos por proteínas que tienen la capacidad de unir calcio. En la ruta de señalización de las auxinas también involucran el calcio, ya que la aplicación de auxinas a coleóptilos de maíz inducen un incremento en el calcio citosólico (Felle, 1988). Además, la formación de raíces adventicias en explantes inducidos por auxinas dependen de la disponibilidad intra y extracelular del calcio (Lanteri et al., 2006). El análisis de la participación del calcio durante la interacción *Azospirillum*-planta de trigo dió como resultado que el calcio no participa en la reducción de la longitud de la raíz inducido por *Azospirillum*. Al igual que en la modificación de la distribución de anión superóxido e incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes inducido por esta bacteria. Sin embargo, la formación de raíces laterales en plantas tratadas con *Azospirillum* es dependiente del calcio, ya que las plantas tratadas con un inhibidor de canales de calcio ( $\text{LaCl}_3$ ) junto con *Azospirillum* son incapaces de formar raíces laterales, que concuerda con los reportes donde el calcio es un componente importante en la formación de raíces laterales (Lanteri et al., 2006).

En conjunto estos resultados nos indican que las auxinas producidas por *A. brasilense* modifican los niveles y la distribución de las especies reactivas de oxígeno a través de incrementar la actividad de sistemas antioxidantes como las superóxido dismutasas y peroxidasas que regulan los niveles de estas moléculas. Las ERO controlan el balance entre proliferación y diferenciación celular en la raíz, por lo tanto, al modificar la distribución, modifican la arquitectura de la raíz. Y por último la formación raíces laterales inducida por auxinas es dependiente de calcio (Fig. 23.)

Hay que tomar en cuenta que la modificación en la distribución de las ERO no dependen totalmente de los sistemas antioxidantes. La expresión de genes

NADPH oxidasas productoras de ERO en la raíz también son reguladas durante la interacción (Lohar et al., 2007). El estudio de la señalización de las auxinas involucrando a las ERO, calcio, NADPH oxidasas y proteínas de unión a calcio sería interesante desarrollarlas.



**Fig. 23. Modelo de la interacción *Azospirillum*-trigo.** SOD: Superóxido dismutasa, PRX: Peroxidasas,  $O_2$ : Oxígeno molecular,  $O_2^-$ : Anión superóxido,  $H_2O_2$ : Peróxido de hidrógeno,  $H_2O$ : Agua, zd: Zona de diferenciación, ze: Zona de elongación, zm: Zona meristemática. La coloración azul representa la producción de anión superóxido. Las flechas verdes indican incremento o disminución.

## IX. CONCLUSIÓN

*A. brasilense* reducen la concentración de anión superóxido, incrementa la actividad de la superóxido dismutasa y peroxidasas en el ápice de la raíz de trigo. El efecto observado durante la interacción, involucra la señalización de auxina. El mecanismo seguido por *A. brasilense* para afectar la concentración de anión superóxido en el meristemo no depende totalmente de la señalización del calcio. Mientras que para la formación de raíces laterales es indispensable.

## X. LITERATURA CITADA

Almagro L, Gómez RLV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A y Pedreño MA. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*. 60: 377–390.

Alscher RG, Erturk N y Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53 (372). 1331-1341.

Arthikala MK, Sánchez-López R, Nava N, Santana O, Cárdenas L. y Quinto C. 2014. *RbohB* a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene enhances symbiosome number bacteroid size and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytologist*. 202: 886–900.

Asada K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*. Vol. 141, pp. 391–396

Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JP y Bashan Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp-tagged Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils*. Volume 40 (3), pp 188-193.

Bannister WH, Bannister JV, Barra D, Bond J y Bossa F. 1991. Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radicals Research Communications*. 12-13. 349-361.

Barceló AR y Ros LVG. 2009. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Walls. En: L.A. del Río and A. Puppo (eds.), *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants*. Springer Berlin Heidelberg. 73–93.

Bashan Y y de-Bashan LE. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv *tomato* using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2637-2643.

Bashan Y y Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990– 1996). *Canadian Journal of Microbiology*. 43:103-121.

Bell E, Takeda S, y Dolan L. 2009. Reactive Oxygen Species in Growth and Development. En: L.A. del Río and A. Puppo (eds.), *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*, Signaling and Communication in Plants. Springer Berlin Heidelberg.

Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science*. 89:1113-1121

Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C y Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*. 53:1367-1376.

Bordo D, Djinovic K y Bolognesi M. 1994. Conserved patterns in the Cu-Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology*. 238: 336-386.

Bueno P, Soto MJ, Rodríguez-Rosales MP, San Juan J, Olivares J y Donaire JP. 2001. Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytologist*. 152: 91-96.

Capoen W, Sun J, Wysham D, Otegui MS, Venkateshwaran M, Hirsch S, Miwa H, Downie JA, Richard J. Morrisa, Jean-Michel Anéc y Giles E. D. Oldroyd. 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol. 108: 34. 14348-14353.

Cárdenas L, Holdaway-Clarke TL, Sanchez F, Quinto C, Feijo JA, Kunkel JG y Hepler PK. 2000. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiology*. 123:443-452.

Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F y Quinto C. 2008. Fast transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*. 56:802-813.



Cardon Z, Whitbeck G y Lynn J. 2007. The rhizosphere: an ecological perspective. *Elsevier Academic Press*. San Diego California, USA. Pp: 212.

Chelikani P, Fita I y Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell and Molecular Life Sciences*. 61, 192–208.

Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y, Prinsen E y Jansen MAK. 2008. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry*. 69: 2149-2156.

Corpas FJ, Barroso JB y del Rio LA. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Science*. 6:145-150.

Correa-Aragunde N, Graziano M y Lamattina L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*. 218: 900–905.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 850 – 861.

Cosio C y Dunand C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*. 60 (2): 391-408.

Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA y Lamattina L. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta*. 221: 297-303.

Creus CM, Pereyra MA, Molina FC, Ramella NA, Casanovas EM, Pereyra CM, Arruebarrena-Di PA, Lamattina LS, Rolando J y Barassi CA. 2008. La pared celular como target en la promoción del crecimiento de las plantas por *Azospirillum*. En: *Azospirillum* spp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Fabricio Darío Casan e Inés García de calamone (editores). 1a ed. Buenos Aires. Asco. *Argentina de Microbiología*. 276 p.

Desbrosses GJ y Stougaard J. 2011. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell host & Microbe*. 10(4):348-58.

Díaz-Zorita M y Fernández-Canigia MV. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 45 (1), Pg. 3–11.

Díaz-Zorita M, Baliña RM, Fernández-Canigia MV y Peticari A. 2006. Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasilense*. *INPOFOS Informaciones agronómicas*. 29:17-19.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Francisco Aguirre J, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S y Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 871–879

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, van de Broek A y Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 212:155-164.

Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassing R, Witte CP, Schulze WX y Romeis T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 110. 8744–8749.

Dunand C, Crevecoeur M y Penel C. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*. 174:332-341.

Dutta R y Robinson KR. 2004. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts. *Plant Physiology*. 135: 1398–1406.

Feierabend J. 2005. Catalases in Plants: Molecular and Functional Properties and Role in Stress Defence. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (ed N. Smirnoff), Blackwell Publishing Ltd. Oxford. UK.

Felle H. 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*. 174:495-499.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H y Torres MA. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422: 442–6.

Foyer CH y Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 21-25.

Foyer CH y Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. 28: 1056–1071.

Fry SC. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*. 332: 507 – 515.

Gill SS, y Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology. And Biochemistry*. 48: 909-930.

Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi W-G, Toyota M, Devireddy AR, y Mittler R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*. 19: 623–630.

Haag AF, Arnold M FF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, Zanda M, Mergaert P y Ferguson GP. 2013. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*. 37: 364–383.

Hadas R y Okon Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*. 5:241-247.

Hartmann A y 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.

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), pp. 89–103. Springer Verlag, Berlin.

Holguin G y Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus sp.*) *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1651-1660.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Revisado el 23 de enero del 2015.

Huabo J, Shengfeng W, Lili G, Lei C, Jinsheng H, Yin Y y Hong W. 2013. Effects of Lanthanum Chloride Addition on Root Growth of Wheat Plants Grown under Different Concentrations of Nitrate Supply. *Journal of the Chinese Society of Rare Earths*. 04.

Joo JH, Bae YS, y Lee JS. 2001. Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiology*. Vol. 126.

Kamal-Eldin A y Appelqvist LA. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 31: 671-701.

Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA y Oldroyd GE. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 105: 9823–9828.

Kudla OBJ. 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820. 1283–1293.

Kukavica B, Mojovic' M, Vucinic' Ž, Maksimovic' V, Takahama U y Jovanovic SV. 2009. Generation of Hydroxyl Radical in Isolated Pea Root Cell Wall, and the Role of Cell Wall-Bound Peroxidase, Mn-SOD and Phenolics in Their Production. *Plant & Cell Physiology*. 50(2): 304–317.

Lanteri ML, Pagnussat GC y Lamattina L. 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced

adventitious root formation in cucumber. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57, No. 6, pp. 1341–1351.

Liszakay A, Kenk B y Schopfer P. 2003. Evidence for involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*. 217: 658 – 667.

Liszakay A, van der Zalm E y Schopfer P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  and  $\cdot OH$  by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*. 136: 3114–3123.

Lohar DP, Haridas S, Gantt JS y Vandenbosch KA. 2007. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist*. 173, 39–49.

Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC y Lamattina L. 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling and Behaviour*. 1: 28–33.

Lugtenberg B y Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63:541–56.

Malamy JE y Benfey PN. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124:33–44.

Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC y Becana M. 2003. Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia Legume Symbiosis. *Plant Physiology*. 133(2):499-509.

McNear Jr DH. 2013. The Rhizosphere-Roots Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge*. 4(3):1.

Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F y Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 61, No. 15, pp. 4197–4220.

Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL y Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signal*. 2: ra45.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S y Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*. 33, 453–467.

Mittler R, Hallak Herr E, Orvar BL, Van Camp W, Willekens H, Inzé D y Ellis BE. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 96: 14165–14170.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M. y Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*. 9. 490–498.

Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S y Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 21:1001-9.

Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C y Gilroy S. 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 104: 20996–21001.

Monshausen GB, Messerli MA y Gilroy S. 2008. Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 147: 1690–1698.

Montiel J, Nava N, Cárdenas L, Sanchez-Lopez R, Arthikala MA, Santana O, Sanchez F y Quinto C. 2012. A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol*. 53(10): 1751–1767.

Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH y Gupta KJ. 2012. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS*. 5: pls052.

Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N y Dunand C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactios. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52(2): 195-204.

Neill SJ, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D y Wilson I. 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 59, No. 2, pp. 165–176.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A y Hancock JT. 2002b. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* 128: 13–16.

Neill SJ, Desikan R y Hancock J. 2002a. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 388 – 395.

Neill SJ, Desikan R y Hancock JT. 2003. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*. 159, 11-35.

Okon Y, Heytler PG, y Hardy RWF. 1983. N<sub>2</sub> fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Applied Environmental Microbiology*. 46, 694–697.

Oldroyd GE y Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Reviews Plant Biology*. 59: 519-46.

Pagnussat GC, Lanteri ML y Lamattina L. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant physiology*. 132: 1241-1248.

Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S y Lamattina L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*. 129: 954–956.

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

Passardi F, Penel C y Dunand C. 2004a. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Science*. 9: 534–540.

Patriquin DG, Döbereiner J, y Jain Dk. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology*. 29: 900-915.

Patten CL Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207–220.

Planchet E y Kaiser WM. 2006. Nitric Oxide Production in Plants Facts and Fictions. *Plant Signal Behavior*. 1(2): 46–51.

Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnoff N y Zárský V. 2007. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist*. 174: 742–751.

Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I y Gouesbet G. 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*. 9:28.

Ramu SK, Peng H-M y Cook DR. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 15: 522–528.

Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L, Schwaiger H, Furtmu" ller PG, Peschek GA, Za" mocky M y Obinger C. 2002. Occurrence and biochemistry of hydroperoxidase in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 479–490.

Sagi M y Fluhr R. 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*. 141: 336–340.

Saharan B y Nehra V, 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. 2011.



Santos R, Hérouart D, Sigaud S, Touati D y Puppo A. 2001. Oxidative burst in alfalfa–*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 14: 86–89.

Sarsour EH, Venkataraman S, Kalen AL, Oberley LW, y Goswami PC. 2008. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. *Aging Cell*. 7: 405–417.

Schopfer P. 2001. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*. 28: 679–688.

Smirnoff N. 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N. (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 53e86.

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 Phytologist*. 201: 850–861.

Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A y Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*. 312:15-23.

Spaepen S, Van Derleyden J y Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*. 51:283–320.

Spaepen S, Vanderleyden J y Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 425–448.

Steenhoudt O y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487–506.

Steinhorst L y Kudla J. 2013. Calcium and Reactive Oxygen Species Rule the Waves of Signaling. *Plant Physiology*. Vol. 163. pp. 471–485.

Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, y Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:691–699.

Swanson S y Gilroy S. 2010. ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* 138: 384–392.

Taiz L y Zeiger E. 2003. Topic: 14. Signal transduction. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Publisher. USA. 623 p.

Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K y Dolan L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*. 319:1241-1241.

Tapia-Hernández A, Mascarúa-Esparza MA y Caballero-Mellado J. 1990. Production of bacteriocins and siderophorelike activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64: 73-83

Tarrand JJ, Krieg NR y Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian journal of microbiology*. 24: 967-980.

Tien TM, Gaskins MH y Hubbell DH. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 37:1016-24.

Tognolli M, Penel C, Greppin H y Simon P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 288: 129–138.

Torres MA. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*. 138: 414–429.

Tsukagoshi H, Busch W, y Benfey PN. 2010. Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell*. 143: 606–616.

Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552, 2, pp335-344.

Tyburski J, Krzeminski L y Tretyn A. 2009. Exogenous auxin affects ascorbato metabolism in roots of tomato seedlings. *Plant Growth Regulation*. 54: 203-215.

Van Loon L.C. 2007. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 243–254.

Vanneste S y Friml J. 2009. Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*. 136.

Veresoglou SD y 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.

Welinder KG. 1992. Plant peroxidases: structure–function relationships. In *Plant Peroxidases* (Penel, C. et al., eds), pp. 1–24, University of Geneva, Switzerland

White PJ y Broadley MR. 2003. Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 92:487-511.

Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 218-223.

Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I, y Pieterse CM J. 2013. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology*. 162:304-318.

Zhi-Xia X, Yi Z, Xiao-li T, Zhao-hu L, Zhong-pei H, Zhi-xi Z y Liu-sheng D. 2006. Effects of Calcium and Auxin on Lateral Roots Initiation of Cotton Seedling. *Cotton Science*. 02.

## **XI. Apéndice**

### **Protocolo No. 1**

#### **Desinfección de semillas de trigo**

##### **Material:**

Vasos de precipitado	Alcohol a 70%
Pinza	Semillas de trigo
Plancha y mosca para agitar	SDS al 1%
H <sub>2</sub> O destilada estéril	Cloro al 1%
Campana de flujo laminar	

##### **Procedimiento:**

- 1.- sumergir las semillas de trigo en una solución de SDS al 1% y agitar durante 3 minutos
- 2.- enjuagar las semillas 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril con 2 minutos en cada tiempo
- 3.- enseguida, sumergir las semillas en una solución de cloro (cloralex) al 1% por 5 minutos
- 4.- enjuagar las semillas 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril con 2 minutos en cada tiempo

##### **Soluciones:**

Cloro: tomar 1 ml de cloro (clorox) y disolverlo en 99 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril

SDS: pesar 1 gr de SDS y disolverlo en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril

## Protocolo No. 2

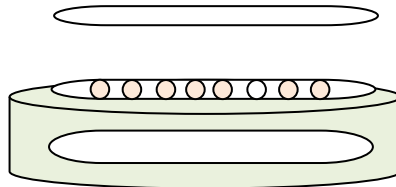
### Germinación de semillas de trigo

#### Materiales

Pinza  
H<sub>2</sub>O destilada estéril  
Pipeta de 10 ml  
Papel filtro y algodón estéril  
Cajas petri

#### Procedimiento:

- 1.- Con una pinza poner el algodón y papel filtro en cajas petri
- 2.- Adicionar 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril
- 3.- Acomodar las semillas previamente desinfectadas en la caja petri
- 4.- Tapar con papel filtro
- 5.- Adicionar 5 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril
- 6.- Sellar la caja e incubarlos a 26 °C en oscuridad durante 3 días o dependiendo del experimento



## Protocolo No. 3

### Crecimiento de plántulas de trigo en medio MS líquido

#### Materiales:

Pinza	Medio ms
Tubos de ensaye estériles	Pipetas de 5 ml
Semillas previamente germinadas	Gradillas
Campana de flujo laminar	Alcohol al 70%

#### Procedimiento:

1. Poner 4 ml de medio ms en cada tubo de ensaye
2. Con la ayuda de una pinza estéril, colocar cuidadosamente las plantas en los tubos de ensaye (uno por cada tubo)
3. Incubarlos en una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 2000 Lux, 26°C con un Fotoperiodo de 16 horas luz-8 horas oscuridad. (Se incuba el tiempo deseado, dependiendo el experimento)
4. Para la infección, se le agrega la cantidad de bacteria al tubo después de haber puesto la planta.

## Protocolo 4

### Preparación de medio MS para 1L

#### Materiales:

Vaso de precipitado

Potenciómetro

Probeta

Stock para medio ms

Mosca y plancha de agitación

#### Procedimiento:

1.- vaciar 900 ml de agua destilada estéril en un vaso de precipitado

2.-adicional los siguientes componentes

Stock I	1 ml
Stock II	10 ml
Stock III	5 ml
Stock IV	1 ml
Stock V	10 ml
Stock VI	10 ml

3.-adicionar 30 gr de sacarosa y agitar con la plancha

4.-ajustar el pH a 5.75

5.-aforar a 1 l y esterilizar a 20 libras de presión por 20 minutos

FIN

## Protocolo No. 5

### Medio LB mínimo (1 L)

#### Materiales:

Micropipetas

Mosca

Vaso de precipitado de 1 o 2 litros

Plancha agitadora

Potenciómetro

H<sub>2</sub>O destilada

#### Procedimiento:

1.-Pesar los siguientes componentes para 1 litro

Reactivos	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cl Na	5 g
Mg SO <sub>4</sub>	0.186 g
Cl <sub>2</sub> Ca	0.2775 g
Agar bacteriológico	15 g

2.-Adicionar 950 ml de agua destilada estéril y disolver completamente

3.- Ajustar el pH a 7 y esterilizar

Nota: el agar se adiciona solo cuando se hace medio solido



## Protocolo No. 6

### Preinóculo e inóculo de *A. brasilense* Sp245

#### Materiales:

Matraces	Incubadora con agitación
Micropipetas y puntas estériles	Tubos de ensaye estéril y gradilla
Aza bacteriológica	<i>A. brasilense</i> crecido en medio sólido (no más de 20 horas)
Medio LB mínimo líquido	
Tetraciclina disuelta en etanol absoluto	

#### Preinóculo

1. Tomar una azada de *A. brasilense* Sp245
2. Inocular en 3 ml de medio LB mínimo líquido suplementado con Tetraciclina a una concentración final de 10 µg/ml.
3. Posteriormente incubar a 28 °C durante 16 horas en agitación constante a 180 rpm.

#### Inóculo

1. Se partió con 50 ml de medio LB mínimo (con la concentración de TC antes mencionada)
2. Adicionar 150 µl del preinóculo con una densidad óptica de 0.900 a 600 nm.
3. Mantener en las mismas condiciones que el Preinóculo pero con 20 horas de incubación.

## Protocolo No. 7

### Preparación de Tetraciclina (TC)

#### Materiales:

Tubos eppendorf	Capsulas de Tetraciclina 500 mg
Micropipetas y puntas estériles	Centrifuga
Campana de flujo laminar	Alcohol al 70%
Etanol absoluto	Vortex

#### Procedimiento:

1. Vaciar el contenido de una capsula de Tetraciclina en un tubo eppendorf
2. Adicionar 1 ml de etanol absoluto
3. Agitar en vortex lo mas que se pueda para disolver
4. Centrifugar el tiempo necesario para precipitar (aprox. 12 000 rpm por 5 min)
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo estéril
6. Mantener la TC preparada a  $-20^{\circ}\text{C}$  (la TC preparada tiene una concentración de 500 mg)

## Protocolo No. 8

### Lavado de bacterias con buffer de fosfato de sodio

**MATERIALES:**

Balanza

Micropipetas

Tubos eppendorf

Microcentrifuga

Vortex

**Reactivos:**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

NaCl

H<sub>2</sub>O**Preparación del Buffer:**

1.- Para 1 litro pesar lo siguiente:

- 0.39 gr de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 8.80 gr de NaCl

2.- Disolver en 1 l de H<sub>2</sub>O destilada estéril

3.- Esterilizar con una membrana de 0.2 µm o esterilizar en autoclave a 20 libras de presión por 20 min

Nota: no es necesario ajustar el pH.

**Lavado de bacterias:**

1.- Tomar 1 ml del cultivo bacteriano y centrifugar a 12000 rpm por 3 min

2.- Eliminar el sobrenadante

3.- Resuspender en 1 ml de buffer de fosfato

4.- Agitar (5 pulsos) con el vortex y centrifugar a 12 000 rpm por 3 minutos

5.- Eliminar el sobrenadante

6.- Repetir el paso 3 y 4 dos veces

7.- Por ultimo resuspender en un volumen final de 1 ml de buffer

Nota: El lavado se hace en condiciones estériles

## Protocolo No. 9

### Detección de anión superóxido en tejido vegetal

Causin H.F. et al., 2012. The control of root growth by reactive oxygen species in *Salix nigra* Marsh. seedlings. *Plant Science*. 183. 197–205

**Materiales:**

Vaso de precipitado

Pinza

Plantas de trigo

Vasos desechables chicos

**Reactivo:**

NBT

Fosfato de sodio 50 mM pH: 7.5

H<sub>2</sub>O

1.- Sumergir las plantas en una solución de NBT al 0.1% disuelto en un buffer de fosfato de sodio 50 mM pH: 7.5

2.- Incubar 15 minutos en oscuridad

3.- Cumpliendo el tiempo, se retira de la solución y se enjuaga ligeramente con H<sub>2</sub>O

4.- Tomar fotografías inmediatamente o puede guardarse a 4 °C sumergidas en agua durante el tiempo necesario

Notas: si las plantas están en alguna solución, se enjuagan suavemente. Si se requiere guardar el tejido, no debe de pasar mucho tiempo para tomarse las fotos (no más de 2 días). Al preparar el NBT debe de estar cubierto con papel aluminio.

## Protocolo No. 10

### Tinción de raíz con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)

<b>Materiales:</b>	Fosfato de potasio
Pinza	Celulasa
Micropipetas	Pectinasa
Vasos de precipitado	Manitol
Bisturí	Triton X-100
<b>Reactivos y material biológico:</b>	DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)
Metanol	Plántulas de trigo
Acido acético glacial	

#### Procedimiento:

1. Fijar el tejido radical con una solución de Metanol:Ácido acético glacial, 3:1 (v/v). (La fijación debe ser por lo menos 24 horas antes de pasar al paso 2. La muestra debe estar almacenada a -20°C hasta su análisis)
2. Lavar tres veces con buffer PBs
3. Transferir el tejido en una solución de enzimas disuelta en buffer PBs pH: 7.3
  - 30 mg de celulasa 0.30%
  - 30 mg de pectinasa 0.30%
  - 720 mg de manitol 0.4 M
  - 10 ml buffer PBs pH: 7.3
4. Incubar a T° ambiente durante 15 minutos y posteriormente lavar tres veces con buffer PBs.
5. Tratar el tejido con 0.5% de triton X-100 disuelto en buffer PBs por 10 minutos y lavar tres veces con PBS.
6. Teñir el núcleo con 1µg/ml de DAPI por 30 minutos a T° ambiente o 30°C

7. Lavar 3 veces con buffer PBS

8. Montar el tejido en portaobjetos con una solución de glicerol al 50% y observar en microscopio con luz UV.

**Nota:** trabajar siempre con guantes debido a que el DAPI es mutagénico.

Buffer de fosfato de potasio (PBS) 25 mM (4.0 g de NaCl; 0.1 g de KCl; 0.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 500 ml de agua destilada estéril, pH 7.3). Antes de tratar con 30 mg de celulasa 0.3 %, 30 mg de pectinasa 0.3 %, 720 mg de manitol 0.4 M, disuelta en 10 ml de PB pH: 7.3.

## Protocolo No. 11

### Tinción de raíz con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)

#### Materiales

Pinza

Micropipetas

Vasos de precipitado

Bisturí

#### Reactivos y material biológico:

Paraformaldehído 4%

Fosfato de potasio 50 mM pH 7

DAPI

Plántulas de trigo

#### Procedimiento:

1. Fijar el tejido radical en una solución de paraformaldehído al 4% (la fijación debe ser por lo menos 24 horas antes de pasar al paso 2. La muestra debe estar almacenada a -20°C hasta su análisis)
2. Lavar 3 veces con buffer de fosfatos (PBS)
3. Teñir el núcleo con 1µg/ml de DAPI por 30 minutos a T° ambiente o 30 °C
4. Lavar 3 veces con buffer PBS
5. Montar el tejido en portaobjetos con una solución de glicerol al 50% y observar en microscopio con luz UV.

**Nota:** trabajar siempre con guantes debido a que el DAPI es mutagénico.

Buffer de fosfato de potasio (PBS) 25 mM (4.0 g de NaCl; 0.1 g de KCl; 0.7 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0.1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 500 ml de agua destilada estéril, pH 7.3).

## Protocolo No. 12

# SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD) DE PLANTAS

### DESCRIPCION

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

La actividad de la enzima se determina por la inhibición de la reducción del reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT).

### Extracción de la enzima:

### EQUIPO:

Mortero

Tubos Eppendorf de 1.5 ml

Vortex

Microcentrífuga Eppendorf

### SOLUCIONES

† Nitrógeno líquido

† **Buffer de extracción:**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 7, 0.1mM de EDTA y 1 % de PVPP

### PROCEDIMIENTO:

1. Moler 0.5 g de tejido con nitrógeno líquido en un mortero frío
2. Resuspender el polvo obtenido con 1 ml de buffer de extracción.
3. Homogeneizar la muestra (agitar en vortex por 15 ó 20 segundos)
4. Centrifugar a 10, 000x g por 5 minutos a 4°C
5. Colocar el sobrenadante (extracto crudo de la enzima) en un tubo Eppendorf y conservar a 4°C.



## A. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD POR ESPECTROFOTOMETRÍA

### EQUIPO

Tubos Eppendorf de 1.5 ml

Lámpara de luz fluorescente de 40 W

Espectrofotómetro

### SOLUCIONES

- † EDTA 0.1 M
- † NBT 1.5 mM
- †  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.067M, pH 7
- † Riboflavina 0.12mM

### PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 10  $\mu\text{l}$  de sobrenadante (extracto crudo de la enzima) en un tubo Eppendorf y adicionar los siguientes reactivos:

40  $\mu\text{l}$  de EDTA (0.1 M)

20  $\mu\text{l}$  de NBT (1.5 mM)

600  $\mu\text{l}$  de buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.067M, pH 7)

2. Agregar 50  $\mu\text{l}$  de riboflavina 0.12 mM, preparada en buffer de extracción y mezclar suavemente.

3. Iluminar los tubos eppendorf con una lámpara de 40 W durante 10 min.

4. Leer absorbencia a 560 nm cada minuto durante los 10 min.

**NOTA:** El NBT y la riboflavina se preparan en buffer de extracción.

## B. ACTIVIDAD EN GEL NO DESNATURALIZANTE

### EQUIPO

Espectrofotómetro

Cámara vertical de electroforesis

Fuente de poder

Lámpara de luz fluorescente de 40 W

Transiluminador de luz blanca

Cámara fotográfica

## **SOLUCIONES**

- † Reactivo de Bradford
- †  $\text{KPO}_4$  32 mM, pH 7.8
- † TEMED 28 mM
- † NBT 2mM
- † Agua destilada estéril
- † Acrilamida 30%
- † Glicerol 25%
- † Riboflavina 28  $\mu\text{M}$

## **PROCEDIMIENTO:**

1. Cuantificar la proteína del extracto crudo por la técnica de Bradford (utilizar una curva estándar de proteína. 0.2 de absorbencia= 5 $\mu\text{g}$  de proteína total).
2. Cargar la proteína en un gel de acrilamida no desnaturizante (60-100  $\mu\text{g}$ ).
3. Correr las muestras a 200 V durante 6 hrs, a 4 $^\circ\text{C}$  (en hielo).
4. Sumergir el gel en 100 ml de buffer de  $\text{KPO}_4$  32 mM, pH 7.8, conteniendo riboflavina 28  $\mu\text{M}$  (preparada en buffer de extracción) y TEMED (28 mM).
5. Incubar en agitación durante 25 min a T $^\circ$  ambiente.
6. Reemplazarla solución con 100 ml de buffer  $\text{KPO}_4$  36 mM, pH 7.8, conteniendo NBT 2mM.
7. Incubar durante 30 min.

8. Exponer el gel en una lámpara fluorescente de 40 W hasta que aparezcan bandas acromáticas (tiempo aprox: 15 min).

## Protocolo No. 13

### Peroxidasa (Prx)

#### Extracción de la enzima

##### EQUIPO

Mortero

Tubos

Eppendorf de 1.5 ml

Vortex

Microcentrífuga Eppendorf

##### REACTIVOS

NaPO<sub>4</sub> 100 mmol, pH 7.0

Nitrógeno líquido

#### PROCEDIMIENTO:

1. Pulverizar 0.5 g de tejido con nitrógeno líquido en un mortero frío.
2. Resuspender en vortex, durante 20 segundos, el macerado en 1 ml de NaPO<sub>4</sub> 100 mmol, pH 7.0
3. Centrifugar 10.000 g por 30 min 4°C. Utilizar el sobrenadante para los diferentes ensayos.

#### A. ACTIVIDAD POR ESPECTROFOTOMETRIA

##### EQUIPO

Celdas de plástico de 1 ml

Espectrofotómetro

##### REACTIVOS

Preparación del buffer de guayacol:

Mezclar los siguientes reactivos:

0.25% de guayacol

0.25% de Na PO<sub>4</sub> (10 mmol/l pH 6.0)

0.125% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**PROCEDIMIENTO:**

1. Tomar 990  $\mu\text{l}$  del buffer de guayacol y adicionarle 10  $\mu\text{l}$  del extracto de la enzima
2. Leer absorbencia a 470 nm, durante 3 minutos a intervalos de 30 seg.

**B. DETECCION DE ACTIVIDAD EN GEL DE PEROXIDASA****EQUIPO**

Cámara de electroforesis vertical  
Fuente de poder  
Agitador orbital o vertical  
Transiluminador de luz banca  
Cámara digital

**REACTIVOS**

Reactivo de Bradford  
Citrato de sodio 50 mM, pH 5.5  
Diaminobenzidina 1 mM  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  0.03%

**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 desnaturizante (~ 90  $\mu\text{g}$ ).
3. Correr las muestras a 100 V por aprox 8 h.
4. Sumergir el gel en citrato de sodio 50 mM, pH 5.5, durante 30 min en agitación constante.
5. Eliminar la solución.

1. Incubar con citrato de sodio conteniendo DAB 1mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03%, hasta que aparezcan bandas de color café.
2. Documentar fotográficamente el resultado.

## Protocolo No. 14

### Cuantificación de proteína por el método de BRADFORD

#### Materiales:

Micropipetas

Celdas de plástico

Espectrofotómetro

Tubos eppendorf

Gradilla chica

#### Reactivos

H<sub>2</sub>O destilada esteril

Reactivo BRADFORD

Extracto de proteína

#### Procedimiento:

1. Como BLANCO, poner 800 µl de H<sub>2</sub>O en un tubo de eppendorf y adicionar 200 µl del reactivo Bradford.
2. Para cuantificar la proteína: poner 790 µl de H<sub>2</sub>O en un tubo eppendorf, enseguida adicionar 10µl de la muestra extracto de proteína y por ultimo adicionar 200 µl del reactivo Bradford.
3. Incubarlos a T<sup>o</sup> ambiente durante 5 minutos.
4. Leer la absorbencia de la muestra por espectrofotometría a 595 nm en celdas de plástico.

Nota: para conocer la cantidad de proteínas totales debemos basarnos en una curva estándar de proteínas. Que es:

Absorbencia	Cantidad de proteína
0.200	5 µg

**Por ejemplo:**

0.600 de absorbencia de la muestra y se quiere saber la cantidad de proteína en esta muestra.

Se hace una regla de tres.

0.200 de abs -----5 µg de prot

0.600 de abs-----15 µg de prot

Estos 15 µg de proteína se dividen por la cantidad de muestra tomada, que son 10 µl.

Entonces:  $15 \mu\text{g} / 10 \mu\text{l} = 1.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$

Por lo tanto tenemos: **1.5 µg de proteína por cada 1 µl de muestra.**



## Protocolo No. 15

### Ascorbato oxidasa

#### Material:

Mortero	Micropipetas
Tubos eppendorf de 1.5 ml	Celdas de cuarzo
Microcentrifuga eppendorf	Espectrofotómetro

#### Reactivos:

Buffere de extracción

100 µl de PMSF 0.5 mM

PVPP 1.5 %

200 µl de fosfato de potasio 20 mM, pH 5.6

Amortiguador: citrato de sodio 0.025 M, fosfato de potasio 0.05 M, pH 5.6

Sustrato: acido ascórbico 0.05%, EDTA disodico 1%, neutralizado (pH 7.0)

Albumina al 1%

#### Procedimiento:

##### a. Extracción de la enzima

1. Pulverizar 0.5 g de tejido fresco con N<sub>2</sub> liquido
2. Pasar la muestra en tubos eppendorf que contienen buffer de extracción a 4°C o hielo
3. Agitar en vortex
4. Centrifugar durante 5 minutos a 12 000 rpm a 4°C.

5. Usar el sobrenadante para hacer el ensayo de actividad enzimática

**b. Medición de la actividad enzimática**

1. preparar la siguiente mezcla de reacción para 1 ml:

938  $\mu\text{l}$  de amortiguador

30  $\mu\text{l}$  de sustrato

15  $\mu\text{l}$  de albumina

2. Agregar 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante (enzima) y medir inmediatamente la absorbencia a 265 nm en una celda de cuarzo.

3. Registrar la absorbencia cada minuto, durante 3 minutos.

La actividad enzimática se obtiene por la disminución de la absorbencia a esa longitud de onda.

Determinar la actividad de la enzima utilizando el coeficiente de extinción para el ácido ascórbico de  $9246 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 265 nm.

El ensayo espectrofotométrico se basa en el hecho de que el ascorbato absorbe a 265 nm, mientras que su producto de oxidación, el dehidroascorbato, no.

## Protocolo No. 16

### Curva estándar para NBT (Nitroazul de tetrazolio ó Nitro Blue Tetrazolium)

Ramel et al., 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*. 9:28

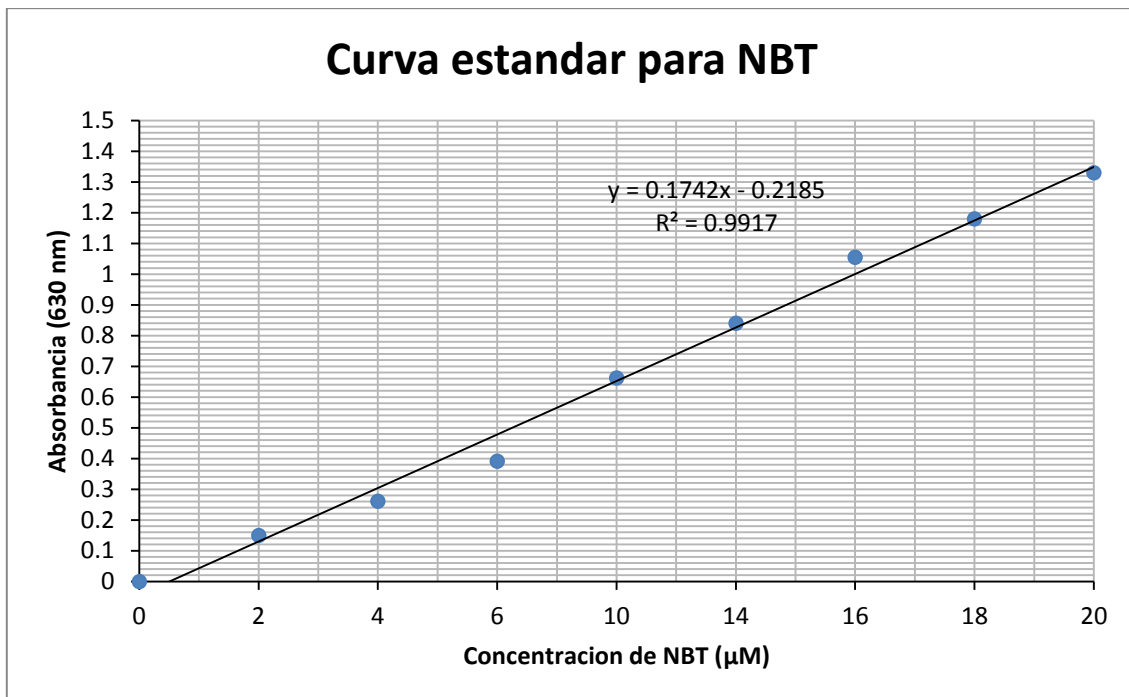
#### Materiales:

Tubos eppendorf	NBT
Micropipetas	KOH
Espectrofotómetro	DMSO

#### Procedimiento:

- 1.- Preparar una solución de NBT 1 mM (1ml) en un tubo eppendorf cubierto en aluminio.
- 2.- Tomar alícuotas de 2-18  $\mu$ l que corresponden a 2-10  $\mu$ M de NBT
- 3.- Disolverlos en 1 ml de la solución 2M de KOH-DMSO (v/v 1:1.16)
- 4.- Agitar e incubar durante 3 minutos en oscuridad
- 5.- Leer la absorbencia 630 nm y graficarlos

Curva estándar:



## Protocolo No. 17

### Aclareo de raíz

Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*.124: 33–44.

#### Materiales:

Micropipetas

Metanol

Cajas de microtitulación

Glicerol al 50%

Incubadora

NaOH

HCl

Etanol

#### Procedimiento:

- 1.- Seleccionar la raíz seminal principal de trigo
- 2.- Sumergir la raíz en una solución de 0.24 N HCl en 20% metanol
- 3.- Incubar a 62 °C por 1 hora
- 4.- Reemplazar la solución con 7% de NaOH en 60% de etanol
- 5.- Incubar 30 minutos a T° ambiente
- 6.- Rehidratar la raíz por 5 minutos con etanol al 40%, 20%, 10% para cada caso.
- 7.- Montar cuidadosamente la raíz en un portaobjetos con glicerol al 50%

