



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**“Participación de la fosfolipasa D durante la interacción de
Azospirillum brasilense Sp245 con la planta de trigo”**

TESIS QUE PRESENTA:

Q.F.B. Roberto Daniel Iñaki Durán Baltazar

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Director de tesis:

D.C. Ernesto García Pineda

Morelia, Michoacán, Agosto 2018.



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORIA DEL D.C. ERNESTO GARCÍA PINEDA Y CON LA BECA 598340 OTORGADA POR EL CONACyT.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Características generales del trigo	3
2.1.1 Clasificación taxonómica	4
2.1.2 Clasificación y cultivo	5
2.2. Bacterias que promueven el crecimiento vegetal (BPCV)	5
2.2.1 Reguladores del crecimiento vegetal	8
2.2.2. Fijación de las rizobacterias a las células vegetales.....	9
2.2.3. Biofertilizantes.	9
2.3 Género <i>Azospirillum</i>	10
2.3.1. Características generales	10
2.3.2. Clasificación taxonómica	11
2.3.3. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal	12
2.3.4. Colonización de raíces por <i>Azospirillum brasilense</i>	13
2.4. Lípidos de señalización	14
2.4.1. Lípidos de membrana	15
2.5. Fosfolipasas	17
2.5.1. Generalidades de las fosfolipasas	17
2.5.2. Fosfolipasa D	18
2.5.3. Clasificación y estructura de la PLD	19
2.5.4. Hidrólisis lipídica, localización y expresión de las PLDs	20
2.5.5. Funciones celulares de la PLD y el AF en las plantas	22
2.5.6. Modo de acción de las PLDs implicadas en la regulación celular	23
2.6. Ácido fosfatídico	24

2.6.1. Origen del ácido fosfatídico.	25
2.6.2. Enzimas que remueven al ácido fosfatídico.....	26
2.6.3 Efectos del AF ácido fosfatídico.....	26
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS.....	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Material biológico.....	31
6.2. Preparación de medio LB mínimo.....	31
6.3. Preparación de preinóculo e inóculo bacteriano	31
6.4. Lavado de células bacterianas	32
6.5. Desinfección y germinación de las semillas de trigo.....	32
6.6. Preparación de medio MS 0.2X.....	33
6.7. Interacción de las plantas de trigo con las bacterias	33
6.8. Análisis de parámetros de crecimiento.	33
6.9. Análisis del contenido de clorofila total.	33
6.10. Análisis de la producción de anión superóxido	34
6.11. Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno.....	34
6.12. Análisis de la inhibición de la fosfolipasa D	35
6.13. Inhibición de la fosfolipasa D	35
6.14. Análisis de ácido ascórbico como sistema antioxidante	35
6.15. Efecto de la adición de ácido fosfatídico sobre el crecimiento de las plantas de trigo.....	36
6.16. Extracción de lípidos.....	36
6.17. Separación de los fosfolípidos mediante cromatografía en capa fina	36

6.18. Cuantificación de ácido fosfatídico.....	37
6.19. Análisis estadístico	37
VII. RESULTADOS.....	38
7.1. Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre plantas de trigo.....	38
7.2. Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre el contenido de clorofila en plántulas de trigo	38
7.4. Efecto de la inhibición con N-butanol sobre la morfología del trigo.	42
7.5. Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción de la planta de trigo con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245.....	43
7.6. Efecto de la inhibición de la PLD sobre el contenido de clorofila total durante la interacción con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245.....	43
7.7. Efecto de la inhibición de la PLD sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.....	44
7.8. Efecto de tratamientos con ácido fosfatídico.	46
7.9. Efecto del ácido fosfatídico en la producción de especies reactivas de oxígeno	48
7.10. Efecto del ácido fosfatídico sobre sistemas antioxidantes no enzimáticos, durante la interacción.	49
7.11. Efecto de las auxinas sobre la actividad de la PLD.	49
7.12. Inhibición de la PLD y su participación en la vía de señalización auxínica ...	50
7.13. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la actividad enzimática de la PLD en plántulas de trigo.....	51
7.14. Efecto del ácido indol-3-acético sobre la actividad enzimática de la PLD	52
VIII. DISCUSIÓN.....	54
IX. CONCLUSIONES	58
X. LITERATURA CITADA.....	59

XI. APÉNDICE.....	73
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Posibles mecanismos de acción usados por las BPCV.	8
Fig. 2. <i>Azospirillum brasilense</i>	10
Fig. 3. Efecto de las auxinas producidas por <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 y FAJ0009.....	13
Fig. 4. Composición de los glicerofosfolípidos	16
Fig. 5. Fosfolipasas vegetales.....	17
Fig. 6. Estructura y dominios de las PLD codificadas por <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
Fig. 7. Fosfolipasas en respuestas de estrés vegetal.	21
Fig. 8. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (<i>A. brasilense</i> Sp245) en plantas de trigo.	34
Fig. 9. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (<i>A. brasilense</i> Sp245) sobre el contenido de clorofila..	35
Fig. 10. Efecto de la inhibición de la PLD mediante alcoholes primarios en plantas de trigo.	36
Fig. 11. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo	37
Fig. 12. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo en interacción con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	39
Fig. 13. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo sobre el contenido de clorofila.....	40
Fig. 14. Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 en plantas de trigo sobre la producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	41
Fig. 15. Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción con <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 en plantas de trigo sobre la producción de anión superóxido (O ²⁻)..	42
Fig. 16. Efecto de la actividad de la PLD mediante la adición de ácido fosfatídico de manera exógena	43

Fig. 17. Efecto de la acción de la PLD, sobre la producción de peróxido de hidrógeno y anión superóxido	44
Fig. 18. Efecto de la acción de la PLD, sobre sistemas antioxidantes.	45
Fig. 19. Efecto de las auxinas producidas por <i>Azospirillum brasilense</i> en la arquitectura del sistema radical.....	46
Fig. 20. Inhibición de la PLD y su participación sobre la vía de señalización auxínica relacionada con el cambio sobre la arquitectura radicular	47
Fig. 21. Efecto de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 sobre la actividad enzimática de PLD.	48
Fig. 22. Efecto del ácido indol-3-acético sobre la actividad enzimática de PLD..	49

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I. Efectos fisiológicos de la manipulación de diferentes PLD en <i>Arabidopsis</i>	21
---	----

RESUMEN

Las rizobacterias son de gran importancia para las plantas porque les proporcionan resistencia a diversos tipos de estrés, activando vías enzimáticas de señalización, y mejoran su valor nutricional. En este estudio se analizó la participación de la fosfolipasa D (PLD) durante la interacción de la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* Sp245 con la planta de trigo (*Triticum aestivum*). Se inoculó la bacteria a diferentes concentraciones, observándose que con la concentración de 1×10^6 UFC se producían cambios en la arquitectura radicular. También se aplicó N-butanol a diferentes concentraciones durante la interacción. Esta molécula es un inhibidor de la síntesis de ácido fosfatídico (AF), producto principal de la actividad enzimática de la PLD. Con la aplicación del inhibidor N-butanol, se observó una disminución en el crecimiento foliar así como de la raíz. Durante la adición exógena de diferentes concentraciones del AF, después de la adición del inhibidor, no se observaron cambios morfológicos visibles en las plántulas, de igual manera que al analizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se observó una disminución en la producción de AF en la raíz de trigo en presencia de la rizobacteria y con la adición de ácido indol-3-acético. Los resultados obtenidos sugieren que la inoculación de plántulas de trigo con *Azospirillum brasilense* Sp245 disminuye la actividad enzimática de la PLD.

Palabras clave: rizobacteria, trigo, *Azospirillum brasilense* Sp245, fosfolipasa D, ácido fosfatídico.

ABSTRACT

The rhizobacteria are important to plants because they provide resistance to various kinds of stress, activating enzymatic and signaling pathways, as well as improving their nutritional value. In this study the participation of phospholipase D (PLD) during the interaction of the plant growth promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 with wheat (*Triticum aestivum*) was analyzed. The rhizobacteria was inoculated at different concentrations, and changes in the radical architecture at 1×10^6 CFU were observed. Also, treatment with N-butanol at different concentrations was performed during the plant-microorganism interaction. This molecule is an inhibitor of the phosphatidic acid synthesis (PA), the main product of the enzymatic activity of the PLD. Its treatment showed a decrease in plant growth in both leaf area as well as the root. Different PA concentrations did not affect morphogenesis or the production of reactive oxygen species (ROS). A decrease in the PA production in wheat root was observed in presence of the rhizobacteria, and after treatment with indol-3-acetic acid. The results suggest that the inoculation of wheat seedlings with *Azospirillum brasilense* Sp245 decrease the enzymatic activity of PLD.

Keywords: rhizobacteria, wheat, *Azospirillum brasilense* Sp245, phospholipase D, phosphatidic acid.

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las principales actividades humanas que contribuyen más al incremento en las cantidades de contaminantes químicos mediante el uso de fertilizantes químicos sintéticos y pesticidas, los cuales causan también daño ambiental con potenciales riesgos hacia la salud humana. Para una sustentabilidad agrícola, los cultivos necesitan tener resistencia a enfermedades, tolerancia a la salinidad, sequía, estrés por metales pesados, y mejorar su valor nutricional (Draft U.S.).

La rizosfera es una zona dinámica de interacción de las raíces de las plantas con microbios, insectos y el suelo. Las respuestas de las plantas contra un amplio grupo de patógenos incluyendo hongos, bacterias e insectos se llevan a cabo en esta zona (Hirsch *et al.*, 2003). Las plantas liberan una gran diversidad de compuestos a través de exudados radiculares, mucílago, compuestos volátiles orgánicos y metabolitos de daño tisular, los cuales pueden atraer a una gran diversidad de microorganismos que pueden colonizar los alrededores circundantes a la raíz (Jones, *et al.*, 2009).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV, PGPR por sus siglas en inglés) pueden ser utilizadas para mejorar la salud y promover el crecimiento de las plantas disminuyendo la contaminación ambiental (Calvo *et al.*, 2014).

II. ANTECEDENTES

2.1 Características generales del trigo

El trigo es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia *Poaceae* (*Gramineae*) (Arendt y Zannini, 2013) de hasta 150 cm de altura; los tallos son erectos y presentan estructura de caña, es decir están huecos en su interior excepto en los nudos. El crecimiento de los tallos no es apical sino que se produce por el estiramiento de los tejidos situados por encima de los nudos. Las hojas nacen de los nudos. Al igual que el resto de las gramíneas, presentan dos partes: la vaina que rodea al peciolo y protege al meristemo o zona de crecimiento y el limbo que tiene forma alargada y presenta nervios paralelos. Las flores se reúnen en espigas. Cada espiga consta de un eje principal sobre las que se distribuyen lateralmente las

espiguillas. Estas constan de un eje principal del que nacen unos filamentos terminados por las glumas que encierran las flores hasta que estas empiezan a madurar. Además de las glumas, las flores se encuentran protegidas por otras dos brácteas: la palea y la lema (Botanical-online).

Las flores son muy poco vistosas. No presentan pétalos ni sépalos, cada flor femenina consta de un ovario del que salen dos estilos terminados en dos estigmas plumosos. Las flores masculinas presentan tres estambres que pueden ser dorados, verdes o violetas. La fecundación o maduración del óvulo produce el grano de trigo, un fruto del tipo cariósipide (Botanical-Online).

El trigo mayormente cultivado actualmente es el diploide *T. monococcum* (trigo Einkorn, $2n=14$, genéticamente descrito como plantas AA), los tetraploides *T. dicoccum* (trigo emmer) y *T. durum* (trigo para pasta o trigo duro) ($2n = 28$, genéticamente descritos como plantas AABB) y los hexaploides *T. aestivum* (trigo suave o trigo panadero) y *T. spelta* (spelt) ($2n = 42$, genéticamente descritos como plantas AABBDD) (Peña, 2017).

2.1.1 Clasificación taxonómica

Superreino: Eucaria

Reino: Viridiplantae

División: Magnoliophyta

Filo: Streptophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Triticum*

Especie: *Triticum aestivum*

2.1.2 Clasificación y cultivo

El trigo actualmente cultivado es el hexaploide *T. aestivum* (trigo blando o trigo panadero). Actualmente, cerca del 95% de este cereal cultivado en todo el mundo es el trigo panadero, la mayoría del 5% restante es utilizado para la elaboración de pasta (Szabó & Hammer, 1995).

Para fines de negociación este se clasifica en distintas categorías según la dureza del grano (suave, medio y duro) y el color (rojo, blanco y ámbar). Puede subdividirse en subclases basadas en el hábito de crecimiento (primavera o invierno).

Cada subclase se puede agrupar en grados, que generalmente se utilizan para ajustar el precio de base de un depósito de trigo mediante la aplicación de las primas o sanciones. Dichos grados son indicadores de la pureza de una clase o subclase, existen diversos factores externos que afectan la solidez del grano (lluvia, el calor, las heladas, insectos y moho) y la limpieza (atraque y materiales extraños) del lote. Hoy en día, el trigo es un componente importante de la mayoría de las dietas del mundo debido a su alta adaptabilidad agronómica, la calidad nutricional, el hecho de que se puede almacenar de manera efectiva indefinidamente antes de su consumo (siempre que el contenido de agua esté por debajo del peso seco de 15% y se controlen las plagas) y la capacidad de su harina para producir una variedad de alimentos satisfactorios, interesantes y agradables al paladar (Arendt y Zannini, 2013).

2.2. Bacterias que promueven el crecimiento vegetal (BPCV)

La agricultura es una de las actividades humanas que contribuye con el incremento de la cantidad de contaminantes debido al uso excesivo de fertilizantes químicos y pesticidas, los cuales causan además daño ambiental con potenciales riesgos a la salud humana dependiendo del tipo y tiempo de exposición, pueden presentarse desde desórdenes digestivos, trastornos respiratorios hasta problemas reproductivos, cáncer, trastornos del sistema nervioso y efectos sobre el sistema inmunológico y endocrino (Bertolote *et al.*, 2006; WHO, 2006; UNEP-UNICEF, 2002).

Para mejorar la sustentabilidad, los cultivos necesitan tener resistencia a las enfermedades, salinidad, sequía, metales pesados, y debe poseer un mejor valor nutricional (Armada *et al.*, 2014). Las BPCV pueden ser usadas para mejorar la salud y el crecimiento vegetal sin contaminación ambiental (Calvo *et al.*, 2014).

Las BPCV son un grupo de bacterias que viven en simbiosis con las plantas y contribuyen a su crecimiento. Las BPCV existen también como rizobacterias residentes del suelo que pueden colonizar las raíces para entrar en su estado endofítico (Compant *et al.*, 2010). Estas llevan a cabo una gran variedad de actividades tales como la adquisición de nitrógeno, producción de fitohormonas, protección mediante el control de patógenos y mejorando el consumo de minerales (Compant *et al.*, 2010). Resultante de este respuesta simbiótica, las rizobacterias encuentran refugio en las raíces (Gray y Smith, 2005).

Las rizobacterias benefician a las plantas a través de varios mecanismos. Estos incluyen: a) la habilidad de producir reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas tales como el ácido indol-3-acético (AIA), citocininas y giberelinas (Glick, 1995; Marques *et al.*, 2010), b) mejorando la fijación de nitrógeno (Sahin *et al.*, 2004), c) solubilizando fosfato inorgánico y mineralización de fosfato orgánico y/o de otros nutrientes (Glick, 1995; Jeon *et al.*, 2003), d) efecto antagonista contra microorganismos fitopatógenos por la producción de sideróforos, la síntesis de antibióticos, enzimas y/o compuestos fungicidas, así como por la competición de nutrientes con microorganismos perjudiciales (Dey *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004) (Fig. 1).

Se han estudiado por décadas las BPCV, algunas de ellas incluso han llegado a comercializarse para su uso como biofertilizantes, de estas BPCV integradas a estos productos podemos incluir bacterias de los géneros, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Variovorax*, *Azospirillum* y *Serratia* (Glick, 2012).

La utilización exitosa de las BPCV es dependiente de su sobrevivencia en el suelo, la compatibilidad con el tipo de cultivo en el cual es inoculado, la habilidad de interacción con microbiota, y factores ambientales como las condiciones del suelo,

temperatura, humedad, entre otros (Martinez-Viveros *et al.*, 2010). Las BPCV no solamente están asociadas con la raíz para ejercer efectos benéficos sobre el desarrollo vegetal, aunque se ha observado que también tienen efectos positivos sobre el control de microorganismos fitopatogénicos dentro de los que se incluyen bacterias, hongos, parásitos y algunos virus (Kloeper *et al.*, 1980; Son *et al.*, 2014). Las BPCV se pueden agrupar en bacterias simbióticas, las cuales habitan dentro de las plantas e intercambian metabolitos con ellas directamente, y las rizobacterias de vida libre, las cuales viven fuera de las células vegetales (Gray, *et al.*, 2005). Los mecanismos de acción de las BPCV pueden ser clasificados en directos e indirectos. Los mecanismos directos son la biofertilización, estimulación del crecimiento radicular, rizoremediación y control del estrés vegetal. Los mecanismos indirectos involucran la reducción del impacto de las enfermedades, las cuales incluyen la antibiosis, la inducción de resistencia sistémica, y competencia por nutrientes y nichos (Fig. 1) (Egamverdieva *et al.*, 2014).

Las plantas exudan una gran diversidad de nutrientes orgánicos (ácidos orgánicos, fitosideróforos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos, mucílago) y desencadenan señales que atraen a las poblaciones microbianas, especialmente aquellas capaces de metabolizar compuestos exudados y proliferan en ese hábitat (Bais *et al.*, 2006; Pothier *et al.*, 2007; Bradi *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2011; Drogue *et al.*, 2013).

La mayoría de las plantas terrestres desarrollan su sistema radicular para explorar el suelo, encontrar nutrientes y por lo tanto sustentar su crecimiento. La raíz es un órgano complejo compuesto de distintas regiones tales como la punta, el meristemo, las zonas de diferenciación y elongación, y las raíces laterales emergentes (Scheres *et al.*, 2002). Esas regiones tienen distintos papeles. Por ejemplo, los pelos radiculares son células epidérmicas diferenciadas importantes para la nutrición mineral de la planta, como infieren estudios de expresión genética (Lauter *et al.*, 1996; Von Wiren *et al.*, 2000).

2.2.1 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias que regulan el crecimiento de las plantas. La más activa de las auxinas es el ácido indol-3-acético (Hayat *et al.*, 2010). Una baja cantidad de AIA puede estimular la elongación de la raíz primaria, mientras que altos niveles de AIA disminuyen la longitud, incrementando la formación de pelos radiculares y estimulando la formación de raíces laterales.

Las giberelinas (AG) están relacionadas con procesos de germinación de semillas y emergencia, inducción floral, desarrollo de flores y frutos y crecimiento de tallo y hojas (Bottini *et al.*, 2004), Sin embargo, el mayor efecto fisiológico dominante del AG es la elongación del brote (Spaepen *et al.*, 2011). Las citocininas estimulan la división de las células vegetales y la diferenciación vascular e inducen la proliferación de pelos radiculares, pero a su vez inhiben la formación de raíces laterales y la elongación de la raíz primaria (Fig. 1) (Sabry *et al.*, 1997; Riefler *et al.*, 2006). El etileno promueve la maduración de los frutos o la abscisión de las hojas (Reid, 1981).

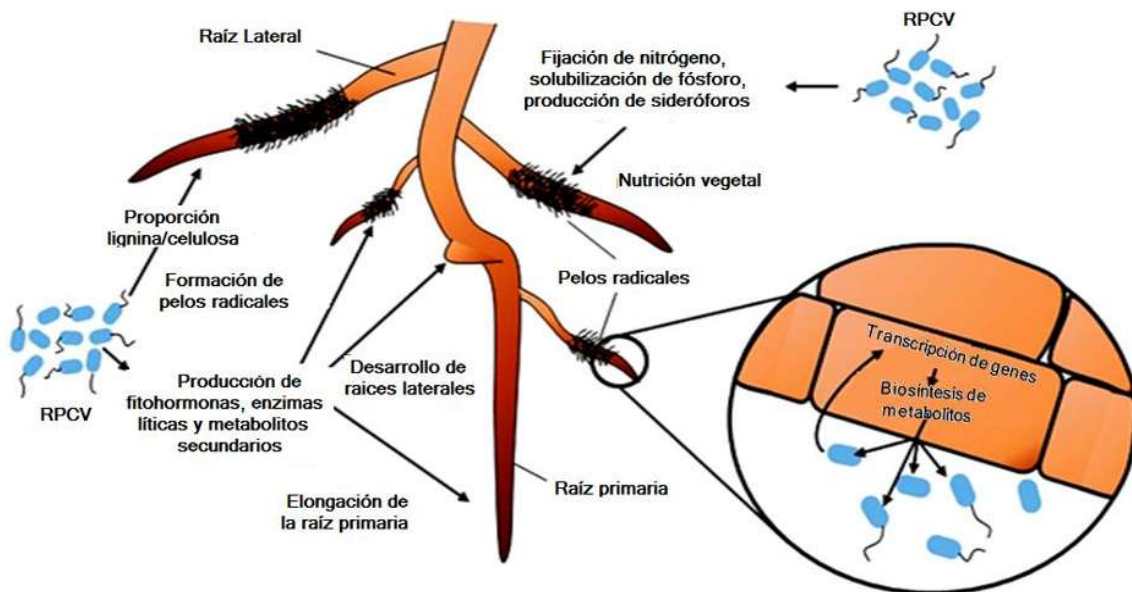


Fig. 1. Mecanismos de acción de las rizobacterias. Modificado de (Vacheron, *et al.*, 2013).

2.2.2. Fijación de las rizobacterias a las células vegetales

Una variedad de compuestos tales como las proteínas de superficie y polisacáridos, han sido implicados en la adherencia de muchas RPCV a las raíces de las plantas. La importancia de la fijación bacteriana en las interacciones planta-BPCV ha sido intensivamente estudiada en *Azospirillum* y *Pseudomonas*. La fijación de *Azospirillum brasilense* a las células de la raíz de trigo (*Triticum aestivum*) puede ser dividida en dos diferentes pasos (Michiels *et al.*, 1991). El primer paso es débil, reversible y de unión inespecífica la cual llevan a cabo proteínas de superficie bacteriana y los flagelos. Los flagelos polares de *A. brasilense* contienen un componente de adhesina que está involucrado en la fijación bacteriana a las raíces de trigo. La segunda fase de fijación parece ser irreversible. Esto ocurre de 8 a 16 horas después de la inoculación y es mediada por los polisacáridos de la superficie bacteriana. Las células de *Azospirillum irakense* son encontradas principalmente en pelos radiculares de arroz, mientras células de *A. brasilense* son principalmente localizadas en las superficies de las raíces de plantas de trigo y caña de azúcar (Zhu *et al.*, 2002).

2.2.3. Biofertilizantes.

Los biofertilizantes pueden ser definidos como productos que contienen microorganismos vivos, cuando son aplicados a las semillas, superficies vegetales o el suelo, colonizan la rizosfera o el interior de las células vegetales promoviendo el crecimiento, debido principalmente al suministro o mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes primarios (Vessey, 2003). Se ha propuesto que los biofertilizantes pueden contener en su formulación uno o más microorganismos que mejoran el estado nutricional (crecimiento y rendimiento), ya sea por el remplazo de nutrientes del suelo y/o haciendo que los nutrientes sean más disponibles así como el mejoramiento del transporte de los nutrientes necesarios para hacerlos más accesibles (Malusá y Vassilev, 2014).

2.3 Género *Azospirillum*

2.3.1. Características generales

El género *Azospirillum* pertenece a la clase de las Alfabroteobacterias. Son consideradas bacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno, son consideradas bastones o bacilos con forma de vibrión o espirilo, las cuales producen flagelos polares y peritricos dependiendo del medio en el que se encuentren (Fig. 2) (Baldani *et al.*, 2005)

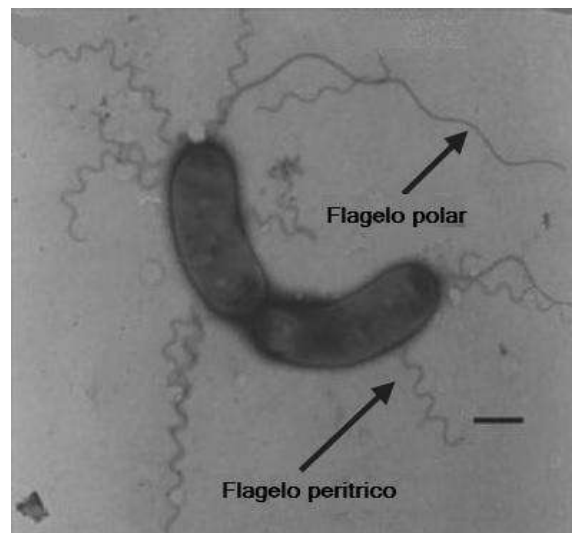


Fig. 2. *Azospirillum brasilense*, con sus característicos flagelos polares y peritricos, además de su forma vibroide (Fibach-Paldi *et al.*, 2012).

El género *Azospirillum* prospera en la rizosfera de diversos ambientes (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Son capaces de llevar a cabo todas las vías del ciclo del nitrógeno, excepto la nitrificación. Este microorganismo es típicamente quimioorganotrofo; produce fitohormonas tales como las auxinas, giberelinas y citocininas; fija N_2 bajo condiciones tropicales (30-40°C); puede colonizar los tejidos del maíz, trigo, arroz, sorgo y plantas no gramíneas como endófitos facultativos, y se encuentran en su mayoría como diazótrofos rizosféricos (Döbereiner *et al.*, 1987). Las bacterias del género *Azospirillum* se encuentran casi en cualquier lugar sobre la tierra. Contrario a las bacterias simbióticas, como *Rizobium* que secreta

prácticamente todo el nitrógeno fijado cuando se encuentra en simbiosis; los diazótrofos tienen una limitada, pero significativa capacidad para secretar o transferir el nitrógeno fijado a la planta asociada. El papel importante de *A. brasilense* y otras especies de *Azospirillum* como bacterias que promueven el crecimiento vegetal es también debido a la producción de fitohormonas y a la protección contra fitopatógenos. La especie mejor estudiada es *A. brasilense* cepa Sp7.

La inoculación de las plantas, principalmente cereales y gramíneas, con *A. brasilense* estimula el desarrollo del sistema radicular, lo cual se observa en el incremento de la densidad, longitud de los pelos radiculares y en el número y volumen de las raíces laterales, además de que se observan incrementos significativos en la absorción de nutrientes por la planta hospedera (K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , H_2O , etc.); aumento en la resistencia al estrés hídrico (resistencia a la sequía); en la respiración de la raíz a través de la activación de enzimas de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico, así como en el diámetro del brote y ancho de la hoja en el maíz; en la aceleración de la movilización de nitrógeno de semillas y plántulas crecidas (precocidad incrementada) y también se observa una floración temprana. Además, provee protección contra patógenos, inducción del transporte de amonio, aumenta el proceso de nodulación de leguminosas tras la co-inoculación con *Rizobia* (Huergo *et al.*, 2005; Huergo *et al.*, 2003). Se han descrito cerca de 16 especies de *Azospirillum* hasta el momento, sin embargo, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, han sido estudiados en más detalle que otros (Baldani *et al.*, 2005).

2.3.2. Clasificación taxonómica

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*

2.3.3. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

A pesar de estudios intensivos, aún no se conocen todos los mecanismos que utiliza *Azospirillum* para promover el crecimiento. Sin embargo, se sabe que esta bacteria afecta muchas vías metabólicas, incluyendo la actividad de la membrana celular. La mayor consecuencia aparente de la inoculación son cambios en la morfología del sistema radicular (tanto positivo como negativo). Aquellas que fueron inoculadas tienden a absorber minerales y agua de una manera más eficiente (Bashan y Levanony, 1990). Uno de los primeros mecanismos propuestos para explicar la capacidad de *Azospirillum* sp. para promover el crecimiento, fue la fijación biológica de nitrógeno (Okon *et al.*, 1983).

Otro mecanismo propuesto se relaciona con su habilidad para producir y metabolizar diversas fitohormonas y otras moléculas reguladoras del crecimiento (Tien *et al.*, 1979). La producción de sideróforos, la solubilización de fosfato (Puente *et al.*, 2004) y el biocontrol de fitopatógenos (Bashan y de-Bashan, 2010), así como la protección contra tipos de estrés abiótico tal como la salinidad o compuestos tóxicos (Creus *et al.*, 1997) son otros mecanismos importantes involucrados en la promoción del crecimiento vegetal.

Tien *et al.* (1979), fueron los primeros en sugerir que el género *Azospirillum* sp. puede mejorar el crecimiento mediante la síntesis de auxinas, particularmente por la producción del ácido indol-3-acético (AIA), además, estudios subsecuentes mostraron la capacidad de este género para producir fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal (Bashan y de-Bashan, 2010; Spaepen *et al.*, 2007). En *Azospirillum brasilense* el 90% del AIA es producido por la vía del 3-indol piruvato, en la presencia de triptófano (Trp) en la cual, la triptófano transaminasa convierte el Trp en ácido indol-3-pirúvico, después mediante la acción de la ácido-3-indol piruvato decarboxilasa produce el indol-3-acetaldehído, el cual produce a su vez ácido indol-

3-acético por la acción de la indol-3-acetaldehído dehidrogenasa. (Van den Broek *et al.*, 2005).

Existen reportes donde se demuestra que la inoculación con la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 mejora la formación de pelos radiculares, mientras que una cepa mutante de *A. brasilense* Sp245, con una gran reducción en la capacidad de producción de AIA, no lo hace (Fig. 3) (Dobbelaere, *et al.*, 1999). Esto demuestra el importante papel del AIA producido por *A. brasilense* sobre la modificación en la morfología de las raíces de trigo (Prinsen *et al.*, 1993).

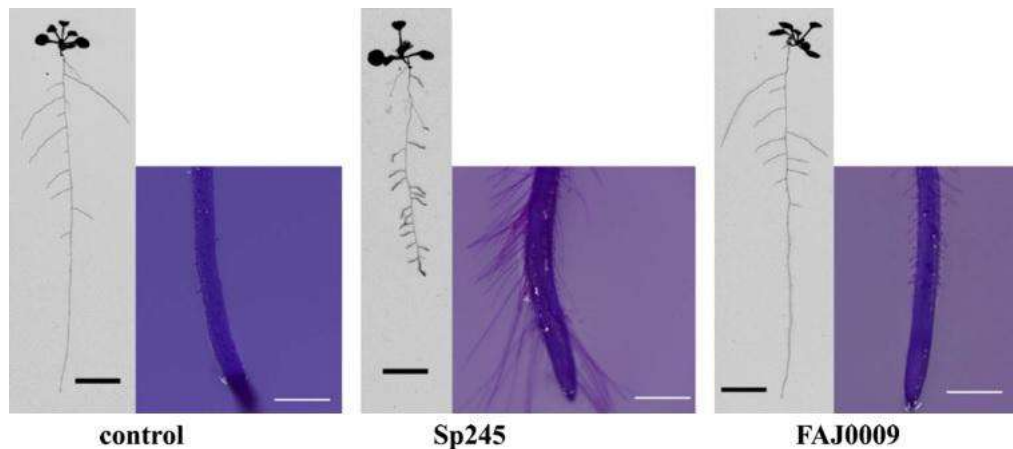


Fig. 3 Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 y la mutante FAJ0009 deficiente en la producción de AIA, sobre la arquitectura de la raíz y el área foliar de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Spaepen *et al.*, 2014).

2.3.4. Colonización de raíces por *Azospirillum brasilense*

Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* posee la capacidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo (*Pennisetum purpureum*) el pasto pangula (*Digitaria decumbens*) (Umali-García *et al.*, 1980), trigo (*Triticum aestivum*) (Jain y Patriquin, 1984), y maíz (*Zea Mayz*), (Gafny *et al.*, 1986). La facilidad de *Azospirillum* para adherirse a las raíces, al menos a las de mijo, es significativamente mayor que la mostrada por otras bacterias de la comunidad rizosférica como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* e incluso que *E. coli* (Umali-García *et al.*, 1980).

La asociación de *Azospirillum* con las raíces se desarrolla en dos etapas completamente independientes (Michiels *et al.*, 1991). La primera consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar (Croes, *et al.*, 1993).

La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 h después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular rico en ramnosa y arabinosa, ya que esta última juega un papel importante en la determinación de la capacidad de agregación de *Azospirillum brasilense* (Michiels *et al.*, 1991; Burdman *et al.*, 2000). Los resultados de un estudio reciente sugieren la posibilidad de que una proteína de la membrana externa del tipo porina de *Azospirillum* para participar en el proceso de adherencia a las raíces (Burdman *et al.*, 2000).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radiculares (Levanony y Bashan, 1991). Sólo pequeñas cantidades de *Azospirillum* llegan a adherirse a la cofia o a los pelos radiculares (Kapulnik *et al.*, 1985). Sin embargo, se ha observado la presencia de *Azospirillum* dentro del mucigel que se acumula en la cofia (Umali-García *et al.*, 1980). Debido a que *Azospirillum* exhibe actividad pectinolítica, se ha propuesto un rol activo de *Azospirillum* en la penetración de los pelos radiculares y otras células (Sprent, 1979). La localización de *Azospirillum* en las regiones internas de la raíz puede ser para facilitar el eficiente intercambio de sustratos y productos entre *Azospirillum* y el hospedero (Crawford, 1976). Además, tiene la capacidad de degradar la pared celular, sugiriendo que *Azospirillum* puede colonizar el interior de la raíz a través de la degradación de los componentes de la pared celular de la raíz.

2.4. Lípidos de señalización

Los lípidos son biomoléculas encontradas en todos los tejidos vegetales. Son los componentes mayores de las biomembranas. Algunos de ellos son precursores para llevar a cabo la síntesis de moléculas de señalización (Fahy *et al.*, 2005).

Como organismos sésiles, las plantas están expuestas a muchos tipos de estrés biótico y abiótico, las cuales perciben estos estímulos casi siempre a través de la membrana plasmática y transducen la señal hacia respuestas biológicas al interior de la célula, a través de los lípidos de señalización. Estos son usualmente generados por enzimas específicas como las fosfolipasas, las cinasas lipídicas o las fosfatasas. Las moléculas de señalización de lípidos se acumulan transitoriamente y tienen una rápida movilización (Testerink y Munnik, 2005).

Estas moléculas de señalización incluyen un amplio rango de productos lipídicos, tales como lisofosfolípidos, ácidos grasos, ácido fosfatídico, inositol fosfato, diacilglicerol, oxilipinas, esfingolípidos y n-aciletanolamina. Estos están usualmente presentes en pequeñas cantidades en los tejidos y son rápidamente sintetizados a partir de lípidos de membrana pre existentes o intermediarios biosintéticos (Wang, 2004; Munnik y Testerink, 2009).

La señalización por lípidos ofrece el mecanismo perfecto para la transmisión de información entre la membrana plasmática, el citosol y otros orgánulos, particularmente el núcleo. Las membranas son sitios donde muchas señales son percibidas por la célula y ofrece un ambiente único para una actividad enzimática inducible (Horvath *et al.*, 2012).

2.4.1. Lípidos de membrana

Las plantas contienen un diverso grupo de lípidos, incluyendo ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides, esfingolípidos y ceras. Están constantemente expuestas al suelo, agua y aire, de manera que interactúan con una multitud de microorganismos, los cuales pueden ser mutualistas, parásitos o patógenos. Cuando las plantas entran en contacto con microorganismos se intercambia información molecular entre el hospedero y el invasor. Las ceras cuticulares establecen una barrera física sobre las superficies celulares epidermales, modulan la comunicación entre el hospedero y el microorganismo, afectan el desarrollo del patógeno, sirven como moléculas de señalización o proveen elicitores para el reconocimiento de ataques de patógenos (Jones y Dangl, 2006).

Los elicitores son compuestos que inducen señales las cuales son reconocidas por el sistema inmune innato, resultando en la inducción de una respuesta de defensa.

Estos inductores pueden ser derivados de plantas o de microorganismos. La percepción de estas moléculas desencadena respuestas inducidas por patrones moleculares asociados a microorganismos o patógenos (MAMPs /PAMPs). Estas moléculas son casi siempre reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (RRP), los cuales se encuentran en la membrana plasmática, y estas respuestas deben ser suprimidas para una reproducción exitosa de patógenos en el hospedero (Jones y Dangl, 2006)

Las membranas lipídicas son estructuras importantes en las células vegetales durante la respuesta a ataques microbianos y durante la interacción con microorganismos benéficos. La expresión de muchos genes que codifican enzimas para el metabolismo de lípidos es regulada después de la infección de las células vegetales, resultando en la síntesis, modificación o re-asignación de moléculas derivadas de los lípidos. Las enzimas que modifican los lípidos son reguladores esenciales de la producción espacial y temporal de metabolitos lipídicos involucrados en la señalización y proliferación de membrana, es decir, incrementar la cantidad de lípidos de membrana para el establecimiento de compartimentos intracelulares o para llevar a cabo cambios de composición de estas barreras lipídicas (Zhao *et al.*, 2013).

Los fosfolípidos son considerados como bloques de construcción de las membranas celulares y también son utilizados para la generación de mediadores intracelulares. El tipo y contenido de fosfolípidos difieren entre membranas y cambia durante el desarrollo celular y en respuesta a señales de estrés. En las plantas, el fosfolípido más abundante es la fosfatidilcolina (FC) (Wang *et al.*, 2012).

Los fosfolípidos contienen dos ácidos grasos esterificados a la posición Sn-1 y Sn-2 en un esqueleto de glicerol, y un grupo principal polar adjunto a la posición Sn-3. Los fosfolípidos de plantas principalmente comprenden el ácido fosfátidico (AF), fosfatidilserina (FS), fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilglicerol (FG) y fosfatidilinositol (FI) (Fig. 4). Cada clase incluye una amplia variedad de especies moleculares debido a la variación en la longitud de los ácidos grasos y al grado de desaturación. Estas moléculas son predominantemente sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) (Quancan *et al.*, 2016).

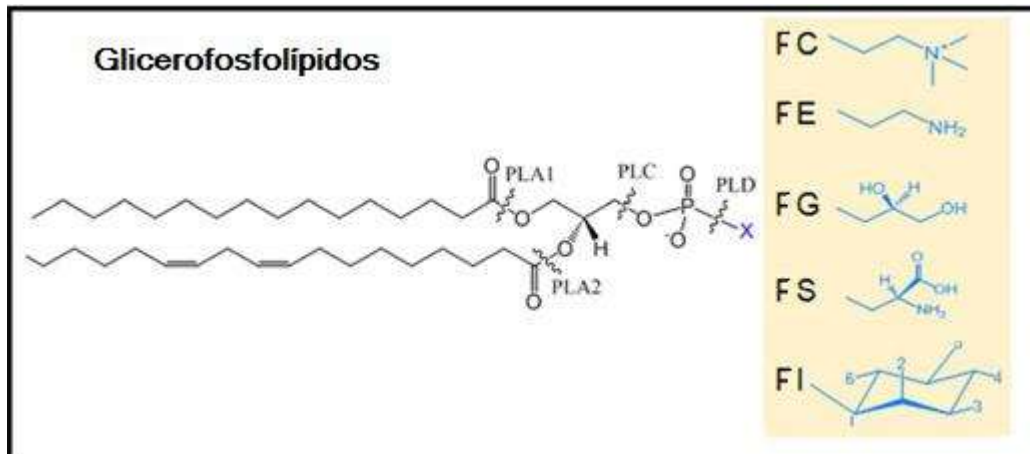


Fig. 4 Composición de los principales glicerofosfolípidos, la “x” representa el grupo principal mostrado en color azul, además, se muestran los sitios de acción de las diferentes fosfolipasas. Modificado de (Quancan *et al.*, 2016).

2.5. Fosfolipasas

2.5.1. Generalidades de las fosfolipasas

Las cascadas de señalización de fosfolipasas son normalmente clasificadas de acuerdo a la modificación del fosfolípido involucrado (Zhu, 2002), fosfolipasa D (PLD), C (PLC), A1 (PLA₁) y A2 (PLA₂). PLC y PLD escinden en el primer y segundo enlace fosfodiéster, respectivamente, mientras que las PLA, rompen las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Fig. 5). Las fosfolipasas de origen vegetal participan en diferentes procesos celulares y fisiológicos, los cuales son clasificados dentro de tres categorías: regulación celular, remodelación de la membrana lipídica y degradación de lípidos; además, algunas de ellas pueden participar en la biosíntesis de lípidos de reserva (Wang *et al.*, 2012).

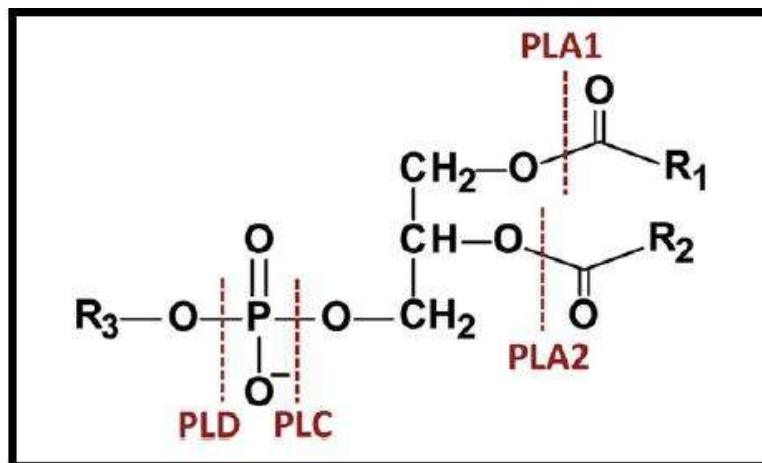


Fig. 5 Fosfolipasas vegetales. Sitios de acción de cada una de las PLD (Maiké, *et al.* 2016).

Dentro de cada tipo hay diferentes familias o subfamilias de enzimas que difieren en su estructura, selectividad por diferentes sustratos, requerimiento de co-factores y/o condiciones especiales de reacción. Estudios sobre la actividad enzimática y su inhibición indican que las fosfolipasas tienen diversos papeles en el crecimiento, desarrollo vegetal y durante respuestas a estrés de tipo biótico y abiótico (Wang *et al.*, 2012; Wang X., 2004).

2.5.2. Fosfolipasa D

La fosfolipasa D (PLD) hidroliza diferentes fosfolípidos de membrana, produciendo ácido fosfatídico (AF) y varios grupos principales, tales como colina y etanolamina. La PLD tiene funciones diversas en el metabolismo y regulación celular, desde señalización hormonal (ácido abscísico, jasmonato, auxinas y ácido giberélico) hasta respuestas a estrés ambiental (sequía, congelación, corte, intoxicación por metales pesados y deficiencia de fósforo) (Wang *et al.*, 2006).

Los diferentes tipos de fosfolipasas parecen tener diversas funciones, pero se superponen en algunos procesos celulares (Uraji *et al.*, 2012). El modo de acción de la PLD es llevado a cabo a través de su producto enzimático, el AF, el cual es considerado como un lípido de señalización universal, que regula numerosos procesos fisiológicos (Wang *et al.*, 2006; Pleskot *et al.*, 2013). El AF derivado de la

acción enzimática de la PLD casi siempre se une directamente a proteínas para alterar su localización y otros procesos (Testerink y Munnik, 2011). Mientras el complejo PLD/AF en plantas juega papeles en procesos celulares y fisiológicos en respuesta a señales hormonales o abióticas, también se han implicado en interacciones planta-microorganismo y en respuestas de defensa contra hongos y bacterias patógenas (Anderson *et al.*, 2006a; Bargmann *et al.*, 2006; Kirik y Mudgett, 2009).

El AF se acumula rápidamente en las plantas infectadas con patógenos para regular respuestas de defensa, aunque su participación sigue siendo desconocida. Como la primera barrera de las células, la membrana fosfolipídica es la primera en responder al ataque de los patógenos, y el AF es potencialmente una de las moléculas de señalización temprana que transduce la información del exterior al interior de las células (Pleskot *et al.*, 2013).

2.5.3. Clasificación y estructura de la PLD

La familia de PLD de *Arabidopsis* tiene 12 genes identificados, los cuales son designados como PLD α (1,2,3), β (1,2), γ (1,2,3), δ , ϵ , y ζ (1,2), basadas en su secuencia y propiedades enzimáticas (Wang *et al.*, 2006). Las PLD tipo α , β , γ , δ y ϵ son PLD tipo C2 debido a la presencia de un dominio C2 cerca del amino terminal. Sin embargo, dos PLD no contienen el dominio C2, en su lugar tiene los dominios de homología a pleckstrina (PH) y homología a phox (PX) (Eliás *et al.*, 2002; Qin y Wang, 2002).

El dominio C2 está involucrado en la unión a Ca^{2+} y fosfolípidos, los cuales son requeridos para la activación enzimática. Las PLD-C2, poseen un dominio que consiste aproximadamente en 130 aminoácidos (Wang *et al.*, 2006). Las PLD β , γ y δ poseen un sitio de residuos ácidos para la unión del Ca^{2+} , mientras las PLD α y ϵ carecen de residuos para este fin (Qin y Wang, 2002). A esta diferencia pueden deberse los diferentes requerimientos de Ca^{2+} para llevar a cabo su actividad enzimática, los cuales han sido experimentalmente determinados (Zheng *et al.*, 2000) La PLD ζ tiene dominios PH y PX cerca del extremo amino terminal, el cual

también se encuentra presente en las PLD de mamíferos. Ambos dominios, poseen diferente afinidad de unión por fosfoinosítido (Fig. 6) (Cheever *et al.*, 2001).

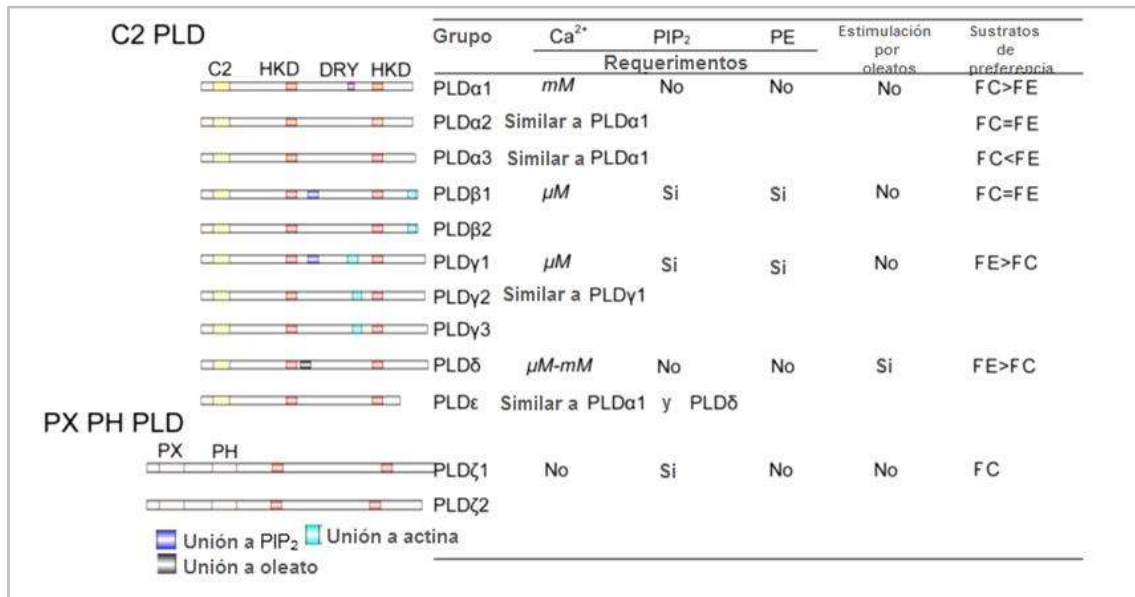


Fig. 6. Estructura y dominios de las PLDs en *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los requerimientos de cada una para llevar a cabo su actividad enzimática, así como la organización de los dominios estructurales (Hong *et al.*, 2016).

Todas las PLDs de los organismos eucariotas poseen dos motivos catalíticos HDK, los cuales interactúan el uno con el otro para formar el sitio activo. El motivo HDK tiene la secuencia altamente conservada HxKxxxD/E (Hammond *et al.*, 1995). La mutagénesis puntual de los aminoácidos en el motivo HDK revelan que los residuos HDK son críticos para la actividad de PLD (Sung *et al.*, 1997). La presencia de estos dominios en las PLDs provee la base para la regulación de sus funciones.

2.5.4. Hidrólisis lipídica, localización y expresión de las PLDs

La mayoría de las PLDs caracterizadas utilizan varios de los fosfolípidos de membrana, tales como fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilglicerol (FG) como sustratos. Sin embargo, algunas PLDs también pueden utilizar fosfatidilserina (FS) y fosfatidilinositol (FI), no obstante, ninguna de las PLDs

de *Arabidopsis* analizadas demostró actividad de hidrólisis sobre FI (Oblozinsky *et al.*, 2005).

Las diferentes PLDs poseen preferencias distinguibles para lípidos específicos, esta selectividad sugiere que la activación de diferentes PLD conlleva a una hidrólisis selectiva de lípidos componentes de membrana. En algunos casos, la selectividad del sustrato ha sido observada en plantas estresadas mediante su perfil lipídico, en el cual se observan diferentes especies de fosfolípidos. La activación diferencial y la selectividad lipídica de las diferentes PLD han sido demostradas en diversas respuestas fisiológicas específicas (Welti *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Además, las PLDs individualmente tienen diferentes asociaciones subcelulares. Por ejemplo la PLD α 1 está presente en las fracciones de membrana y citosólica, además sufren translocaciones intracelulares entre la membrana y el citosol en respuesta al estrés como es el caso de la herida (Fan *et al.*, 1999). La PLD ζ 2 se encuentra asociada a la membrana del tonoplasto (Yamaryo *et al.*, 2008). La PLD γ está asociada principalmente con membranas intracelulares (Fan *et al.*, 1999), mientras que las PLD δ , PLD ϵ y PLD α 3 con la membrana plasmática (Hong *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Wang X., 2001). La asociación subcelular de las PLDs juega un papel importante en la regulación espacial de la hidrólisis de los lípidos de membrana y producción de AF.

Las PLD exhiben de manera individual diferentes patrones de expresión en tejidos y en respuesta a diversos tipos de estrés (Fig. 7). En *Arabidopsis* los transcritos de PLD α 1 y PLD δ son más abundantes que otras PLD en la mayoría de los tejidos. La PLD ζ 2 es altamente inducida por deficiencia de fósforo (Li *et al.*, 2006) y la PLD δ por estrés hiperosmótico extremo (Katagiri *et al.*, 2001). La transcripción de la PLD ζ 1 es regulada por el factor transcripcional homeobox GL2, el cual se une al promotor del PLD ζ 1 e inhibe su transcripción. Sin embargo, se conoce poco acerca de la regulación transcripcional de otras PLDs, o su patrón de expresión. (Ohashi *et al.*, 2003).

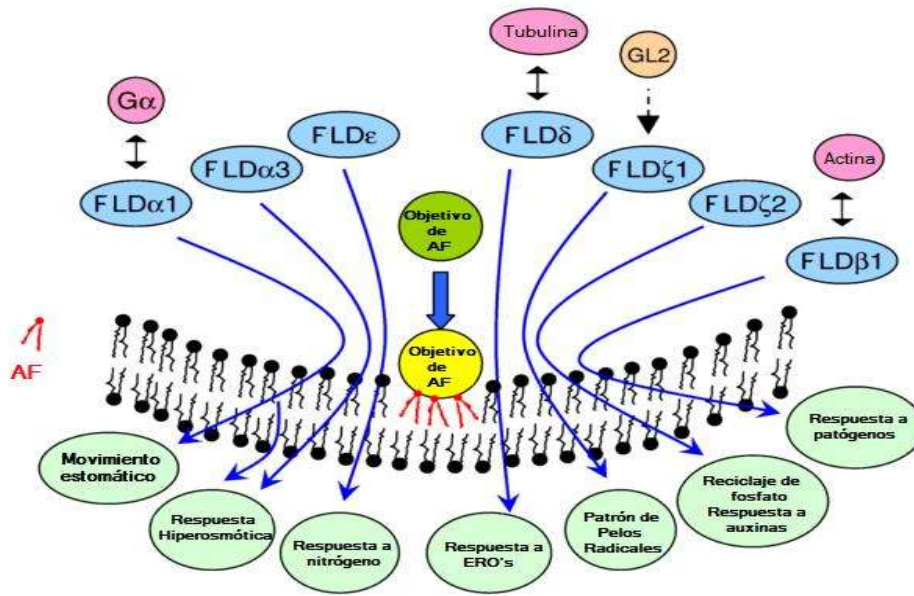


Fig. 7. Fosfolipasas en respuestas de estrés vegetal. PLDs involucradas en varios procesos fisiológicos, las cuales son activadas dependiendo del estrés vegetal al cual son sometidas las plantas, la activación de diferentes PLDs regula la localización y las especies moleculares de AF, las cuales interactúan con blancos específicos. (Li *et al.*, 2009).

2.5.5. Funciones celulares de la PLD y el AF en las plantas

Las diversas propiedades bioquímicas y moleculares de las PLDs indican que son activadas bajo diferentes condiciones de crecimiento y desarrollo, y poseen funciones únicas. Existen estudios sobre el análisis de plantas deficientes o sobreexpresantes de PLDs específicas en *Arabidopsis* que proveen evidencia de la participación de estas en respuestas fisiológicas específicas (Tabla I).

La PLD y el AF han estado implicados en varios procesos vegetales, los cuales incluyen: 1) estrés abiótico como el congelamiento, deshidratación, sequía, salinidad, privación de nutrientes, corte y ataque de especies reactivas de oxígeno; 2) desafíos bióticos, tales como ataques por bacterias y hongos patógenos, tratamiento con elicitores, así como la inducción de nódulos; y 3) crecimiento y desarrollo durante la germinación de semillas, hojas senescentes, semillas envejecidas y en la expansión

de tubos de polen, crecimiento de la raíz y los pelos radiculares, así como en la toxicidad del cobre y aluminio (Li *et al.*, 2009).

Tabla I.- Efectos fisiológicos de la manipulación genética de diferentes PLD en *Arabidopsis*. OE- sobre expresantes, KO- knock out (Li, M. *et al.* 2009).

PLD	Manipulación	Efecto fisiológico	Ref.
PLD α 1	α 1-KO	Cierre retardado de estomas abiertos; inhibición de la apertura retrasada sobre estomas cerrados.	(Mishra <i>et al.</i> , 2006)
PLD α 3	α 3-KO	Incremento en la sensibilidad a la salinidad y deficiencia de agua; floración tardía bajo sequía.	(Hong <i>et al.</i> , 2008)
	α 3-OE	Disminución en la sensibilidad a la salinidad y deficiencia de agua; floración temprana bajo sequía	(Hong <i>et al.</i> , 2008)
PLD ϵ	ϵ -OE	Incremento en la acumulación de biomasa, crecimiento de raíces laterales y longitud de pelos radiculares bajo privación de nitrógeno.	(Hong <i>et al.</i> , 2009)
PLD δ	δ -KO	Incremento de muerte celular programada por H ₂ O ₂ .	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)
PLD ζ 1	ζ 1-OE	Alteración del crecimiento y patrón de pelos radiculares.	(Ohashi <i>et al.</i> , 2003)
PLD ζ 2	ζ 2-KO	Disminuye la sensibilidad a auxinas, gravitropismo radical reducido, supresión de la elongación de hipocótilos dependientes de auxinas.	(Li <i>et al.</i> , 2007)

2.5.6. Modo de acción de las PLDs implicadas en la regulación celular

Los efectos de las PLDs sobre los procesos celulares en las plantas pueden ser agrupados dentro de tres categorías generales: regulación, remodelación de membranas y degradación de membranas. La regulación incluye la participación de la PLD en la señalización, tráfico vesicular y rearrreglo del citoesqueleto, mientras que la degradación de la membrana se refiere al efecto catabólico de las PLDs, lo que conlleva a la pérdida de la integridad de membrana y pérdida de las funciones (Potocky *et al.*, 2003; Anthony, *et al.*, 2004; Testerink y Munnik, 2005).

En la remodelación de la membrana, las PLDs participan en las actividades de biosíntesis de lípidos, así como en el cambio de la composición de los lípidos de membrana. El mejor ejemplo de esta acción es el papel de la PLD en el cambio de la

composición lipídica en respuesta a la deficiencia de fosfato en plantas (Li *et al.*, 2006; Tiellstrom *et al.*, 2008).

2.6. Ácido fosfatídico

El ácido fosfatídico (AF) es el fosfolípido de membrana más simple, el cual es el intermediario principal para la síntesis de lípidos de membrana y de almacenamiento. El AF es considerado como una nueva clase de lípido mediador, implicado en varios procesos celulares de transducción de señales, tráfico de membranas, secreción y rearrreglo del citoesqueleto. Los efectos del AF son ligados a la supervivencia, proliferación y reproducción de células u organismos (Testerink y Munnik, 2005; Wang X., 2004; Wang X., 2005).

Una de sus características más importantes es su habilidad para unirse a las proteínas. Esta reacción es dependiente del pH (Loew *et al.*, 2013) y típicamente resulta en el reclutamiento de proteínas a las membranas, acompañado por cambios en la conformación proteica (Kooijman y Testerink, 2010). Está presente en pequeñas cantidades en las membranas biológicas. En hojas de *Arabidopsis thaliana*, el nivel de AF es de 0.5 a 1.5 nmol/mg de peso seco, y la concentración es de 50-150 μ M (Welti *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004).

El AF constituye menos del 1% de los fosfolípidos totales, en comparación de la FC, el cual es 20 veces más abundante, siendo el fosfolípido de mayor abundancia en membranas eucariotas (Welti *et al.*, 2002). La magnitud del recambio de ácido fosfatídico varía, dependiendo del tratamiento, tejido y método de evaluación del AF. Tratamientos en protoplastos de *Arabidopsis* con H_2O_2 incrementa el contenido de AF en un 30% (Zhang *et al.*, 2003), cuando 50 μ M de ABA fue aplicado a hojas de *Arabidopsis* se observó un incremento del 65% dentro de los primeros 10 minutos. Por otro lado en plantas sometidas a tratamientos de corte y congelamiento, se incrementó varias veces el contenido de AF (Welti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001).

Este segundo mensajero comprende un gran número de especies moleculares, las cuales difieren en la longitud de la cadena del ácido graso, en el número de dobles

enlaces y la unión de dicha cadena en la posición Sn1 o Sn2. No todas las especies de AF necesariamente tienen la misma función, y el papel de especies particulares de AF ha sido examinado solamente en pocos sistemas (Wang *et al.*, 2006).

2.6.1. Origen del ácido fosfatídico.

El AF celular puede ser producido por diferentes enzimas: 1) La PLD, a través de la hidrólisis fosfolipídica de la membrana; 2) mediante la diacilglicerol cinasa (DGK), fosforilando el diacilglicerol (DAG); 3) Por una acil transferasa añadiendo un ácido graso al ácido lisofosfatídico (LisoPA), entre otras. Estudios realizados sobre actividad enzimática sugieren que la PLD y DGK son las dos principales rutas que producen AF.

Definir la fuente enzimática es importante para entender la función celular del AF y su regulación celular de las vías de señalización. Estos enfoques se utilizaron para distinguir entre la PLD y la DGK en la producción de AF. Sus funciones celulares se pueden agrupar en tres categorías: manipulación genética, marcado metabólico diferencial y tratamientos farmacológicos (Testerink y Munnik, 2005).

El tratamiento con alcoholes se ha utilizado específicamente para suprimir la producción de AF por la acción enzimática de la PLD. Este tratamiento toma ventaja de la reacción de transfosfatidilación, una reacción durante la acción enzimática de la PLD, la cual utiliza alcoholes primarios como sustrato para formar fosfatidilalcoholes a expensas del AF (Brown *et al.*, 2007). Sin embargo, no es muy específico porque los alcoholes primarios estimulan o inhiben la actividad de la PLD. Así el efecto asociado a tratamientos con alcoholes necesita ser interpretado con cuidado, debido a que este puede resultar de otros efectos del alcohol, tal como el incremento en la hidrólisis de lípidos, cambios en la composición de los lípidos, y/o el incremento en algunas clases principales de grupos lipídicos (Gómez-Merino *et al.*, 2005).

2.6.2. Enzimas que remueven al ácido fosfatídico.

Existen enzimas que metabolizan ácido fosfatídico, las cuales juegan un papel importante en apagar la señalización. La remoción puede ser llevada a cabo por diversas enzimas: 1) la fosfatasa de lípidos fosfato (PLP) la cual actúa desfosforilando al AF para obtener de esta manera una molécula de diacilglicerol; 2) la cinasa de AF (AFK) la cual se va a encargar de fosforilar al AF para resultar en la formación del diacilglicerol pirofosfato, otro lípido de señalización; 3) la fosfolipasa tipo A, selectiva la cual actúa desacilando al AF para poder producir ácido lisofosfatídico, el cual contiene solamente un grupo ácido graso en su estructura además de liberar una molécula de ácido graso. Además para disminuir la función, estas actividades enzimáticas también pueden generar nuevos lípidos mensajeros, tales como el diacilglicerol, ácidos grasos libres, diacilglicerol pirofosfato y ácido lisofosfatídico (Sciorra y Morris, 2002; Pierrugues *et al.*, 2001).

La actividad de la AFK es activada durante respuestas de estrés que estimulan la señalización por AF (Laxalt y Munnik, 2002), sugiriendo que puede participar en respuestas de disminución de este lípido. Por otro lado, la producción del DAG pirofosfato, derivado del AF, juega un papel en la señalización por ABA (Zalejski *et al.*, 2005). Hay múltiples fosfolipasas A en mamíferos y plantas, aunque solo pocas de estas enzimas utilizan el ácido fosfatídico como sustrato de preferencia *in vivo* (Ryu, 2004).

2.6.3 Efectos del AF ácido fosfatídico.

Algunos de los efectos celulares del AF se propone que resultan en alteraciones estructurales sobre las membranas celulares. El AF es un lípido aniónico con forma cónica, y es propenso a formar una estructura débil alrededor del AF con lo cual puede observarse disrupción de la membrana, así exponiendo una zona hidrofóbica de lípidos de membrana a una gran diversidad de proteínas efectoras (Van den Brink-van der Laan *et al.*, 2004; Kooijmann *et al.*, 2003). Por ejemplo, algunas proteínas con regiones hidrofóbicas pueden insertarse dentro de la bicapa y unirse al

AF. Además, un incremento en la forma cónica del AF en la bicapa lipídica induce una curvatura negativa, la cual es usualmente encontrada en el cuello de una vesícula durante procesos de fusión a un aceptor desde una membrana donadora (Kooijmann *et al.*, 2003).

El AF y la fosfolipasa D están involucrados en la transducción de señales mediada por el ácido salicílico (Kalachova *et al.*, 2013), en respuesta al estrés por bajas temperaturas (Ruelland *et al.*, 2002; Arisz *et al.*, 2013), al estrés por salinidad (Yu *et al.*, 2010; McLoughlin *et al.*, 2013), organización de los microtúbulos en respuesta al estrés salino (Zhang *et al.* 2012), supresión de la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno (Zhang *et al.*, 2003), al ácido abscísico, sequía (Katagiri *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005c; Hong *et al.*, 2008; Uraji *et al.*, 2012) y a la señalización de nitrógeno (Hong *et al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

“*Azospirillum* es una rizobacteria que promueve el crecimiento y desarrollo vegetal, debido principalmente a la producción de fitohormonas. El metabolismo de los lípidos de membrana que resulta en la producción de lípidos de señalización no se ha estudiado en la interacción planta-rizobacteria. En este estudio es de interés analizar si la interacción de *Azospirillum brasilense* con la planta de trigo estimula la actividad de la enzima fosfolipasa D.

IV. HIPÓTESIS

La interacción de *Azospirillum brasilense* Sp245 con la planta de trigo estimula la actividad de la fosfolipasa D.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar el papel de la fosfolipasa D durante la interacción *Azospirillum brasilense* y la planta de trigo.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto de *A. brasilense* sobre el crecimiento en plantas de trigo.
- Analizar el efecto de la inhibición de la fosfolipasa D sobre el crecimiento de plantas de trigo.
- Observar el efecto de la adición exógena del ácido fosfatídico como principal producto de la fosfolipasa D sobre el crecimiento vegetal.
- Determinar la actividad enzimática de la fosfolipasa D en plantas de trigo inoculadas con *A. brasilense*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Las cepas de *Azospirillum brasilense* Sp245 y la mutante *Azospirillum brasilense* FAJ0009 fueron amablemente proporcionadas por la doctora Gladys Alexandre del Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular de la Universidad de Tennessee, Knoxville, Tennessee USA y el doctor Yoav Bashan del Departamento de Microbiología del Centro de investigaciones biológicas del noreste, La paz, Baja California México, respectivamente.

Las semillas de trigo var. Nana fueron amablemente proporcionadas por el doctor Mario Martín González Chavira del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de la ciudad de Celaya, Guanajuato México.

6.2. Preparación de medio LB mínimo

Las cepas se mantuvieron viables en medio LB (Luria-Bertani) mínimo estéril (Peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, sulfato de magnesio 0.3009 g/L, cloruro de calcio 0.277 g/L, agar bacteriológico 15 g/L) se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10%, y fue suplementado con tetraciclina (TC) [10 µg/mL] y kanamicina (KN) [50 µg/mL], respectivamente. Las cepas se resembraron en medio sólido cada 72 h, incubando las placas a 28°C durante 24 h y posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su nueva resiembra.

6.3. Preparación de preinóculo e inóculo bacteriano

Para el preinoculo, en condiciones de esterilidad se tomó una azada de la bacteria y se re-suspendió en medio LB mínimo líquido adicionado con antibiótico según la bacteria a trabajar. Posteriormente se incubó a 28°C durante 20 h en constante agitación a 180 rpm en la incubadora (Labnet 211DS). Con la preparación del preinoculo se lleva cabo el inoculo, lo cual consiste en tomar 150 µL de preinoculo y

adicionarlo a un matraz Erlenmeyer el cual contenga 50 mL de medio LB mínimo líquido con antibiótico: TC [10 µg/mL] o KN [50 µg/mL] según corresponda; se mantiene a 28°C en constante agitación a 180 rpm durante 16 h, por último se mide la D.O a una $\lambda = 600\text{nm}$ la cual deberá ser de 0.900.

6.4. Lavado de células bacterianas

En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se toma 1 mL del inoculo bacteriano con D.O. de 0.900 a una $\lambda = 600\text{nm}$, se somete a centrifugación a 3893 g durante 12 min a temperatura ambiente, una vez separadas las fases, se descarta el sobrenadante; se re-suspende el pellet bacteriano con una solución de NaCl 0.85% y se homogeniza en vortex durante 30 s, se centrifuga nuevamente a 3893 g durante 12 min a temperatura ambiente; se descarta el sobrenadante y se re-suspende nuevamente pero ahora con una solución de MgSO_4 [0.01M] y se homogeniza para poder ser utilizado.

6.5. Desinfección y germinación de las semillas de trigo

Se colocan semillas de trigo en un vaso de precipitado que contenga una solución de SDS 1% y se mantiene en agitación durante 5 min. Posteriormente se somete a lavados con 50 mL de agua destilada estéril durante 3 min, por triplicado, descartando en cada lavado el sobrenadante. Se adiciona 50 mL de una solución de hipoclorito de sodio 1% y se mantiene en agitación durante 5 min. De igual manera se somete a tres rondas de lavado con 50 mL de agua destilada estéril, desechando entre cada lavado el sobrenadante. Las semillas lavadas y desinfectadas se pasarán a germinar en camillas de algodón y papel filtro en cajas de Petri húmedas (20 mL de agua destilada estéril). Las semillas se germinaron en total oscuridad durante 24 h a 28°C.

6.6. Preparación de medio MS 0.2X

Para llevar a cabo la interacción planta-microorganismo se preparó medio Murashige-Skoog (MS) 0.2X sólido (0.9 g/L, sacarosa 6 g/L y fitoagar 10g/L), se ajustó el pH a 7.0 con KOH 10%. Se procedió a esterilizar durante 15 min, a 15 lb de presión, una temperatura de 121°C, y se vació el medio en cajas de Petri las cuales contienen disueltas las bacterias según el tratamiento.

6.7. Interacción de las plantas de trigo con las bacterias

Una vez germinadas las semillas de trigo por 24 h, se colocaron en cajas de Petri con medio MS 0.2X las cuales contendrán diferentes concentraciones de bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 (1×10^6 y 4×10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro disueltas en el medio MS), posteriormente se sellaron las cajas y se mantuvieron en la cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: 2000 lux, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, a una temperatura de 26°C durante 72 h.

6.8. Análisis de parámetros de crecimiento.

A las plantas de trigo que fueron tratadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 se les midieron los siguientes parámetros: longitud de la lámina, longitud de la raíz, número total de raíces emergidas, y así como el número de raíces laterales, y se observó la formación de pelos radiculares.

6.9. Análisis del contenido de clorofila total.

Las plantas de trigo sometidas a los diferentes tratamientos (Sp245, FAJ0009, n-butanol, AF) fueron molidas con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a tubos Eppendorf y se le añadió 1 mL de metanol, se re-suspendió por medio de agitación en vortex en condiciones de oscuridad

durante 15-30 s, para eliminar los restos de tejido vegetal; se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo nuevo protegiéndolo de la luz; se lee el sobrenadante en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 665 y 652 nm utilizando metanol como blanco, la concentración de clorofila total se obtiene aplicando la siguiente ecuación $C_{a+b} = 1.44(a_{665.2}) + 24.93(a_{652.4})$ (Lichtenthaler *et al.*, 1994)

6.10. Análisis de la producción de anión superóxido

Para llevar a cabo la detección del anión superóxido en las plantas de trigo tratadas, se procedió a sumergir las raíces de las plantas que fueron tratadas por 72 h con los diferentes tratamientos a una solución de nitro azul de tetrazolio (NBT) al 0.1% disuelto en buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5, durante 15 min. Se mantuvieron en agua destilada para su posterior análisis en un microscopio estereoscópico marca LEICA MZ6, con el objetivo ocular 0.63X y 1.0X tomando imágenes con el programa TV@Anywhere plus de MSI (Causin *et al.*, 2012).

6.11. Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno

Para llevar a cabo la detección del peróxido de hidrógeno en las plantas de trigo tratadas, se sumergieron las raíces de las plantas que fueron tratadas por 72 h con los diferentes tratamiento a una solución de 3,3 diaminobencidina (DAB) al 0.1%, pH a 3.8 con HCl 10% en agua destilada durante 2 h, posteriormente se aclararon con etanol 96° en ebullición; se mantuvieron en agua destilada para su posterior análisis en un microscopio estereoscópico marca LEICA MZ6, con objetivo 0.63X y 1.0X tomando imágenes con el programa TV@Anywhere plus de MSI (Thordal-Chirstensen *et al.*, 1996).

6.12. Análisis de la inhibición de la fosfolipasa D

Plántulas de trigo lavadas, desinfectadas y germinadas por 24 h, se pusieron en contacto en las cajas de Petri que contenían medio MS 0.2X sólido con n-butanol a diferentes concentraciones 0.1, 1.0, 10, 100 y 500 mM/mL; se llevó a cabo la interacción durante 72 h a 2000 lux, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y posteriormente se midieron parámetros morfológicos como la longitud de la lámina, la longitud de la raíz, el número total de raíces emergidas, así como el número de raíces laterales y se observó la formación de pelos radiculares.

6.13. Inhibición de la fosfolipasa D

Plántulas de trigo lavadas, desinfectadas y germinadas por 24 h, se pusieron en cajas de Petri que contenían medio MS 0.2X sólido con n-butanol 10 mM/mL y *Azospirillum brasilense* Sp245; se llevó a cabo la interacción durante 72 h a 2000 lux, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y posteriormente se midieron parámetros morfológicos como la longitud de la lámina, la longitud de la raíz y el número total de raíces emergidas y así como el número de raíces laterales y se observó la formación de pelos radiculares.

6.14. Análisis de ácido ascórbico como sistema antioxidante

Se trataron las plántulas de trigo con ácido fosfatídico añadido de manera exógena a diferentes concentraciones durante 72 h, posteriormente las raíces fueron molidas con nitrógeno líquido en un mortero, se re-suspendieron en buffer de acetatos 3 M, se añadió una solución de 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DCPIP) 0.3 mg/mL y se dejó reposar durante 45 s. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm, la concentración de ácido ascórbico es inversamente proporcional a la visualización de un color rosado (Davies H., *et al.*, 1991).

6.15. Efecto de la adición de ácido fosfatídico sobre el crecimiento de las plantas de trigo

Plántulas de trigo con 24 h de germinación fueron colocadas en cajas de Petri con medio MS 0.2X sólido, el cual contenía disuelto ácido fosfatídico (16:0-18:1) 100, 500, 1000, 5000 nM, se dejaron interactuar durante 72 h a 2000 lux, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y posteriormente se midieron parámetros morfológicos como la longitud de la lámina, de la raíz, el número total de raíces emergidas, raíces laterales y la formación de pelos radiculares.

6.16. Extracción de lípidos

Las raíces de plantas de trigo tratadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 y ácido indol-3-acético (AIA) 1 μ M a diferentes tiempos de interacción 5, 15, 30, 60, 120 min y 6, 12, 18, 24, 48 h fueron trituradas en nitrógeno líquido, disueltas con agua desionizada estéril y puestas a ebullición en baño de agua para inactivar enzimas lipolíticas; se dejó enfriar. Los lípidos se extrajeron de acuerdo al protocolo descrito por Bligh y Dyer (1985) con pequeñas modificaciones con un sistema de solventes a base de cloroformo:metanol:agua (7.5:15:6 v/v/v); se mezcla durante 2 min en vortex, se agrega cloroformo y mezcla en vortex por 30 s, se agrega agua desionizada y se mezcla en vortex por 30 s. Se acidifica la mezcla con HCl 6N, y se mezcla durante 5 s, se procede a centrifugar a 4500 rpm durante 10 min para eliminar el tejido vegetal restante, el sobrenadante se transfiere a tubos Eppendorf pre-pesados y se elimina el solvente bajo flujo de nitrógeno gaseoso, se mantuvo a -20°C hasta su utilización (Tanaka *et al.*, 2012).

6.17. Separación de los fosfolípidos mediante cromatografía en capa fina

El extracto de lípidos se re-suspende en un volumen conocido para poder aplicar la cantidad adecuada de extracto; los extractos se aplican sobre placas de sílice gel,

posteriormente se colocan en una cuba cromatográfica que contiene el sistema de solventes cloroformo: metanol: amoniaco 28% (60: 35: 8, v/v/v), se deja correr la cromatografía y se retira cuando llega justo a la marca del frente de solventes, se secó la placa a temperatura ambiente durante 30 min y se procedió a revelar con vapores de yodo durante 3 minutos (Tanaka *et al.*, 2012).

6.18. Cuantificación de ácido fosfatídico.

Las placas de los tratamientos que fueron reveladas con vapores de yodo se sometieron a cuantificación relativa de la mancha mediante el programa ImageJ, el cual se basa en cuantificar el valor de intensidad de los pixeles de la imagen.

6.19. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA versión 7, y el programa Microsoft Office Excel 2007.

VII. RESULTADOS

7.1. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre plantas de trigo

Para analizar el efecto que produce *Azospirillum brasilense* Sp245 (*A. brasilense* Sp245), se sometieron las plantas de trigo de 24 h de germinación a la interacción con la bacteria a diferentes concentraciones (1×10^6 y 4×10^6 UFC) durante 72 h. Como control se usaron plántulas no inoculadas. Visualmente se distinguió un incremento en la cantidad de pelos radiculares en los tratamientos inoculados con la bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 (Fig. 8A). La inoculación de *A. brasilense* Sp245 a las diferentes concentraciones indujo que en la lámina foliar solamente se observara una reducción de la longitud en el tratamiento de 4×10^6 UFC (Fig. 8B). Mientras que se observó una reducción de la longitud de la raíz en ambas concentraciones analizadas (Fig. 8C).

7.2. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el contenido de clorofila en plántulas de trigo

La clorofila es un componente esencial para la fotosíntesis a través de la cual las plantas derivan su energía para llevar a cabo sus procesos de metabolismo, lo cual es importante para poder llevar a cabo procesos de crecimiento y reproducción de una manera más eficiente (Vallero, 2016). Para analizar el efecto de *A. brasilense* Sp245 sobre el contenido de clorofila, plántulas de trigo con 24 h de germinación en oscuridad a 28°C; se colocaron en cajas que contenían medio MS 0.2X, y *A. brasilense* Sp245 a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Se dejaron interactuar durante 72 h y posteriormente se llevó a cabo la medición de clorofila de la lámina foliar. Se observó un incremento significativo en la cantidad de clorofila total las que fueron inoculadas con *A. brasilense* Sp245 en comparación con el control (Fig. 9), lo que sugiere que la bacteria afecta procesos de desarrollo durante su inoculación, lo que se manifiesta como un incremento en el contenido de clorofila total de los tratamientos con la bacteria.

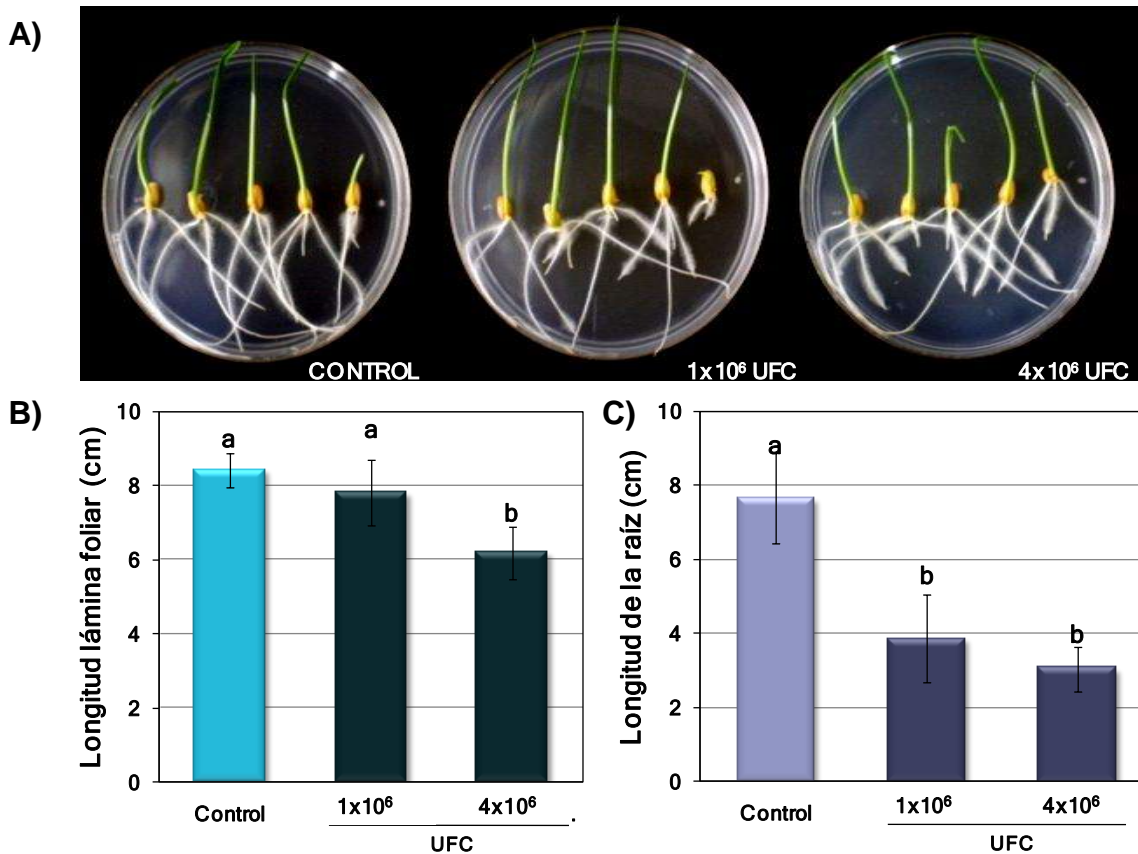


Fig. 8 Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 (*A. brasilense* Sp245) sobre el crecimiento de plántulas de trigo. A. Imagen representativa, 24 h de germinación y 72 h de interacción con diferentes concentraciones de la bacteria. B. Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo inoculadas con *A. brasilense* Sp245. C. Longitud de la raíz de plantas de trigo inoculadas *A. brasilense* Sp245. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p=0.005$, las barras indican DE, $n=10$.

7.3. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo.

Una vez demostrado el efecto de la bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la modificación en el sistema radicular, se analizó el efecto de la inhibición de la PLD sobre el crecimiento de las plántulas de trigo. Para este experimento se utilizaron diferentes tipos de alcoholes primarios como: etanol, propanol y n-butanol, este último reportado para realizar la reacción de transfosfatidilación, la cual es específica para evaluar la actividad enzimática de la PLD, y observar si pueden producir cambios morfológicos en los parámetros de crecimiento.

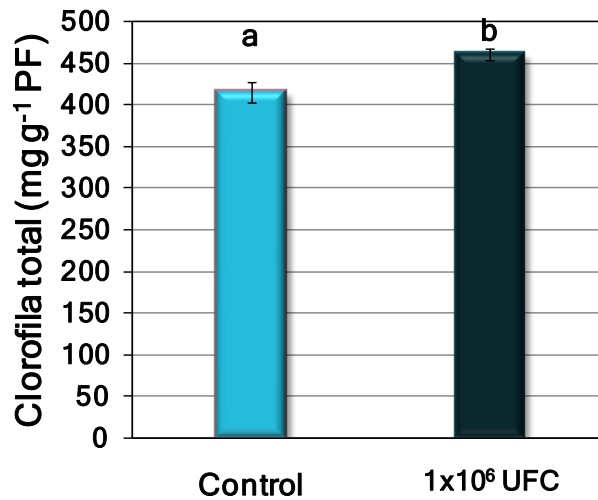


Fig. 9. Efecto de *Azospirillum brasilense* (*A. brasilense* Sp245) sobre el contenido de clorofila. Se cuantificó el contenido de clorofila de plantas de trigo con 24 h de germinación y 72 h de interacción con la bacteria. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p=0.005$, las barras indican DE, $n=10$.

Para el experimento se utilizaron plantas con 24 h de germinación en oscuridad a 28°C se pusieron a crecer en caja Petri que contenían medio MS 0.2X sólido y un alcohol primario (etanol, propanol y n-butanol 10 mM), se dejaron incubar durante 72 h (Fig. 10A), y posteriormente se llevó a cabo la medición de los parámetros morfológicos. La longitud de la lámina foliar disminuyó en el tratamiento con n-butanol, los otros dos tratamiento no mostraron esta disminución. Sin embargo, el tratamiento con etanol indujo un crecimiento de la longitud de la lámina foliar, en comparación con las que no fueron tratadas (Fig.10B). Con respecto a la longitud de la raíz, se observó una disminución en las tratadas con n-butanol con respecto a las no tratadas, sin embargo, los tratamiento con etanol y propanol mostraron un incremento en la longitud de la raíz con respecto al grupo control (Fig. 10C).

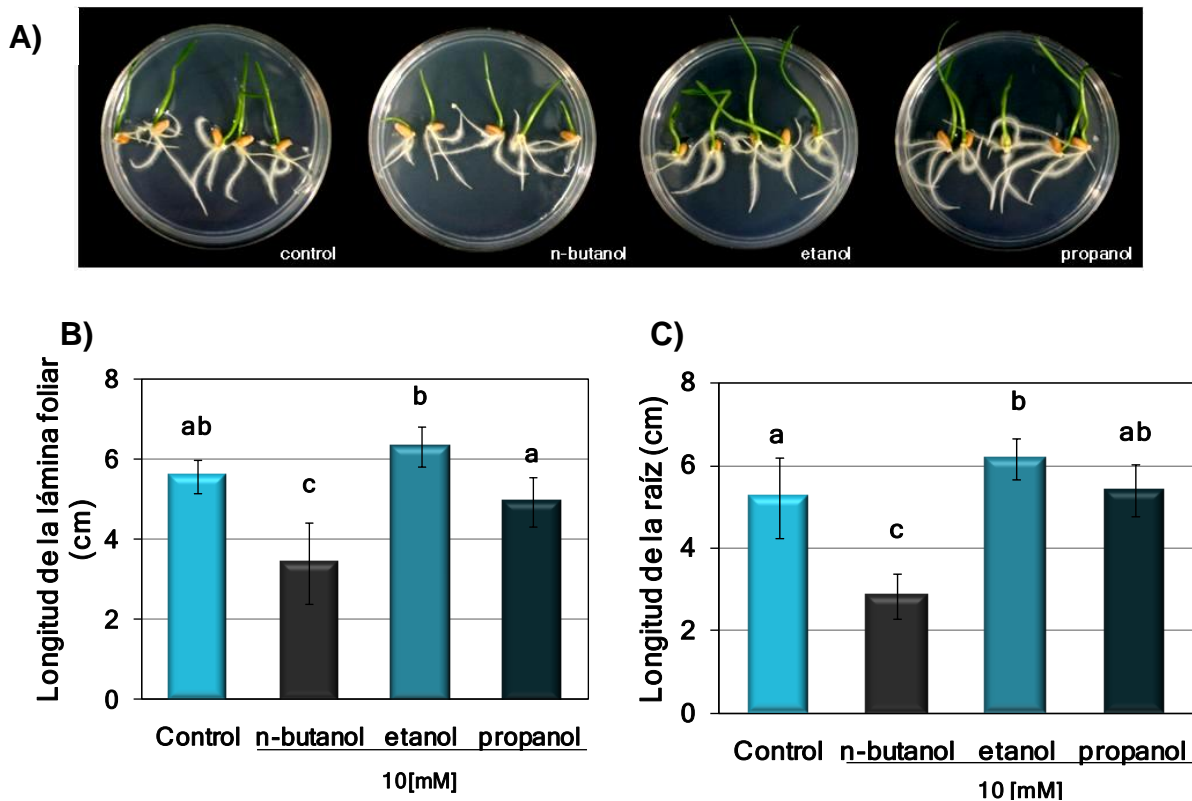


Fig. 10. Efecto de la inhibición de la PLD con alcoholes primarios en plantas de trigo. A. Imagen representativa, plántulas de trigo con 24 h de germinación y 72 h de interacción con diferentes alcoholes primarios (n-butanol, etanol y propanol), a una concentración de 10 mM. **B.** Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo tratadas con alcoholes primarios. **C.** Longitud de la raíz de las plantas de trigo tratadas con alcoholes primarios. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de ANOVA Tukey, $p=0.005$, las barras indican DE, $n=10$.

Con estos resultados podemos concluir que el n-butanol a una concentración de 10 mM es capaz de inducir cambios en la morfología de las plantas de trigo, lo cual puede observarse en la disminución de la longitud del área foliar, así como la disminución de la longitud de la raíz.

7.4. Efecto de la inhibición con N-butanol sobre la morfología del trigo.

Para analizar con más detalle el efecto de n-butanol sobre el crecimiento de plántulas de trigo, se utilizaron diferentes concentraciones de n-butanol (0.1, 1, 10, 100, 500 mM), y se evaluaron los parámetros morfológicos de longitud de la lámina foliar y la longitud de la raíz. Se observó que a concentraciones bajas de n-butanol no hay cambios en la longitud del área foliar, solamente a concentraciones a partir de 10 mM se observa una disminución del tamaño de aproximadamente 50% y a concentraciones mayores de 100 y 500 mM hay una mayor disminución de este parámetro en un 80% (Fig. 11A).

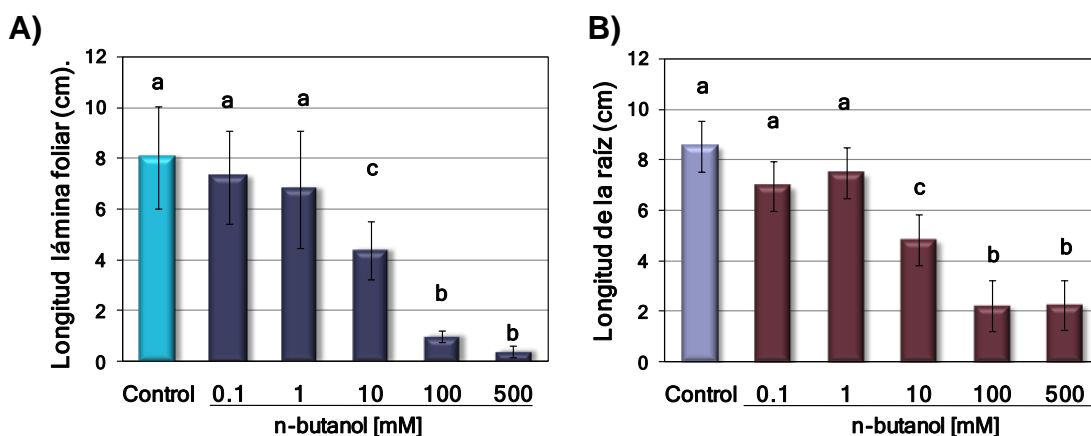


Fig. 11. Efecto de la concentración de n-butanol sobre el crecimiento de plantas de trigo. A. Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo tratadas con n-butanol a diferentes concentraciones. **B.** Longitud de la raíz de plantas de trigo tratadas con n-butanol a diferentes concentraciones. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p < 0.005$, las barras indican DE, $n=10$.

En el caso de la longitud de la raíz observamos de manera similar, que a concentraciones bajas no hay disminución significativa de la raíz, solamente a la concentración de 10 mM hay una disminución de la longitud de aproximadamente 60% y a concentraciones mayores de 100 y 500 mM hay una mayor disminución en un 75% con respecto al control (Fig. 11B). Con los resultados anteriores podemos

comentar que el n-butanol induce la reducción de la longitud tanto de la lámina foliar y de la raíz a una concentración de 10 mM, pudiendo sugerirse un papel durante la ruta de señalización de PLD, además a concentraciones mayores de 100 y 500 mM se observa una mayor disminución de los parámetros analizados mayor al 50%.

7.5. Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción de la planta de trigo con *Azospirillum brasilense* Sp245

Para poder analizar el efecto del n-butanol (n-but) como inhibidor de la biosíntesis de AF durante la interacción de las plantas de trigo con *A. brasilense* Sp245 y así poder relacionar el efecto de la inoculación de la bacteria con la posible participación de la PLD, se trataron plántulas de trigo con n-butanol 10 mM y 100 mM, y se inocularon con 1×10^6 UFC/mL. En el caso de la longitud de la lámina podemos observar que el tratamiento con *A. brasilense* Sp245+ n-but 10mM hay una disminución de la longitud de la lámina foliar y, en el caso del tratamiento con *A. brasilense* Sp245 + n-but 100mM se puede observar una disminución mayor (Fig. 12A). Caso similar se observó en la longitud de la raíz, donde podemos observar disminuciones en la longitud, tanto de la lámina foliar como de la raíz (Fig. 12B). Los resultados sugieren la participación de la enzima en la señalización implicadas en procesos de desarrollo y crecimiento, ya que existe evidencia que al adicionar el inhibidor se observa una disminución tanto de la longitud de la lámina como de la raíz.

7.6. Efecto de la inhibición de la PLD sobre el contenido de clorofila total durante la interacción con *Azospirillum brasilense* Sp245

Plántulas de trigo con 24 h de germinación en oscuridad a 28°C se colocaron en placas de Petri que contenían medio MS 0.2X sólido, una concentración de 1×10^6 UFC/mL de *A. brasilense* Sp245 así como una concentración de 10 mM de n-butanol, con sus respectivos controles; se llevó la interacción planta-bacteria-inhibidor durante 72 h. Se observó una disminución en el contenido de la clorofila total en los tratamiento con el inhibidor n-butanol (Fig. 13), mientras que el tratamiento que contiene solamente la bacteria, hay un aumento en la cantidad de clorofila total. Con los resultados obtenidos se puede concluir que durante la interacción con el inhibidor

hay disminución de alrededor del 50% en la concentración de clorofila total presente en las plantas que fueron tratadas con el n-butanol, mientras que el tratamiento que contiene el inhibidor con la bacteria disminuye de igual manera un 50% aproximadamente el contenido de este pigmento. Lo anterior sugiere que la alteración en los procesos de desarrollo de la planta puede estar involucrada la actividad enzimática de la PLD.

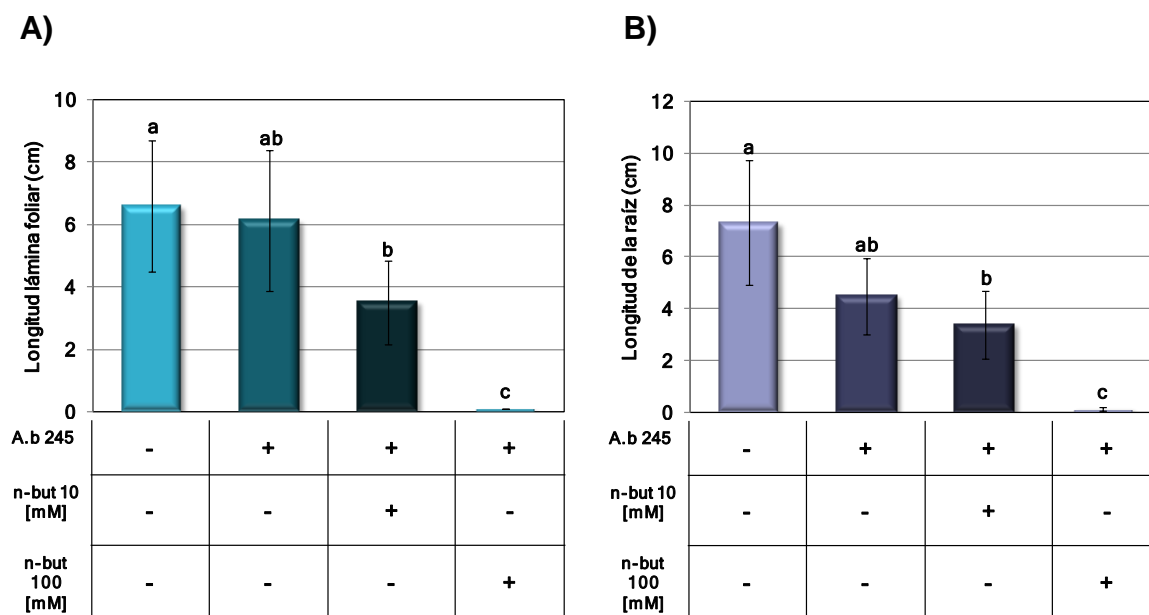


Fig. 12. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo durante la interacción con *Azospirillum brasilense* Sp245. A. Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo tratadas con n-butanol a 10 y 100 mM y 1×10^6 UFC de *Azospirillum brasilense* Sp245. **B.** Longitud de la raíz de plantas de trigo tratadas con n-butanol a 10 y 100 mM y 1×10^6 UFC de *Azospirillum brasilense* Sp245. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p < 0.005$, las barras indican DE, $n = 10$.

7.7. Efecto de la inhibición de la PLD sobre la producción de especies reactivas de oxígeno

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) están implicadas en procesos de defensa contra patógenos, así como en procesos de desarrollo, y como segundos mensajeros en diversas cascadas de señalización (Foreman et al., 2003). Se analizó

el efecto de la PLD y la bacteria sobre la producción de las ERO en las raíces de plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. 72 h después de los tratamientos se realizaron tinciones con DAB (diaminobencidina) y del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se utilizó la tinción con NBT (nitro azul de tetrazolio).

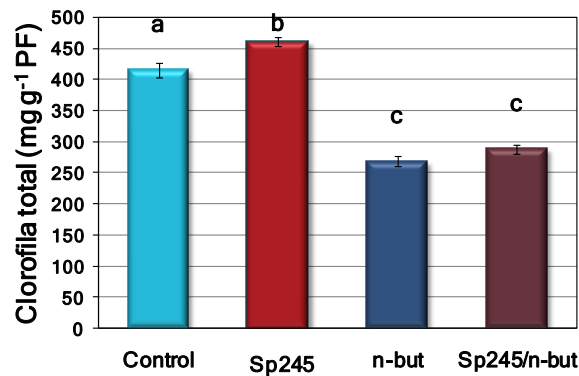


Fig. 13. Efecto de la inhibición de la PLD en plantas de trigo sobre el contenido de clorofila. Cuantificación de la clorofila total en plantas de trigo en interacción con *A. brasilense* Sp245 y n-butanol, expresado en $mg\ g^{-1}$ PF (miligramos de clorofila total por gramo de peso fresco. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p < 0.005$, las barras indican DE, $n=10$).

Durante la inoculación con *A. brasilense* Sp245 se observó la producción de H_2O_2 en la zona de elongación y diferenciación, así como el aumento en la cantidad de pelos radiculares en relación con las plantas no inoculadas, donde se observó solamente la producción de H_2O_2 en el meristemo de la raíz. Por otro lado el tratamiento que contenía a la bacteria y el inhibidor solamente se aprecia un incremento de la cantidad de H_2O_2 en el meristemo apical (Fig. 14), no observándose un incremento en la cantidad de pelos radiculares durante la inoculación solamente con la bacteria.

La producción del $O_2^{\cdot-}$ se observó en la zona de diferenciación, viéndose una disminución de la producción en el meristemo de la raíz, así como un incremento en la cantidad de pelos radiculares, mientras que el tratamiento inoculado con la

bacteria y n-butanol no hay cambios significativos, solamente una disminución en la cantidad de $O_2^{\cdot -}$ en el meristemo apical de la raíz (Fig. 15). Con estos resultados podemos mencionar que la inoculación de *A. brasilense* Sp245 induce la formación de H_2O_2 mientras que la producción de $O_2^{\cdot -}$ se afecta directamente en esta interacción, pudiendo relacionar la acción de inhibición en la síntesis de AF posiblemente estimulado por la bacteria, y de esta manera verse afectados procesos implicados en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

7.8. Efecto de tratamientos con ácido fosfatídico.

Para analizar el efecto de la adición exógena del AF sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de trigo, diferentes concentraciones de ácido fosfatídico (100, 500, 1000, 5000 nM) se incubaron durante 72 h con plántulas de trigo. Posteriormente se procedió a analizar la longitud de la lámina foliar y longitud de la raíz. Se observó que la adición de manera exógena de AF no modificó la morfología de las plántulas a las diferentes concentraciones usadas (Fig. 16A, 16B).

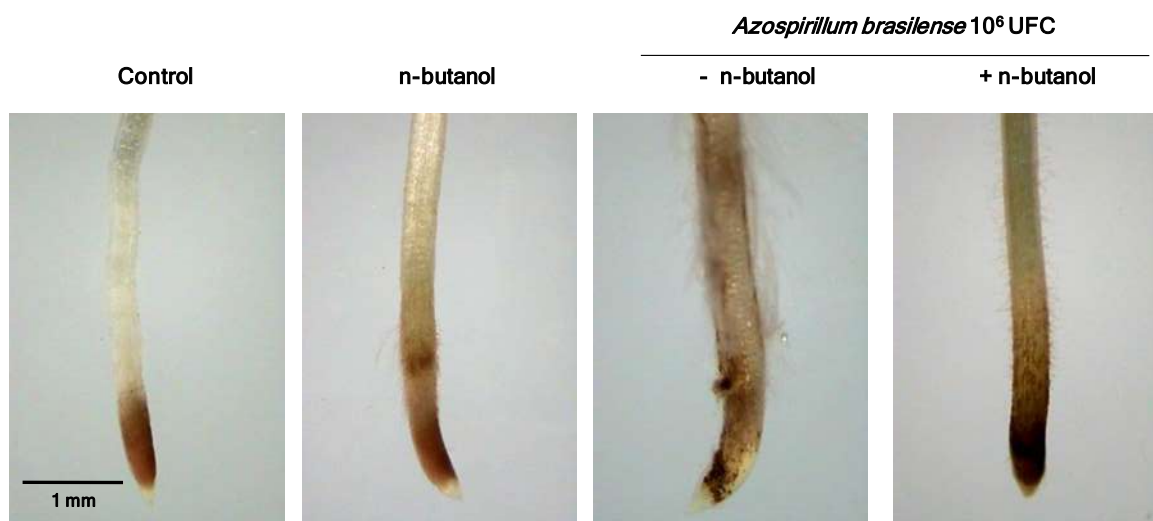


Fig. 14 Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción con *Azospirillum brasilense* Sp245 en las plantas de trigo sobre la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Plántulas de trigo inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 y n-butanol, las cuales fueron teñidas con DAB (diaminobencidina) durante 2 h. La coloración café indica la presencia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), n=10.

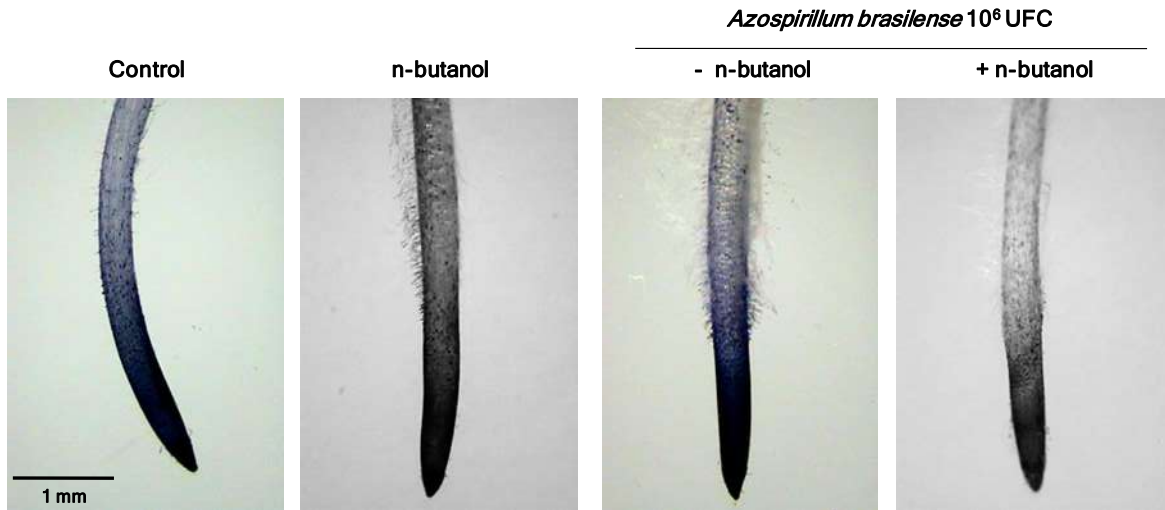


Fig. 15. Efecto de la inhibición de la PLD durante la interacción con *Azospirillum brasilense* Sp245 en plantas de trigo sobre la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Plántulas de trigo inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 y n-butanol fueron teñidas con NBT (nitro azul de tetrazolio) durante 15 min. La coloración azul indica la presencia del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), n=10.

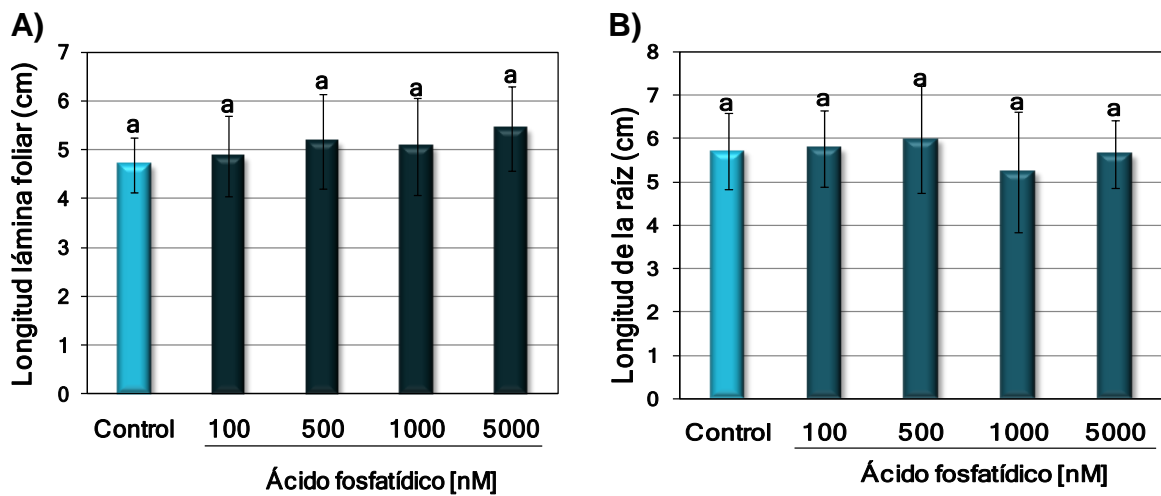


Fig. 16. Efecto de la adición exógena de AF sobre el crecimiento de plántulas de trigo. **A.** Longitud de la lámina foliar tratadas con AF. **B.** Longitud de las raíces tratadas con AF. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p=0.3640$, 0.6155 , las barras indican DE. n=10.

7.9. Efecto del ácido fosfatídico en la producción de especies reactivas de oxígeno

Se analizó el efecto de AF sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. Para analizar la producción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se hicieron tinciones con DAB (diaminobencidina), y con NBT (nitro azul de tetrazolio) el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La adición de AF de manera exógena no mostró cambios en la presencia de $O_2^{\cdot-}$ ni en H_2O_2 en las plantas que fueron tratadas (Fig. 17).

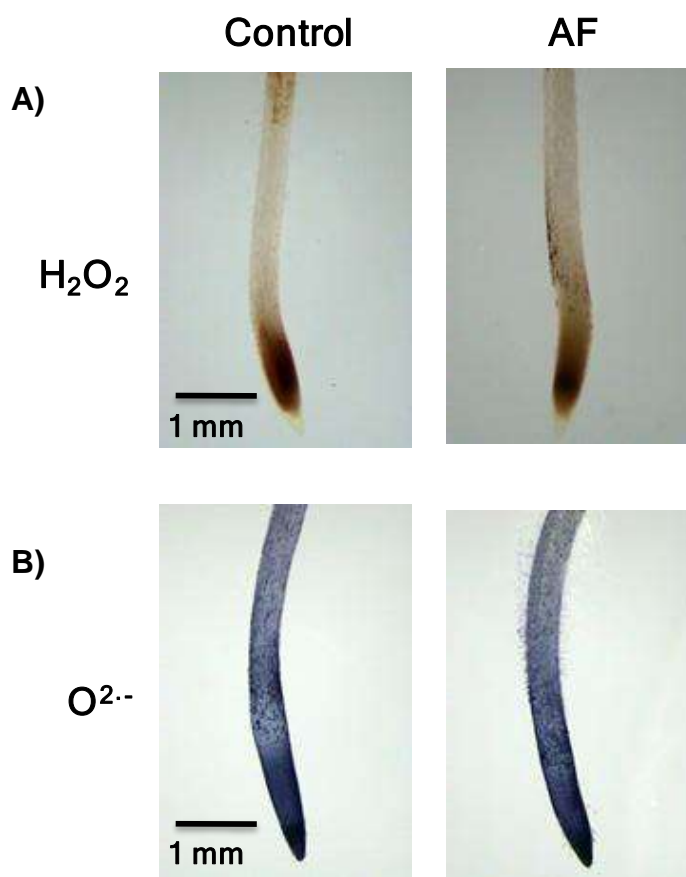


Fig. 17. Efecto de la adición de AF de manera exógena sobre la producción de peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Plántulas de trigo tratadas con AF (16:0-18:1) exógeno 5000 nM, las cuales fueron teñidas con A) DAB (diaminobencidina) B) NBT (nitro azul de tetrazolio) durante 2 h y 15 min respectivamente. La coloración café indica la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el color azul indica la presencia del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). n=10.

7.10. Efecto del ácido fosfatídico sobre sistemas antioxidantes no enzimáticos, durante la interacción.

Debido a que no se observaron cambios en la producción de ERO, se analizó el estado de los sistemas antioxidantes en respuesta a la adición de AF, específicamente el contenido de ácido ascórbico (AA). Los resultados mostraron un incremento en la producción de AA durante la adición de 1000 ng/mL de AF (Fig. 18), lo que sugiere que la adición de AF induce la activación de sistemas antioxidantes no enzimáticos, lo que podría explicar la baja producción de EROs bajo estas mismas condiciones de interacción con la bacteria.

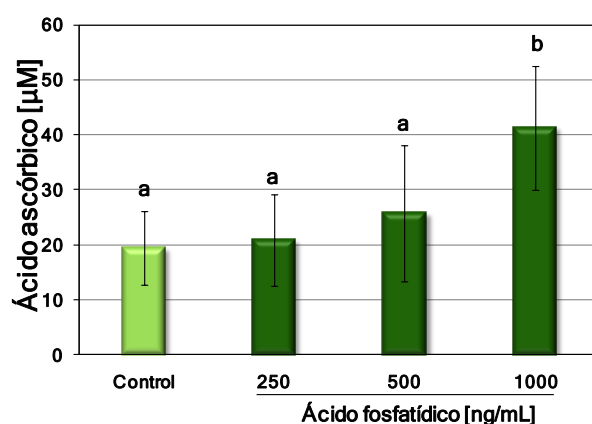


Fig. 18. Efecto de la adición exógena de AF sobre la producción de AA. Cuantificación de ácido ascórbico de plántulas de 72 h de interacción con AF (16:0-18:1) mediante espectrofotometría utilizando la técnica de reducción de DCPIP. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p < 0.005$, las barras indican DE. $n=6$.

7.11. Efecto de las auxinas sobre la actividad de la PLD.

Se sabe que uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento de *Azospirillum brasilense* es la producción de fitohormonas, en especial de auxinas como el ácido indol-3-acético, por lo cual es de importancia ver el efecto de esta molécula en el desarrollo de las plantas. Las plántulas de trigo se incubaron 72 h con 1×10^6 UFC/mL de *A. brasilense* Sp245 (la bacteria productora de auxinas) y FAJ0009 (bacteria mutante, deficiente en el 90% de la biosíntesis de auxinas). La interacción con la cepa silvestre resultó en los cambios morfológicos ya mostrados anteriormente, es decir la reducción de la longitud de la raíz y la lámina foliar (Fig.

19A, 19B). En el caso de la interacción con la mutante deficiente en la producción de auxinas, se observó que la lámina foliar se mantiene al tamaño de las plantas no tratadas, y por otro lado en el caso de la raíz se observa una disminución pero no tan baja como la observada durante la interacción con la cepa silvestre.

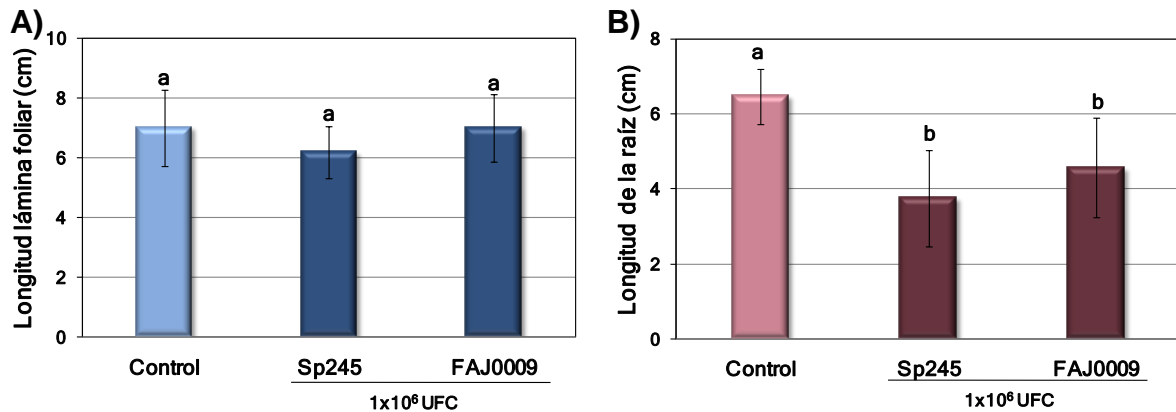


Fig. 19. Efecto de las auxinas producidas por *Azospirillum brasilense* sobre la arquitectura del sistema radical. A. Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo tratadas con 1×10^6 UFC de *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Azospirillum brasilense* FAJ0009. **B.** Longitud de la raíz de plantas de trigo tratadas con 1×10^6 UFC de *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Azospirillum brasilense* FAJ0009. Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p=0.1740$, <0.005 , las barras indican DE, $n=10$.

7.12. Inhibición de la PLD y su participación en la vía de señalización auxínica

Se analizó el efecto de la adición exógena de las auxinas, en este caso del ácido indol-3-acético (AIA), sobre el crecimiento de las plantas de trigo y su relación con la vía de señalización de la PLD utilizando el inhibidor n-butanol (n-but). Se realizaron los siguientes tratamientos: AIA a una concentración de $1 \mu\text{M}$, n-but 10 mM y AIA+ n-but $1 \mu\text{M}$, 10 mM , se dejó la interacción durante 72 h. Se observó una disminución de la longitud de la lámina foliar en los tratamientos con n-but, mientras que el tratamiento solamente con AIA no tuvo cambios estadísticamente significativos con respecto a las plantas que no fueron tratadas (Fig. 20A). El caso de la longitud de la raíz es diferente, donde podemos observar que los tratamientos con AIA inducen la

reducción de la longitud de la raíz, en el caso del tratamiento con n-but existe una disminución de la longitud, sin embargo no se observa un efecto de sinergismo de las auxinas en conjunto con el n-but (Fig. 20B).

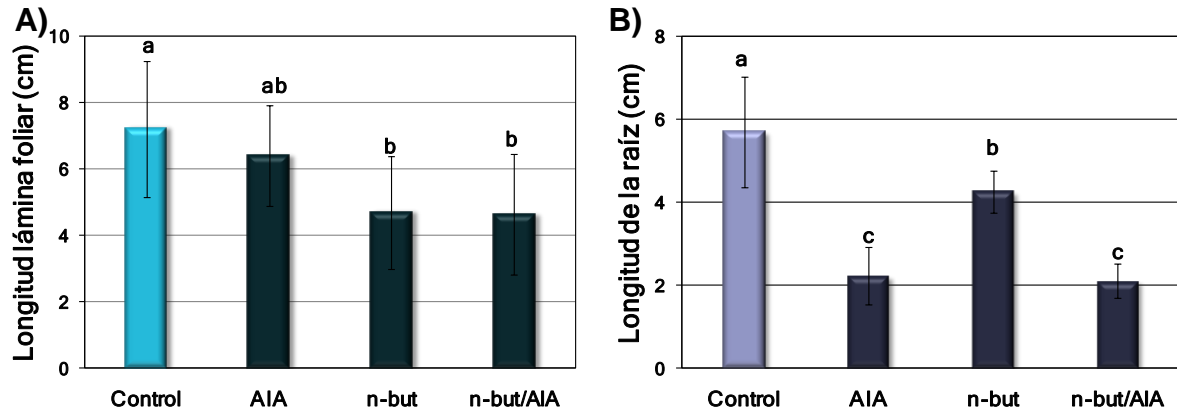


Fig. 20. Inhibición de la PLD y su participación sobre la vía de señalización auxínica relacionada con el cambio sobre la arquitectura radicular. A. Longitud de la lámina foliar de plantas de trigo tratadas con ácido indol-3-acético (1 μ M) y n-butanol (10 mM) **B.** Longitud de la raíz de plantas de trigo tratadas con ácido indol-3-acético (1 μ M) y n-butanol (10 mM). Las letras sobre la barra indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey $p < 0.005$, las barras indican DE, $n=10$.

Con todo lo anterior podemos ver que la disminución de la longitud de la raíz está influenciada directamente por la producción de auxinas sin involucrar directamente la participación de la PLD.

7.13. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la actividad enzimática de la PLD en plántulas de trigo

Se analizó el efecto de la rizobacteria sobre la actividad de la PLD. Para lo anterior, plántulas de trigo con 24 h de germinación en oscuridad y 48 h en luz, se colocaron en medio MS 0.2X líquido que contenía la bacteria a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, se dejó la interacción durante diferentes tiempos: 5, 15, 30, 60 min y 6, 12, 18, y 24 h. Después de la interacción se realizó la extracción de los lípidos totales de la raíz con solventes orgánicos, se aplicaron en placas de sílice y se revelaron con

vapores de yodo (Fig. 21A). Se observó que al aumentar el tiempo interacción de las plantas de trigo con *A. brasilense* Sp245, la concentración de ácido fosfatídico disminuyó (Fig. 21B), lo cual puede relacionarse con la actividad de la PLD.

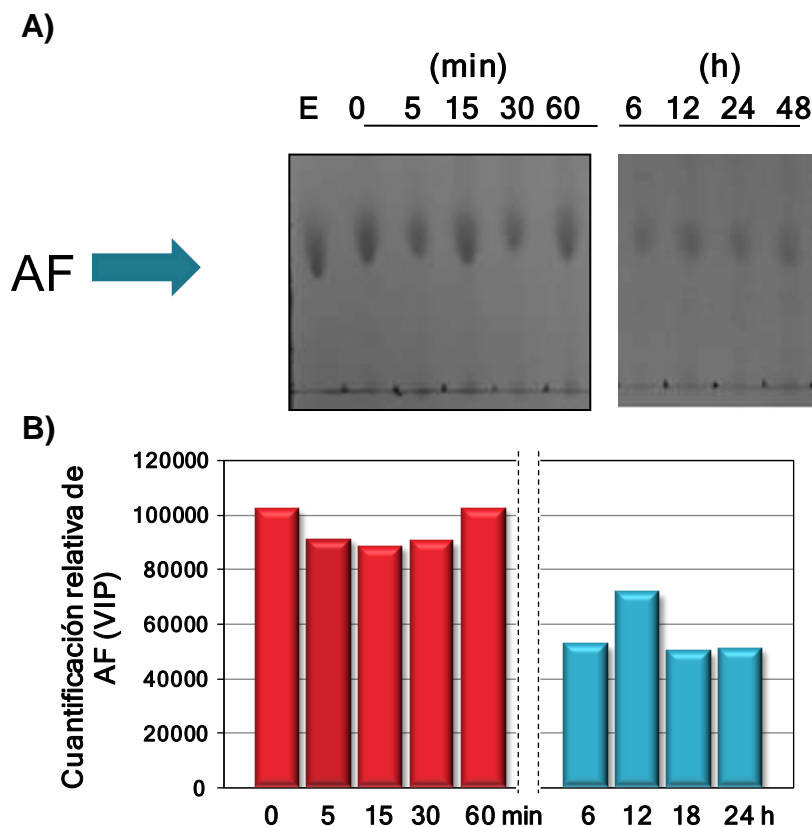


Fig. 21. Efecto de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre la actividad enzimática de PLD. **A.** Cromatografía en capa fina de raíces de plantas tratadas con 1×10^6 UFC de *Azospirillum brasilense* Sp245, de tratamientos a tiempos cortos y tiempos largos, revelado con vapores de yodo. **B.** Cuantificación relativa de las manchas de la TLC para medir la cantidad de AF producido, las manchas fueron tratadas con el programa ImageJ-NIH. Se presentan las medias de dos experimentos independientes. $n=6$.

7.14. Efecto del ácido indol-3-acético sobre la actividad enzimática de la PLD

Para estudiar el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre la actividad de la PLD, plántulas de trigo de 24 h de germinación en oscuridad y 48 h en luz, se colocaron en medio MS 0.2X líquido con AIA a una concentración de $1 \mu\text{M}$, y se incubó durante

diferentes tiempos: 5, 15, 30, 60 min y 6, 12, 18, y 24 h. Se realizó la extracción de los lípidos totales de la raíz con solventes orgánicos, el extracto se aplicó en placas de sílice, y se reveló con vapores de yodo (Fig. 22A). Se observó que la concentración de ácido fosfatídico disminuyó (Fig. 22B), lo que sugiere una relación de inhibición del AIA sobre la actividad de la PLD.

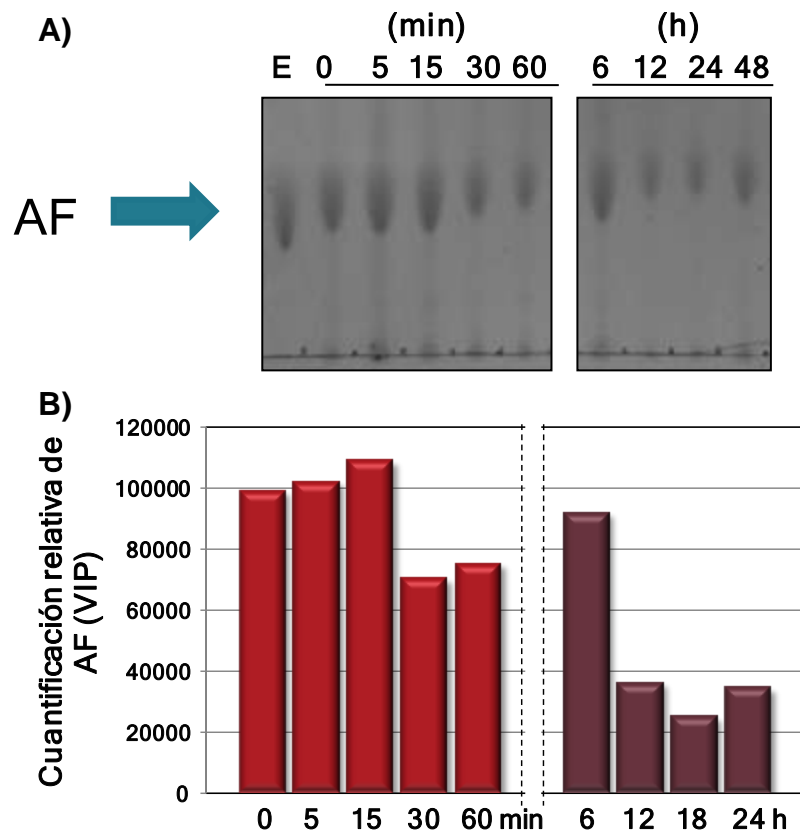


Fig. 22. Efecto del ácido indol-3-acético sobre la actividad enzimática de PLD. A. Cromatografía en capa fina de raíces de plantas tratadas con 1 μ M de ácido indol-3-acético, tratamientos a tiempos cortos y tiempos largos, revelado con vapores de yodo. **B.** Cuantificación relativa de las manchas de la TLC para medir la cantidad de AF producido, las manchas fueron tratadas con el programa ImageJ-NIH. Se presentan las medias de dos experimentos independientes. n=6.

VIII. DISCUSIÓN.

La rizosfera ha sido definida como el suelo alrededor de las raíces vegetales la cual está influenciada por los exudados que excretan, los cuales deben poseer características que lo hagan óptimo para que comunidades microbianas puedan llegar y colonizarlas.

Dentro de estos beneficios podemos observar aquellos causados por la producción de fitohormonas, las cuales la mayoría del tiempo son producidas por estas rizobacterias benéficas.

Rizobacterias del género *Azospirillum* han generado gran interés principalmente a que su interacción con las plantas genera fenotipos particulares, debido a la producción de fitohormonas como las auxinas. Se sabe que *Azospirillum brasilense* es capaz de sintetizar ácido indol-3-acético (AIA) mediante 3 vías; dos dependientes de triptófano y una independiente del aminoácido (Prinsen, 1993).

En el presente trabajo se llevó a cabo la inoculación de plántulas de trigo con la bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 a una concentración de 1×10^6 U.F.C. Posterior a la inoculación durante 72 h hubo cambios en la morfología del sistema radicular, lo cual puede observarse en la disminución de la longitud de la raíz y el aumento en la cantidad de pelos radiculares, lo cual concuerda con lo reportado por Ryu, C. (2005) donde menciona que la característica más común de las plantas tratadas con rizobacterias es la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, aunada a la proliferación de raíces laterales y pelos radiculares (Persello-Cartieaux, 2001). Estos efectos son dependientes tanto de la densidad bacteriana y la distancia desde la raíz a donde fue aplicada la rizobacteria (Ryu C., 2003; Blom, 2011).

Existen reportes donde plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* poseen un sistema radical más corto, además se observa un considerable aumento en la formación de raíces laterales y pelos radiculares, lo cual puede ayudar a la planta a aumentar su área de contacto con el suelo y de esta manera aumentar su absorción de agua y nutrientes (Spaepen *et al*, 2008).

También se evaluó el contenido de clorofila, debido a que se sabe que este pigmento es un indicador fidedigno para monitorear el estado fisiológico y de desarrollo (Piekielek *et al* 1995).

Los resultados obtenidos nos muestran un incremento significativo en el contenido de clorofila de las plantas de trigo que fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245, lo anterior es un efecto que se observa durante esta interacción, tal y como lo menciona Fonseca *et al.*, (2015) utilizando como al maíz y Swdrzynska (2000), quien utiliza al trigo y observa el incremento en este pigmento durante la inoculación de *Azospirillum brasilense*.

Aunque los fenotipos de crecimiento vegetal han sido ya bien descritos, los mecanismos moleculares quedan aún pendientes por conocer (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Tal es el caso de los lípidos de señalización, los cuales proceden principalmente o son originados de lípidos de membrana, ya que como sabemos las plantas como organismos sésiles están expuestas a diversos tipos de estrés biótico y abiótico, las plantas perciben estos estímulos y transducen la señal en respuestas biológicas río abajo, casi siempre a través de la membrana plasmática. Estos son generados por enzimas, como las fosfolipasas (Testerink y Munnik, 2005).

En este trabajo, se estudió si la inoculación de plantas de trigo con la bacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 estimula la actividad de la fosfolipasa D (PLD). Durante las primeras etapas de interacción, las bacterias tienden a producir cambios en el metabolismo y expresión de genes de la planta hospedera, donde se ven involucradas moléculas de señalización como las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las cuales se sabe que son compuestos parcialmente reducidos o derivados activos del oxígeno, donde la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática es la responsable de estimular la producción de ERO. En *Arabidopsis*, la PLD α 1 y el AF han sido implicados en el incremento de la actividad de la NADPH oxidasa y su consiguiente aumento en la producción de ERO (Sang, Cui, y Wang, 2001). Incluso hay reportes donde la PLD α 1 promueve la producción de ERO, mientras que la PLD δ medía la respuesta a ERO, es decir que las diferentes PLD funcionan en diferentes pasos de las vías de señalización de ERO.

En este trabajo se observó que las plántulas de trigo que fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 a una concentración de 1×10^6 UFC incrementaron la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la zonas de elongación y diferenciación. Por otro lado, la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no se afectó.

También se observó un gran incremento en el número de pelos radiculares formados durante la interacción.

Recordando que el anión superóxido está relacionado con la proliferación celular y el peróxido de hidrógeno es localizado en las zonas de diferenciación celular (Tsukagoshi, 2010), quizá la reducción de la raíz se deba al fenómeno ya antes descrito al igual que el aumento en el número de pelos radiculares. La literatura menciona que la PLD puede ser activada por una amplia variedad de estímulos tales como el corte, congelación, salinidad, sequía, interacción con metales pesados y durante el ataque de patógenos. Sin embargo no existen reportes donde se mencione si las rizobacterias o bacterias benéficas estimulen vías de señalización mediadas por fosfolipasas.

Uno de los métodos para poder analizar la participación de la PLD, es el uso de inhibidores, de los cuales el n-butanol (n-but), ha sido estudiado ampliamente debido a la reacción de transfosfatidilación que se produce durante su acción enzimática y de esta manera facilitar la medición de la actividad de la PLD (Potocky *et al.*, 2003) (Yang *et al.*, 1967).

Se analizó el efecto de la inhibición de la PLD en plántulas inoculadas con la rizobacteria. Los resultados mostraron una disminución en la cantidad de pelos radiculares, involucrando la vía de señalización de PLD, sin embargo, no se sabe cuál o cuáles de todas las isoformas de PLD se encuentran involucradas.

Reportes de la adición exógena de 200 μ M de AF con diferentes cadenas de ácidos grasos; AF 8:0, AF 16:0, AF 18:0 y AF 18:1, muestran un incremento en la producción de anión superóxido. Sin embargo las cantidades utilizadas no fueron suficientemente adecuadas, además de que el AF añadido contenía las cadenas de ácidos grasos 16:0 -18:1. En un experimento realizado por Sang *et al.*, (2001), observan que los AF con 8:0, 16:0, 18:0 y 18:1 incrementan la producción de O_2^- , por lo cual la composición del tipo de AF también puede influir en la activación y producción de ERO.

Para observar si los cambios morfológicos observados tras la inoculación de *Azospirillum brasilense* Sp245 eran debidos a las auxinas sintetizadas por la bacteria, se llevó a cabo la inoculación de una mutante en la biosíntesis de auxinas,

FAJ0009 (Costacurta *et al.*, 1994). Las plántulas tratadas con la mutante mostraron más similitud con las plantas que no fueron inoculadas, sin embargo es importante mencionar un ligero incremento en la cantidad de pelos radiculares y esto es debido a que la mutante es capaz de sintetizar auxinas hasta en un 10%.

Por otro lado, observamos una disminución en la producción de AF en los tratamientos con *A. brasilense* y con la adición exógena de auxinas en la raíz de las plántulas de trigo. Existen reportes donde la adición de AIA 10 μ M induce la formación e incremento de AF en pepino (Lamattina *et al.*, 2008), sin embargo esta disminución en ambos experimentos pudiera ser debida a la acción de diversos inhibidores tales como las n-aciletanolaminas producidas por diversas fosfolipasas como la PLD β y la PLD γ , ya que se sabe que estas n-aciletanolaminas actúan como inhibidores de la PLD, por ejemplo la PLD α 1. Otro posible panorama contempla la activación de otras cascadas de señalización cuyo principal propósito es la disminución de AF, pudiéndose involucrar enzimas como la fosfatasa de lípido fosfato, la cual desfosforila al AF para producir diacilglicerol (DAG), la cinasa de AF que fosforila al AF para formar DAG pirofosfato, la PLA que desacila al AF para producir ácido lisofosfatídico, que además de atenuar la función del AF, ayudan a la generación de nuevos lípidos mensajeros (Wang *et al.*, 2006).

El estudio de la gran familia de PLD es de importancia para poder conocer su participación en una infinidad de señales producidas por diversos estímulos, para lo cual se necesita de mayor experimentación con el modelo de estudio que nosotros utilizamos en este trabajo, ya que posee un amplio valor agronómico. Son necesarias determinaciones más precisas de la actividad enzimática, durante la interacción planta-microorganismo, así como evaluar el perfil lipídico durante la interacción, obteniendo las especies moleculares mayormente producidas durante el estímulo. Así como la realización de ensayos “in silico” para poder evaluar los niveles de expresión de las diferentes PLD. Se debe realizar la adición exógena de las diferentes especies moleculares para observar su efecto y poder relacionarlo con los diversos procesos fisiológicos y de señalización implicados en procesos de desarrollo, crecimiento y defensa.

IX. CONCLUSIONES

- *A. brasilense* Sp245 induce la disminución del sistema radicular y un aumento en la cantidad de pelos radiculares.
- *A. brasilense* Sp245 induce la producción de EROs durante su interacción con el trigo.
- *A. brasilense* Sp245 promueve el desarrollo del trigo, relacionándolo al aumento en el contenido de clorofila.
- La inhibición de la PLD resulta en la disminución del crecimiento y contenido de clorofila de las plantas de trigo.
- El ácido fosfatídico exógeno no induce cambios morfológicos en las plantas de trigo, sin embargo produce un aumento en el ácido ascórbico el cual está relacionado con sistemas antioxidantes no enzimáticos.
- Las auxinas producidas por *A. brasilense* Sp245 son las responsables de los cambios morfológicos observados durante la interacción.
- La actividad enzimática de la PLD disminuye durante la interacción de *A. brasilense* Sp245 con el trigo.

X. LITERATURA CITADA

Anderson, M., Kourtchenko, O., Dangl, J., Mackey, D., y Ellerström, M. (2006a). Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **47**: 947-959.

Anthony, R., Henriques, R., Helfer, A., Meszaros, T., Rios, G., Testerink, C., y otros. (2004). A protein kinase target of a PDK1 signaling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J*, **23**: 572-581.

Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. Irlanda: Woodhead.

Armada, E.; Portela, G.; Roldan, A.; Azcon, R. (2014) Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. *Geoderma*, **232**: 640–648.

Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., and Vivanco, J. M. (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol*, **20**; 642–650.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol*, **57**; 233–266.

Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. D., Hartmann, A., y Döbereiner, J. (2005). Genus II. *Azospirillum*. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, y J. T. Staley (Edits.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2, págs. 7-26). New York: Springer-Verlag.

Bargmann, B., Laxalt, A., Ter Riet, B., Schouten, E., Van Leeuwen, W., Dekker, H., y otros. (2006). LePLD β 1 activation and relocalization in suspension-cultured tomato cells treated with xylanase. *Plant J*, **45**: 358-368.

Bashan, Y., y de-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Adv Agron*, **108**: 77-136.

Bashan, Y., y Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol*, **36**: 591-608.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, **37**: 911–917.

Blom, D. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol*, **13**: 3047-3058.

Botanical-Online. (s.f.). *Botanical-Online SL*. Recuperado el 30 de marzo de 2018, de <http://www.botanical-online.com/trigo.htm>

Bottini, R.; Cassan, F.; Piccoli, P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**; 497–503.

Brown, H. A., Henage, L. G., Preininger, A. M., Xiang, Y., y Exton, J. H. (2007). Biochemical analysis of phospholipase D. *Methods Enzymol*, **434**: 49-87.

Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M. E., Gil Serrano, A. M., y Okon, Y. (2000). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol Lett*, **189**: 259-264.

Calvo, P., Nelson, L. M., y Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, **383**: 3-41.

Cárdenas-Rodríguez, N., y Pedraza-Chaverri, J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*, **12**: 164-173.

Causin HF, Roqueiro G, Petrillo E, Láinez V, Pena LB, Marchetti CF, Gallego SM, Maldonado SI (2012) The control of root growth by reactive oxygen species in *Salix nigra* Marsh. Seedlings. *Plant Sci*, **183**:197–205.

Cheever, M., Sato, T., de Beer, T., Kutateladze, T., Emr, S., y Overduin, M. (2001). Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat Cell Biol*, **3**: 613-618.

Compant, S., Clement, C., y Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem*, **42**: 669-678.

Crawford, R. M. (1976). *Mineral Nutrition. In plant structure, function and adaptation* (Hall, M A ed.). London: The Macmillan Press.

Creus, C., Sueldo, R., y Barassi, C. (1997). Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiol Biochem*, **35**: 939-944.

Croes, C. L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., y Michiels, K. W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J Gen Microbiol*, **139**: 2261-2269.

Davies, H.R. y Masten, S.J. (1991). Spectrophotometric method for ascorbic acid using dichlorophenolindophenol: elimination of the interference due to iron. *Anal chem acta*, **248**: 225-227.

Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., y Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachishypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res*, **159**: 371-394.

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.

Döbereiner, J., Pedrosa, F. O. (1987) Nitrogen-fixing bacteria in Nonleguminous Crop plants. New York: Sci.Tech.Publishers/Springer-Verlag,1-155; Madison Wis, USA.

Draft U.S. (s.f.). *Greenhouse Gas Inventory Report: 1990–2014*. Recuperado el 24 de Marzo de 2018, de <https://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/usinventoryreport.html>

Drogue, B., Combes-Meynet, E., Moënné-Loccoz, Y., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C. (2013) "Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signals," in Vol.1 and 2, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, ed. F.J. de Bruijn (NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 281–294.

Egamberdieva, D.; Lugtenberg, B. (2015) Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Alleviate Salinity Stress in Plants. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*; Springer. New York, NY, USA, 1: 73–96.

Eliás, M., Potocký, M., Cvrcková, F., y Zárský, V. (2002). Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics* , **3**: 2.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., y otros. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Res*, **46**: 839-862.

Fan, L., Zheng, S., Cui, D., y Wang, X. (1999). Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase Dalpha, Dbeta y Dgamma in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **119**: 1371-1378.

Fibach-Paldi. S, Burdman, S. & Okon, Y. (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett*, **326**: 99–108

Fonseca, R; Ferreira, G; de Freitas, D; Barbosa, C; de Souza, A. (2015) Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesq Agropec Trop Goiania*, **45**: 304-311.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J., Mylona, P., Miedema, H., Angel, M., y otros. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**: 442-446.

Gafny, R., Okon, Y., Kapulnik, Y., y Fischer, M. (1986). Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol Biochem*, **18**: 69-75.

Glick, B R. (1995). The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Can J Microbiol*, **4**: 1109-1114.

Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation, Scientifica: Waterloo* .

Gomez-Merino, F., Arana-Ceballos, F., Trejo-Tellez, L., Skirycz, A., Brearley, C., y Dormann, P. (2005). *Arabidopsis* AtDGK7, the smallest member of plant diacylglycerol kinases (DGK's), displays unique biochemical features and saturates at low substrate concentration: The DGK inhibitor R59022 differentially affects AtDGK2 and AtDGK7 activity in vitro and alters plant growth and development. *J Biol Chem* , **280**: 34888-34899.

Gray, E. J., y Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem*, **37**: 395-410.

Hammond, S., Altshuller, Y., Sung, T., Rudge, S., Rose, K., y Engebrecht, J. (1995). Human ADP-rybosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem*, **270**: 29640-29643.

Hayat, R.; Ali, S.; Amara, U. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann Microbiol*, **60**; 579–598.

Hirsch, A. M., Buaer, W. D., Bird, D. M., Cullimore, J., Tyler, B., y Yoder, J. I. (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, **84**: 858–68.

Hong, Y., Devaiah, D., Thamasandra, B., Bahn, S., Li, M., Welti, R., y otros. (2009). Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant J*, **58**: 376-387.

Hong, Y., Pan, X., Welti, R., y Wang, X. (2008). Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**: 803-816.

Horvath, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M. L., Munnik, T., Saidi, Y., y otros. (2012). Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections. *Prog Lipid res*, **51**: 208-220.

Huergo, L.F., Souza, E.M., Steffens, M.B.R., Yates, M.G., Pedrosa, F.O., and Chubatsu, L.S. (2005) Effects of overexpression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. *Arch Microbiol*, **183**: 209-217.

Huergo, L.F., Souza, E.M., Steffens, M.B.R., Yates, M.G., Pedrosa, F.O., and Chubatsu, L.S. (2003) Regulation of glnB gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the ntrC protein. *FEMS Microbiol Lett*, **223**; 33–40.

Jain, D. K., y Patriquin, D. G. (1984). Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl Environ Microbiol*, **48**: 1208-1213.

Jeon, J., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., y Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J Microbiol*, **41**: 271-276.

Jones, D. L., Nguyen, C., y Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant Soil*, **321**: 5–33.

Jones, J. G., y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**: 323-329.

Kapulnik, Y., Okon, Y., y Henis, Y. (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can J Microbiol*, **31**: 881-887.

Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M. and Shinozaki, K. (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **43**: 107-117.

Katagiri, T., Takahashi, S., y Shinozaki, K. (2001). Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signaling. *Plant J*, **26**: 595-605.

Kirik, A., y Mudgett, M. (2009). *SOBER1 phospholipase activity suppresses phosphatidic acid accumulation and plant immunity in response to bacterial effector AvrBsT*. USA: Proc Natl Acad Sci USA, **106**: 20532-7.

Kloepper, J.W.; Leong, J.; Teintze, M.; Schroth, M.N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**; 885–886.

Kooijmann, E., Chupin, V., de Kruijff, B., y Burger, K. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, **4**: 162-174.

Kooijman, E., Tieleman, D., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D., Burger, K., Kruijff, B. (2007) An Electrostatic/Hydrogen Bond Switch as the Basis for the Specific Interaction of Phosphatidic Acid with Proteins. *J Biol Chem*, **282**: 11356-11364

Kooijman, E., Testerink, C. (2010) Phosphatidic acid: an electrostatic/hydrogen-bond switch? In: Munnik, T. (Ed.), *Lipid Signaling in Plants*. Springer Verlag, Berlin, 203–222.

Lamattina, L., Laxalt, A., y Lanteri, M. (2008). Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Plant Physiol*, **147**: 188-198.

Laxalt, A., y Munnik, T. (2002). Phospholipid signaling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, **5**: 332-338.

Lauter, F.R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J.W., and Frommer, W.B. (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**; 8139–8144.

Levanony, H., y Bashan, Y. (1991). Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil*, **137**: 91-97.

Li, M., Qin, C., Welti, R., y Wang, X. (2006). Double knockouts of phospholipases Dzeta1 y zeta2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning. *Plant Physiol*, **140**: 761-770.

Li, M., Welti, R., y Wang, X. (2006). Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D ζ 1 and ζ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol*, **142**: 750-761.

Li, G., Xue, H.W., (2007). *Arabidopsis* PLD ζ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell*, **19**: 281-295.

Li, M., Hong, Y., Wang, X. (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1791**: 927-935.

Loew, S., Kooijman, E.E., May, S. (2013) Increased pH-sensitivity of protein binding to lipid membranes through the electrostatic-hydrogen bond switch. *Chem Phys Lipids*, **169**: 9–18.

Lucy, M., Reed, E., y Glick, B. R. (2004). Application of free living plant-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86**: 1-25.

Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*, **63**: 541-556.

Malusá, E., y Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Appl Microbial Biotechnol*, **98**: 6599-6607.

Mantelin, S., y Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot*, **55**: 27-34.

Marques, A. G., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A. S., y Castro, P. L. (2010). Assesment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using Zea mays as indicator plant. *Soil Biol. Biochem*, **42**: 1229-1235.

Martinez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., y Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Sci Plant Nutr*, **10**: 293–319.

Michiels, K. W., Croes, C. L., y Vanderleyden, J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol*, **137**: 2241-2246.

Mishra, C., Zhang, W., Deng, F., Zhao, X., Wang, X. (2009) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* growth. *Science*, **312**: 264-266.

Munnik, T., y Testerink, C. (2009). Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *J Lipid Res*, **50**: 260-265.

Oblozinsky, M., Ulbrich-Hofmann, R., y Bezakova, L. (2005). Head group specificity of phospholipase D isoenzymes from poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.). *Biotechnol Lett*, **27**: 181-185.

Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, G., Morelli, G., y otros. (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*, **300**: 1427-1430.

Okon, Y., Heytler, P., y Hardy, W. (1983). N₂ Fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Appl Environ Microbiol*, **46**: 694-697.

Peña, R. J. (s.f.). *Wheat for bread and other foods*. Recuperado el 30 de Marzo de 2018, de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO): www.fao.org/docrep/006/Y4011E/y4011e0w.htm

Persello-Cartieaux, F. (2001). Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta*, **212**: 190-198.

Pierrugues, O., Brutesco, C., Oshiro, J., Gouy, M., Deveaux, Y., y Carman, G. (2001). Lipid phosphate phosphatases in *Arabidopsis*. Regulation of the AtLPP1 gene in response to stress. *J Biol Chem*, **276**: 20300-20308.

Pleskot, R., Pejchar, P., Zárský, V., Straiger, C., y Potocký, M. (2013). Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Sci*, **18**: 496-504.

Pothier, J.F.; Wisniewski-Dyé, F.; Weiss-Gayet, M.; Moëne-Loccoz, Y.; and Prigent-Combaret, C. (2007) Promoter trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology*, **153**; 3608–3622.

Potocky, M., Elias, M., Profotova, B., Novotna, Z., Valentova, O., y Zarsky, V. (2003). Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. *Planta*, **217**: 122-130.

Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., y Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol Plant Microb Interact*, **6**: 609-615.

Puente, M., Li, C., y Bashan, Y. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol*, **6**: 643- 650.

Qin, C., y Wang, X. (2002). The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol*, **128**: 1057-1068.

Quanca, H., Guido, U., y Dorothea, B. (2016). Lipid signaling in plants responses to abiotic stress. *Plant, Cell y Environment*, **39**: 1029-1048.

Riefler, M.; Novak, O.; Strnad, M.; Schumuller, T. (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**; 40–54.

Ryu, C. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 4927-4932.

Ryu, C. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, **268**: 285-292.

Ryu, S. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci*, **9**: 229-235.

Sabry, S.R.S.; Saleh, S.A.; Batchelor, C.A. (1997) Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc Biol Sci*, **264**: 341–346.

Sahin, F., Cakmacki, R., y Kanta, F. (2004). Sugar beet and barley yields in relation of inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, **265**: 123-129.

Sang, Y., Cui, D., y Wang, X. (2001). Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **126**: 1449-1458.

Sciorra, V., y Morris, A. (2002). Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1582**: 45-51.

Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L. (2002). Root development *Arabidopsis* Book 1, American Society of Plant Biologist.

Shukla, K.P., Sharma, S., Singh, N.K., Singh, V., Tiwari, K., and Singh, S. (2011) Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. *Afr J Biotechnol*, **10**: 9717–9724.

Son, J.S.; Sumayo, M.; Hwang, Y.J.; Kim, B.S.; Ghim, S.Y. (2014) Screening of plant growth promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against grey leaf spot diseases in pepper. *Appl. Soil Ecol*, **73**: 1-8.

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

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. (2011) Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**: 1-13.

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., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, **31**: 425-448.

Sprent, J. (1979). *The biology of nitrogen-fixing organisms*. London, New York: McGraw-Hill.

Steenhoudt, O., y Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and acological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, **24**: 487-506.

Sung, T., Roper, R., Zhang, Y., Rudge, S., Ternel, R., y Hammond, S. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, **16**: 4519-4530.

Szabó, a., y Hammer, k. (1995). Notes on the taxonomy of farro: *Triticum monococcum*, *T. dicoccon* and *T. spelta*. Hulled wheats In: padulosi, S., hammer, k. and heller, j. (eds), Hulled Wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and Neglected crops. 4. *Proceedings of the first International workshop on Hulled Wheats. Rome*, 2-40.

Tanaka, T., Kassai, A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Tokumura, A. (2012). Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *J Agricult and Food Chem*, **60**: 4156–4161.

Testerink, C., y Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot*, **62**: 2349-2361.

Testerink, C., y Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci*, **10**: 368-375.

Thordal- Christensen, Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1996) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, **11**: 1187-1194

Tiellstrom, H., Andersson, M., Larsson, K., y Sandelius, A. (2008). Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid to

digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ*, **31**: 1388-1398.

Tien, T., Gaskins, M., y Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol*, **37**, 1016-1024.

Tsukagoshi, H. (2010). Transcriptional regulation of ROS control transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, **143**: 606-616.

Umali-García, M., Hubbell, D. H., Gaskins, M. H., y Dazzo, F. B. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl Environ Microbiol*, **39**: 219-226.

Uraji, M., Katagiri, T., y Okuma, E. (2012). Cooperative function of PLDd and PLDa1 in abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **159**: 450-460.

Vacheron, J.; Desbrosses, G.; Bouffaud, M.-L.; Touraine, B.; Moënne-Loccoz, Y.; Muller, D. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*, **4**; 1-19.

Vallero, D. A. (2016). *Environmental biotechnology A biosystems Approach*. London: Elsevier.

Van den Brink-van der Laan, E., Killian, J., y de Kruijff, B. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys acta*, **1666**: 275-288.

Van den Broek, D., Bloemberg, G. V., y Lutenberg, B. (2005). The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol*, **7**: 1686-1697.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil*, **255**: 571 -586.

Von Wiren, N., Lauter, F. R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., et al. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J*. **21**; 167– 175.

Wang, C., Zien, C., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D., y Wang, X. (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant cell*, **12**: 2237-2246.

Wang, G., Ryu, S., y Wang, X. (2012). Plant phospholipases: an overview. *Methods Mol Biol*, **861**: 123-137.

Wang, X. (2001). Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **52**: 211-231.

Wang, X. (2004). Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, **7**: 329-336.

Wang, X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol*, **139**: 566-573.

Wang, X., y Zhang, W. (2007). Phospholipid signaling in plant response to drought and salt stress. En *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*.(págs. 183-192). Netherlands: Springer.

Wang, X., Devaiah, P., Zhang, W., y Welti, R. (2006). Singaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, **45**: 250-278.

Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., y Zhou, H.-E. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **277**: 31994-32002.

Yamaryo, Y., Dubots, E., Albrieux, C., Baldan, B., y Block, M. (2008). Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD ζ 2, an *Arabidopsis thaliana* phospholipaseD. *FEBS Lett*, **582**: 685-690.

Yang, J., Kloepper, J., y Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci*, **14**: 1-4.

Yang, S., Freer, S., y Benson, A. (1967). Transphosphatidylation by phospholipase D. *J Biol Chem*, **242**: 477-484.

Zalejski, C., Zhang, Z., Quettier, A.-L., Maldiney, R., Bonnet, M., y Brault, M. (2005). Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J*, **42**: 145-150.

Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y. and Wang, X. (2005c) Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, **1736**: 1–9.

Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., y Wang, X. (2004). Phospholipase Da1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci*, **101**: 9508-9513.

Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R., y otros. (2003). The oleate-stimulated phospholipase D, PLDd, and phosphatidic acid decrease H₂O₂- induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**: 2285-2295.

Zhao, J., Devaiah, S. P., Wang, C., Li, M., Welti, R., y Wang, X. (2013). *Arabidopsis* phospholipase Dβ1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens. *New Phytol*, **199**: 228-240.

Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., y Wang, X. (2000). Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase Dα y β. *J. Biol Chem*, **275**: 19700-19706.

Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**: 247-273.

Zien, C., Wang, C., Wang, X., y Welti, R. (2001). In vivo substrates and the contibution of the common phosphoalipase D, PLDα, to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *Biochim Biosphys Acta*, **1530**: 236-248.

XI. APÉNDICE

PROTOCOLOS

LAVADO Y DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

- 1.- Colocar las semillas de trigo en un vaso de precipitados que contenga 50 mL de una solución de SDS 1% y mezclar con el agitador magnético, sobre la plancha de agitación durante 5 minutos. Eliminar por decantación la solución de SDS.
- 2.- Se realizaran lavados de las semillas añadiendo 50 mL de agua destilada estéril, agitando de la misma manera que el punto anterior durante 2 minutos, repetir este proceso 3 veces, eliminando el agua en cada repetición.
- 3.- Colocar las semillas con ayuda de una pinza en otro vaso de precipitados el cual contenga 50 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 1%, procediendo a agitar de igual manera que en los puntos anteriores durante 5 minutos. Eliminar la solución de hipoclorito de sodio por decantación.
- 4.- Enjuagar las semillas con 50 mL de agua destilada estéril agitando de igual manera con la plancha de agitación durante 2 minutos. Repetir este proceso 3 veces, eliminando el agua en cada repetición. Se debe eliminar toda el agua posible.

NOTAS:

- Todo el procedimiento debe llevarse a cabo en condiciones de esterilidad, dentro de campana de flujo laminar, desinfectando el área de trabajo con una solución de Hipoclorito de sodio 1% y posteriormente con una solución de Etanol al 70%.

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TRIGO

- 1.- Con una pinza estéril poner el algodón y papel filtro en cajas de Petri.
- 2.- Adicionar 10 mL de agua destilada estéril (para humedecer).
- 3.- Acomodar las semillas dentro la caja de Petri con distancias entre ellas en una misma posición previamente desinfectadas.
- 4.- Cubrir las semillas con papel filtro estéril.
- 5.- Adicionar 5 mL de agua destilada estéril.

6.- Sellar la caja de Petri con papel parafilm (se puede dejar sin sellar, teniendo cuidado al llevarlas a incubar).

7.- Colocar en la incubadora a 26 °C en oscuridad durante 3 días o dependiendo del experimento.

NOTAS:

➤ Después de la incubación al día siguiente adicionar 5 mL de H₂O estéril para mantener la humedad.

PREPARACIÓN DE MEDIO LB MÍNIMO, LÍQUIDO Y SÓLIDO

1.-Pesar todos los componentes para el volumen que se requiera preparar, de acuerdo a la Tabla I.

2.- Colocar todos los componentes en un vaso de precipitados.

3.- Adicionar agua destilada para disolver.

4.- Agitar en la plancha con un agitador magnético (Mosca).

5.- Ajustar el pH con NaOH a pH 7.0

6.-Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

TABLA I.

MEDIO LB MINIMO pH 7.0	1 LITRO	500 mL	250 mL
Triptona	10 g	5 g	2.5 g
Extracto de levadura	5 g	2.5 g	1.25 g
NaCl	5 g	2.5 g	1.25 g
MgSO₄	0.3009 g	0.1504 g	0.0752 g
CaCl₂	0.277 g	0.1387 g	0.0693 g
Agar Bacteriológico	15 g	7.5 g	3.75 g

NOTAS:

➤ Para preparar medio LB mínimo sólido, se adiciona agar bacteriológico dependiendo el volumen que se esté preparando y se esteriliza para posteriormente vaciarlo en cajas de Petri.

➤ Si se necesita la adición de Antibiótico (Tetraciclina "TC" por ejemplo) se debe tener una concentración de 10 µg/mL

➤ Si se utiliza TC 500mg/mL se utilizan 5.0 µL de la solución para 250 mL de medio.

- Si se utiliza TC 100mg/mL se utilizan 25.0 µL de la solución para 250 mL de medio.

PREPARACIÓN DE MEDIO MS 0.2X LÍQUIDO Y SÓLIDO

- 1.- Vaciar el medio MS y la sacarosa en un vaso de precipitados según la tabla II.
- 2.- Adicionar 95% del total de H₂O destilada a preparar y mezclar.
- 3.- Ajustar el pH a 7.0 con KOH al 10%
- 4.- Adicionar el agar y mezclar.
- 5.- Aforar con H₂O destilada a la cantidad necesaria.
- 6.- Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión.
- 7.- Vaciar el medio en cajas de Petri (Aproximadamente 33.3 mL/caja) en condiciones estériles, dejar solidificar y sellarlas con parafilm.
- 8.- Almacenar a temperatura ambiente.

NOTAS:

- El medio MS en polvo es de la compañía SIGMA-ALDRICH y se utiliza una menor cantidad debido a que concentrado no es apto para el óptimo crecimiento.
- Se puede utilizar Azúcar comercial en lugar de utilizar sacarosa.
- Es importante que se utilice KOH (Hidróxido de Potasio) al 10% para ajustar el pH. Si por alguna razón se adiciona más del KOH 10% y el pH incrementa más de 7.0, no intentar disminuir el pH con HCl (Ácido clorhídrico). Simplemente se desecha el medio.
- El agar utilizado es Phytoagar.

TABLA II

MEDIO MS SOLIDO	1000 mL	800 mL	500 mL	250 mL
Medio MS	0.9 gr.	0.72 gr.	0.45 gr.	0.225 gr.
Sacarosa	6 gr.	4.8 gr.	3 gr.	1.5 gr.
Agar Plantas	10 gr.	8 gr.	5 gr.	2.5 gr.

PREPARACIÓN DE PREINÓCULO BACTERIANO

- 1.- Vaciar en un (01) matraz Erlenmeyer 15 mL de medio LB líquido pH 7.0, adicionar antibiótico tetraciclina dependiendo la cantidad de medio para una

concentración de 10 µg/mL *

2.- Depositar en (04) tubos de ensaye 3 mL de medio LB min líquido para un total de 12 mL.

3.- (03) tres de los (04) cuatro tubos serán inoculados con una (01) asada de la bacteria (*Azospirillum brasilense* sp 245) cada uno. Uno será el control, el cual no será inoculado con la bacteria.

4.-Incubar durante 16 horas a 28 °C en agitación constante a 180 rpm.

NOTAS:

➤ *Si se utiliza TC 100 mg/mL, para 15 mL se necesitan 1.5 µL. Para tener una concentración de 10 µg/mL.

PREPARACIÓN DE INÓCULO BACTERIANO

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

2.- Añadir al matraz marcado con "Bacteria" "X µL" de pre-inoculo.
X= 150 µL por cada 50 mL de medio LB.
Al marcado con control no se le adiciona pre-inoculo.

3.- Incubar durante 16 horas a 28 °C en agitación constante 180 rpm.

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

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

NOTAS:

➤ *Azospirillum brasilense* sp 245, se resiembrada cada 3 días y se mantiene a 4°C

➤ Se mide la absorbancia de las muestras, tanto control y muestra con bacteria.

D.O. = 0.900 = 1×10^8 U.F.C.

LAVADO DE CELULAS BACTERIANAS

1.- 1 mL de cultivo bacteriano de 16–20 hrs de crecimiento se deposita en un tubo eppendorf.

2.- Centrifugar 3893 g durante 12 minutos a T° Ambiente.

3.- Eliminar el sobrenadante (Realizar en campana de Flujo).

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

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

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

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

NOTAS:

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

INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

- 1.- Lavar, desinfectar semillas de trigo y germinarlas durante 24 h.
- 2.- Preparar medio MS 0.2X sólido.
- 3.- Antes de que solidifique el medio, añadir la bacteria *Azospirillum brasilense* Sp 245 hasta obtener la concentración deseada /mL.
- 4.- Dejar solidificar el medio MS a temperatura ambiente.
- 5.- Trasplantar las semillas de trigo germinadas a las placas con medio y bacteria con ayuda de unas pinzas.
- 6.- Tapar y sellar las cajas.
- 7.- Incubar a 24 h a 28°C.
- 8.- Pasar a cámara de crecimiento 16h luz/ 8h oscuridad, hasta completar 72 h.

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

- 1.- Moler en nitrógeno líquido hojas de los tratamientos.
- 2.- Transferir el polvo a un tubo limpio y añadir 1 mL de metanol.
- 3.- Re suspender en vortex en condiciones de oscuridad durante 15 a 30 s.
- 4.- Centrifugar a 3000 rpm. durante 15 min a 4°C.
- 5.- El sobrenadante se transfiere a otro tubo nuevo, limpio y foto protegido.
- 6.- Leer la absorbancia del sobrenadante a $\lambda = 665$ y 652 , utilizando metanol como blanco.
- 7.- La concentración de clorofila total se obtiene aplicando la ecuación: $C_{total} = 1.44 (a_{665}) + 24.93 (a_{652})$.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

- 1.- Plantas de trigo tratadas con *Azospirillum brasilense*, n-butanol, AF.
- 2.- Sumergir las plantas en una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) al 0.1%, pH 3.8, durante 2 horas.
- 3.- Aclarar en etanol 96° en ebullición.
- 4.- Mantener en agua destilada hasta su visualización.
- 5.- Observar en microscopio estereoscópico

DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

- 1.- Plantas de trigo tratadas con *Azospirillum brasilense*, n-butanol, AF.
- 2.- Sumergir las plantas en una solución de nitro azul de tetrazolio (NBT) al 0.1%, durante 15 min.
- 3.- Sacar las plantas y mantenerlas en agua destilada hasta su visualización.
- 4.- Observar en microscopio estereoscópico.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

- 1.- Moler la raíz de plantas de trigo tratadas en nitrógeno líquido, el polvo recolectarlo y transferirlo a un tubo limpio y seco.
- 2.- Re suspender en buffer de acetatos 3 M.
- 3.- Añadir una solución de 2,6-diclofenolindofenol 0.3 mg/mL.
- 4.- Dejar reposar durante 45 seg.
- 5.- Medir absorbancia a 520 nm.

NOTAS:

- La concentración de ácido ascórbico es inversamente proporcional a la visualización de un color rosado.

EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

- 1.- Moler 0.2 g de raíz con N₂ líquido.
- 2.- Colocar la raíz molida en tubos falcon y agregar 500 µL de agua desionizada.

- 3.- Calentar en baño de agua caliente por 3 minutos para inactivar enzimas lipolíticas, dejar enfriar.
- 4.- Agregar 1.14 mL del sistema de extracción: Cloroformo: metanol: agua (7.5: 15: 6), mezclar durante 2 minutos en el vortex.
- 5.- Agregar 300 μ L de cloroformo y mezclar en vortex 30 segundos.
- 6.- Agregar 300 μ L de agua desionizada y mezclar en vortex 30 segundos.
- 7.- Agregar 4 μ L de HCl 6N, mezclar 5 segundos.
- 8.- Centrifugar 4500 rpm durante 10 minutos para acelerar la precipitación.
- 9.- Pre-pesar tubos eppendorf y anotar pesos.
- 10.- Transferir 400 μ L de la fase clorofórmica (es la que contiene los fosfolípidos) y evaporar a sequedad con N₂ líquido.
- 11.- Pesar los tubos y obtener el peso del extracto para poder cargar en la TLC.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- 1.- Preparar la cámara cromatográfica con el sistema de solventes cloroformo: metanol: amoníaco 28% (60: 35: 8, v/v/v).
- 2.- Colocar las muestras en la placa de sílice gel con una micropipeta, ajustando la cantidad de extracto, y colocar las placas dentro de las cámaras cromatográficas, dejar correr y retirar cuando llegue a la marca del frente de solventes.
- 3.- Dejar secar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 4.- Revelar las placas con vapores de yodo durante 5 a 10 min.
- 5.- Tomar imagen de las placas con foto documentador.
- 6.- Analizar las imágenes de las placas con algún programa para medir densidades de pixel, como ImageJ.

NOTAS:

- Utilizar estándares de los fosfolípidos a analizar para poder observar su corrimiento, de lo contrario investigar factores de retención de cada fosfolípido con el sistema de solventes utilizado.