



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE
GENES INVOLUCRADOS EN EL RECONOCIMIENTO Y
ADHESIÓN DE *Azospirillum* spp. A RAÍZ DE TRIGO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Ana Carolina Martínez Salido

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2017

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 09 del Mes de octubre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de la expresión diferencial de genes involucrados en el reconocimiento y adhesión de *Azospirillum* spp. a raíz de trigo"

Presentada por el alumno:

Ana Carolina Martínez Salido

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

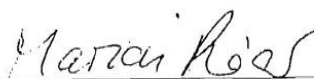
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Thelma Castellanos Cervantes
Director de Tesis



Dra. Gracia Gómez Anduro
Co-Tutor



Dra. Marion Röder
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Directora de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

Dra. Gracia Gómez Anduro
Co-tutora de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

Dra. Marion Röder
Co-tutora de tesis
Institut für PflanzenGenetik und KulturPflanzenForschung (IPK)

Cómite revisor de tesis

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dra. Gracia Gómez Anduro

Dra. Marion Röder

Jurado de Exámen

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dra. Gracia Gómez Anduro

Dra. Marion Röder

Suplente
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

RESÚMEN

Uno de los cereales cultivados más importantes a nivel mundial es el trigo, el cual aporta una quinta parte del total de las calorías consumidas por el hombre. No obstante, los requerimientos de fertilizantes químicos para la producción del grano de trigo son elevados y su constante uso genera problemas de contaminación medioambiental. Una estrategia para mitigar este problema es el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés) ya que presentan un alto potencial para ser usados como inoculantes. *Azospirillum brasilense*, perteneciente a las PGPR, es una de las bacterias mayormente estudiadas y, se ha demostrado, en experimentos en laboratorio, sus beneficios en el crecimiento y desarrollo del trigo. Sin embargo, los resultados en campo son inconsistentes. La caracterización fenotípica de adhesión, llevada a cabo por el grupo del laboratorio, sugieren que *A. brasilense* Cd se adhiere preferencialmente a ciertos genotipos de trigo. Indicios de esta afinidad se ha obtenido de la caracterización fenotípica realizada en una población para mapeo genético constituida de 114 líneas haploide dobladas (DH), derivadas de los progenitores *Triticum aestivum* L. cv. Ópata y el sintético hexaploide WSHD67.2, de las cuales el 32% presentaron el fenotipo de adhesión, cuyos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés) se localizaron en regiones de los cromosomas 1A, 2D, 6B y 5A. Adicionalmente, estudios de proteoma de la raíz inoculada con *A. brasilense* Cd mostró expresión diferencial de algunas proteínas.

En este trabajo, se probaron otras especies del género de *Azospirillum*, además de *A. brasilense* Cd, como *A. brasilense* SP245, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans* en trigos harineros y sintéticos. Se determinó que existe diferencias significativas de adhesión a raíz y por lo tanto, un polimorfismo cuando *A. brasilense* SP245 y *A. lipoferum* son inoculados.

Para identificar los genes involucrados en la adhesión y reconocimiento planta-bacteria, se analizó la expresión global de genes mediante el uso de microarreglos. En este análisis, se encontraron 81 genes reprimidos, y 165 genes inducidos en el sistema radicular de la variedad Ópata en presencia de *A. brasilense* Cd. Así mismo, los genes: Fosfatidil inositol N-acetil glucosaminil transferasa y Kinasa asociada a pared (WAK3) son importantes señalizadores en procesos de infecciones. Mientras que, xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa 5 (XTH5), y el gen que codifica para un poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa, están involucrados en la biosíntesis de la pared celular. Estos genes fueron utilizados para la evaluación del microarreglo. En este sentido, el análisis de expresión relativa de los genes WAK3 y XHT5 en raíces de Ópata comparada con trigo sintético WSHD67.2 al inocular *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* SP245, *A. lipoferum*, y *A. halopraeferans* demuestra que existe una expresión diferencial asociada al genotipo y que depende de la bacteria inoculada. Mientras que, el análisis para los genes que codifica para fosfatidil inositol N-acetil glucosaminiltransferasa y poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa no mostró diferencias de expresión entre los dos genotipos de trigo. Este estudio contribuye a generar información adicional sobre la afinidad entre este género de bacterias y trigo, y así ampliar el conocimiento que puede ser utilizado por los programas de mejoramiento genético en trigo, así como brindar mayor certidumbre al utilizar inoculantes a base de *Azospirillum*.

Palabras clave: PGPR, *Azospirillum*, trigo, expresión de genes.

SUMMARY

Worldwide, wheat is one of the most important crops and contributes a fifth of the total calories consumed by humans. However, the requirements of chemical fertilizers for the production of wheat grain are high, and its constant application generates environmental pollution problems. Thus, the plant growth promoting rhizobacteria or PGPR have a potential use as an inoculant and a candidate to lower chemical fertilizer consumption. *Azospirillum brasilense* is the bacteria mostly studied in the last decade, which demonstrated its benefits, undoubtedly at least for *in vitro* experiments, for the growth and development of wheat. However, the results in the field are inconsistent.

The phenotypic characterization of bacteria adhesion trait carried out by the group of the laboratory suggested that *Azospirillum brasilense* Cd adhered preferentially to certain genotypes of wheat. Evidence of this affinity has been obtained from the phenotype characterization of this trait on a wheat mapping population consisting of 114 doubled haploid lines, derived from progenitors *Triticum aestivum* L. cv. Ópata genotype and the synthetic hexaploid WSHD67.2, where 32% of the lines presented the adhesion trait. Also, quantitative trait loci (QTL) associated with chromosomes 1A, 2B, 6B, and 5A pointed out that this trait is allele-dependent. Furthermore, proteomic studies in wheat roots inoculated with *A. brasilense* Cd showed differential protein expression on those bacteria-adhering genotypes.

In this work, phenotypic adhesion trait was tested, in addition to *A. brasilense* Cd, with *A. brasilense* SP245, *A. halopraeferans*, and *A. lipoferum*, in a collection of bread and synthetic hexaploid wheat. It was found adhesion polymorphism when *A. brasilense* SP245 and *A. lipoferum* were inoculated.

It was analyzed the global transcription of genes through the use of a microarray assay to identify genes involved in the adhesion and recognition of wheat-*Azospirillum* interaction. A total of 165 sub-expressed and 81 genes over-expressed founded in cultivar Ópata roots in the presence of *A. brasilense* Cd. The codifying genes for phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase, WAK 3, a microbial signal kinase-associated cell wall, for polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase (similar to GAUT1 in *Arabidopsis*) and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5 (XTH5), involved in the synthesis of the plant cell-wall, were analyzed (for the microarray validation) with RT-qPCR technique. The inoculation on cultivar Ópata and the synthetic hexaploid with the strains *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* SP245, *A. lipoferum* and *A. halopraeferans* showed a differential expression of WAK3 and XHT5, in a genotype and bacterium dependent manner. Meanwhile, genes coding for phosphatidylinositol N-acetyl glucosaminyltransferase and polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase showed no differences between treatments or genotype.

This study aimed to generate information on the affinity between this genus of bacteria and wheat, and thus broaden the knowledge which permits its use for optimization of *Rhizobium* inoculants of *Azospirillum* applied to wheat yield improvement marker-assisted programs.

Keywords: PGPR, *Azospirillum*, wheat, gene expression

DEDICATORIA

A mis padres y abuelos por motivarme y apoyarme en mis estudios

A mi familia por su amor incondicional

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional Técnico de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. 702915).

A mi comité tutorial por sus valiosos consejos y paciencia, Dra. Thelma Castellanos, Dra. Gracia Gómez y Dra. Marion Röder.

Al Dr. Jose Luis Díaz Álvarez por sus consejos y motivación para el desarrollo de esta tesis.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del CIBNOR, en especial a Julio Hernández, Dr. Mario Rojas, Anahís y Héctor por el apoyo técnico, amistad y compañía.

Al M.C. Ángel Carrillo del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular por sus consejos y atención en el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio de Gene and Genome Mapping del IPK, Gatersleben, especialmente a Rosemarie, Ellen, Sonja por su amistad y consejos técnicos, a Dalia, Sajjad, Daniela y Quddos por su compañía en mi estancia.

Al Dr. Ricardo Vázquez y a la Dra. Cristina Escobedo del Laboratorio de Genómica por las facilidades otorgadas.

Al Dr. Felipe Ascencio por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana.

Al personal de posgrado del CIBNOR por el apoyo durante mis estudios de posgrado.

A Norma, Josefina y Manuel por su valiosa amistad y consejos técnicos.

A mis amigos de la maestría, Lupita, Emilio y Daniel.

A mi familia por todo el apoyo para concluir esta etapa de mi vida.

Contenido

RESÚMEN	ii
SUMMARY	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 El trigo y su importancia	4
2.2 Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPR)	4
2.3 Estudios de inoculación con <i>Azospirillum</i>	5
2.4 Respuesta del sistema radicular de plantas en interacción con PGPR	6
2.4.1 Moléculas y genes involucrados en la adhesión y reconocimiento <i>Azospirillum</i> -trigo.....	7
2.5 Inconsistencias de desarrollo en trigo al inocular <i>Azospirillum brasilense</i>	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Germinación e higienización de las semillas de trigo	14
6.2 Preparación de células bacterianas.....	14
6.3 Inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. a raíz de trigo	15
6.4 Cuantificación de células adheridas	16
6.5 Extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN)	17
6.6 Síntesis de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc).....	17
6.7 Purificación del Aminoacyl aaADNc.....	17
6.7.1 Reacción de conjugación y purificación del aaADNc marcado (Alexa-aaADNc)	18
6.7.2 Pretratamiento del microarreglo.....	18
6.7.3 Hibridización.....	19
6.8 Análisis de genes expresados en raíces de trigo harinero Ópata.....	19
6.9 Diseño de oligonucleótidos para la validación de la expresión de transcritos de microarreglos	20

6.10 Determinación de genes endógenos	21
6.11 Método de BestKeeper	21
6.11 Método de NORM qPCR	22
6.12 Validación de genes de microarreglo	22
6.3. Análisis estadísticos para los genes expresados	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Experimento de adhesión	24
7.2 Extracción de ARN para hibridación de microarreglos	27
7.3 Análisis del microarreglo	27
7.3.1 Genes reprimidos	29
7.3.2 Genes inducidos	32
7.4 Primers utilizados en la validación del microarreglo	39
7.5 Resultados de la extracción ARN para validación de genes	41
7.6. Selección de genes endógenos	42
7.7 Cuantificación de la expresión de genes seleccionados del microarreglo.....	43
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
11. LITERATURA CITADA	61
12. ANEXOS	75

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del diseño experimental de la primera repetición biológica..	15
Figura 2. <i>A. brasilense</i> Cd adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo..	25
Figura 3. <i>A. brasilense</i> SP245 adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo..	25
Figura 4. <i>A. lipoferum</i> adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo..	26
Figura 5. <i>A. halopraeferans</i> adheridas a raíces de diferentes genotipos de trigo..	26
Figura 6. Extracción de ARN a raíz del trigo con los tratamientos bacterianos..	27
Figura 7. Clasificación de genes expresados diferencialmente en el microarreglo..	28
Figura 8. Genes reprimidos en raíz de Ópata, relacionados con el sistema endomembranal, traducción, y moléculas de unión a ARN..	29
Figura 9. Genes inducidos en raíz de Ópata, relacionados la síntesis de macromoléculas, expresión de genes, traducción, y moléculas de unión a ARN..	30
Figura 10. Genes reprimidos que participan en rutas metabólicas Kegg..	33
Figura 11. Diagrama de la ruta de pentosas e interconversión del glucoronato..	34
Figura 12. Modelo en el que se representan algunos de los patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) y sus respectivos receptores de reconocimiento (PRRS)..	36
Figura 13. Ruta metabólica de intervención del gen acotinasa 1 ACO1..	37
Figura 14. Genes inducidos que participan en rutas metabólicas Kegg..	38
Figura 15. Gel de electroforesis de ARN de raíz de trigo WSHD67.2 con sus respectivos tratamientos..	41
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de ARN de raíz de trigo Ópata tras la inoculación..	41
Figura 17. Expresión relativa del gen WAK3 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2..	43
Figura 18. Expresión relativa del gen fosfatidil inositol N-glucosaminil transferasa en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2..	44
Figura 19. Expresión relativa del gen XHT5 en raíces de trigo Ópata y sintético WSHD67.2..	45
Figura 20. Expresión relativa del gen poligalacturotano 4-alfa-galacturonosiltransferasa en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2..	46

Lista de tablas

Tabla I. Variedades de trigo usadas para la adhesión de <i>Azospirillum</i> spp. a raíz de trigo .	16
Tabla II. Reacción de preparación para técnica de tiempo real.....	23
Tabla III. Genes reprimidos en ontología Procesos biológicos, base de datos DAVID.	30
Tabla IV. Genes inducidos en ontología Procesos biológicos, base de datos DAVID.	35
Tabla V. Primers diseñados para evaluar la expresión de genes en raíces de trigo con los diferentes tratamientos.....	39
Tabla VI. Primers diseñados para la evaluación de genes constitutivos en raíz de trigo. ..	40
Tabla VII. Resultados de la evaluación para el gen más estable.....	42

1. INTRODUCCIÓN

El trigo es el tercer cultivo a nivel mundial más importante, precedido del arroz y maíz. Aporta una quinta parte del total de calorías consumidas por el ser humano. La producción industrial del trigo obedece a la introducción del gen enano derivado del arroz, la mecanización y la abundante aplicación de fertilizantes químicos. Sin embargo, para mantener estos altos rendimientos el uso excesivo de plaguicidas y fertilizantes químicos ha ocasionado contaminación de los suelos agrícolas, a los cuerpos de agua por lixiviación, la volatilidad de los compuestos nitrogenados a la atmósfera y, por tanto, su contribución a la problemática de los gases tipo invernadero (FAO, 2002).

El problema más importante, es que los suelos agrícolas no tienen un sistema biológico eficiente para procesar las altas cargas de fertilizantes químicos y, por lo tanto, los residuos se lixivian a los mantos freáticos contaminándolos. En el caso de las tierras para cultivo contribuyen a su salinización, que provocan un continuo bajo rendimiento, que sin un tratamiento adecuado se transforman en tierras infértiles (Lassere *et al.*, 1999; Moss, 2008). En este sentido, en las últimas décadas una de las propuestas para reducir el uso de fertilizantes químicos, es el uso de inoculantes microbianos en plantas de interés agronómico. (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) se encuentran asociadas a la rizosfera de muchos tipos de plantas. Indirectamente mejoran la salud de la planta, ya que no permiten que organismos patógenos (hongos, bacterias, nemátodos) tengan acceso al sistema radicular, pues se cree que compiten por espacio, emitiendo sustancias antimicrobianas, enzimas que degradan la pared celular, fenoles, antioxidantes, e inducen a la resistencia sistémica. Además, esta asociación permite que la planta obtenga mayores recursos nutritivos del suelo, ya que estos microorganismos solubilizan el fósforo y mineralizan el P inorgánico, fijan nitrógeno (N₂) y, de esta manera, coadyuvan para su metabolismo y desarrollo. Las PGPR tienen la capacidad de sintetizar fitohormonas (giberelinas, auxinas y citocininas). En presencia de las PGPR se ha reportado mayor crecimiento y producción en ciertas plantas. Una de las PGPR más estudiada es *Azospirillum*, la cual se ha aislado de maíz,

arroz, tomate, algodón (Bashan *et al.*, 1989), trigo y en otros cereales de temporada (Kapulnik *et al.*, 1981; García de Salamone *et al.*, 2012).

Cuando *Azospirillum* se asocia a trigo, se ha reportado un mejor desarrollo de las raíces laterales y longitudinales, debido principalmente a que la bacteria produce ácido 3-indolacético (IAA) (Dobbelaere *et al.*, 1999; Zimmer y Bohte, 1988). *Azospirillum* puede fijar el nitrógeno en asociación con diferentes cereales (Okon, 1982), aumentar el aparato fotoprotector y clorofilas (Bashan *et al.*, 2006), además de disminuir la producción de etileno.

Por otro lado, estudios en campo muestran resultados inconsistentes de producción en trigo cuando es inoculado *Azospirillum brasilense* (Okon y Labandera-Gonzalez 1994; Diaz de Zorita y Fernández-Canigia 2009).

En el grupo de trabajo de la Dra. Thelma Castellanos se han observado estas inconsistencias y han sido explicadas como un evento genotipo-dependiente (Díaz de León *et al.*, 2015; Mora, 2010; Rojas *et al.*, 2013). *Azospirillum brasilense* Cd, al ser inoculada en una población para mapeo genético de trigo, formada por 114 líneas de haploides dobladas (DH), obtenidas de la cruce entre el genotipo Ópata y el sintético hexaploide WSHD67.2, mostró adhesión diferencial al sistema radicular de algunas de estas líneas (Rojas *et al.*, 2013). La caracterización genotípica, vía microsatélites, sugieren que esta variación está dada al menos por seis QTLs asociados a cuatro cromosomas (1A, 2D, 6B y 5A.), que explican en un 32% este fenotipo (Díaz de León *et al.*, 2015). Además, se llevó a cabo un estudio para analizar el proteoma de 3 diferentes variedades de trigo, donde *A. brasilense* Cd se adhirió a las raíces de Norwich y Ópata, mientras que la variedad Chinese Spring no presentó este fenotipo, después de la inoculación Mora-Ruíz (2010) reportó expresión diferencial de proteínas en las raíces de estas tres variedades.

Con referencia a los antecedentes anteriores, la presente tesis abordó estudios para determinar cuáles son los genes involucrados en el reconocimiento y adhesión de *Azospirillum* spp., y definir si las cepas *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. halopreferans* y *A. lipoferum* presentan una adhesión, similar a la observadas para *A. brasilense* Cd, o si existe un polimorfismo de adhesión al sistema radicular de la variedad Ópata y el sintético hexaploide WSHD67.2, y con ello contribuir a un diseño de inoculantes

basados en *Azospirillum* spp., así como a través de un programa de selección asistido por marcadores moleculares emplear las variedades de trigo *ad hoc* en la producción agroindustrial.

2. ANTECEDENTES

2.1 El trigo y su importancia

El trigo es una planta monocotiledónea hexaploide anual, de tallos simples y erectos, llega a medir 1.2 metros, las hojas miden entre 20 a 38 cm, y son planas estrechas. El género *Triticum* se encuentra formado por seis especies (Matsuoka, 2010).

El trigo es tercer cultivo con mayor demanda a nivel mundial. Entre el trigo, arroz y maíz forman el cultivo alimenticio base en al menos 40 países (Williams, 1993). El trigo aporta una quinta parte de las calorías consumidas por el hombre. En cuanto a las condiciones de crecimiento que presenta el trigo, estas son muy variables (Matsuoka, 2011), puede crecer en suelos profundos y superficiales, se les cultiva en regiones cálidas, tropicales, árticas, así como en diferentes latitudes.

La producción de trigo para el año 2014 fue de 710.8 millones de toneladas, entre los principales productores están la Unión Europea, China, India y Rusia (FAO, 2016). Mientras que, en México la producción de trigo para ese mismo año fue de 3,500 toneladas con un aumento respecto a años pasados (INEGI, 2015). Al respecto, se calcula que para satisfacer las necesidades alimentarias mundiales en el año 2020, la producción de estos cereales debe aumentar en un 40%.

2.2 Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPR)

El uso de microorganismos como inoculantes ha mostrado ser una alternativa viable en la agricultura (Davidson, 1988; Nadeem *et al.*, 2014). Las PGPR, provocan una cascada de señalización favorable para el desarrollo de la planta (Spaepen y Vanderleyden, 2010). Existen un gran número de experimentos sobre todo a nivel de laboratorio, que corroboran los efectos benéficos en el desarrollo de plantas de interés agronómico (Beneduzi *et al.*, 2012; Boddey *et al.*, 1988; Dobbelaere *et al.*, 1999).

Las PGPR se encuentran en el suelo formando parte de la comunidad microbiana asociada a la raíz de la planta, en este caso se habla de una simbiosis asociativa, o bien en el

interior de la raíz, y cuando llegan a establecerse en nódulos como ocurre en leguminosas, forman lo que se conoce como una simbiosis estricta (Echegaray-Alemán, 1995; Gray y Smith, 2005). Un mecanismo indirecto en el que las PGPR actúan es el de inhibir a otras bacterias que compitan por espacio y que sean patógenas para la planta (Bashan y de-Bashan, 2002; Thakore, 2006), mediante la excreción de enzimas que degradan la pared celular (Vivekananthan *et al.*, 2004), o estimulan el sistema de defensa de la planta por medio de producción de antioxidantes, e. g., ácido jasmónico, ácido salicílico y la fitohormona de etileno (Beneduzi *et al.*, 2012; Glick, 1995; Jain, 2011; Saravanakumar *et al.*, 2007). Así mismo, en la planta provocan mayor desarrollo de raíces, y por lo tanto mayor biomasa (Çakmakç, 2007), contenido de azúcares, y concentración de prolina, y este último como respuesta a condiciones de estrés, e. g. salinidad, (Upadhyay, 2012) y tolerancia a metales pesados (Burd *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2014).

2.3 Estudios de inoculación con *Azospirillum*

Entre las PGPR, *Azospirillum* es una de las bacterias más estudiadas, y ha sido objeto de investigaciones por más de 40 años (Dobbeleire *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 1987; Okon y Labandera, 1994). *Azospirillum* tiene una distribución mundial y se han aislado de la rizosfera de varias plantas, maíz, pastos (Eckert *et al.*, 1995), arroz (Trân Van *et al.*, 1998) y trigo (Dobereiner, 1988). En rizosfera se han contabilizado hasta 10^7 UFC por gramo, colonizando además las hojas, semillas y vástago de la planta, a este grupo bacteriano se le conoce como diazotrófos endófitos facultativos (Dobereiner *et al.*, 1995). Actualmente se han descrito 17 especies: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. canadense*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. humicireducens*, *A. fermentarium* y *A. formosense*.

En el caso del trigo *Azospirillum*, al igual que otras PGPR, exuda auxinas (Zhang *et al.*, 2007), las cuales intervienen en la división celular, elongación y diferenciación, de esta forma promueven el crecimiento de las raíces (Barbieri y Galli, 1993; Spaepen *et al.*, 2008),

que provoca una deformación de las mismas para poder tomar mayor cantidad de nutrientes, lo que se traduce en un aumento en peso seco y fresco (Zimmer y Bothe, 1988), aumento de los pigmentos fotosintéticos y los de fotoprotección (Bashan *et al.*, 2006), *A. brasilense* SP245 provoca un cambio en la membrana y el flujo de electrones (Bashan, 1990), ayuda a fijar el nitrógeno y aumenta la asimilación de nitratos.

Se sugiere que la colonización de *Azospirillum* a raíz de trigo ocurre en dos fases: la primera fase es débil y ocurre una adsorción rápida con duración de dos horas, mientras que en la segunda etapa se caracteriza por disminuir la absorción y ocurre un anclaje que dura entre 8 y 16 horas después de la incubación (Michiels *et al.*, 1991).

2.4 Respuesta del sistema radicular de plantas en interacción con PGPR

Para que ocurra una interacción bacteria-planta es necesario se produzcan cambios moleculares. A pesar de la importancia de estos procesos, el análisis de expresión de metabolitos y genes involucradas en la adhesión y reconocimiento ha sido estudiado mayormente en bacterias que en plantas (Broek y Vanderleyden, 1995; Fan *et al.*, 2012; Ramos-González, 2007; Schwedock y Long, 1991). Y en el caso de la respuesta de la planta, y debido a las pérdidas económicas, la mayoría de los estudios se remontan a infecciones bacterianas que provocan daños en los tejidos de éstas (Mohammadi *et al.*, 2008).

Inicialmente las bacterias tienen una interacción electrostática y fisicoquímica con la pared de la raíz de la planta (Berne *et al.*, 2015) y estas interacciones están dadas por la hidrofobicidad y la carga de la pared celular bacteriana, que en el caso de *Azospirillum* spp. estas características varían, lo que probablemente interfiere al momento de adherirse a las raíces (Castellanos *et al.*, 1997). En este aspecto, los exudados de las raíces son los responsables de atraer o, incluso, repeler a la comunidad microbiana en la rizosfera (Leach *et al.*, 1983). Posteriormente, a la atracción primaria, existe un reconocimiento molecular entre las bacterias y la planta, seguido de la colonización y en ocasiones una penetración al sistema vascular radicular (Hallmann, 2001). En este caso las lectinas y exopolisacáridos de

la bacteria tienen un papel importante en el reconocimiento y adhesión (Nikitina *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha detectado que aglutinina de germen de trigo o wheat germ agglutinin (WGA por sus siglas en inglés), la cual es una molécula señalizadora cuando *A. brasilense* se asocia a raíz de trigo (Antonyuk *et al.*, 1993).

El crecimiento bacteriano en la rizosfera se debe a la cantidad de materia orgánica, como células desprendidas, mucílago que contiene arabinosa, fructosa, galactosa, manosa, ramosa, ácido galacturónico, proveniente de las células más jóvenes (Knee *et al.*, 2001) y representa hasta el 25% de carbono en los exudados de raíz de maíz (Chamoud, 1983). Los microorganismos de la rizosfera solubilizan algunos nutrientes para la planta, modifican los patrones de enraizamiento, produciendo fitohormonas como giberelinas, citocinas y auxinas, (Michiels *et al.*, 1989). Uno de los mecanismos más estudiados de promoción de crecimiento es la producción de ácido indol 3-acético (IAA por sus siglas en inglés), la bacteria produce este compuesto a partir de precursores como triptofano o tiamina (Patten y Glick 1996; Spaepen *et al.*, 2007), pero se sabe que estos compuestos también son producidos por la planta (Villareal *et al.*, 2012).

2.4.1 Moléculas y genes involucrados en la adhesión y reconocimiento *Azospirillum*-trigo

La interacción planta-bacteria es mediada por una comunicación celular entre ambos organismos (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008), y es necesario que la planta reconozca y responda rápidamente a las señales moleculares de la bacteria. En este sentido, se ha encontrado en la pared de *Azospirillum* lectinas que son importantes para el reconocimiento celular (Castellanos *et al.*, 1997). Así como, *Che 1* que juega un papel importante en la adhesión de *A. brasilense* a las raíces (Siuti *et al.*, 2011), el regulador transcripcional *flcA* involucrado en la síntesis de polisacáridos, floculación y colonización (Pereg *et al.*, 1998), los genes *noeJ* (mannose-6-phosphate isomerase) y *noeL* (GDP-mannose 4,6-dehydratase), que están involucrados en las propiedades de la superficie celular de *Azospirillum* (Lerner *et al.*, 2009), los genes *nifH* y *nifA*, relacionados con la fijación de nitrógeno en

Azospirillum (Karpati *et al.*, 1999).

Así mismo, cuando el microorganismo se encuentra establecido en el sistema radicular induce la expresión de genes relacionados a la toma de nutrientes, asimilación de nitrógeno, replicación del ADN y la regulación del ciclo celular transporte y producción de fitohormonas en la planta. Investigaciones revelan que en respuesta a la colonización de *Azospirillum brasilense* SP245, en raíz de trigo se expresan factores de transcripción ETTIN/ARF3 que controlan el desarrollo de la flor y fruto, mediante la unión de un receptor de auxina (AuxRec). En la planta se ha detectado la transcripción de genes relacionados al mecanismos de defensa en la planta, como antimicrobianos, especies moleculares reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Camilios-Neto *et al.*, 2014). Normalmente las ROS se elevan cuando existe una respuesta ante un patógeno, sin embargo, cuando es una interacción simbiótica temprana estas moléculas sufren variaciones (Fisher y Long, 1992).

Por otra parte, las PGPR promueven la resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés), la respuesta fenotípica es muy similar cuando se trata de patógenos (Van Loon *et al.*, 1998). Algunos microorganismos suprimen genes que codifican para hormonas como el ácido salicílico (Jacobs *et al.*, 2011), y genes involucrados en la defensa de la planta como Plant defensin 1.2 (PDF1.2) (Alabid *et al.*, 2016).

En trigo se han encontrado genes que codifican proteínas para la defensa como kinasas con receptores ricos en leucinas (LRR-Kinasas), endoglucosas, proteínas de resistencia a enfermedades, proteínas de choque térmico, las cuales requieren receptores tipo LRR para ser activadas, genes que codifican para transportadores de flujo de nitrato (*NAXT* y *PTR2*), gen citosólico para la glutamina sintetasa (*GSI*) responsable de la incorporación de nitrógeno inorgánico a las células. Así mismo, se encontró inducido el gen *ACO*, que codifica para ACC oxidasa y regula la producción para etileno (Camilios-Neto *et al.*, 2014). Por su parte, Díaz de León *et al.* (2015), encontraron las posibles regiones en el cromosoma responsable del fenotipo de adhesión trigo-*Azospirillum*, algunas secuencias codifican para proteínas hipotéticas y de dominio a la proteína SDGIII, una metiltransferasa asociada a un factor de transcripción que se encuentra involucrado con mecanismo para el desarrollo de la planta, tal como florecimiento y embriogénesis, se encontró la región que

codifica para delta-1-pyrrolina-5 carboxilato deshidrogenasa, un formilglicinamida ribonucleótido amidotransferasa, fosforribosil formil, una glicosiltransferasa, una proteína SAUR, y varias kinasas, estas enzimas también participan en el desarrollo de la planta, en la concentración de osmoreguladores, selección y reconocimiento de transporte membranal a nivel transduccional.

2.5 Inconsistencias de desarrollo en trigo al inocular *Azospirillum brasilense*

A pesar de la importancia de los inoculantes en trigo, la mayoría de los trabajos sobre la respuesta de la planta son llevados a cabo *in vitro*, debido a que en campo son otros factores que se tienen que considerar y que son difíciles de controlar, tales como el clima, microorganismos nativos, patógenos y condición del suelo.

En el caso de la inoculación con rizobacterias, los resultados no siempre son satisfactorios y, en campo, se presentan diferencias de desarrollo y rendimiento entre variedades del cultivo, por mencionar algunos trabajos, se citan los siguientes:

Smith *et al.* (1984) obtuvo resultados de producción significativos al inocular *A. brasilense* en *Sorghum bicolor* y el híbrido *Pennisetum americanum* y *P. purpureum*, mientras que con *Sorghum sudanense* y *Pennisetum glaucum* no obtuvo resultados significativos. Resultados similares se obtuvieron con bluegrass (Okon *et al.*, 1993). La producción obtenida en diferentes variedades de arroz fue desde 7.3 hasta 20% y biomasa de 1.7 a 8.7%, al inocular *Pseudomonas* y *A. brasilense*, con lo que demuestra una especificidad genotípica a maíz por la adhesión de *A. brasilense* (García de Salamone *et al.*, 2012).

De la misma forma, se inoculó *Azospirillum* spp. aislada de rizosfera de trigo, las cuales fueron más eficientes que al inocularse con otra población de *Azospirillum* (Boddey y Dobereiner, 1988). Rodríguez-Cáceres (1996) obtuvo un aumento de producción en trigo entre 30 y 16% al inocular *Azospirillum* Az39 y Cd respectivamente, sin embargo se utilizó un sustrato a base de materia orgánica (Turba de *Spagnum* sp. y carbono), lo que puede enmascarar los efectos del inoculante. Así mismo, se han observado variaciones pronunciadas en cuanto a la producción, biomasa y peso al inocular *Azospirillum* spp. en variedades de

trigo (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994; Rodriguez-Salas *et al.*, 2007; Saubidet y Barneix, 1998).

En este sentido, los resultados obtenidos en el consorcio de investigación donde participa el grupo del laboratorio concuerdan con las investigaciones anteriormente mencionadas, por lo tanto se sugirió que *A. brasilense* reconocía y se adhería preferentemente a ciertas variedades de trigo. Para comprobar esta hipótesis Rojas *et al.* (2013) realizaron de caracterización fenotípica de la adhesión de *A. brasilense* Cd en una colección de genotipos de trigo empleando como progenitores de poblaciones para mapeo genético o de sustitución cromosómica. En éste estudio se reporta que *A. brasilense* Cd se adhiere un mayor número a la variedad Ópata respecto a los genotipos hexaploides como Norwich o la variedad Ciano T79, incluso no se encontraron bacterias asociadas a raíz en otras variedades como Chinese Spring y líneas sintéticas de haploides dobladas (DH). Los resultados indican que la adhesión al sistema radicular se debe a los alelos heredados. En relación a estos resultados obtenidos Díaz de Leon *et al.* (2015), obtuvieron una población de mapeo genético compuesto por 114 líneas de haploides doblados, derivadas de la cruce del genotipo Ópata y el sintético hexaploide WSHD67.2, los cuales presentaron polimorfismo a la adhesión de *A. brasilense* Cd, donde el 32% presentaron el fenotipo de adhesión, mientras que al 68% restante no hubo células adheridas. El análisis de QTL mostró que los QTL asociados a los cromosomas 1A, 2D, 6B y 5A explican la variación de adhesión para la población de mapeo.

Por otro lado, Mora-Ruíz (2010) realizó experimentos de inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd en el sistema radicular de tres variedades de trigo, de las cuales Ópata presentó mayor cantidad de bacterias adheridas a la raíz que el sintético hexaploide Norwich, y en cambio Chinese Spring no adhirió células bacterianas. Así mismo, bajo la influencia de *A. brasilense*, el estudio de expresión proteica, reveló una expresión diferencial de las proteínas HSP70, Metionina adenosiltransferasa, Malato Deshidrogenasa, Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa y UDP-D Glucoronato descarboxilasa, que posiblemente son codificados por los genes HSP70, SDGIII, MDH, GAPB y GAE, respectivamente.

En consecuencia, la hipótesis en esta tesis plantea, que cuando la raíz de trigo está

en contacto con las bacterias de interés, permitirá identificar los genes relacionado en el proceso de adhesión y las rutas metabólicas en las que esta involucrados, con la finalidad de entender el proceso biológico y sus posibles implicaciones en agricultura.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los cultivos más importantes a nivel mundial es el trigo. Su producción se basa en la creación de nuevas variedades, una eficiente mecanización, y en la abundante utilización de fertilizantes químicos a base de amoníaco, urea y fósforo. En este sentido, el exceso de fertilización ha dado como resultado problemas de salud, contaminación de los cuerpos de agua, deterioro de las tierras de cultivo, y con ello problemas sociales. Por lo que la preocupación principal es reducir el uso de compuestos nitrogenados para garantizar un desarrollo sustentable en agricultura.

Entre las alternativas de solución, se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento o PGPR por sus siglas en inglés. Uno de las bacterias más estudiadas para este fin, es *Azospirillum brasilense*. Los experimentos en laboratorio señalan que la bacteria en trigo favorece la adquisición de nutrientes y el alargamiento de las raíces, por lo tanto permite mayor biomasa e incremento de la producción. Sin embargo, los resultados en campo son inconsistentes, debido a que hay indicios que *Azospirillum brasilense* Cd se adhiere a raíz de trigo dependiendo de la variedad. Por lo tanto, es necesario determinar si otras cepas de *Azospirillum* pueden adherirse a la raíz y evaluar si la expresión de genes involucrados en la adhesión bacteriana en trigo es la misma o difieren dependiendo de la cepa utilizada en la inoculación. Así mismo, se pretende generar conocimiento para en un futuro, utilizar de forma correcta inoculantes en el cultivo de trigo, que permitan la reducción de fertilizantes químicos, así como la selección de variedades mediante marcadores moleculares que presenten el fenotipo de adherencia.

4. HIPÓTESIS

Se ha observado que al adherirse *Azospirillum brasilense* Cd a la raíz de trigo da como resultado una expresión diferencial de proteínas involucradas en la ruta de las pentosas e interconversión del glucoronato, en ciclo de Krebs y glucólisis, por lo que entonces se espera que se expresen los genes (SDGIII, MDH, GAPB, HSP70, UXS1) que intervienen en las rutas metabólicas para estas proteínas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la expresión de genes involucrados en la adhesión de raíz de dos variedades de trigo (Ópata y hexaploide WSHD67.2) al inocular *Azospirillum* spp.

5.2 Objetivos particulares

Determinar la adhesión de *A. brasilense* SP245, *A. halopreferans* y *A. lipoferum* a raíz de dos variedades de trigo (Ópata y sintético hexaploide WSHD67.2).

Analizar la expresión global de genes como resultado de la adhesión de *A. brasilense* Cd a raíz de trigo (Ópata).

Cuantificar la expresión de los genes en dos variedades de trigo como resultado de la inoculación con diversas cepas de *Azospirillum*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Germinación e higienización de las semillas de trigo

Para el estudio de adhesión se seleccionaron 150 semillas de *Triticum aestivum* variedad Ópata, semillas del trigo hexaploide sintético línea WSHD67.2, obtenidas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CYMMIT). Para la caracterización fenotípica de adhesión se utilizaron trigos 3477, 5357, 3831, 4116, 5357,4549 y el hexaploide sintético M6 (Tabla I), para lo cual se utilizaron 5 plántulas de cada genotipo por tratamiento y triplicado.

En cuanto a la higienización de las semillas, éstas fueron colocadas en matraces kitasato a las que se les agregó 1.8% (v/v) de NaOCl y se mantuvieron en presión con una bomba de vacío durante 10 minutos, después de los 5 minutos la presión fue interrumpida cada minuto. Finalmente, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada, todo lo anterior fue llevado a cabo bajo condiciones ascépticas.

Para la germinación, se distribuyeron 10 semillas sobre un papel filtro por caja Petri (60 x 15 mm), a las cuales se le adicionaron 10 mL de solución Hoagland de media fuerza iónica (Hoagland y Arnold, 1950). Por último, las semillas se incubaron a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y luz constante y al quinto día las raíces fueron utilizadas para los experimentos de adhesión o extracción de ARN.

6.2 Preparación de células bacterianas

Las cepas *A. brasilense* SP245 y Cd fueron obtenidas del laboratorio de microbiología ambiental (CIBNOR), mientras que la cepas *A. halopreferans* DSM 3675 y *A. lipoferum* DSM 1841 provienen de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares. Las cepas bacterianas fueron inoculadas en 25 mL de caldo nutritivo (LB), a un pH de 7, cultivadas en una incubadora a una temperatura constante de 30°C y

una agitación constante de 90 rpm durante 48 horas. Previo a su uso se tomó una alícuota para contabilizar las UFC.

6.3 Inoculación de *Azospirillum* spp. a raíz de trigo

Para la caracterización fenotípica de adhesión, se tomaron plántulas de cinco días de edad y previo a la inoculación fueron lavadas con agua destilada estéril 3 veces. Posteriormente, se transfirieron cinco plántulas a tubos falcón por tratamiento, el cual consistió en sumergir las raíces en solución salina (0.85% p/v) a una concentración final de $1.0E+6-7$ UFC de las cepas correspondientes (*A. brasilense* Cd, *A. brasilense* SP 245, *A. halopreferans* y *A. lipoferum*). El sistema radicular se mantuvo bajo inoculación a temperatura ambiente durante 2 horas. Paralelamente, se tomaron 3 plántulas de cada variedad, las cuales no fueron inoculadas y sirvieron como control. Todos los tratamientos fueron manejados por triplicados técnicos y triplicados biológicos (Fig. 1) Este proceso fue similar y se aplicó a los otros genotipos de trigo citados en la tabla I.

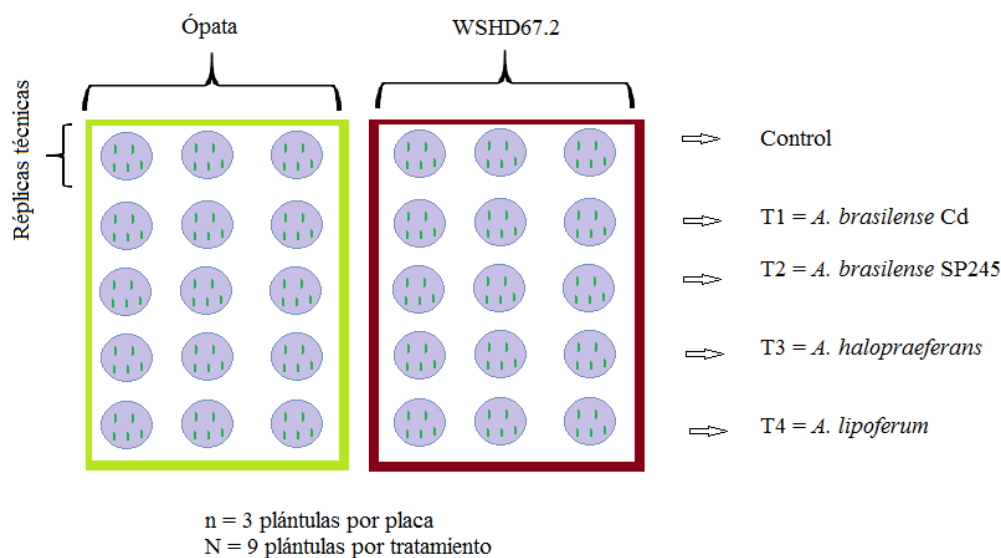


Figura 1. Esquema del diseño experimental de la primera repetición biológica. Las figuras rectangulares en color verde y vino representan las plántulas del trigo harinero Ópata y el trigo sintético hexaploide WSHD67.2 respectivamente, se colocaron 3 plántulas en tubos falcon por tratamiento y se realizaron triplicados. Este diseño fue repetido para la extracción de ARN de raíces.

Tabla I. Variedades de trigo usadas para la adhesión de *Azospirillum* spp. a raíz de trigo

Línea/genotipo	Origen
Sintético hexaploide línea WSHD67.2	CYMMIT
Ópata	CYMMIT
Sintético hexaploide M6	CYMMIT
3477	IPK
3633	IPK
3831	IPK
4116	IPK
5357	IPK
4549	IPK

*Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo: CYMMIT, IPK: Institut für PflanzenGenetik und KulturPflanzenForschung.

6.4 Cuantificación de células adheridas

Para el conteo de células bacterianas adheridas, se siguió el siguiente procedimiento: las raíces fueron enjuagadas suavemente con agua destilada estéril tres veces, inmediatamente se quitó el exceso de agua secándolas con papel absorbente. Las raíces fueron cortadas y colocadas en 10 mL de solución salina (NaCl) al 0.75% (w/v), se sometieron a agitación en vórtex durante cinco minutos. Finalmente se tomaron 100 μ L del sobrenadante para realizar diluciones y desarrollar la técnica de extensión por superficie en placa en medio sólido de (Luria Bertani LB), se utilizaron duplicados por cada dilución contemplada. Para los análisis estadísticos se utilizó la paquetería de R, y se realizaron anovas de una vía o Kruskal Wallis con sus respectivas pruebas a posteriori (HSD de Tukey o Dunn Test), se fijó un valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

6.5 Extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN)

La extracción del ARN total de las raíces se llevó a cabo con el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Las raíces pertenecientes a 3 plántulas por cada tratamiento fueron maceradas en nitrógeno líquido, al cual se le adicionó 10 mL de TRIZOL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se resuspendió en 20 μ L de agua destilada libre de RNAasa. Posteriormente, el ARN total se limpió con DNAsa I (Invitrogen), se cuantificó en un Nanodrop (ND-100) y la integridad del ARN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (w/v) con tampón TAE 1X y 2% de hipoclorito de sodio, se utilizó un voltaje de 80 durante 50 minutos.

6.6 Síntesis de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó a partir de raíces provenientes del genotipo Ópata, con el tratamiento que consistió de la bacteria *A. brasilense* Cd y control), utilizando el Kit ImProm IITM Reverse Transcription System (Promega), para ello se colocó 1 μ g de ARN y 0.5 μ g de oligo-dt a 65°C por 7 minutos, siguiendo las recomendaciones del protocolo. Después de la síntesis de ADNc, se preparó el aminoacil ADNc (aaADNc) y para llevar a cabo el microarreglo, se realizó la hidrólisis del ARN con 5 μ L de NaOH 1N y 1 μ L de EDTA 0.5 M, y se incubó por 10 minutos a 65°C. Posteriormente se le añadió 25 μ L de HEPES 1M a un pH de 7.

6.7 Purificación del Aminoacyl aaADNc

Al aaADNc se le agregaron 7 μ L de acetato de sodio 3M y 400 μ L de tampón de unión, se mezcló con la pipeta y la muestra se colocó en una minicolumna de 0.5 mL de Quiagen con el tubo colector previamente dispuesto, a la cual se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14000 xg durante un minuto. Fue necesario lavar con 500

μL de etanol al 80% y centrifugar a 14,000 xg durante un minuto. Después, se recuperó en un tubo nuevo el aaADNc dos veces con 30 μL de agua desionizada, que se dejó reposar por un minuto y se centrifugó por un minuto. Finalmente, el aaADNc purificado se secó 30 minutos en el Speed-vac y se resuspendió en 4.5 μL de bicarbonato de sodio 100 mM a un pH de 9.

6.7.1 Reacción de conjugación y purificación del aaADNc marcado (Alexa-aaADNc)

El fluoróforo se disolvió con 4.5 μL de DMSO, para después agregar 4 μL del aaADNc purificado, que se mezcló con vórtex. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante dos horas.

Para la purificación del aaADNc marcado se agregaron 7 μL de agua y 8 μL de acetato de sodio 3M y 400 μL de tampón de unión, se mezcló con la pipeta y se colocó en una columna Quiagen a la cual se dejó reposar por un minuto y se centrifugó durante un minuto. Se realizó nuevamente 3 lavados con etanol al 80% y se centrifugó por un minuto, para eliminar el exceso de etanol se centrifugó por cuarta vez.

Alexa-aaADNc se recuperó dos veces de la columna y se colocó en un tubo nuevo con 50 μL de agua desionizada estéril. Por último, se dejó reposar durante dos minutos y se centrifugó un minuto.

6.7.2 Pretratamiento del microarreglo

El lado impreso de la laminilla se expuso al vapor de agua a 50 °C durante 10 segundos y se dejó secar, esta operación se repitió tres veces. Posteriormente, se fijó con dos ciclos de luz U.V. 0.12 J x cm^2 , y se lavó con dodecil sulfato sódico (SDS por sus siglas en inglés) al 1% por un minuto a temperatura ambiente. Enseguida se lavó con agua desionizada durante un minuto y se colocó en la solución de prehidratación, la cual contenía citrato de sodio salino (SSC por sus siglas en inglés) 5X, SDS al 0.1%. Después, se incubó por una hora en

agitación suave a una temperatura de 42°C. La laminilla se enjuagó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1500 xg por 5 minutos.

6.7.3 Hibridización

La hibridación se llevó a cabo con la mezcla de 48 µL de la muestra *Azospirillum brasilense* Cd previamente marcada con Alexa555 y 16 µL de la muestra control marcada con Alexa 647, ambas se secaron por separado en el Spped-vack. Las sondas obtenidas fueron resuspendidas con 26 µL de TE, 10 µL de SCC 20X y 4 µL de SDS al 1% las cuales fueron preincubadas a 65°C. Posteriormente, la mezcla se desnaturalizó a 94°C durante 5 minutos y por 65°C durante 30 segundos. Enseguida, la mezcla se colocó suavemente en el área del microarreglo y se cubrió con un portaobjeto (HibriSlip TM Schleicher and Schuell). Por último, se realizó una serie de lavados a temperatura ambiente, los cuales se realizaron de la siguiente manera:

- a) Un lavado de dos minutos con 50 mL de SSC 1X-SDS al 0.05%
- b) Dos lavado de dos minutos con 50 mL de SSC 0.06X

6.8 Análisis de genes expresados en raíces de trigo harinero Ópata

Para obtener las imágenes y lecturas del microarreglo se utilizó el escáner GenePix 4100A y los resultados fueron procesados en el software GenArise 2.0, el cual arrojó los identificadores de los genes expresados en este estudio.

Los transcritos que se tomaron en cuenta fueron aquellos con un Z-score mayor a 1.5 tanto para los genes inducidos como para los reprimidos. Posteriormente, se realizó un segundo análisis con el software de libre acceso Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) y the Biological Networks Gene Ontology tool (BiNGO), el primero es una plataforma de visualización de la interacción molecular, el segundo es un plugin de cytoscape que permite obtener las

categorías GO a la cual pertenece los identificadores y que estan mas sobrepresentadas, para lo que se utilizó el test estadístico Benjamini and Hochberg correction FDR con un valor de $P \leq 0.05$. Después del análisis estadísticos, los genes más representados se analizaron con los software DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), TAIR (The Arabidopsis Information Resource) y Kegg.

6.9 Diseño de oligonucleótidos para la validación de la expresión de transcritos de microarreglos

La selección de los genes que se utilizaron en la segunda amplificación se diseñaran en base a los resultados del experimento de microarreglos (Anexo C y D), además de considerar los estudios realizados por Díaz de León *et al.* (2015) y Mora (2010).

Para la confirmación de los genes expresados, se realizara un diseño de oligonucleótidos con el software “Primer 3”, y Primer 3 core, en raíz de los dos genotipos de trigo inoculadas con *A. brasilense* SP245, *A. halopreferans* y *A. lipoferum*. Los genes de referencia para este estudio serán RNasa L (GenBank no. At3g13640) (Paolacci *et al.*, 2009), Ribosomal L29e protein family (GenBank no. At3g06680), ADP-ribosylation factor A (GenBank no. AT1G23490), Histone superfamily protein, Zinc finger C-x8 C-x5-C-x3-H type family protein (GenBank no. At3g53650) y ARID/BRIGHT DNA-binding domain-containing protein (GenBank no. AT2G17410). Mientras que los genes problemas diseñados con el mismo software, fueron escogidos por sus posibles relaciones con adhesión y comunicación celular: (GO:0047262), kinasa asociada a la pared 3 (WAK3) (GenBank no. DQ013359.1), xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa 5 (GenBank no. AT2G18800), fosfatidil inositol N-acetilglucosaminiltransferasa (GenBank no. XM_020342609.1), y el gen que codifica para poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa (GenBank no. XM_020293508.1), similar a GAUT 1 en *Arabidopsis*.

6.10 Determinación de genes endógenos

Para determinar el gen endógeno más estable se utilizaron los siguientes los métodos de geNORM (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) y NormqPCR (Perkins *et al.*, 2012).

6.11 Método de BestKeeper

BestKeeper utiliza los valores de la media geométrica (CP), la media aritmética (AM), el mínimo (Min), desviaciones estandares (SD), y coeficiente de varianza (CV). Los genes más estables son aquellos que no tienen variación alta y se correlacionan mejor entre ellos. Además el índice BestKeeper, utiliza los CP (Ecuación 1).

$$\text{Indice BestKeeper} = \sqrt[z]{CP1 \times CP2 \times CP3 \times \dots \times CPz}. \quad (1)$$

Los genes evaluados corresponden a: inhibidor RNASE A 1 (RLI1 A), inhibidor RNASE B L 1 (RLI1 B), factor ADP-ribosilación (ARF1), Union a DNA ARID/BRIGHT (ARID), Dedos Zinc C-x8 C-x5-C-x3-H (ZINC), Histone (H2B.8) y Ribosomal I29 (RPL29).

6.11 Método de NormFinder

Este método normaliza los genes expresados, estima la variación intra e intergrupal y estos valores son utilizados para obtener un valor de estabilidad, el representa una medida de error sistemático.

6.11 Método de geNORM

geNORM utiliza la variación promedio de las comparaciones entre pares (genes) para comparar su expresión, eliminando los genes menos estables, se clasifican según su valor de estabilidad (M) (entre más pequeño sea este valor es más estable el gen).

6.11 Método de NORM qPCR

NormqPCR normaliza los datos usando el valor de $\Delta\Delta Cq$, además utiliza el método de geNORM y el modelo de NormFinder para escoger el gen más estable.

6.12 Validación de genes de microarreglo

Para la validación de los genes en microarreglo, se realizó un análisis de qPCR. Para ello, se utilizó el fluoroforo SYBR® Green Supermix, el cual al unirse a la cadena de ADNc emite una fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de ADN. En este ensayo se realizaron cuantificaciones relativas, que permite conocer cuanto ADNc existe en un tejido con referencia a otra muestra de referencia, en este caso se analizó la expresión de raíz de las variedades de trigo Ópata y el sintético hexaploide WSHD67.2 y 4 tratamientos bacterianos (*A. brasilense* Cd, *A. brasilense* SP245, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*) y el tratamiento control.

Para realizar los cálculos de expresión con referencia al gen problema y el gen de referencia se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), que esta dada por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador}) \quad (2)$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Se utilizaron triplicados de las muestras de raíces con los 5 tratamientos en Ópata y 5 tratamientos en raíces del trigo sintético. Para las curvas de amplificación se determinó que la dilución 1:1 es la más adecuada para el estudio. Las curvas de disociación fueron obtenidas con el termociclador Rotor-Gene (Corbett Research). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial de 95°C durante 30 s, 40 ciclos que consistieron de una desnaturalización a 95°C por 5 s, alineamiento a 58°C por 15 s, y finalmente una extensión de 72°C por 15 s. Se realizó una curva de disociación desde los 50°C hasta los 99°C.

Tabla II. Reacción de preparación para técnica de tiempo real.

Componente	Volumen (µL)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5
Forward	0.5
Reverse	0.5
ADNc	1
H ₂ O	3
Total	10

6.3. Análisis estadísticos para los genes expresados

Los análisis estadísticos se aplicaron por gen, y por cada uno de los tratamientos, las comparaciones se realizaron por genotipo, es decir por gen se realizaron 4 diferentes pruebas estadísticas. Un segundo análisis de los datos fue llevado a cabo, donde se comparó la expresión relativa de un genotipo de trigo en referencia a los cuatro tratamientos bacterianos. Para determinar las diferencias significativas se realizaron tanto anovas de una vía o Kruskal Wallis con sus respectivas pruebas a posteriori (HSD de Tukey o Dun Test) para lo cual se utilizó un valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Experimento de adhesión

La caracterización fenotípica de adhesión se llevó a cabo en el laboratorio de Gene and Genome Mapping, del Institut für PflanzenGenetik und PflanzenKulture (IPK), Gatersleben, Alemania y se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación.

Al inocular una concentración $6.0E + 7$ cel/mL de *A. brasilense* Cd, el análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis arrojó que las bacterias se adhieren a raíces de los genotipos Ópata, WSHD67.2, M6, 3477, 3633, 3831, 4116, 5357 (Fig. 2) y que no existe diferencia significativa de adhesión (p valor de 0.08218) entre las poblaciones. Cabe señalar que en uno de los triplicados de Ópata se usó un inóculo de $6.5E + 5$ cel/mL, sin repercusiones en estos resultados.

Para la inoculación de las raíces con *A. brasilense* SP245 se usó una concentración de $2.0 E + 7$ cel/mL. Los resultados arrojan que *A. brasilense* SP245 no se adhiere a las raíces de 3633, M6 y 3831, pero si al sintético hexaploide, Ópata y 5357. El análisis estadístico indicó que el valor de p (0.00527) es menor al del valor de significancia fijado de 95%, por lo que existen diferencias significativas de adhesión a las raíces entre los trigos Ópata-M6, Ópata-3633, Ópata-3831, y Ópata-5357, WSHD67.2-M6, WSHD67.2-3633 y WSHD67.2-3831 (Fig. 3).

Mientras, que al inocular a las raíces una concentración de $8.5E + 6$ cel/mL de *A. lipoferum*, se observó que se adhiere a Ópata, WSHD67.2, 4116, 5357, 3633, pero no a M6, 3831 y 3477, y existen diferencias significativas de adhesión con un valor de p de 0.0428, entre el sintético hexaploide WSHD67.2 M6, 3477, 3633, 3831, 4116 y 5357 (Fig. 4).

Por último, se utilizó un incóculo de *A. halopraeferans* de $1.6E + 7$ cel/mL para Ópata y WSHD67.2 y $9.5E + 7$ cel/mL para el trigo 3831. Los conteos de UFC arrojan que la bacteria adhiere a WSHD67.2, Ópata y 3831, los análisis estadísticos sugieren que no existen diferencias significativas entre estas 3 poblaciones.

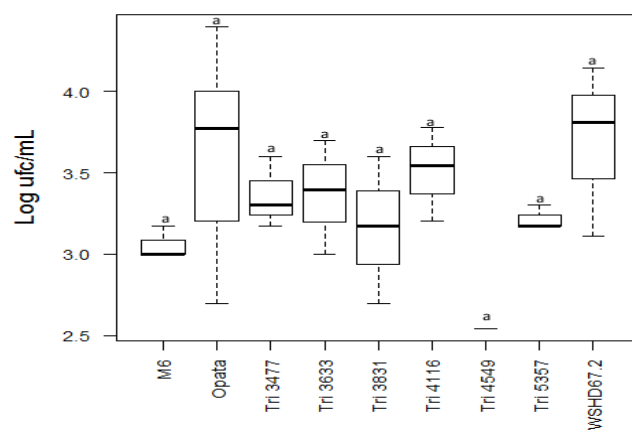


Figura 2. *A. brasilense* Cd adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

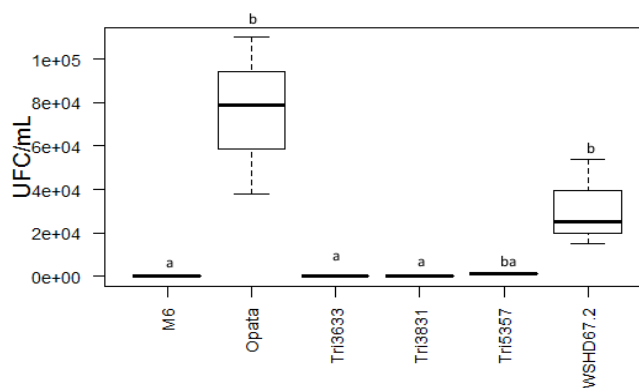


Figura 3. *A. brasilense* SP245 adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

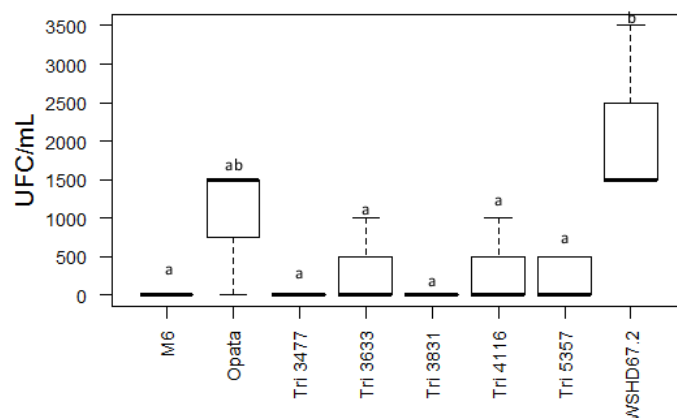


Figura 4. *A. lipoferum* adheridas a raíces de diferentes genotipos/lineas de trigo. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

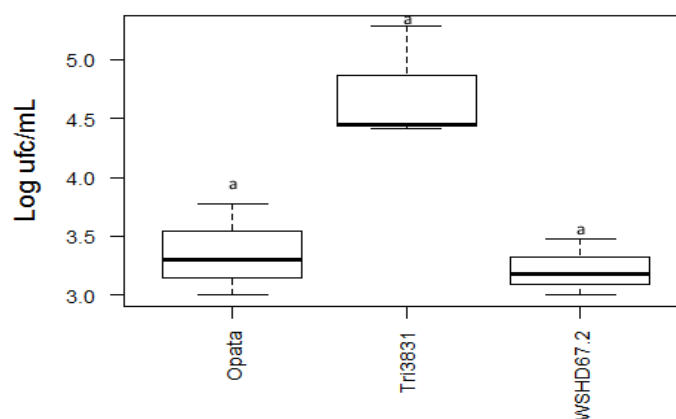


Figura 5. *A. halopraeferans* adheridas a raíces de diferentes genotipos de trigo. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

7.2 Extracción de ARN para hibridación de microarreglos

De las 150 semillas que se colocaron a germinar, únicamente se consideraron que 36 plántulas presentaban un crecimiento adecuado para la inoculación de las bacterias correspondientes y la extracción de ARN.

Para la extracción de ARN se utilizaron raíces de tres plántulas. En la figura 6 se puede apreciar el ARN total de las raíces del trigo Ópata con sus respectivas bandas (28S, 18S y ARN de transferencia), y en el apéndice 12 la cuantificación de éste.

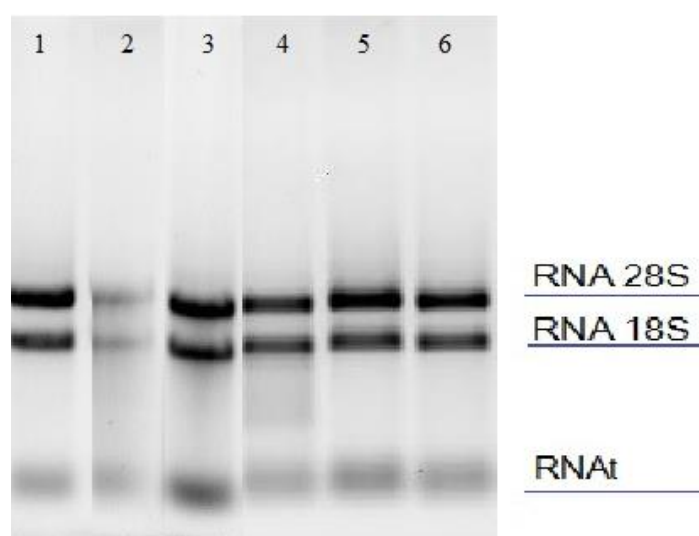


Figura 6. Extracción de ARN a raíz del trigo con los tratamientos bacterianos. Carril 1: Extracción ARN de raíz de trigo Sintético WSHD67.2 inoculada con *A. brasilense* Cd; carril 2: Extracción ARN de raíz de trigo Sintético WSHD67 inoculada con *A. brasilense* SP245; carril 3: Muestra control. Carril 4: Extracción ARN de raíz de trigo Ópata inoculada con *A. brasilense* SP245; carril 5: Extracción ARN de raíz de trigo Ópata inoculada con *A. brasilense* Cd; carril 6: Muestra control.

7.3 Análisis del microarreglo

Una vez procesados los datos del microarreglo con el software GenePix, se sometieron a un análisis estadístico con el software GENARISE, que proporciona la identidad de los genes

expresados al calcular un valor de Z dependiente de la intensidad de la fluorescencia. Para obtener el valor de Z, es necesario calcular la media, desviación estándar y rango de confianza de los valores. Se obtuvo una matriz con 29,072 genes. Para el análisis de los genes expresados, se tomó en cuenta el grupo de genes con un z score mayor a 1.5 lo cual redujo a 1598 genes inducidos y 1754 genes reprimidos (Fig. 7).

Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes expresados, para ello se utilizó el software Bingo, en donde, se obtuvieron 81 genes inducidos (Anexo D). Los cuales se encuentran relacionados con el proceso de biosíntesis de macromoléculas celulares, de expresión y de traducción en la ontología de componentes celulares. Mientras que, en la ontología de función molecular se encuentran genes relacionados con moléculas de unión a ARN.

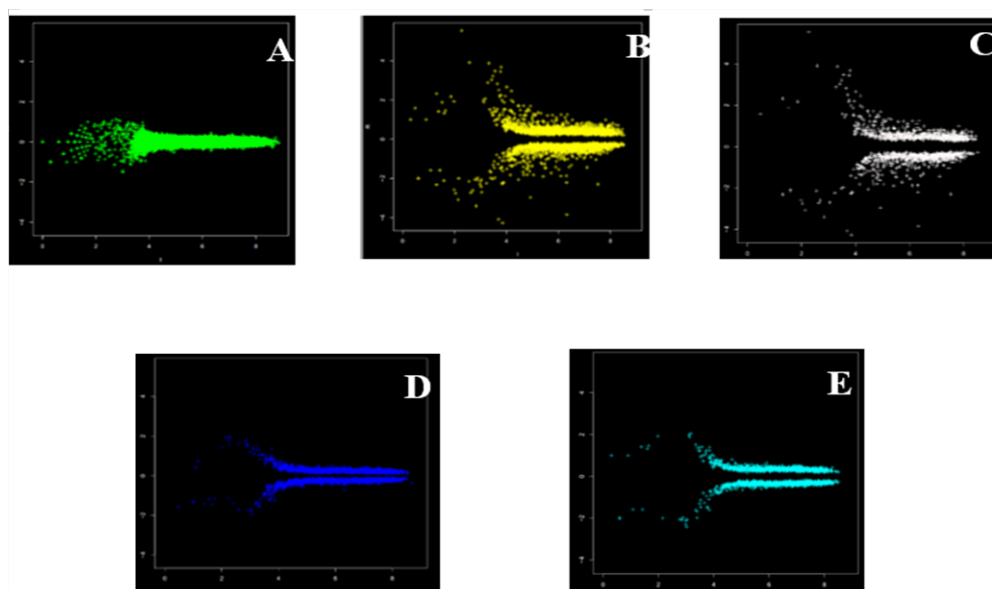


Figura 7. Clasificación de genes expresados diferencialmente en el microarreglo. Los genes expresados (representados por puntos en las graficas) se encuentran por arriba o por debajo del valor 0 en el eje de las ordenas, son genes inducidos y reprimidos respectivamente. La clasificación de los genes esta dada por los valores Z-score (números blancos en la parte superior de la grafica). A) Genes inducidos z-score <1 y genes reprimidos zscore >-1 . B) Genes inducidos z score de > 1.5 y genes reprimidos z score de <-1.5 . C) Genes inducidos con un un valor de $z > 2$ y genes reprimidos con un z score <-2 . D) Genes inducidos con un valor de $z > 1 < 1.5$ y genes reprimidos con un z score $>-1 < -1.5$. E) Genes inducidos con un valor de $z > 1.5 < 2$ y genes reprimidos $>-1.5 < -2$. Valores y graficas obtenidos con el software GENARISE.

Para los genes inducidos más representados (Anexo B), el análisis arrojó un total de 170. De los cuales, en la ontología de procesos biológicos se encuentran genes relacionados con procesos de traducción. En la ontología componentes celulares se encuentran los genes involucrados en sistema endomembranal. Finalmente, en la ontología de función molecular están los genes relacionados de unión a ARN (Figs. 8 y 9).

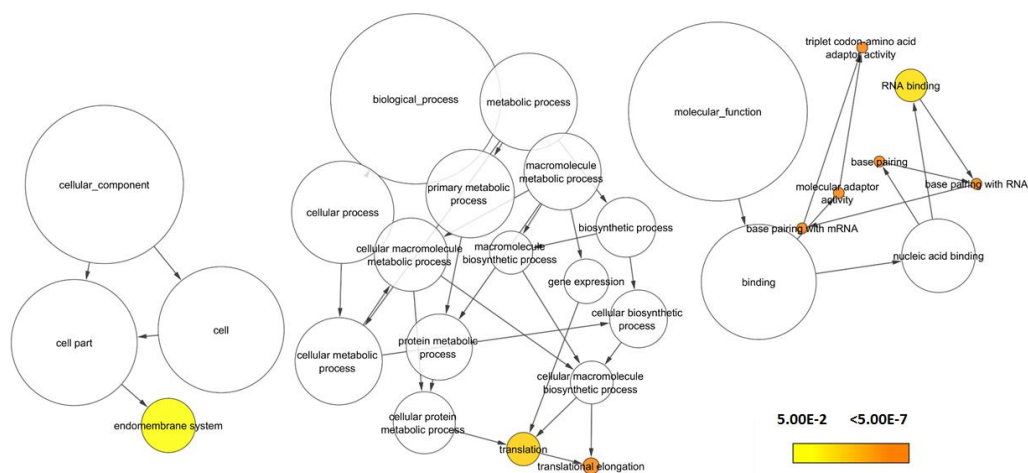


Figura 8. Genes reprimidos en raíz de Ópata, relacionados con el sistema endomembranal, traducción, y moléculas de unión a ARN. Para el análisis estadístico, se utilizó un p-valor de 0.05. Los colores representan un p valor. En la escala de color amarillo el valor de significancia es de .01, mientras que los tonos naranja fuerte representa un valor de $10^{-5} * 0.01$. Los nodos en blanco no son significativos.

7.3.1 Genes reprimidos

Los genes reprimidos con mayor representación en la ontología de procesos biológicos están relacionados con los procesos de traducción, síntesis de metabolitos secundarios, maduración de LSU ARNr, regulación de la traducción, proteínas de transporte, procesamiento del ARNm, factores de iniciación, modificación de la pared celular y receptores transmembranales (Tabla III).

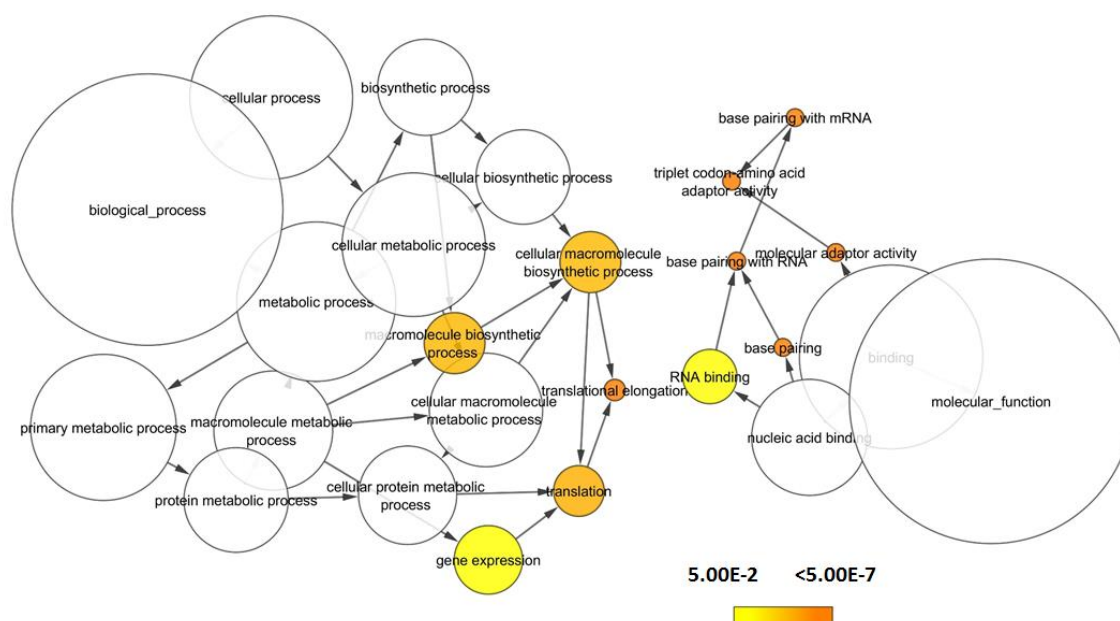


Figura 9. Genes inducidos en raíz de Ópata, relacionados la síntesis de macromoléculas, expresión de genes, traducción, y moléculas de unión a ARN. Para el análisis estadístico, se utilizó un p-valor de 0.05. En la escala de color amarillo el valor de significancia es de .01, mientras que los tonos naranja fuerte representa un valor de $10^{-5} * 0.01$. Los nodos en blanco no son significativos.

Tabla III. Genes reprimidos en ontología Procesos biológicos, base de datos DAVID.

Clasificación	Cantidad	P-Value	Benjamin
Transcripción	25	31.6e-5	4.0e-3
Proceso biosintético del metabolito secundario	6	7.2e-3	3.6e-1
Maduración del LSU-ARNr	3	2.1E-2	4.8E-1
Regulación de la traducción	4	2.32e-2	4.6e-1
Transporte de proteínas intracelular	5	7.6e-2	7.0e-1
Procesamiento de ARNm	6	1.6e-2	4.2e-1
Factores de iniciación	3	1.1e-1	3.8e-1
Modificación de la pared celular	4	2.3e-2	4.4e-1
Proceso catabólico de la proteína	3	2.4e-1	9.5e-1
Homeostasis celular redox	4	1.4e-1	8.7e-1
Metabolismo de carbohidratos	4	6.3e-1	1.0e0
Muerte celular de otros organismos	4	4.3e-1	9.9e-1
Vía de señalización receptor membrana de la proteína tirosina quinasa	3	2.9e-1	9.7e-1

Genes involucrados en la modificación de la pared celular

Debido a la importancia que tiene la pared celular en el proceso de adhesión bacteriana se consideraron importantes los genes inducidos que participan en la modificación de la pared celular y que se encuentran en la ontología del sistema endomembranal: pectina liasa (AT4G33440), inhibidor de la invertasa / pectin metilesterasa (AT1G02810, AT3G05620), (AT3G05620), vanguard (VGDH2), celulosa sintasa A3 (CSLA03) (AT1G23480), galacturonosiltransferasa 5(GATL5) (AT1G02720), xyloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa 21 (XTH21) (AT2G18800) (Figs. 10 y 11). Además del gen *eceriferum* (CER7) (AT3G60500) que codifica para una 3'-5' exoribonucleasa y está involucrado en la síntesis de la pared celular, así como, los genes que codifican para diferentes proteasas: proteína eucariótica de la familia de la proteasa aspartil (AT1G31450, AT5G24820, AT5G43100), enzima de procesamiento alfa-vacuolar (ALPHA-VPE) AT2G25940, serina carboxipeptidasa-47 (scpl47) y 5(scpl5) (AT5G22980, AT1G73290).

Señalización

En este sentido, y debido a que la señalización celular es primordial en el reconocimiento bacteria-raíz se prestó importancia a las protein quinasas. Entre las cuales, se encontraron 4 protein quinasas, dos de ellas involucrados en una respuesta a defensa bacteriana: receptor protein quinasa rico en cisteína (AT4G04540), el receptor transmembranal protein quinasa rico en leucina (AT5G41180). Los genes que codifican para receptores transmembranales ricos en leucina (LRR por sus siglas en inglés) (AT4G20270, AT5G44700, AT5G41180).

Así mismo, se encontraron reprimidos los siguientes receptores: lectina quinasa v.4, un gen que codifica para una defensina (DEFL), receptor quinasa de embriogénesis somática 4 (AT2G13790) (Anexo C), involucrados en defensa contra bacterias y oomicetos. Otras moléculas que fueron reprimidos y funcionan como antimicrobianos son: *cysteine-rich 26* LCR26 (AT4G22230) y toxina escorpion tipo knottin 6 (LCR68) (AT2G43530).

Rutas metabólicas y fitohormas

El análisis en la base de datos David (Kegg) muestra 52 transcritos implicados, entre los cuales se encuentran 17 genes que participan en la síntesis de los constituyentes ribosomales, incluidos elongation factor Tu C-terminal (AT1G35550), proteína ribosomal de unión a zinc (AT1G15250), 2 citocromos p450, factor de iniciación de la traducción 3 H1 (TIF3H1), 2-oxoglutarate (2OG) y el gen que codifica para la oxigenasa dependiente de Fe (II). Alguno de estos genes participan en la síntesis de glicanos (Fig. 10). El gen que participa indirectamente en procesos de oxidación reducción es FAD-binding Berberine, que responde a la presencia de ácido jasmónico.

En este sentido, las fitohormonas juegan un papel importante en el desarrollo de la planta, son conocidas como reguladores en el proceso de adaptación (Fahad *et al.*, 2015) y son necesarias para el reconocimiento bacteria-raíz. En este caso, se encontraron reprimidos los siguientes genes relacionados con el metabolismo de fitohormonas: UDP-glicosiltransferasa, ésta participa en la síntesis de flavonoides, el gen supresor de auxina involucrado en la respuesta a defensas y respuesta a señalización metabólica, así como el transportador de flujo de auxina (PIN8).

7.3.2 Genes inducidos

Los genes que se sometieron al análisis en la base de datos David (Tabla VI) arrojaron que dentro de la ontología de procesos biológicos se encuentran genes involucrados en la traducción, síntesis de macromoléculas para los constituyentes del ribosoma, genes que participan en el proceso de splicing, en el ensamblaje del complejo de pre-iniciación pre ARN -polimerasa II, así como los genes involucrados en la síntesis de la pared celular.

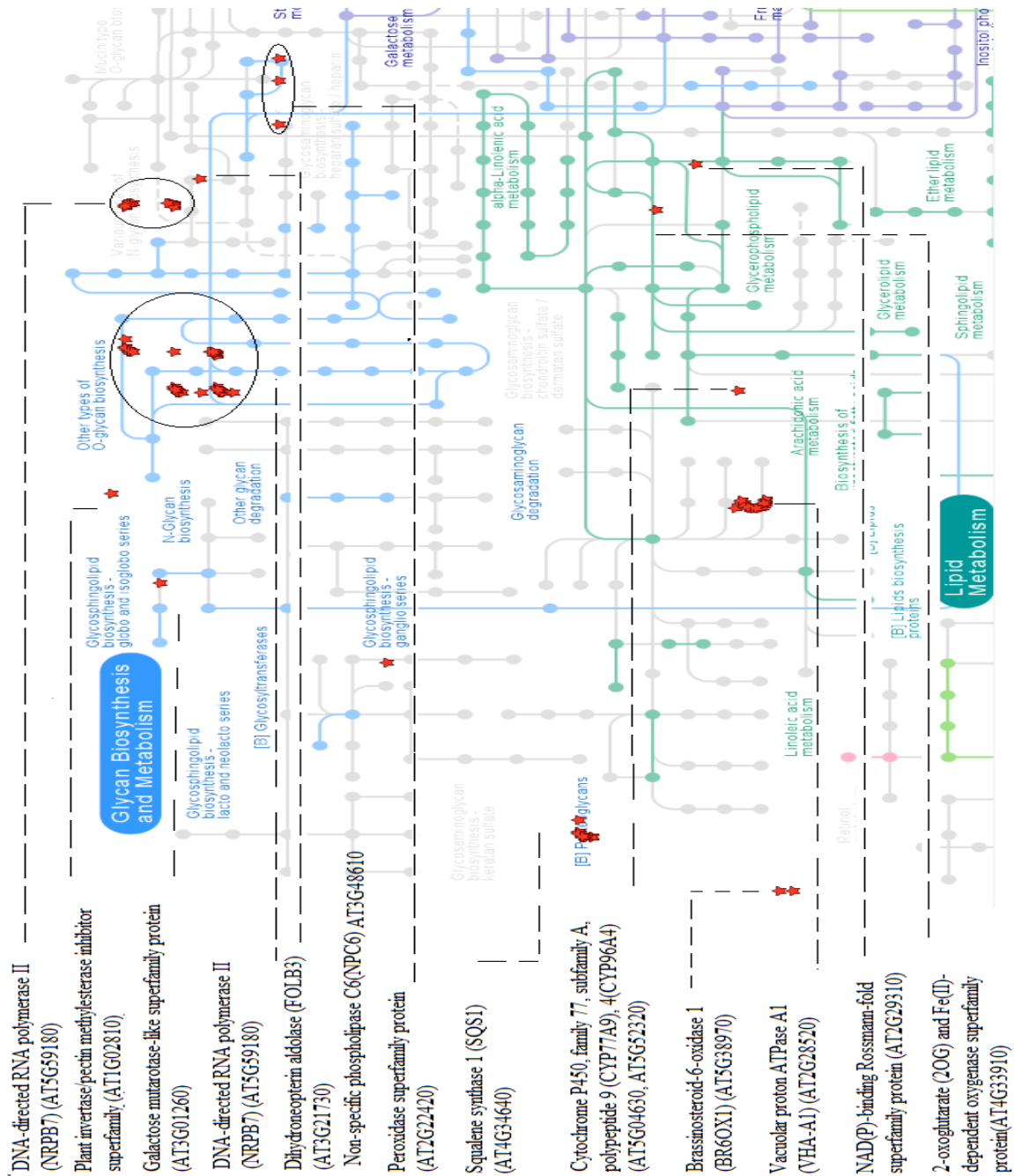


Figura 10. Genes reprimidos que participan en rutas metabólicas Kegg.

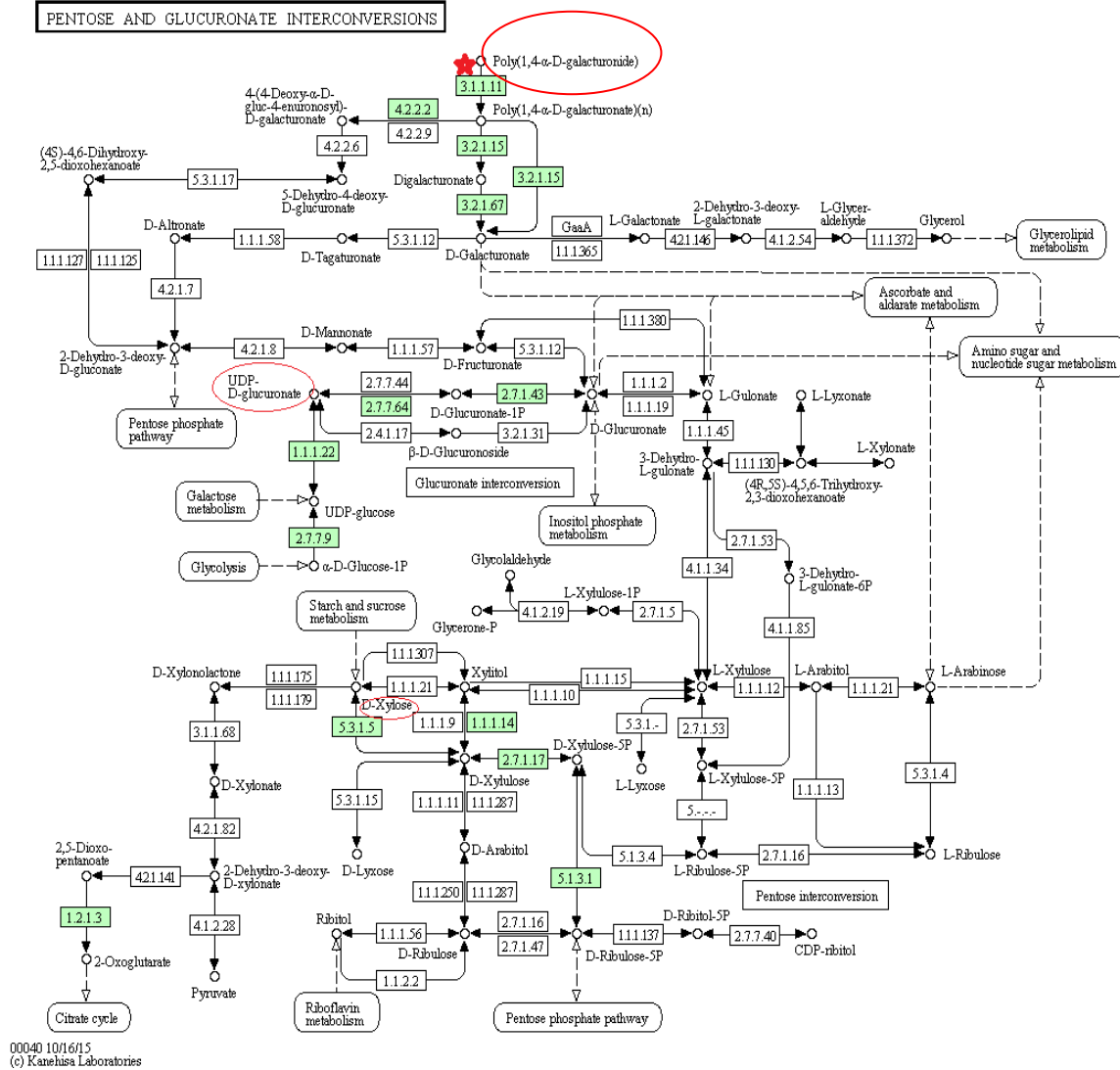


Figura 11. Diagrama de la ruta de pentosas e interconversión del glucuronato. En los círculos señalados se encuentran los genes poli 4- α galacturonosiltransferasa, xilosas y glucuronato, los que participan en esta ruta.

Tabla IV. Genes inducidos en ontología Procesos biológicos, base de datos DAVID.

Clasificación	Cantidad	P- Value	Benjamin
Traducción	19	3.7e-7	6.8e-5
Biogénesis de ribosoma	6	2.84e-4	1.3e-2
Splicing de ARNm, via spliceosoma	4	1.1E-2	2.2E-1
Iniciación de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	4	6.95e-5	4.2e-3
Transcripción	19	3.6e-1	9.9e-1
Organización de la pared celular	4	1.3e-1	4.3e-1

Organización y síntesis de la pared celular

Los genes inducidos de mayor interés por su rol en la organización de la pared celular y glicosilación son los siguientes: celulosa sintasa (CEV1) AT5G05170, G2 (CSLG2) AT4G24000, fucosiltransferasa 12 (FUT12) AT1G49710 y glucano sintasa 10 (AT3G07160).

Otros genes que participan en la glicosilación son: el gen beta-1,2-xylosyltransferase (AT5G55500) y dolicol fosfato manosa sintasa (influenciado por una respuesta a estrés y al amonio). A su vez, este gen es necesario para la donación de 3 manosas en la síntesis de fosfatidil inositol-glicina sintasa SETH1 (AT2G34980), que codifica para un dominio transmembranal y ancla proteínas a la superficie celular (Lalanne *et al.*, 2004), (Oxley *et al.*, 1999).

Factores de transcripción

Los factores de transcripción están involucrados en varios procesos biológicos y su actividad depende de estímulos varios. En este ensayo los siguientes factores de transcripción se encuentran inducidos: factor de transcripción IIA, (AT1G07470), que se incluye en la categoría GO de expresión de genes y síntesis de macromoléculas, factor de transcripción TFIIE, (AT4G20340), factor de transcripción (AT5G59230), factor de

transcripción IIA gamma / TFIIA-gamma (TFIIA-S); estos dos últimos genes se encuentran en la clasificación ontológica de síntesis de macromoléculas.

Genes relacionados en vías metabólicas

Farnesiltransferasa A (FTA) (categoría ontológica de síntesis de macromoléculas), regula negativamente la vía de señalización activada por el ácido abscísico, así como el gen acotinasas (ACO1), que se encuentra en la categoría ontológica de moléculas de unión a ARN (Fig. 13), y que participa en el ciclo del ácido cítrico, cuya función es catalizar la isomerización reversible de citrato isocitrato, e interactúa con el ARNm para regular los altos niveles de hierro.

El gen inducido o que codifica para ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductasa 1, que se encuentra en la categoría ontológica de moléculas de unión a ARN, el cual transfiere electrones en el proceso de fotosíntesis, el que se expresa en presencia de nitratos y bacterias.

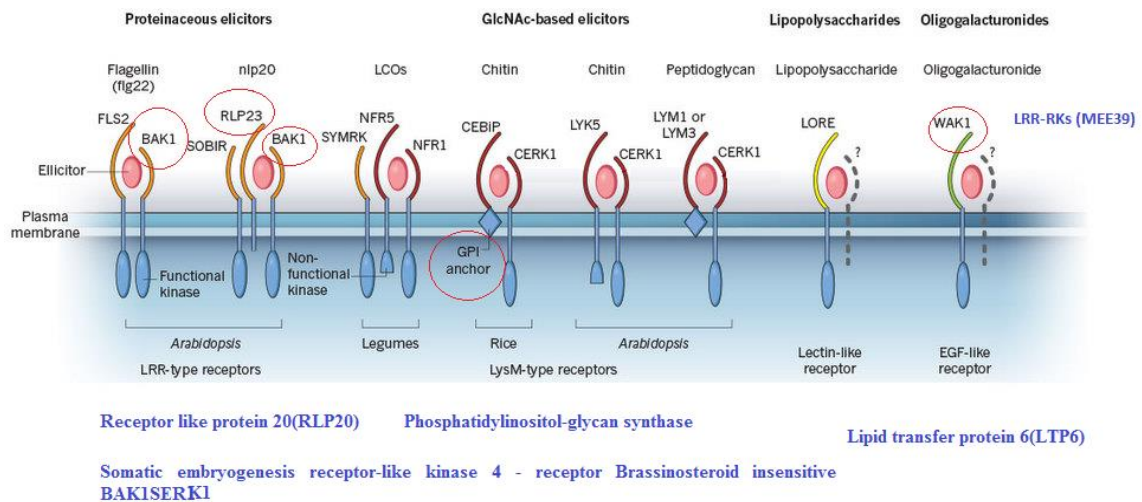
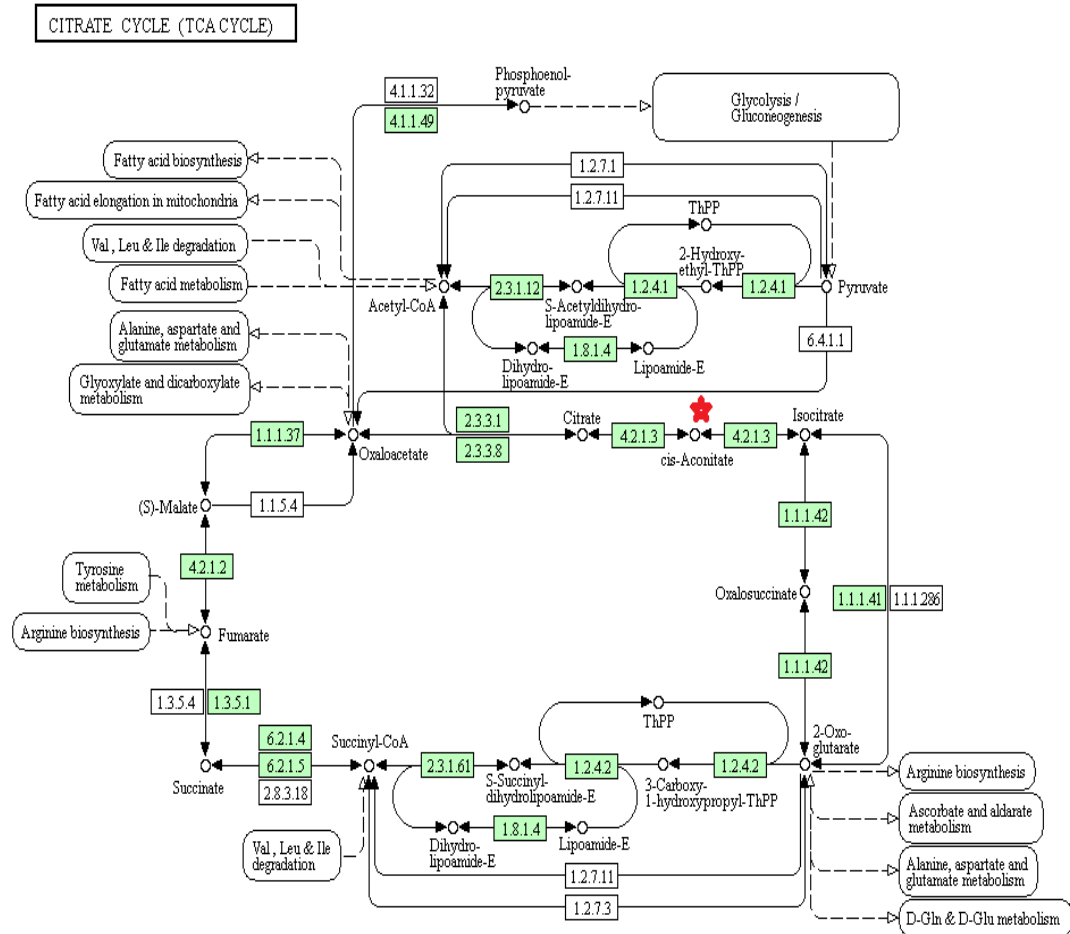


Figura 12. Modelo en el que se representan algunos de los patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) y sus respectivos receptores de reconocimiento (PRRS). Las letras en azul y los círculos en rojo son los genes expresados diferencialmente en este estudio (Modelo modificado, tomado de Zipfel y Oldroyd, 2017).



00020 11/26/15
 (c) Kanehisa Laboratories

Figura 13. Ruta metabólica de intervención del gen acotinasa 1 ACO1 (asterisco señalado), inducido en éste estudio.

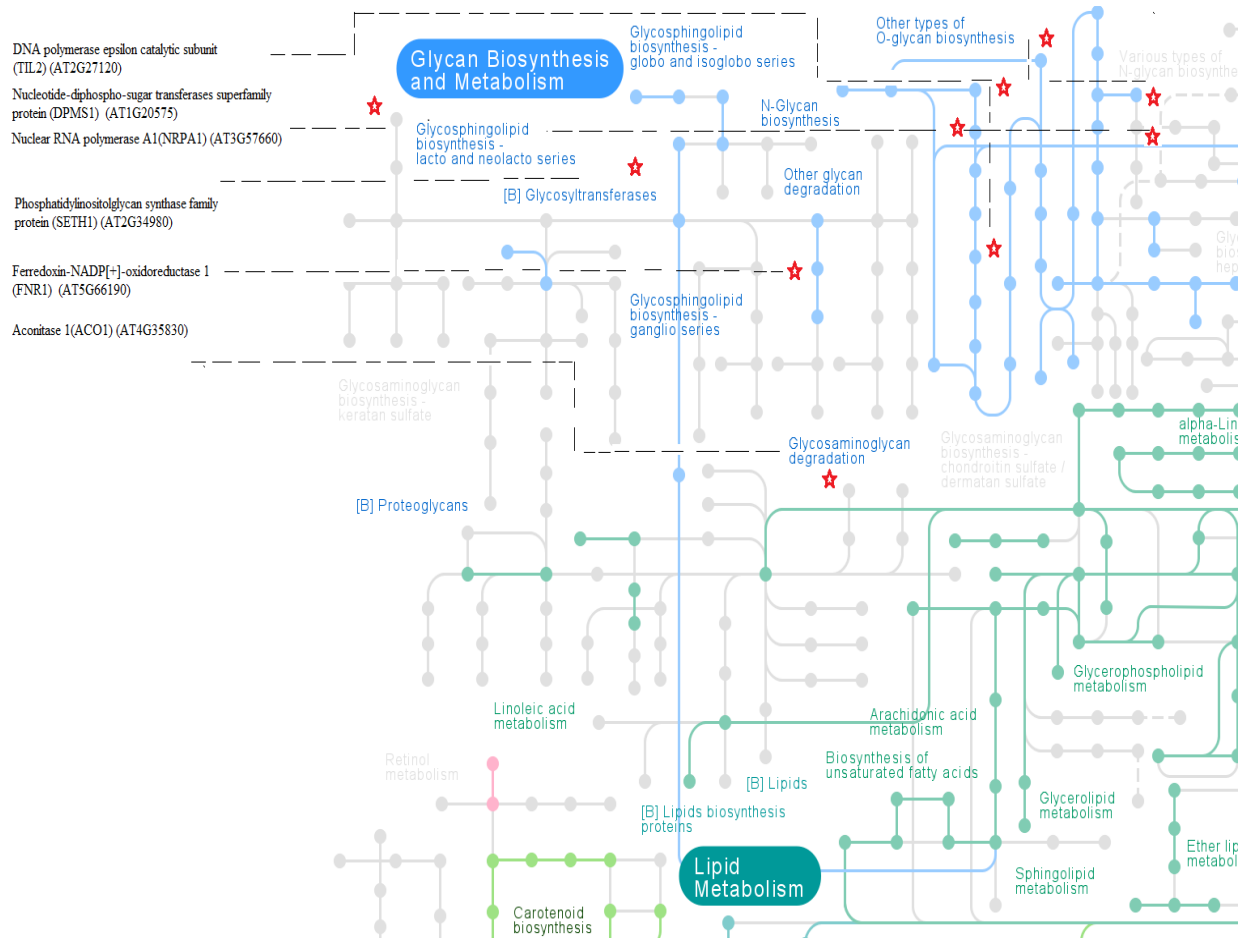


Figura 14. Genes inducidos que participan en rutas metabólicas Kegg.

7.4 Primers utilizados en la validación del microarreglo

Los primers diseñados para la validación del estudio de microarreglos, de genes que participan en la síntesis de moléculas para la adhesión y señalización se muestran en la tabla V, mientras que los primers diseñados para genes que no mueven su expresión se encuentran en la tabla VI.

Tabla V. Primers diseñados para evaluar la expresión de genes en raíces de trigo con los diferentes tratamientos.

Gen para el que codifica	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
Poligalacturonato 4- α galacturonosiltransferasa	Taugly F	5'-AGGGGAAGGTTAATGGTGCT-3'	64.8
	Taugly R	5'-CATTCCAAAAGCCCAGAGAC-3'	64.8
Kinasa asociada a Pared WAK3	TaLrr F	5'-AAGGATGACAGGGTAGTGGC-3'	66.5
	TaLrr R	5'-CGGTGGTTGGTCTGTGAAAG-3'	66.5
Fosfatidil inositol N- glucosaminil transferasa	TaPho F	5'-TTGTTGGGTTCTTGGTCCTC-3'	64.8
	TaPho R	5'-GGCCACTGGTGAAGAATGAT-3'	66.5
Xyloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa	TaXyl F	5'-GTGGGTGCAGAGGAAGTTCA-3'	66.5
	TaXyl R	5'-TTCTTGTAAGCTGCGGGAGG -3'	64.8

Tabla VI. Primers diseñados para la evaluación de genes constitutivos en raíz de trigo.

Gen para el que codifica	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
Ribosoma L29	TaRibl29 F	5'-AAACCCTAGCCCTTCTTCCG-3'	66.5
	TaRibl29 R	5'-GGTTCTTCGACTTGGCCATC-3'	66.5
Factor de ribosilación ADP	TaADP F	5'-TCATGGTTGGTCTCGATGCC3'	66.5
	TaADP R	5'-GTTGGGATGGTGGTGACGAT-3'	66.5
Dominio de unión ARID/BRIGHT	TaARID F	5'-TGTCACTCTCCATGGGCAAT-3'	64.8
	ARID R	5'-AACCTGCAACCATCCTACGA-3'	64.8
Histona H2B.8	TaHist F	5'-GCCATGTCCATCACGAACTC-3'	66.5
	TaHist R	5'-GTGGGCTTCTTGTTGTACCG-3'	66.5
Inhibidor de RNASE L 1	TaRNsel F	5'-TCGTCAAGACCGGGAAGTTG-3'	66.5
	TaRNsel R	5'-CCACAACCAATGCACAGCTC-3'	66.5
Inhibidor de RNASE L 1 (Paolacci <i>et al.</i> , 2014)	TaRNselb F	5'CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG3'	66.5
	TaRNselb R	5'AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAATG- 3'	66.5
Dedos Zinc C-x8 C-x5-C- x3-H	TaZic F	5'-AGGACATCTTCGACGAGCTC-3'	66.5
	TaZic R	5'-CTCCCTGAACTGCACGTAGA-3'	66.5

7.5 Resultados de la extracción ARN para validación de genes

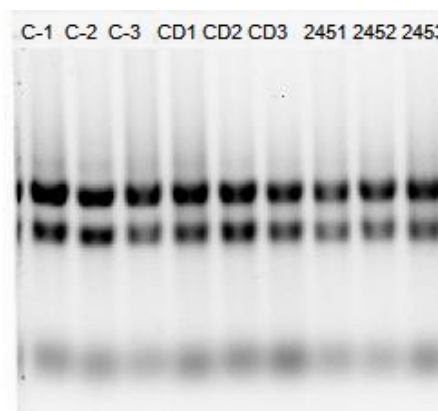


Figura 15. Gel de electroforesis de ARN de raíz de trigo WSHD67.2 con sus respectivos tratamientos. Carril C1-C3=control; carril CD1-CD3= Raíz de trigo inoculada con *A. brasilense* Cd; Carril 245.1-245.3= Raíz de trigo inoculada con *A. brasilense* SP245.

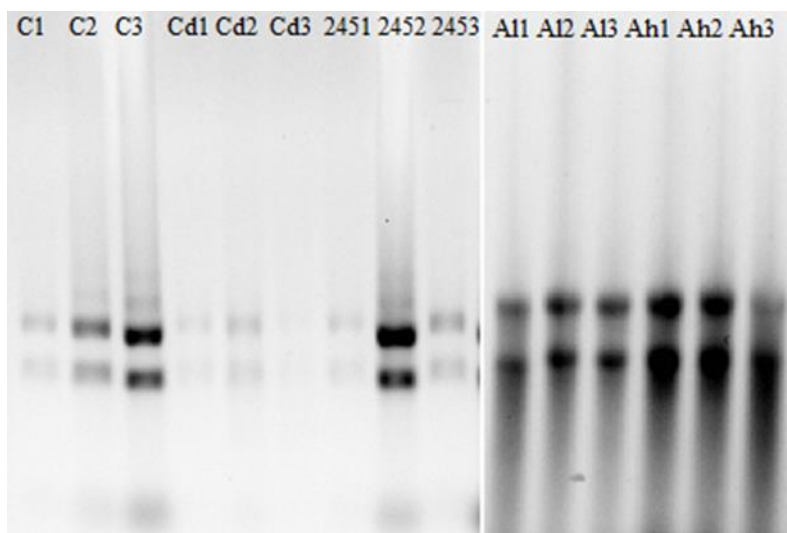


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de ARN de raíz de trigo Ópata tras la inoculación. Carril C1-C3 = control; carril CD1-CD3 = Raíz de trigo inoculada con *A. brasilense* Cd; carril 245.1-245.3 = Raíz de trigo inoculada con *A. brasilense* SP245; carril A11-A13=*A. lipoferum*; carril Ah1-Ah3 = Raíz de trigo inoculada con *A. halopraeferans*.

7.6. Selección de genes endógenos

Para determinar el mejor gen constitutivo, se evaluaron siete genes en dos variedades de trigo (Ópata y WSHD67.2), bajo los diferentes tratamientos bacterianos.

Las secuencia RNASE L 1, se seleccionó de un diseño de Paolacci *et al.* (2014), los otros seis genes fueron seleccionados de secuencias del microarreglo: inhibidor RNASE 1 A, factor ADP-ribosilación (ARF1), unión a DNA ARID/BRIGHT, dedos zinc C-x8 C-x5-C-x3-H, histone (H2B.8) y ribosomal l29 (RPL29). En la tabla VII se muestra que los genes más estables según el método de Bestkeeper, por su menor desviación de CP y menor cambio en la regulación ($\pm x$ – fold change), fueron los housekeeping RPL29 (Ribosomal L29) y H2B.8 (Histone superfamily protein), mientras que el gen ARID es que tiene mayor desviación.

NormqPCR arrojó que Ribosomal l29 y Histone superfamily protein (H2B.8) son los genes más estables para este estudio. El gen que codifica para zinc (dedos zinc C-x8 C-x5-C-x3-H) y RPL29 se encuentran entre los más estables según NormFinder. Mientras que geNORM muestra que el gen más estable es RNASE L B, RNASE L A y Ribosomal l29 (Tabla VII).

Tabla VII. Resultados de la evaluación para el gen más estable.

Gen	Programa			
	Normfinder	Genorm	Best keeper	NormqPCR
Inhibidor de la proteína RNASE A L 1	7	2	6	3
Inhibidor de la proteína RNASE B L	6	1	4	2
Factor de ADP-ribosilación	4	6	5	5
Unión a ADN ARID/BRIGHT	5	4	7	6
Dedos Zinc C-x8 C-x5-C-x3-H	1	7	3	4
Histona H2B.8	3	5	2	1
Ribosomal l29	2	3	1	1

*Valor más estable 1, valor menos estable 7.

7.7 Cuantificación de la expresión de genes seleccionados del microarreglo

Para cumplir con el objetivo tres, se realizó la técnica de RT-qPCR, donde el análisis de expresión se llevó a cabo con el gen de referencia RPL29 E y los genes problema WAK3, xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XHT5), fosfatidil inositol N-acetil glucosaminiltransferasa y el gen que codifica para poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa, los cuales fueron evaluados en las dos variedades de trigo

Para el análisis de la expresión del gen WAK3, se detectaron diferencias significativas entre genotipos, a excepción del tratamiento con la cepa *A. brasilense* Cd. El genotipo WSHD67.2 se encuentra reprimido en todos los tratamientos, mientras que la expresión en raíces de trigo Ópata muestran inducción, a excepción del tratamiento con *A. brasilense* SP245 (Fig. 17).

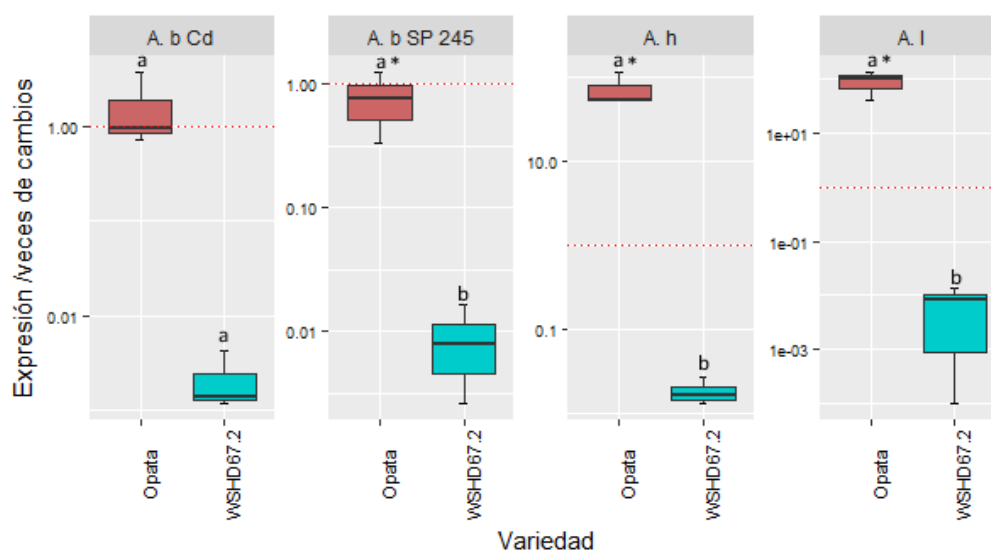


Figura 17. Expresión relativa del gen WAK3 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos. *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Los datos fueron normalizados con el gen RPL29. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Por otro lado, para el gen que codifica para fosfatidil inositol N-glucosaminil transferasa en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 no se detectaron diferencias significativas entre ambos genotipos con ninguno de los tratamientos (Fig. 18).

Los análisis de la expresión relativa del gen xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XHT5) en raíces de trigo Ópata comparado con el trigo Sintético muestran una tendencia a reprimirse. En este caso, no existen diferencias significativas entre los genotipos en cada tratamiento analizado, a excepción del tratamiento con la bacteria *A. brasilense* SP245 (Fig. 19).

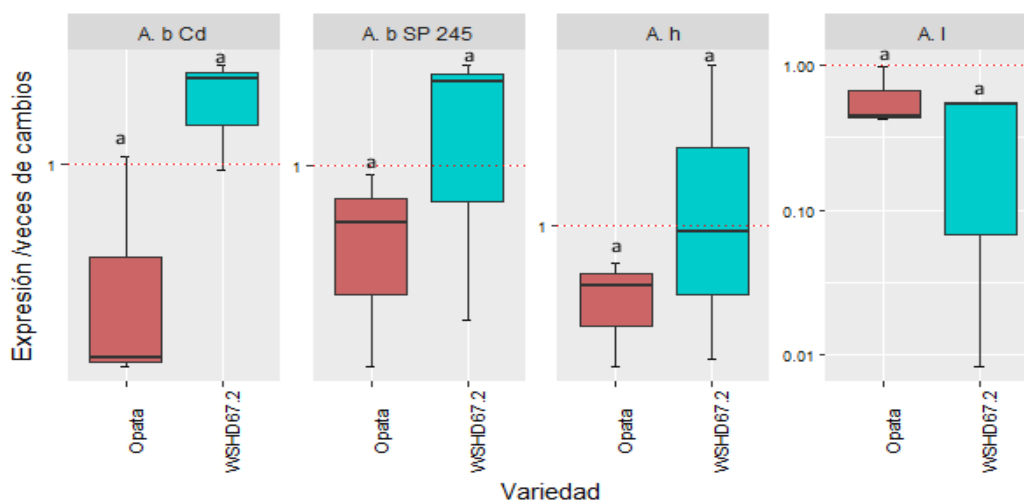


Figura 18. Expresión relativa del gen fosfatidil inositol N-glucosaminil transferasa en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos. *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Los datos fueron normalizados con el gen RPL29. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

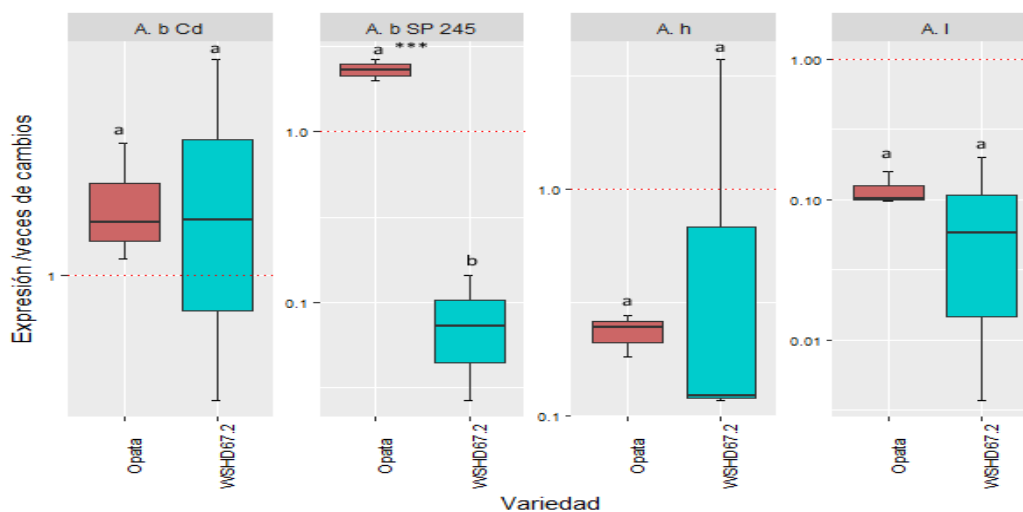


Figura 19. Expresión relativa del gen XHT5 en raíces de trigo Ópata y sintético WSHD67.2, al utilizar cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Los datos fueron normalizados con el gen RPL29. Los datos fueron normalizados con el gen RPL29. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Por último, los análisis estadísticos llevados con los datos del gen poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa, similar a GAUT1 en *Arabidopsis*, no mostraron diferencias de expresión entre las raíces de trigo Ópata-sintético con los respectivos tratamientos. En todos los tratamientos se percibe una represión del gen en las raíces de ambos genotipos de trigo (Fig. 20).

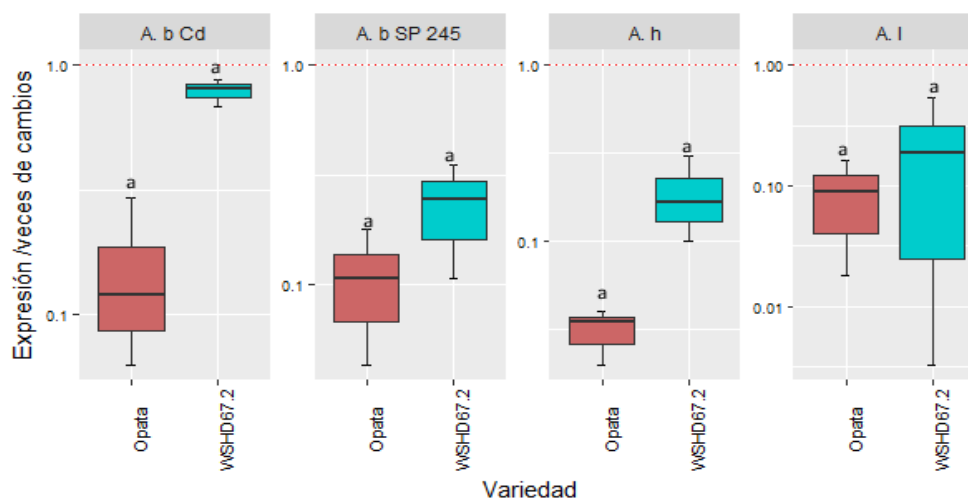


Figura 20. Expresión relativa del gen poligalacturotano 4-alfa-galacturonosiltransferasa en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2. *A. brasilense* SP245, al utilizar los cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Los datos fueron normalizados con el gen RPL29. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas. El diagrama de cajas y bigotes representa el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y los valores mínimos y máximos. Valor de nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, no se encontró un polimorfismo de adhesión de *Azospirillum* spp. a la raíz del trigo sintético hexaploide y el trigo harinero Ópata, es decir las bacterias probadas se adhieren a ambas raíces, sin embargo, Díaz de León *et al.* (2015) determinaron que *A. brasilense* Cd se adhiere a Ópata pero no al sintético WSHD67.2. Cabe señalar que las semillas que se utilizaron para ambas investigaciones fueron adquiridas por CIMMYT en diferentes lotes y años.

Por otra parte, *A. brasilense* presentó una mayor adherencia a las raíces de Ópata y sintético en un orden de magnitud de $8.0E + 4$ y $2.0E + 4$ respectivamente, mientras que *A. lipoferum* y *A. halopraeferans* se contabilizaron bacterias en un orden de magnitud menor ($1.5E + 3$ y $3.5E + 3$) en ambos genotipos de trigo. Aunado a lo anterior, *A. brasilense* SP245 y *A. lipoferum* se adhieren diferencialmente a otras raíces de trigo probadas en este estudio (Figs. 3 y 4). En este sentido, este polimorfismo puede deberse a una coevolución del trigo y la cepa de *Azospirillum*, ya que *A. brasilense* SP245 y *A. lipoferum* fueron aisladas de rizosfera de raíz de trigo, mientras que *A. halopraeferans* y *A. brasilense* Cd se aislaron de los pastos *Leptochloa fusca* y *Cynodon dactylon* respectivamente (Garrity *et al.*, 2005). Este resultado confirma la hipótesis anterior de que *Azospirillum* tiene una afinidad a las raíces de trigo.

Por otro lado, las raíces de las plantas son las que inician una comunicación, produciendo señales con la comunidad bacteriana del suelo a través de señales químicas (Bais *et al.*, 2006) y una vez que las bacterias logran tener una interacción con los carbohidratos y receptores de reconocimiento de la membrana de la planta, ocurre la adherencia, invasión en el caso de endófitas y patógenos, después ocurre la colonización y finalmente estrategias de interacción (Berg, 2009).

Robledo *et al.* (2008) menciona, que en interacciones patogénicas o mutualista la pared celular de la planta es degradada y ocurre una sobre-regulación de los genes de defensa, sin embargo en este estudio se encontraron más genes reprimidos relacionados a los de defensa (Tablas III y IV), lo que puede indicar que son genes específicos en la asociación benéfica planta-bacteria.

Por otra parte, la pared celular de la planta es un complejo de polisacáridos entre los cuales se encuentran pectinas, celulosas, ligninas, entre otras (Malinovsky *et al.*, 2014). Las pectinas son complejos de heteropolisacáridos de pectinas que se encuentran en la matrix, y son abundantes en la pared primaria (Wolf *et al.*, 2009), se componen de residuos de homogalacturonanos o HGA (por sus siglas en inglés), y ramnogalacturonanos, de los cuales en este estudio, se encontró, el gen inducido Ramnogalacturonato liasa que se encarga de degradar al polisacárido (Laatu y Condemine, 2009).

En el caso de infecciones por hongos, se ha detectado las pectinasas que son las primeras enzimas que participan en la degradación de la pared celular, estas a su vez desencadenan rupturas de xiloglucano y celulosa. En plantas uno de los mayores componentes de la pared celular es el xiloglucano, que se caracteriza por estar formado de unidades de glucosa y residuos de xilosa tipo XXGG y XXGGG (Kato y Matsuda, 1985). El xiloglucano participa en el desarrollo de las paredes secundarias (Hayashi, 1989), y una de las enzimas que regula la división y reconexión del xiloglucano/celulosas es xiloglucano endotransglucosilasa, el que se encontró reprimido en presencia de *A. brasilense* Cd. Así mismo, Spaepen *et al.* (2014) menciona que a los 7 días de contacto de *Azospirillum* en raíces de *Arabidopsis* se induzcan genes que codifican para expansinas y xiloglucanos, lo que confirma las observaciones de que *A. brasilense* permite la elongación de raíces, sin embargo xiloglucano endotransglucosilasa en este trabajo se encuentra reprimido (probablemente por el microarreglo heterólogo utilizado en este estudio). Aunque se ha reportado que en infecciones con el hongo *Penicillium expansum* en tomate provoca una disminución de los transcritos de XTH conforme aumenta el tiempo de infección entre las 24-48 horas, lo que ocasiona cambios en la estructura celular y facilita la infección del hongo en los tejidos (Miedes y Lorences, 2007), probablemente esta diferencia entre los niveles del transcrito XTH se deba al tiempo en el que fueron tomados las muestras, en el caso de Spaepen *et al.* (2014), la bacteria ya se encontraba colonizando las raíces de la planta y seguramente en esta tesis, *Azospirillum* aún se encontraba en un proceso de interacción y adhesión a la pared celular.

Mora-Ruíz (2010) encontró la proteína UDP-Glucuronato descarboxilasa sobre-expresada en raíces de trigo cuando se les inóculo *Azospirillum brasillense* Cd, la cual

cataliza la síntesis de UDP-xilosa mediante UDP-D-Xyl sintasa (UXS), y que se encuentran involucrados en la síntesis de componentes de la pared celular (Fig. 11). A pesar que, UDP glucoronato descarboxilasa no está representado en nuestro estudio, si se encuentran expresadas diferencialmente los transcritos invertasa pectin metilesterasa que intervienen indirectamente en el metabolismo de interconversión de glucoronato, poli 1,4 alfa galacturonato, xilosa endotransglucosilasa hidrolasa 21, entre otros (Fig. 11).

Otro componente importante y abundante de la pared celular es la celulosa, polímero de β -1,4-enlazado no ramificado de cadenas de glucano, que forman unas microfibrillas y son codificadas por los genes de la familia CSL C (cellulose synthesis por sus siglas en inglés). En este sentido, se encontró que la presencia de la bacteria, puede inactivar y activar moléculas específicas de la familia CSL, ya que el gen parecido a celulosa sintasa A3 (CSLA03) estaba reprimido, sin embargo otros dos genes de la familia CSL (CEV1 y CSLG2) se encontraron inducidos., Spaepen *et al.* (2014) también encontró inducidos genes de la familia celulosa sintasa (CEV1) (Toller *et al.*, 2008).

Además, las CEV y CLS contienen motivos para glicosiltransferasas y dominios de dedos zinc en el extremo terminal, lo que concuerda con los genes tipo dedos zinc inducidos y reprimidos en este trabajo, U2AF35B y ATCTH respectivamente. Tanto las glicosiltransferasas como los dedos zinc, se encuentran involucrados en la síntesis de la celulosa en las paredes y adhesión celular (Kurek *et al.*, 2002).

Por otro lado, los procesos de interacción benéfica se encuentran aún poco elucidados. Aunque se sabe que, el éxito de infección o invasión está dado por un reconocimiento de los patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs por sus siglas en inglés) (Latgé, 2010). Algunas de las moléculas encargadas de la supervivencia del patógeno son elicitores general tipo flagelina (Flg), factores de enlongación Tu (EF-Tu), peptidoglicanos (PGN), lipopolisacáridos (LPS), Ax21 (Activador XA21-de la inmunidad mediada en arroz), quitinas, y β -glucanos de oomicetos (Boller y Felix, 2009), los cuales son reconocidos por los patrones de reconocimiento del sistema inmune de la planta o PRRs (por sus siglas en inglés Pattern recognition receptors), que se encuentran en la superficie celular.

Así mismo, las moléculas PRRs están clasificadas en protein kinasas o RLKs, por sus siglas en inglés (receptor-like kinases) si tienen un dominio Kinasa intracelular, pero si el

dominio está ausente se denominan proteínas tipo receptores (RLPs por sus siglas en inglés) (Zipfel, 2008). Participan en varios procesos como el de recombinación, procesamiento de RNA, unión a la matrix extracelular, señalización, adhesión celular, apoptosis y respuesta inmune (Rothberg, 1990).

Poco se sabe de los protein kinasas reprimidos en plantas. No obstante, en este trabajo se encontraron nueve genes reprimidos que codifican para receptores, entre los cuales se encuentran genes con repeticiones ricas en leucinas. Por ejemplo el gen que codifica para la Protein kinasa rica en repeticiones de leucina (MEE39) aparece reprimido 3 veces menos respecto al control (Z-score de -3.14), y se encuentra en la categoría ontológica de sistema endomembranal según el análisis de BINGO. Este gen está involucrado en procesos de simbiosis en la raíz de *Arabidopsis* al ser inoculado con el hongo micorrizico *Piriformospora indica* (Shahollari *et al.*, 2005), el que genera una promoción de crecimiento en varias plantas (Varma *et al.*, 1995). Cabe señalar que este transcrito tiene una similitud con la secuencia del gen Kinasa asociada a pared (WAK3) en trigo, se trata de receptores que tienen un dominio citoplasmático protein kinasa, y que se encuentran asociados a pectinas (Shahollari *et al.*, 2005), entre los cuales se encuentran algunos polímeros como homogalacturonanos (HA), fragmentos de pectinas (OGs), y ramnogalacturonanos (RG) I y II, (Kohorn *et al.*, 2009), de estos, en nuestro estudio también se encontraron reprimidos y forman parte de los genes en el sistema endomembranal (ver tabla V) (Zipfel y Oldroyd, 2017).

Otras moléculas importantes en la asociación bacteria-plantas son los liposacáridos (LPS), específicamente los LPS de bacterias contribuyen a la interacción y señalización en estos procesos, en plantas ha sido menos estudiada (Newman, 1995), pero en mamíferos se sabe que el receptor glicosil fosfatidil inositol (GPI) se une a un LPS (Wright *et al.*, 1990), y para el estudio de expresión llevado a cabo, se encontró el gen fosfatidilinositol-glicano sintasa inducido 3 veces más respecto al control (Z score = 3), el que está involucrado en el primer paso de la síntesis de glicosil fosfatidil inositol y, está representado en la categoría ontológica según BINGO en la síntesis de procesos moleculares.

Además, se encontró reprimido el gen que codifica para una proteína de transporte lipídico 6 (LTP6) dentro de la categoría del sistema endomembranal, cuya inducción

permite que la planta sea susceptible al ataque de patógenos (Gao *et al.*, 2015), y que pueda indicar que *A. brasilense* fue reconocida por la planta (Fig. 14).

Así mismo, estudios anteriores sugieren que los lipopolisacáridos de bacterias patogénicas como no patogénicas inducen a la generación de ROS, sin embargo en este estudio se encontró el gen peroxidasa (AT2G22420) inducida en la clasificación endomembranal (Anexo B) el cual participa en la síntesis de compuestos fenilpropanoides, al igual que genes que codifican para glicosiltransferasas (AT2G15490, AT3G55710), reprimidas en este trabajo y que se han encontrado expresadas en raíces de *Arabidopsis* bajo condiciones similares a las de éste estudio (Spaepen *et al.*, 2007). De igual forma, se sabe que glicosiltransferasas asociada a QTLs se encuentran relacionada al fenotipo de adhesión bacteriana (Díaz de León *et al.*, 2015).

Con respecto a los genes que intervienen en algunas rutas metabólicas, acotinasasa (ACO 1) presentó una inducción y esta representada en la ontología de moléculas de unión a ARN. Acotinasasa participa en la síntesis de etileno y promueve la elongación y extensión de las células, sin embargo las implicaciones en el metabolismo de la planta son varias, y debido a que los transcritos relacionados a la síntesis y transporte de etileno se encuentran reprimidas, es más evidente que la producción de ACO1 se deba a otra función específica. En este sentido, Mora-Ruíz (2010), encontró expresada a la alta malato deshidrogenasa (MDH) (el cual es un precursor de acotinasasa) en la variedad Ópata, pero sub-regulada en la variedad Norwich, a la cual también se adhiere *A. brasilense* Cd pero en menor cantidad (Fig. 13).

En el estudio de microarreglos se encontraron genes inducidos que, al ser analizados con KEGG arrojaron que están involucrados en la síntesis para metabolitos secundarios (terpeneoides) y glicanos, que bien puede tratarse de moléculas involucradas en el reconocimiento molecular, así como metabolitos que pueden ser usados como nutrientes por *Azospirillum*, entre los genes expresados diferencialmente se encuentran Acotinasasa 1 ACO1, Fosfatidil inositol glicano sintasa (SETH1), la proteína de la superfamilia de nucleótidos-difosfato-azúcar transferasa (DPMS1), la ARN polimerasa A1 (NRPA1), subunidad catalítica de la ADN polimerasa epsilon (TIL2), y ferredoxina-NADP [+] -

oxidoreductasa 1 (FNR1), este último transfiere electrones en el proceso de fotosíntesis, y se expresa en presencia de nitratos y/o bacterias.

Por otro lado, las hormonas son sintetizadas por la propia planta y permanecen latentes en todo el desarrollo, sin embargo esta producción se ve modificada al estar en contacto con las PGPR, ya que estas bacterias producen auxinas, giberelinas y al colonizar la planta modifican la expresión de estas hormonas (Spaepen y Vanderleyden, 2010).

Una de las hormonas importantes en la regulación del crecimiento de la planta es el etileno, y en este estudio se encontró varios genes que están reprimidos para la síntesis indirecta de ésta, tal como el gen Oxoglutarol iron depend dioxigenasa (Aravind y Koonin, 2001). Además se encontraron genes reprimidos que su expresión depende de la presencia del etileno, entre estos se encuentran thionin (AT1G72260) (transport heavy metal y copper ion binding por sus siglas en inglés) y también se encuentra representado en la ontología de sistema endomembranal. Es muy probable que *Azospirillum brasilense* contrarreste o regule la producción de etileno de la planta. Normalmente se asocia el etileno como un inhibidor del crecimiento de la planta y muerte celular (Pierik *et al.*, 2006), no obstante, se ha demostrado que el etileno en bajas concentraciones promueve la asociación de las bacterias promotoras (Glick *et al.*, 2007).

Por otra parte, una de las estrategias de los microbios para invadir/colonizar una planta es su habilidad para la manipulación del sistema inmune (O'Connell y Panstruga, 2006), la planta por su parte reconoce y activa una cascada de señalización, iniciada por los MAMPS (Microbe-associated molecular paternal) que ocurre por las proteínas de reconocimiento (PRRS), las cuales reconocen factores de virulencia y efectores. Entre ellos se encuentran los WAKs por sus siglas en inglés Wall associated kinases. Los WAKs son receptores que se encuentran asociados a pectinas de la pared celular, los dominios extracelulares de Waks reconoce a configuraciones de pectatos, y fragmentos cortos de homogalacturanos (Kohorn *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2008), estos últimos promueven una respuesta de defensa contra microorganismos patógenos, y de señalización microbiana (Zipfel, 2017) aunque también son necesarios para la expansión celular (Anderson *et al.*, 2001).

Para el transcrito kinasa asociada a pared WAK 3 en raíces de trigo sintético se observó en una represión, donde existen diferencias significativas de expresión en raíces de trigo Ópata respecto al trigo sintético en todos los tratamientos, a excepción de *A. brasilense* Cd (Fig. 17). Resulta interesante que, un segundo análisis estadístico de los datos (donde se comparó el efecto de los cuatro tratamientos bacterianos en la expresión de un genotipo de trigo) reveló que la expresión en raíces de trigo Ópata o Sintético, en presencia de cualquiera de las cepas probadas no altera significativamente la transcripción de los genes WAK3 (Anexo F). Resultados que concuerdan con Camilios-Neto (2012), en el que WAK1 no se expresa en raíces colonizadas por la PGPR *A. brasilense* FP2 en trigo, aunque su estudio se enfoca en determinar el proceso de colonización, puede ayudar a elucidar los procesos de interacción benéfica planta-bacteria. Así mismo, Jacobs *et al.*, (2011), detectaron que *Pirimorfozpora indica* un hongo que coloniza raíces, genera beneficios en varios hospederos, y suprime el sistema inmune de la planta.

Por lo tanto, al tratarse de PGPR la planta no activa una señalización de alerta, lo que puede explicar porque en nuestro estudio WAK3 se reprimió en raíz en la mayoría de los tratamientos a excepción de *A. lipoferum* y *A. halopraeferans* en raíces de trigo Ópata sin ser significativo respecto al control.

Es necesario mencionar que existe una diferencia significativa de expresión del trigo sintético comparado con el trigo harinero Ópata (a excepción del tratamiento *A. brasilense* Cd que no mostró diferencias significativas). Estas diferencias podría deberse a, que los antecesores del trigo sintético WSD//P66.270/*Ae. squarrosa*, presentan un fenotipo de resistencia a infecciones por hongos, *Karnal bunt* (Gul, 2015), *M. graminícola* (Martinek, 2013). Mientras que Ópata es susceptible a infecciones por *Septoria tritici* (Mujeeb-Kazi *et al.*, 2000), mosca del trigo (*Mayetiola destructor*), *Schizaphis graminum* (Tan *et al.*, 2017) y roya (Dreisigacker *et al.*, 2012). En referencia a lo anterior, se han encontrado locis de resistencia a enfermedades (R) en variedades silvestres. Este sistema de resistencia especializado esta mediada por proteínas de resistencia R, y se activa cuando el patógeno elude las primeras barreras de la inmunidad innata de la planta, que desencadenan una cascada de señalización rápida (Flor *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2003; MacDowell y Dangl, 2000). El mecanismo es efectivo ya que el reconocimiento se da por los genes patógeno-

hospedero, cabe señalar que este proceso ha sido adquirido por un proceso evolutivo (Doods *et al.*, 2006), lo cual explicaría la rápida respuesta del trigo sintético en comparación con el trigo Ópata.

Por otro lado, se ha detectado la molécula wheat germ aglutinin (WGA), la cual es una molécula señalizadora cuando *A. brasilense* se asocia a raíz de trigo (Antonyuk *et al.*, 1993), ya que permite que estas PGPR biosinteticen ácido indolacético, excreción de amonio y fijación de nitrógeno, esta última característica también se ha detectado en *A. lipoferum* (Karpati *et al.*, 1999), para futuros ensayos sería interesante realizar estudios de expresión del gen que codifica para esta proteína así como el gen WAK3 en conjunto con los tratamientos bacterianos.

Así mismo, el gen que codifica para la proteína fosfatidil inositol N-acetil glucosaminiltransferasa C, la cual participa en la vía de biosíntesis de anclaje de glicosilfosfatidilinositol fue analizado en tiempo real. Los anclajes glicosilfosfatidil inositol, GPI por sus siglas en inglés, son dominios transmembranales que sirven de anclaje para proteínas en la superficie celular. Entre las proteínas de anclaje GPI (GPA's) se encuentran enzimas, receptores, moléculas de adhesión. (Ikezawa, 2002) y ayudan a señalar varios procesos (Sharom *et al.*, 2004). En el caso de infecciones, en parásitos los GPIs son necesarios para invadir en las células huéspedes (Webb *et al.*, 1997). Algunas bacterias secretan Fosfatidil inositol (PI) específico para degradar los GPI en mamíferos (Ikezawa, 1991), aunque la mayoría de los estudios se relacionan en microorganismos patógenos (Daugherty y Low, 1993; Goldfine *et al.*, 2007; Mortara *et al.*, 2001), poco se sabe del comportamiento de los GPIs en plantas y asociaciones microbianas.

Fosfatidil inositol-glican sintasa SETH1 (AT2G34980) es uno de los genes inducidos en el estudio de microarreglos, el cual es similar a la secuencia de fosfatidil inositol N-acetil glucosamiltransferasa C en raíz de trigo. Sin embargo, en el análisis de qPCR en raíces de Ópata en todos los tratamientos se obtuvo una expresión menor a comparación de la expresión en raíces de trigo sintético, aunque no se detectaron diferencias significativas de expresión entre los tratamientos y/o genotipos (Fig. 18), Así mismo, en el segundo estadístico de los datos aplicados (Anexo G), donde se analizó la expresión de cada uno de los genotipos, no se encontraron diferencias significativas de

expresión en referencia a los tratamientos. En este sentido, la asociación entre hongos y plantas provoca una supresión del sistema inmune, como se menciona anteriormente, Jacobs *et al.* (2016) detectaron que el gen fosfatidil inositol N-acetil glucosamiltransferasa subunidad P es reprimido a los 7 días, lo cual podría explicar que a las 12 horas este transcrito no mostrara diferencias significativas.

En relación a lo anterior, existe evidencia que COB-like proteins, candidatos para ser anclajes tipo GPI, afectan el crecimiento de la pared celular y deposición de callosa en las raíces (Roudier *et al.*, 2002), de manera similar mutaciones de SETH1 en *Arabidopsis*, provocan poco crecimiento en los tubos polínicos (Lalanne *et al.*, 2001), y este gen puede estar relacionado con la señalización para el crecimiento de las raíces, al igual que los genes que codifican para poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa, involucrado en el crecimiento de la planta (ambos genes tienen una tendencia a reprimirse en este estudio) y que probablemente indique que se está llevando una reestructuración en la pared, acompañado de una permeabilidad de la misma, que permitirá una comunicación celular.

Por otro lado, el diseño de primers para la secuencia de poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa fue obtenida a partir del estudio de Díaz de León *et al.* (2015), donde la secuencia comparte un 82% de similitud con el QTL en arroz, y coincide con glicosyl transferase 8 domain containing protein, putative expressed (QTL asociado a adhesión bacteriana). Al comparar la secuencia perteneciente al marcador en trigo (Marker496), la base de datos de ENSEMBL hace referencia a un gen que codifica para una hexosa, cuya función molecular (GO) es la de poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa, similar a GAUT 1 en *Arabidopsis*, la cual pertenece a la familia de las glicosil transferasa 8. El gen que codifica para poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa participa en la síntesis de homogalacturonano (HG), una de las pectinas más abundantes en la pared de la planta, éstas son proteínas membranales de tipo II, con dominios N terminal transmembrana (Sterling *et al.*, 2006). Evidencias indican que GAUT4 además de participar en la síntesis de Homogalacturonos es clave para el crecimiento de la planta (Kong *et al.*, 2009).

Los análisis de tiempo real para este gen, muestran que no existen diferencias significativas entre ambos genotipos, en todos los tratamientos y genotipos se observa una

represión. (Fig. 19). Así mismo, el segundo análisis revela que, ningún tratamiento modifica la expresión en raíces Ópata. En cambio, en raíces de trigo sintético todas cepas muestran una represión significativa del gen respecto al tratamiento con la cepa *A. brasilense* Cd (donde ésta última parece no cambiar su expresión) (Anexo I). De manera que, la represión en las raíces en la mayoría de los tratamientos a excepción de la cepa *A. brasilense* Cd en sintético, puede indicar que existe una mayor apertura y/o flexibilidad de la pared, o al menos la respuesta es más rápida, y que permita un intercambio molecular, de nutrientes, y de hormonas como IAA, que son sintetizados por *Azospirillum* (Dobbelaere *et al.*, 1999; Zimmer y Bohte, 1988) y posibilite un crecimiento de las raíces. En relación a lo anterior, se ha observado que cuando la planta adquiere resistencia a ciertos patógenos, se genera más polisacáridos en la pared limitando la entrada y adherencia de estos patógenos (Arie *et al.*, 2007; Wydra *et al.*, 2005). En el caso de de las infecciones, ocurre una desesterificación de la pectina que, promueve un cambio en el pH de la pared celular y genera un aumento en la porosidad, lo que va a facilitar una infección (Marcus *et al.*, 2001; Wojtasik *et al.*, 2016).

De igual manera, en este estudio es probable que también exista un cambio estructural de la pared de la raíz, pero de forma controlada, ya que la expresión de 4-alfa-galacturonosiltransferasa en ambos genotipos se reprimió, lo que va a permitir una flexibilidad en las paredes para que ocurra un intercambio molecular.

Por otra parte, existe evidencia que GAUT en raíces de *Arabidopsis* esta involucrado en la síntesis de xilano (Lee *et al.*, 2007), componente principal en el arreglo de la pared celular (Carpita y Gibeaut, 1993).

Respecto al transcrito xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa, que en el estudio de microarreglos en raíces Ópata en presencia de *A. brasilense* Cd se reprimió (-2.34 z score), en el análisis de PCR tiempo real no fue así. Tanto el tratamientos con las bacterias *A. brasilense* Cd y *A. brasilense* SP245 en raíces Ópata se encuentra inducidos (Fig. 22). Probablemente estas diferencias de expresión estén dadas a la naturaleza de *Arabidopsis* y trigo, ya que la primera cuenta con un genoma de 15 MG (Kaul *et al.*, 2000), mientras que el tamaño del genoma del trigo es de 17 GB (Brenchley *et al.*, 2012).

En referencia a la expresión de XHT en raíz, Spaepen *et al.* (2014) menciona que a los 7 días de contacto con *Azospirillum brasilense* SP245 en raíces de *Arabidopsis* se inducen genes que codifican para expansinas y xiloglucanos transferasas, que coincide con una modificación estructural de la pared y la diferenciación de las raíces en *Arabidopsis*, lo que confirma que *A. brasilense* permite la elongación de raíces. De la misma manera, experimentos realizados con micorrizas arbusculares en *Medicago truncatula* mostraron una inducción de este gen (Maldonado *et al.*, 2012).

Así mismo, al comparar la expresión de este gen entre las dos variedades de trigo, se observa diferencias significativas únicamente con la inoculación con *A. brasilense* SP245 (Fig. 20). Notese que en el análisis alternativo (Anexo H) en el trigo sintético ningún de las cepas probadas modifica la expresión diferencialmente, sin embargo, en trigo harinero Ópata existen diferencias significativas entre el tratamiento con *A. brasilense* Cd-*A. lipoferum* y *A. brasilense* SP245-*A. lipoferum*, estas diferencias pueden deberse a que el inóculo de las cepas *A. brasilense* en las raíces se realizó en una orden de magnitud mayor a comparación de *A. halopraeferans* y *A. lipoferum* (sección 7.1). Interesantemente, estas diferencias solamente se reflejan en Ópata, lo que indica nuevamente que existe una afinidad molecular de las bacterias a la raíz de trigo.

La xiloglucano endotransglucosilasa-hidrolasa (XHT) esta asociada a la membrana plasmática e indirectamente puede estar relacionada con señalización en el proceso de crecimiento (Vissenberg *et al.*, 2000). XHT se compone de dos enzimas: xiloglucanos endohidrolasa (XEH), la que rompe los enlaces β -(1,4) glicosídicos en el xilano, mientras que la xiloglucano endotransglucosilasa (XET) une las cadenas (Fry, 1992; Ohtani *et al.*, 2011), sin embargo aún se desconoce cuáles son los roles específicos en la fisiología en la planta (Ohtani *et al.*, 2011). Lo que se conoce, es que cuando existe una mayor cantidad de XHT que de xiloglucano, el resto de XHT rompe las cadenas de xiloglucano de las paredes y produce un ablandamiento de éstas (Darley *et al.*, 2001), en este estudio existe una inducción de XHT en las raíces de Ópata y sintético en los tratamiento con *A. brasilense*, (a excepción de *A. brasilense* 245 en sintético) (Fig. 19).

Además, se ha reportado que en infecciones con el hongo *Penicillium expansum* en tomate provoca una disminución de los transcritos de XTH conforme aumenta el tiempo de

infección entre las 24 - 48 horas, lo que ocasiona también cambios en la estructura celular y facilita la infección del hongo en los tejidos (Miedes y Lorences, 2007). En este caso la expresión de XHT puede ser un indicador entre infección y asociación bacteriana en plantas, es decir al reprimirse el gen es probable que sea una bacteria patógena, y que al inducir el gen se trate de una asociación benéfica. Sin embargo, para poder confirmar esta hipótesis es necesario realizar experimentales donde se tome raíces inoculada en diferentes tiempos. A pesar que los tratamientos *A. h.* y *A. l.* reprimen la expresión sin ser significativo, probablemente indique que no se esté dando un intercambio molecular al menos no en las primeras 12 horas. Aunque, no se puede omitir que pudiese tratarse de una asociación donde exista menor afinidad hacia los exudados de las raíces como es el caso del tratamiento *A. brasilense* SP245, en donde se observa en los genotipos Ópata y sintético una inducción y represión de XHT5 respectivamente. Esto puede deberse a que *A. brasilense* SP245 fue aislado de trigo, y las diferencias en cuanto a señalización entre genotipos serían más notorios o específicas. De la misma manera, existe evidencia que *A. brasilense* permite una despolarización de la membrana de raíces y con ello probablemente más entrada de nutrientes, los resultados fueron comparados con otras bacterias no patogénicas que no provocaron efecto alguno (Bashan, 1991). También, es muy probable que en los tratamientos donde exista una inducción de XHT exista un reacomodo de la pared celular, tal como lo sugiere Shinya *et al.* (2015) en procesos de interacción de hongos y plantas.

Con respecto a lo anterior, Mora-Ruiz (2010) encontró la proteína UDP-Glucoronato descarboxilasa expresada a la alta en raíces de trigo cuando se les inóculo *Azospirillum brasilense* Cd, esta enzima cataliza la síntesis de UDP - xilosa mediante UDP - D - Xyl sintasa (UXS), las que se encuentran involucrados en la ruta metabólica para la síntesis de xilosa, componente de la pared celular y que sugiere un mayor crecimiento radicular (Fig. 13), en esta misma ruta metabólica intervienen los genes que codifican el gen poligalacturonato-4- α galacturonosiltransferasa y XHT5 que permiten un mayor ablandamiento de la pared de la raíz para intercambiar nutrientes, y que posibilite la adhesión y comunicación planta-bacteria.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La hipótesis planteada al inicio de esta investigación se cumplió parcialmente, ya que se esperaba que se expresaran genes que intervienen en las rutas metabólicas de proteínas que previamente se habían encontrado expresadas diferencialmente ante la presencia de *A. brasilense*, siendo así en algunos casos pero no en otros.

No se encontró adhesión polimórfica de *Azospirillum* spp. al trigo sintético WSHD67.2 y trigo harinero Ópata. Sin embargo, en otros genotipos de trigo probados en este trabajo como 3831, 3633, 4116, 5357, 3477, M6 si se observó una respuesta polimórfica a diferentes cepas de *Azospirillum*, lo cual apoya la hipótesis de que la adhesión de *Azospirillum* es genotipo dependiente.

De acuerdo con los resultados de expresión relativa de los 4 genes probados en este estudio, se observó que dos de ellos (kinasa asociada a pared WAK3 y fosfatidil inositol N-acetil glucosaminiltransferasa relacionados con el sistema inmune de la planta) tienden a ser reprimidos, lo que pudiera inferir que favorece la adhesión de *Azospirillum* a raíz de trigo.

En el caso de la expresión del gen que codifica para poligalacturonato 4- α -galacturonosiltransferasa fue reprimido, este gen está involucrado en la producción de pectinas, lo cual posibilita una mayor dureza en la pared, y en este caso su represión ayudaría a *Azospirillum* a adherirse a la raíz de trigo.

Mientras que el gen xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa puede favorecer la adhesión de *Azospirillum* a la raíz, ya que se encuentra involucrado en la flexibilidad de la pared de la planta, lo que concuerda tanto con la sobreexpresión de la proteína glucoronato descarboxilasa encontrada previamente y con la literatura alusiva a interacciones benéficas entre bacterias-plantas.

Para profundizar en el fenómeno de adhesión, se propone realizar microarreglos con genes involucrados en las rutas del sistema inmune y así caracterizar las vías que señalan una interacción benéfica entre el trigo y *Azospirillum*.

Identificar que marcadores moleculares, e.g. microsatélites o snp, se asocian a los genes que codifican para WAK3, fosfatidil inositol N-glucosaminil transferasa, poli 4- α -galacturonosiltransferasa y XHT5 y así utilizarlos dentro de un programa de selección y mejoramiento de trigo harinero asociado al uso de inoculantes asistido por marcadores moleculares.

Por otro lado, sería interesante conocer si la expresión de los genes en este estudio se mantiene en el transcurso del tiempo hasta la etapa de colonización, lo anterior con fines comparativos ya que, la mayoría de la información publicada se realiza en relación a esta última etapa.

11. LITERATURA CITADA

- Alabid, I., K. H. Kogel. 2016. Defence reactions in roots elicited by endofungal bacteria of the sebacinalean symbiosis. En *Belowground defence strategies in plants*. Editorial Springer International Publishing. Suiza. pp 329-339.
- Anderson, C. M., T. A. Wagner, M. Perret, Z. H. He, y B. D. Kohorn. 2001. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol. Biol.* 4: 197-206.
- Andersen C. L., J. Ledet-Jensen, T. Ørntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Res.* 64: 5245-5250.
- Aravind, L., y E. V. Koonin. 2001. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate-and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* 2:0007-1.
- Arie, T., H. Takahashi, M. Kodama, T. Teraoka. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant biotechnol. J.* 24: 135-147.
- Antonyuk, L. P., O. R. Fomina, M. A. Galkin, V. V. Ignatov. 1993. The effect of wheat germ agglutinin on dinitrogen fixation, glutamine synthetase activity and ammonia excretion in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Fems Microbiol. Lett.* 110: 285-289.
- Barbieri, P., E. Galli. 1993 Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144: 69-75.
- Bashan, Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Can. J. Microbiol.* 36:419-425.
- Bashan, Y., L. E. de-Bashan. 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2637-2643.
- Bashan, Y., J. J. Bustillos, L. A. Leyva., J. P. Hernandez, M. Bacilio. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol. Fertil. Soils.* 42: 279-285.
- Bashan, Y. 1991. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 958-963.

- Bachhawat, A. K., S. Ghosh. 1987. Iron transport in *Azospirillum brasilense* - role of the siderophore spirilobactin. *J. Gen Microbiol.* 133: 1759-176.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 234-266.
- Belas, M. R., R. R. Colwell. 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *J. Bacteriol.* 151:1568-1580.
- Beneduzi, A., A. Ambrosini, L. M. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1044-1051.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., K. K. Sharma. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep.* 27: 411-424.
- Bhattacharyya, P. N., D. K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Blanco-Ulate, B., A. Morales-Cruz, K. C. Amrine, J. M. Labavitch, A. L. Powell, D. Cantu. 2014. Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Front. Plant. Sci.* 5.
- Boddey, R. M., J. Dobereiner. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant soil.* 108: 53-65.
- Boller, T., G. Felix. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 379-406.
- Brenchley, R., M. Spannagl, M. Pfeifer, G. L. Barker, R. D'Amore, A. M. Allen, S. Kay. 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole genome shotgun sequencing. *Nature.* 491: 705.
- Burd G. I., D. G. Dixon, B. R. Glick. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3663-3668.
- Carpita, N. C., D. M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Chaboud, A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil.* 73:395-402.

Çakmakçı, R., M. Erat, Ü. Erdoğan, M. F. Dönmez. 2007. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. J.P.N.S.S. 170: 288-295.

Camilios-Neto, D., P. Bonato, R. Wassem, M. Z. Tadra-Sfeir, L. C. Brusamarello-Santos, G. Valdameri, F. O. Pedrosa. 2014. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. BMC genomics. 15: 378.

Daugherty, S., M. G. Low. 1993. Cloning, expression, and mutagenesis of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Staphylococcus aureus*: a potential staphylococcal virulence factor. Infect. Immun. 61: 5078-5089.

Darley, C.P.; A. M. Forrester, S. J. McQueen-Mason. 2001. The molecular basis of plant cell wall expansion. Plant Mol. Biol. 47: 179-195.

Myers, M., D. H. Hubbel. 1987. Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2745-2748.

Davison, J. 1988. Plant beneficial bacteria. Nature Biotech. 6:282-286.

Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, D. Thys, Y. Ptacek, J. Okon, J. Vanderleyden. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol. Fertil. Soils. 36: 284-297.

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

Döbereiner, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. Plant Soil 110: 207-212.

Döbereiner, J., V. L. Baldani, V. M. Reis. 1995. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In *Azospirillum* VI and related microorganisms Editorial Springer. Berlin Heidelberg. 580 pp.

Delteil, A., E. Gobbato, B. Cayrol, J. Estevan, C. Michel-Romiti, A. Dievart, J. B. Morel. 2016. Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus. BMC Plant Biol. 16: 17.

Díaz De León, J. L., T. Castellanos, J. Ling, A. Rojas-Hernández, M. S. Röder. 2015. Quantitative trait loci underlying the adhesion of *Azospirillum brasilense* cells to wheat roots. Euphytica. 204:81-90.

Dodds, P. N., G. J. Lawrence, A. M. Catanzariti, T. Teh, C. I. Wang, M. A. Ayliffe, J. G. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:8888-8893.

Duan, Q., M. Zhou, L. Zhu, G. Zhu. 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 53: 1-8.

Eckert, B., O. B. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffels, A. Hartmann. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 17-26.

Echegaray-Alemán, A. 1995. El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. En: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez M. (eds.). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México. pp. 7-35.

Fahad, S., S. Hussain, A. Matloob, F. A. Khan, A. Khaliq, S. Saud, A. Faiq. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regul.* 75: 391-404.

Fan, B., L. C. Carvalhais, A. Becker, D. Fedoseyenko, N. Von Wirén, R. Borriss. 2012. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol.* 12-116.

Ferreira, M. C. B., M. S. Fernandes, J. Döbereiner. 1987. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biol. Fertil Soils.* 4:47-53.

Fisher, R. F., S. R. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* 357: 655-660.

Fry, S.; R. Smith; K. Renwick, D. Martin. S. Hodge, K. Matthews. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282:821-828.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.

García de Salamone, I. E., J. M. Funes, L. P. Di Salvo, J. S. Escobar-Ortega, F. D'Auria, L. Ferrando, A. Fernandez-Scavino. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl. Soil. Ecol.* 61: 196-204.

- Gao, S., W. Guo, W. Feng, L. Liu, X. Song, J. Chen, J. Hu. 2015. LTP3 contributes to disease susceptibility in *Arabidopsis* by enhancing abscisic acid (ABA) biosynthesis. *Mol. Plant Pathol.* 17: 412-426.
- Garrity, G. M., D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, F. A. Rainey. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two. The Proteobacteria. Part C.* Editorial Springer U.S. New York, U.S.A. 574 p.
- Gaskins, M. H., D. H. Hubbel .1981. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 27:426-431.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Glick, B. R., Z. Cheng, J. Czarny, J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329-39.
- Gray, E. J. D. L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412.
- Goldfine, H., H. Marquis. 2000. Escape of *Listeria monocytogenes* from a Vacuole. En *Listeria monocytogenes: pathogenesis and host response.* Editorial Springer. USA. pp. 287.
- Guillaumie, S., D. Goffner, O. Barbier, J. P. Martinant, M. Pichon, Y. Barrière. 2008. Expression of cell wall related genes in basal and ear internodes of silking brown-midrib-3, caffeic acid O-methyltransferase (COMT) down-regulated, and normal maize plants. *BMC Plant Biol.* 8: 71.
- Gul, A., A. Rasheed, F. Afzal, A. A. Napar, A. Ali, M. Jamil, .A. Mujeeb-Kazi. 2015. Characterization of synthetic hexaploids derived from same *Aegilops tauschii* accessions and different *durum* cultivars. *Cytologia*, 80: 427-440.
- Holt, B. F., D. A. Hubert, J. L. Dangl. 2003. Resistance gene signaling in plants—complex similarities to animal innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 20-25.
- Hossain, M. J., C. Ran, K. Liu, C. M. Ryu, C. R. Rasmussen-Ivey, M. A. Williams, J. W. Kloepper. 2015. Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Front. Plant. Sci.*, 6.
- Hartl, F. U., M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295: 1852-1858.

Hayashi, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. Annual Review of Plant Physiology Plant Mol. Biol. 40:139-168.

Hallman, J. 2001. Plant Interaction with endophytic bacteria. En: Rueda Puente, E. O., Barron-Hoyos J. M. y J. Hallman (eds.). Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal. Editorial Plaza y Valdez. p.146.

Islam, F., T. Yasmeen, Q. Ali, S. Ali, M. S. Arif, S. Hussain, H. Rizvi. 2014. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. Ecotoxicol. Environ. Saf. 104: 285-293.

INEGI. 2015. VIII Censo agrícola, ganadero y forestal. Estados Unidos Mexicanos. Censo Agropecuario. 2015. Aguascalientes, Ags. México. 193 p.
http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015_08_8.pdf

Ikezawa, H. 1991. Bacterial PIPLCs-unique properties and usefulness in studies on GPI anchors. Cell. Biol. Int. Rep. 15: 1115-1131.

Ikezawa, H. 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Biol. Pharm. Bull. 25: 409-417.

Jain, A., S. Singh, B. K. Sarma, H. B. Singh. 2011. Microbial consortium-mediated reprogramming of defense network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. J. Appl. Microbiol. 112:537-550.

Josenhans, C., S. Suerbaum. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. Int. J. Med. Microbiol. 29: 605-614.

Jacobs, S., B. Zechmann, A. Molitor, M. Trujillo, E. Petutschnig, V. Lipka, P. Schäfer. 2011. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. Plant Physiol. 156: 726-740.

Kato, Y., K. Matsuda. 1985. Xyloglucan in the cell walls of suspension-cultured rice cells. Plant cell physiol. 26: 437-445.

Karpati, E., P. Kiss, T. Ponyi, I. Fendrik, M. de Zamaroczy, L. Orosz. 1999. Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation. J. Bacteriol. 181:3949-3955.

Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon, J. Kigel, Y. Henis. 1981. Yield increases in summer cereal crops of Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. Exp. Agric. 17:179-187.

- Kaul, S., H. L. Koo, J. Jenkins, M. Rizzo, T. Rooney, L. J. Tallon, C. D. Town. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796-815.
- Kohorn, B. D., S. L. Kohorn. 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front. Plant. Sci.* 3.
- Kohorn, B. D., S. Johansen, A. Shishido, T. Todorova, R. Martínez, E. Defeo, P. Obregon. 2009. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *Plant J.* 60: 974-982.
- Kurek, I., Y. Kawagoe, D. Jacob-Wilk, M. Doblin, D. Delmer. 2002. Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains. En: *Cellulose synthesis in higher plants*. Editorial Proc. Natl. Acad. Sci. . USA: pp. 11109-11114.
- Knee, E. M., F. C. Gong, M. Gao, M. Teplitski, A. R. Jones, A. Foxworthy, W. D. Bauer. 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 775-784.
- Kohorn, B. D., M. Kobayashi, S. Johansen, H. P. Friedman, A. Fischer, N. Byers. 2006. Wall-associated kinase 1 (WAK1) is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis. *J. Cell. Sci.* 119: 2282-2290.
- Kong, Y., G. Zhou, U. Avci, X. Gu, C. Jones, Y. Yin, M. G. Hahn. 2009. Two poplar glycosyltransferase genes, PdGATL1. 1 and PdGATL1. 2, are functional orthologs to PARVUS/AtGATL1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 2:1040-1050.
- Latgé, J. P. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol.* 12: 863-872.
- Lalanne, E., D. Honys, A. Johnson, G. H. Borner, K. S. Lilley, P. Dupree, D. Twell. 2004. SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16: 229-240.
- Lasserre, F., M. Razack, O. Banton. 1999. A GIS-linked model for the assessment of nitrate contamination in ground water. *J. Hydrol.* 224: 81-90.
- Laatu, M., G. Condemine. 2003. Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 185: 1642-1649.
- Leach, J. E., Sherwood, J., R. W. Fulton, L. Sequeira. 1983. Comparison of soluble proteins associated with disease resistance induced by bacterial lipopolysaccharide and by viral necrosis. *Physiological Plant Pathology.* 23: 377-385.

- Lee, C., R. Zhong, E. A. Richardson, D.S. Himmelsbach, B. T. McPhail, Z. H. Ye. 2007. The PARVUS gene is expressed in cells undergoing secondary wall thickening and is essential for glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 48: 1659-1672.
- Lerner, A. S. Castro-Sowinski, A. Valverde, H. Lerner, R. Dror, Y. Okon, S. Burdman. 2009. The *Azospirillum brasilense* Sp7 noeJ and noeL genes are involved in extracellular polysaccharidebiosynthesis. *Microbiology.* 155:4058-4068.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25: 402-408.
- Lu, J., Z. Dong, W. Li, G. Hu. 2014. The effect of desertification on carbon and nitrogen status in the northeastern margin of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Environ. Earth Sci.* 71: 807-815.
- Manson, M. D., J. P. Armitage, J. A. Hoch, R. M. Macnab. 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* 180: 1009-1022.
- McDowell, J. M., J. L. Dangl. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 79-82.
- Maldonado-Mendoza, I. E., G. R. Dewbre, L. Blaylock, M. J. Harrison. 2005. Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, Mt-XTH1, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene.* 345: 191-197.
- Malinovsky, F. G., J. U. Fangel, W. G. Willats. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 5.
- Martinek, P., I. Svobodová, I. L. Věchet. 2013. Selection of the wheat genotypes and related species with resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Agriculture.* 59: 65-73.
- Matsuoka, Y. 2011. Evolution of polyploid triticum wheats under cultivation: The role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant Cell Physiol.* 52: 750-764.
- Miedes, E., E. P. Lorences. 2007. The implication of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTHs) in tomato fruit infection by *Penicillium expansum*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9021-9026.
- Michiels, K. W., C. L Croes, J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Microbiol.*
- Michiel, M. K. 1989. *Azospirillum*. plant root associations: A review. *Biol. Fertil. Soils.* 8: 356-368.

Moens, S., K. Michiels, V. Keijers, F. R. E. D. Van Leuven, J. Vanderleyden. 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* 177: 5419-5426.

Mohammadi, M., N. N. Kav, M. K. Deyholos. 2008. Transcript expression profile of water-limited roots of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* 'Ópata'). *Genome.* 51: 357-367.

Mora Ruiz, M. R. 2010. Expresión diferencial de proteínas radicales de trigo (*Triticum aestivum* L) a la adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd. Tesis (Maestría en Ciencias en el Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). CIBNOR. La Paz, B. C. S. México. 128 p.

Mortara, R. A., L. Minelli, F. Vandekerckhove, V. Nussenzweig, F. J. Ramalho-Pinto. 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 27-37.

Moss, B. 2008. Water pollution by agriculture. *Philosophical transactions of the royal society of London B: Biological Sciences*, 363: 659-666.

Mutch, L. A., J. P. W. J. P. Young. 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* on wild and cultivated legumes. *Mol. Ecol.* 13: 2435-2444.

Mujeeb-Kazi, A., L. I. Gilchrist, R. L. Villareal, R. Delgado. 2000. Registration of 10 wheat germplasm resistant to *Septoria tritici leaf blotch*. *Crop science*, 40: 590-590.
Nadeem, S. M., M. Ahmad, Z. A. Zahir, A. Javaid, M. Ashraf. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 2: 429-448.

Nemoz G., J. Robert-Baudouy, F. Stoeber. 1976. Physiological and genetic regulation of the aldohexuronate transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 127: 706-718.

Nikitina, V. E., E. G. Ponomareva, S. A. Alen'Kina, S. A. Konnova. 2000. The role of cell surface bacterial lectins in the aggregation of *Azospirilla*. *Mikrobiologiya.* 70: 471-476.

O'Connell, R. J., R. Panstruga. 2006. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 171: 699-718.

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

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Dirección de Información de la FAO.

- Oxley, D., A. Bacic. 1999. Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14246-14251.
- Ohtani, M., N. Nishikubo, B. Xu, M. Yamaguchi, N. Mitsuda, N. Goué, T. Demura. 2011. A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* 67: 499-512.
- Osorio, S., C. Castillejo, M. A. Quesada, N. Medina-Escobar, G. J. Brownsey, R. Suau, V. Valpuesta. 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J.* 54: 43-55.
- Patten, C. L., B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Paolacci, A. R., O. A. Tanzarella, E. Porceddu, M. Ciaffi. 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol. Biol.* 10: 1.
- Peleg, Z., T. Fahima, A. B. Korol, S. Abbo, Y. Saranga. 2011. Genetic analysis of wheat domestication and evolution under domestication. *J. Exp. Bot.* 62: 5051-5061.
- Pereg-Gerk, L., A. Paquelin, P. Gounon, I. R. Kennedy, C. Elmerich. 1998. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonisation by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:177-187.
- Perkins, J. R., J. M Dawes, S. B. McMahon, D. L. Bennett, C. Orengo, M. Kohl. 2012. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genom.* 13: 296.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-e45.
- Pierik, R, D. Tholen, H. Poorter, E. J. Visser, L. A. Voeselek. 2006 The Janus factor of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11:176-183.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Grønlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425: 585-592.

- Ramos-González, M. I., M. J. Campos, J. L. Ramos. 2005. Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: In vivo expression technology capture and identification of root activated promoters. *J. Bacteriol.* 187: 4033-4041.
- Robledo M., J. I. Jiménez-Zurdo, E. Velázquez, M. E. Trujillo, J. L. Zurdo-Piñeiro, M. H. Ramírez-Bahena, P. F. Mateos. 2008. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 7064-7069.
- Rodriguez-Sala, V. M., E. J. B. Nogueira-Cardosode Freitas, J. G. Parada-Días da Silveira. 2007. Wheat genotypes response to inoculation of diazotrophic bacteria in field conditions. *Pesq. Agropec. Bras.* 42:833-842.
- Rodriguez-Cáceres, E. A., Di Ciocco, C., y Pacheco-Basurco, J. 1996. Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. *Cienc. Suelo.* 14: 110-112.
- Rojas, A., T. Castellanos, J. Díaz De León. 2013. Genetic variation in wheat for *Azospirillum brasilense* to adhere to the seedling root. *Cereal Res. Commu.* 41: 275-283.
- Rothberg, J. M., J. R. Jacobs, C. S. Goodman, S. Artavanis-Tsakonas. 1990. Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* 4: 2169-2187.
- Saravanakumar, D., C. Vijayakumar, N. Kumar, R. Samiyappan. 2007. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Prot.* 26:556-565.
- Schwedock, J. S., S. R. Long. 1992. *Rhizobium Meliloti* Genes. Involved in sulfate activation: the two copies of Nodpq and a new locus, Saa. *Genetics.* 132:899-909.
- Siuti, P., C. Green, A. N. Edwards, M. J. Doktycz, G. Alexandre. 2011. The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 323: 105-112.
- Shahollari, B., A. Varma, R. Oelmüller. 2005. Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *J. Plant Physiol.* 162: 945-958.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58:221-227.
- Sharom, F. J., G. Radeva. 2004. GPI-anchored protein cleavage in the regulation of transmembrane signals. En *Membrane Dynamics and Domains*. Editorial Springer. USA. pp 285-315.

- Shinya, T., T. Nakagawa, H. Kaku, N. Shibuya. 2015. Chitin-mediated plant–fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26: 64-71.
- Saubidet, M. I., A. J. Barneix. 1998. Growth stimulation and nitrogen supply to wheat plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *J. Plant Nutr.* 21:2565-2577.
- Smith, R. L., S. C. Schank, J. R. Milam, A. A. Baltensperger. 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1331-1336.
- Spaepen, S., S. Bossuyt, K. Engelen, K. Marchal, J. Vanderleyden. 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., S. Dobbelaere, A. Croonenborghs, J. Vanderleyden. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil.* 312: 15-23.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3: a001438.
- Sterling, J. D., M. A. Atmodjo, S. E. Inwood, V. K. Kolli, H. F. Quigley, M. G. Hahn, D. Mohnen. 2006. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 5236-5241.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg, J. Dobereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.
- Thakore, Y. 2006. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol.* 2: 194-208.
- Töller, A., L. Brownfield, C. Neu, D. Twell, P. Schulze-Lefert. 2008. Dual function of *Arabidopsis* glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *PLANT J*, 54: 911-923.
- Upadhyay, S. K., J. S. Singh, A. K Saxena, D. P. Singh. 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology.* 14: 605-611.
- Van, V. T., S. Ngôkê, O. Berge, P. Hebbar, T. Heulin, D. Faure, R. Bally. 1997. Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. *C. J. Microbiol.* 43:486-490.

- Vande Broek, A., J. Vanderleyden. 1995. Review: Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 445-466.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3: research0034-1.
- Varma, A., S. Verma, N. Sahay, B. Bütehorn, P. Franken. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2741-2744.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Vissenberg, K., I. M. Martinez-Vilchez, J. P. Verbelen, J. G. Miller, S. C. Fry. 2000. In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 12: 1229-1237.
- Vivekananthan, R., M. Ravi, A. Ramanathan, R. Samiyappan. 2004. Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defence against the anthracnose pathogen in mango. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 235-244.
- Wang, D., S. Yang, F. Tang, H. Zhu. 2012. Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 14: 334-342.
- Willats, W. G., C. Orfila, G. Limberg, H. C. Buchholt, G. J. W. Van Alebeek, A. G. Voragen, J. P. Knox. 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276: 19404-19413.
- Webb, H., N. Carnall, L. Vanhamme, S. Rolin, J. Van Den Abbeele, S. Welburn, M. Carrington. 1997. The GPI-phospholipase C of *Trypanosoma brucei* is nonessential but influences parasitemia in mice. *J. Cell Biol.* 139:103-114.
- Wydra, K., R. Diogo, E. Dannon, J. Semrau. 2005. Soil amendment with silicon and bacterial antagonists induce resistance against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Tropentag.*
- Williams, P. C. 1993. The world of wheat. In: Grains and oilseeds: handling marketing processing. Editorial Canadian International Grains Institute. Winnipeg, Canada. 557-602 pp.
- Wolf, S., G. Mouille, J. Pelloux. 2009. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant.* 2: 851-8.

Wojtasik, W., A. Kulma, L. Dymińska, J. Hanuza, M. Czemplik, J. Szopa. 2016. Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *BMC Plant Biol.* 16: 75.

Zhang H., M. S. Kim, V. Krishnamachari. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta.* 226: 839-851-1083.

Zimmer, W., H. Bothe. 1988. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil.* 110: 239-247.

Zipfel, C., G. E. Oldroyd. 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature.* 543: 328-336.

12. ANEXOS

Anexo A-. Clasificación de genes inducidos con sus respectivos p-valor en el análisis Bingo.

Clasificación GO	Valor P	Número de genes	Descripción
6414	3.91E-12	1	Translational elongation
6412	4.19E-05	25	Translation
9059	8.96E-05	41	Macromolecule biosynthetic process
34645	1.05E-04	41	Cellular macromolecule biosynthetic process
3723	3.73E-02	30	RNA binding
10467	4.86E-02	55	Gene expression

Anexo B-. Clasificación de genes reprimidos con sus respectivos p-valor en el análisis Bingo.

Clasificación GO	Valor P	Número de genes	Descripción
6414	7.38E-11	3	Translational elongation
6412	4.95E-04	31	Translation
3723	2.25E-03	29	RNA binding
12505	4.77E-02	105	Endomembrane system

Anexo C.- Genes reprimidos en raíz de trigo Ópata al inocular *A.brasilense* Cd.

Id Tair	Nombre del gen	Z-score
AT5G20160	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein(AT5G20160)	-1.82
AT3G01260	Galactose mutarotase-like superfamily protein(AT3G01260)	-2.10
AT1G15250	Zinc-binding ribosomal protein family protein(AT1G15250)	-1.87
AT1G79880	RNA recognition motif (RRM)-containing protein(La2)	-1.59
AT1G74350	Intron maturase, type II family protein(AT1G74350)	-2.06
AT1G73290	serine carboxypeptidase-like 5(scpl5)	-1.91
AT1G03300	agenet domain protein (DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 1)(ATDUF1)	-2.54
AT1G29110	Cysteine proteinases superfamily protein(AT1G29110)	-2.63
AT3G55710	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein(AT3G55710)	-1.80
AT2G45560	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1(CYP76C1)	-1.63
AT3G60500	3'-5'-exoribonuclease family protein(CER7)	-2.63
AT1G77030	putative DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 29(AT1G77030)	-2.10
AT4G22380	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein(AT4G22380)	-1.87
AT3G25470	bacterial hemolysin-like protein(AT3G25470)	-2.022
AT5G43100	Eukaryotic aspartyl protease family protein(AT5G43100)	-1.69
AT1G31450	Eukaryotic aspartyl protease family protein(AT1G31450)	-1.94
AT1G21900	emp24/gp25L/p24 family/GOLD family protein(p24delta5)	-1.59
AT3G48610	non-specific phospholipase C6(NPC6)	-1.92
AT5G46160	Ribosomal protein L14p/L23e family protein(AT5G46160)	-1.82
AT3G46330	Leucine-rich repeat protein kinase family protein(MEE39)	-3.48
AT3G25560	NSP-interacting kinase 2(NIK2)	-2.34
AT3G16680	DNA binding / DNA-directed RNA polymerase(AT3G16680)	-2.30
AT2G06005	FRIGIDA interacting protein 1(FIP1)	-1.53
AT2G32430	Galactosyltransferase family protein(AT2G32430)	-3.22
AT1G50520	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 27(CYP705A27)	-2.20
AT3G62800	double-stranded-RNA-binding protein 4(DRB4)	-2.13
AT2G16950	transportin 1(TRN1)	-1.78
AT3G43840	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein(AT3G43840)	-2.57
AT5G14580	polyribonucleotide nucleotidyltransferase(AT5G14580)	-1.73
AT5G38170	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein(AT5G38170)	-1.73
AT4G28040	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family	-1.88

	protein(UMAMIT33)	
AT4G22230	defensin-like protein(AT4G22230)	-2.14
AT4G20860	FAD-binding Berberine family protein(AT4G20860)	-1.56
AT5G11940	Subtilase family protein(AT5G11940)	-2.62
AT1G20150	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein(AT1G20150)	-1.58
AT4G30110	heavy metal atpase 2(HMA2)	-1.58
AT1G04270	cytosolic ribosomal protein S15(RPS15)	-1.76
AT3G61040	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 7(CYP76C7)	-1.85
AT1G54980	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein(AT1G54980)	-1.59
AT1G36380	transmembrane protein(AT1G36380)	-3.05
AT4G13070	RNA-binding CRS1 / YhbY (CRM) domain protein(AT4G13070)	-1.60
AT4G38030	Rhamnogalacturonate lyase family protein(AT4G38030)	-1.84
AT5G14660	peptide deformylase 1B(PDF1B)	-1.50
AT1G74970	ribosomal protein S9(RPS9)	-1.61
AT4G33440	Pectin lyase-like superfamily protein(AT4G33440)	-2.89
AT1G22240	pumilio 8(PUM8)	-2.77
AT4G13410	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein(ATCSLA15)	-1.91
AT1G17560	Ribosomal protein L14p/L23e family protein(HLL)	-2.29
AT5G38970	brassinosteroid-6-oxidase 1(BR6OX1)	-1.64
AT5G39020	Malectin/receptor-like protein kinase family protein(AT5G39020)	-1.54
AT4G27090	Ribosomal protein L14(AT4G27090)	-1.52
AT1G35730	pumilio 9(PUM9)	-1.69
AT4G36130	Ribosomal protein L2 family(AT4G36130)	-1.55
AT5G60180	pumilio 19(PUM19)	-1.56
AT5G23990	ferric reduction oxidase 5(FRO5)	-2.03
AT1G22670	Protease-associated (PA) RING/U-box zinc finger family protein(AT1G22670)	-1.60
AT2G28520	vacuolar proton ATPase A1(VHA-A1)	-2.20
AT4G33910	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein(AT4G33910)	-1.61
AT3G50480	homolog of RPW8 4(HR4)	-2.01
AT1G51340	MATE efflux family protein(AT1G51340)	-2.25
AT2G16730	glycosyl hydrolase family 35 protein(AT2G16730)	-2.05
AT3G07100	Sec23/Sec24 protein transport family protein(ERMO2)	-1.63
AT1G35550	Elongation factor Tu C-terminal domain-containing	-3.11

	protein(AT1G35550)	
AT3G48110	glycine-tRNA ligase(EDD1)	-3.65
AT1G66580	senescence associated gene 24(SAG24)	-3.01
AT1G80680	SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE 3(SAR3)	-2.36
AT3G62170	VANGUARD-like protein(VGDH2)	-1.51
AT4G08930	APR-like 6(APRL6)	-2.21
AT5G41180	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein(AT5G41180)	-2.20
AT2G35730	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein(AT2G35730)	-1.65
AT1G74060	Ribosomal protein L6 family protein(AT1G74060)	-2.30
AT4G01440	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein(UMAMIT31)	-2.16
AT2G02130	low-molecular-weight cysteine-rich 68(LCR68)	-1.52
AT1G56590	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein(ZIP4)	-2.06
AT3G16830	TOPLESS-related 2(TPR2)	-2.31
AT4G08840	pumilio 11(PUM11)	-1.79
AT5G59850	Ribosomal protein S8 family protein(AT5G59850)	-2.79
AT1G63840	RING/U-box superfamily protein(AT1G63840)	-3.55
AT4G15770	RNA binding protein(AT4G15770)	-1.97
AT1G02810	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily(AT1G02810)	-1.57
AT2G18800	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 21(XTH21)	-2.34
AT3G20230	Ribosomal L18p/L5e family protein(AT3G20230)	-1.73
AT2G01890	purple acid phosphatase 8(PAP8)	-1.94
AT1G54080	oligouridylate-binding protein 1A(UBP1A)	-1.84
AT1G24580	RING/U-box superfamily protein(AT1G24580)	-2.12
AT1G62670	rna processing factor 2(RPF2)	-1.92
AT1G07770	ribosomal protein S15A(RPS15A)	-2.81
AT5G05110	Cystatin/monellin family protein(AT5G05110)	-1.71
AT5G28060	Ribosomal protein S24e family protein(AT5G28060)	-4.81
AT3G21730	Dihydroneopterin aldolase(FOLB3)	-1.69
AT1G69410	eukaryotic elongation factor 5A-3(ELF5A-3)	-1.52
AT4G29290	low-molecular-weight cysteine-rich 26(LCR26)	-1.75
AT1G07960	PDI-like 5-1(PDIL5-1)	-1.66
AT5G59180	DNA-directed RNA polymerase II(NRPB7)	-1.53
AT1G35160	GF14 protein phi chain(GF14 PHI)	-1.59
AT5G16870	Peptidyl-tRNA hydrolase II (PTH2) family protein(AT5G16870)	-2.13

AT2G23220	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 6(CYP81D6)	-3.04
AT5G59170	Proline-rich extensin-like family protein(AT5G59170)	-1.51
AT3G54460	SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein / F-box family protein(AT3G54460)	-2.49
AT1G02720	galacturonosyltransferase 5(GATL5)	-1.50
AT5G52400	cytochrome P450, family 715, subfamily A, polypeptide 1(CYP715A1)	-1.69
AT1G23480	cellulose synthase-like A3(CSLA03)	-1.65
AT1G30010	Intron maturase, type II family protein(nMAT1)	-1.52
AT2G46880	purple acid phosphatase 14(PAP14)	1-59
AT1G64600	copper ion binding / methyltransferase(AT1G64600)	-1.91
AT1G72260	thionin 2.1(THI2.1)	-1.82
AT5G08180	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein(AT5G08180)	-1.74
AT1G23410	Ribosomal protein S27a / Ubiquitin family protein(AT1G23410)	-3.98
AT5G04630	cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 9(CYP77A9)	-1.85
AT1G26440	ureide permease 5(UPS5)	-3.12
AT4G34640	squalene synthase 1(SQS1)	-2.04
AT4G34670	Ribosomal protein S3Ae(AT4G34670)	-1.90
AT2G25900	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein(ATCTH)	-1.65
AT1G32490	RNA helicase family protein(ESP3)	-1.78
AT2G41840	Ribosomal protein S5 family protein(AT2G41840)	-1.69
AT2G23560	methyl esterase 7(MES7)	-2.64
AT3G47700	RINT-1 / TIP-1 family(MAG2)	-1.63
AT2G25940	alpha-vacuolar processing enzyme(ALPHA-VPE)	-2.26
AT5G47120	BAX inhibitor 1(BI1)	-2.69
AT5G52320	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 4(CYP96A4)	-1.53
AT1G56240	phloem protein 2-B13(PP2-B13)	-2.21
AT1G69620	ribosomal protein L34(RPL34)	-2.02
AT2G15490	UDP-glycosyltransferase 73B4(UGT73B4)	-2.51
AT5G56210	WPP domain interacting protein 2(WIP2)	-1.60
AT5G64200	serine/arginine-rich splicing factor-like protein, putative(SC35)	-2.22
AT3G28500	60S acidic ribosomal protein family(AT3G28500)	-1.69
AT2G25160	cytochrome P450, family 82, subfamily F, polypeptide 1(CYP82F1)	-1.71
AT3G08770	lipid transfer protein 6(LTP6)	-3.41

AT1G18630	glycine-rich RNA-binding protein 6(GR-RBP6)	-1.97
AT1G10840	translation initiation factor 3 subunit H1(TIF3H1)	-2.03
AT5G64140	ribosomal protein S28(RPS28)	-2.68
AT2G22420	Peroxidase superfamily protein(AT2G22420)	-1.95
AT4G25890	60S acidic ribosomal protein family(AT4G25890)	2.12
AT5G24820	Eukaryotic aspartyl protease family protein(AT5G24820)	-1.54
AT4G25835	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT4G25835)	-1.83
AT4G35010	beta-galactosidase 11(BGAL11)	-1.71
AT2G43530	scorpion toxin-like knottin superfamily protein(AT2G43530)	-1.50
AT5G44700	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase(GSO2)	-1.94
AT2G03750	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT2G03750)	-2.10
AT3G49080	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein(AT3G49080)	-1.51
AT4G04540	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 39(CRK39)	-1.63
AT2G43700	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein(AT2G43700)	-2.06
AT4G23630	VIRB2-interacting protein 1(BTI1)	-2.30
AT5G15100	Auxin efflux carrier family protein(PIN8)	-1.90
AT2G25440	receptor like protein 20(RLP20)	-1.89
AT2G29310	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein(AT2G29310)	-3.21
AT5G40000	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein(AT5G40000)	-3.76
AT1G11420	agenet domain protein (DOMAIN OF UNKNOWN FUNCTION 724 2)(DUF2)	-3.58
AT1G02840	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein(SR34)	-3.20
AT1G76720	eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF-2) family protein(AT1G76720)	-1.80
AT4G20270	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein(BAM3)	-1.75
AT5G37690	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein(AT5G37690)	-2.30
AT1G50300	TBP-associated factor 15(TAF15)	-1.84
AT5G15230	GAST1 protein homolog 4(GASA4)	-1.69
AT1G62410	MIF4G domain-containing protein(AT1G62410)	-1.55
AT1G34780	APR-like 4(APRL4)	-1.66
AT3G05620	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily(AT3G05620)	-2.16

AT3G44340	hypothetical protein(CEF)	-1.73
AT1G47490	RNA-binding protein 47C(RBP47C)	-1.73
AT2G20060	Ribosomal protein L4/L1 family(AT2G20060)	-2.10
AT2G13790	somatic embryogenesis receptor-like kinase 4(SERK4)	-1.84
AT4G16830	Hyaluronan / mRNA binding family(AT4G16830)	-1.90
AT4G39890	RAB GTPase homolog H1C(RABH1c)	-1.53
AT5G22980	serine carboxypeptidase-like 47(scpl47)	-1.52
AT1G18470	Transmembrane Fragile-X-F-associated protein(AT1G18470)	-1.91

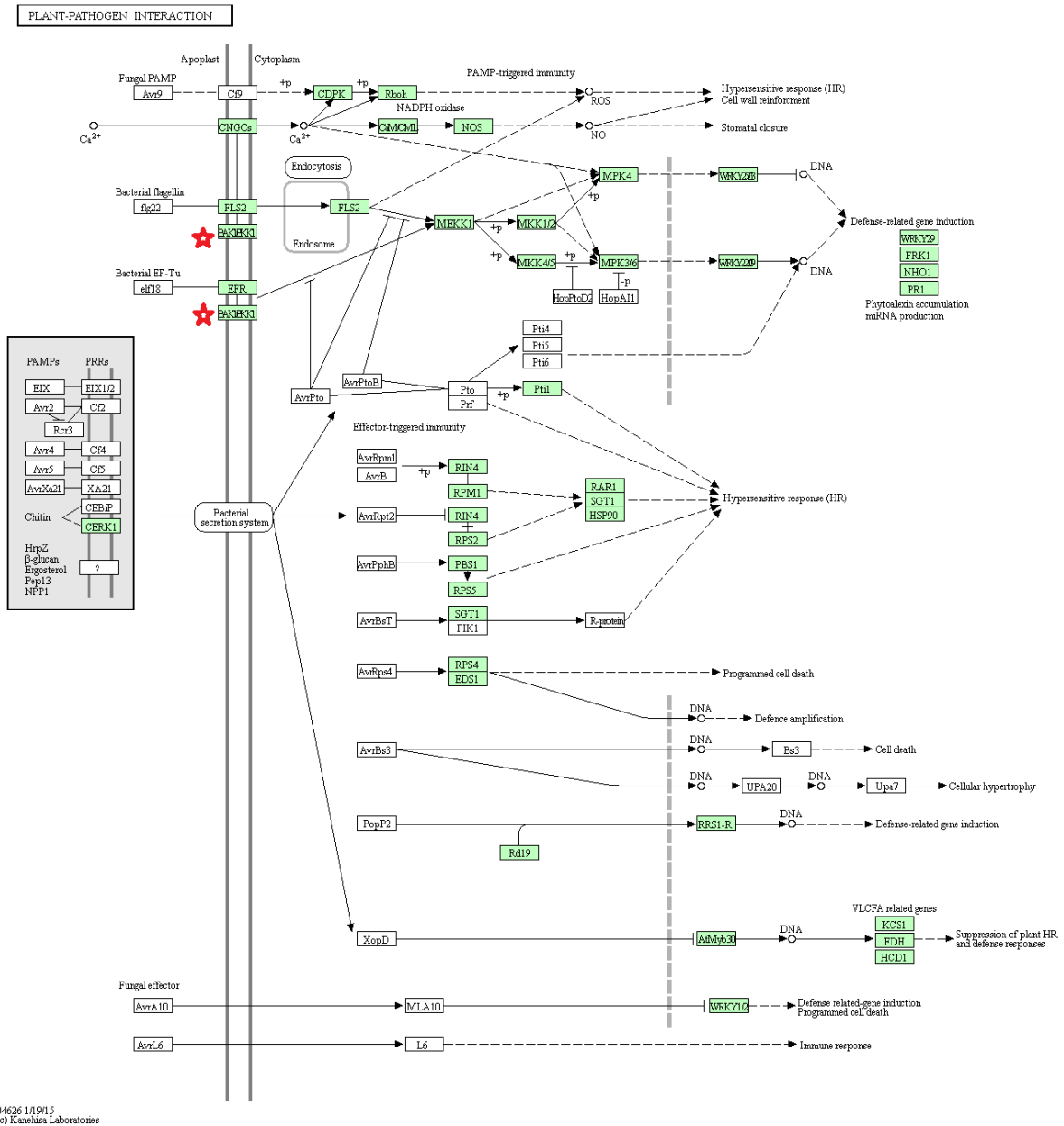
Anexo D. Genes inducidos en raíz de trigo Ópata al inocular *A. brasilense* Cd.

Id TAIR	Nombre del gen	Z-score
AT3G20250	pumilio 5(PUM5)	3.44
AT2G27840	histone deacetylase-related / HD-like protein(HDT4)	1.61
AT3G59380	farnesyltransferase A(FTA)	1.55
AT2G30260	U2 small nuclear ribonucleoprotein B(U2B")	2.63
AT2G34980	phosphatidylinositolglycan synthase family protein(SETH1)	3.01
AT1G69485	Ribosomal L32p protein family(AT1G69485)	1.84
AT4G20440	small nuclear ribonucleoprotein associated protein B(smB)	1.72
AT5G66190	ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductase 1(FNR1)	1.70
AT3G23070	CRM family member 3A(CFM3A)	4.21
AT1G32790	CTC-interacting domain 11(CID11)	2.44
AT3G55750	Ribosomal protein L35Ae family protein(AT3G55750)	2.58
AT3G19150	KIP-related protein 6(KRP6)	2.27
AT5G46250	RNA-binding protein(LARP6a)	2.22
AT5G05170	Cellulose synthase family protein(CEV1)	2.09
AT1G16740	Ribosomal protein L20(AT1G16740)	3.01
AT5G59230	transcription factor-like protein(AT5G59230)	2.33
AT3G58140	phenylalanyl-tRNA synthetase class IIc family protein(AT3G58140)	1.56
AT2G19750	Ribosomal protein S30 family protein(AT2G19750)	2.47
AT3G09200	Ribosomal protein L10 family protein(AT3G09200)	3.09
AT3G12990	ribonuclease PH45A(RRP45a)	1.73
AT4G20340	Transcription factor TFIIE, alpha subunit(AT4G20340)	1.87
AT1G60200	splicing factor PWI domain-containing protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein(AT1G60200)	2.01
AT4G24000	cellulose synthase like G2(CSLG2)	2.08

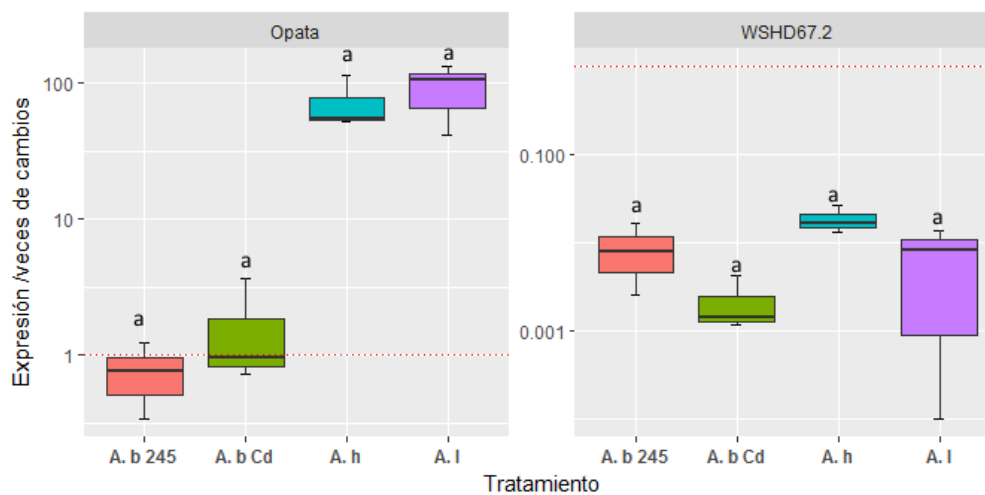
AT1G20575	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein(DPMS1)	1.79
AT1G72050	transcription factor IIIA(TFIIIA)	3.26
AT1G01410	pumilio 22(PUM22)	2.35
AT3G20550	SMAD/FHA domain-containing protein(DDL)	1.83
AT5G40950	ribosomal protein large subunit 27(RPL27)	1.59
AT5G66360	Ribosomal RNA adenine dimethylase family protein(DIM1B)	1.81
AT3G14450	CTC-interacting domain 9(CID9)	2.38
AT2G48120	pale cress protein (PAC)(PAC)	1.82
AT4G35830	aconitase 1(ACO1)	1.51
AT1G07470	Transcription factor IIA, alpha/beta subunit(AT1G07470)	2.22
AT5G52470	fibrillarin 1(FIB1)	2.23
AT1G11870	Seryl-tRNA synthetase(SRS)	1.77
AT1G49710	fucosyltransferase 12(FUT12)	2.35
AT1G34150	Pseudouridine synthase family protein(AT1G34150)	1.66
AT1G14460	AAA-type ATPase family protein(AT1G14460)	2.12
AT2G25850	poly(A) polymerase 2(PAPS2)	1.81
AT2G25840	Nucleotidyl transferase superfamily protein(OVA4)	2.02
AT1G65660	Pre-mRNA splicing Prp18-interacting factor(SMP1)	2.92
AT1G09700	dsRNA-binding domain-like superfamily protein(HYL1)	1.78
AT2G47300	ribonuclease Ps(POP1)	2.06
AT4G24440	transcription initiation factor IIA gamma chain / TFIIA-gamma (TFIIA-S)(AT4G24440)	3.90
AT5G02960	Ribosomal protein S12/S23 family protein(AT5G02960)	1.54
AT5G18810	SC35-like splicing factor 28(SCL28)	1.83
AT2G43460	Ribosomal L38e protein family(AT2G43460)	3.07
AT3G63490	Ribosomal protein L1p/L10e family(EMB3126)	1.77
AT1G28350	Nucleotidyl transferase superfamily protein(AT1G28350)	3.49
AT1G52370	Ribosomal protein L22p/L17e family protein(AT1G52370)	1.62
AT1G05190	Ribosomal protein L6 family(emb2394)	2.89
AT2G28350	auxin response factor 10(ARF10)	1.64
AT3G07160	glucan synthase-like 10(GSL10)	1.59
AT5G02250	Ribonuclease II/R family protein(EMB2730)	1.91
AT5G01270	carboxyl-terminal domain (ctd) phosphatase-like 2(CPL2)	1.83
AT3G57490	Ribosomal protein S5 family protein(AT3G57490)	1.57
AT3G23390	Zinc-binding ribosomal protein family protein(AT3G23390)	2.09
AT2G27120	DNA polymerase epsilon catalytic subunit(TIL2)	1.63
AT3G22310	putative mitochondrial RNA helicase 1(PMH1)	1.94
AT1G71280	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein(AT1G71280)	1.72

AT1G02780	Ribosomal protein L19e family protein(emb2386)	1.57
AT1G54385	ARM repeat superfamily protein(AT1G54385)	3.55
AT3G61620	3'-5'-exoribonuclease family protein(RRP41)	2.14
AT3G42723	ATP binding / aminoacyl-tRNA ligase/ nucleotide binding protein(AT3G42723)	1.71
AT4G23620	Ribosomal protein L25/Gln-tRNA synthetase, anti-codon-binding domain-containing protein(AT4G23620)	1.65
AT5G24360	inositol requiring 1-1(IRE1-1)	2.83
AT2G47580	spliceosomal protein U1A(U1A)	1.60
AT4G24770	31-kDa RNA binding protein(RBP31)	2.42
AT1G15930	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein(AT1G15930)	1.63
AT5G42820	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein(U2AF35B)	2.57
AT3G57660	nuclear RNA polymerase A1(NRPA1)	1.84
AT3G56300	Cysteinyl-tRNA synthetase, class Ia family protein(AT3G56300)	4.46
AT2G39990	eukaryotic translation initiation factor 2(EIF2)	2.31
AT1G57660	Translation protein SH3-like family protein(AT1G57660)	1.53
AT5G10350	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein(AT5G10350)	1.57
AT1G09320	agenet domain-containing protein(AT1G09320)	2.12
AT5G55500	beta-1,2-xylosyltransferase(XYLT)	1.61
AT4G28360	Ribosomal protein L22p/L17e family protein(AT4G28360)	1.52
AT1G04480	Ribosomal protein L14p/L23e family protein(AT1G04480)	2.20
AT3G13740	Ribonuclease III family protein(AT3G13740)	1.79
AT5G67220	FMN-linked oxidoreductases superfamily protein(AT5G67220)	2.06

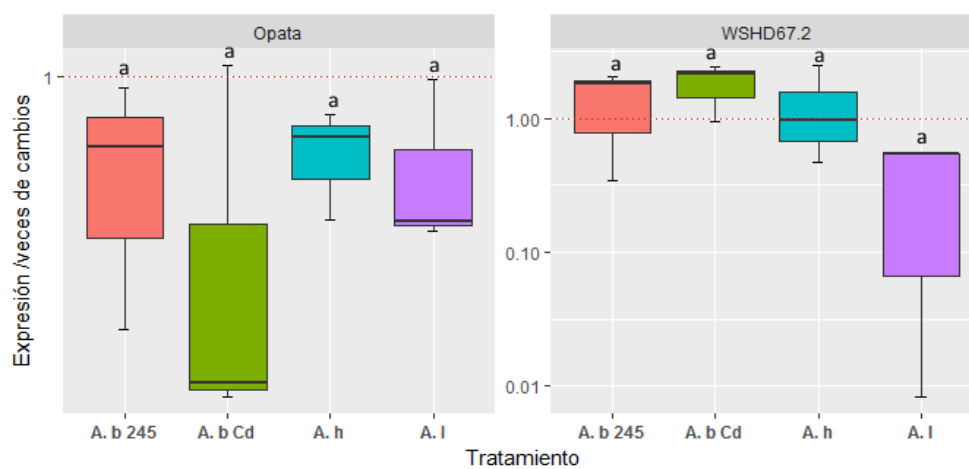
Anexo E.- Modelo de interacción del gen Somatic embryogenesis receptor-like kinase 4 (AT2G13790) reprimido en este estudio, el cual interactúa con (BR) receptor Brassinosteroid insensitive, y es responsable de detectar bacterias patógenas.



Anexo F



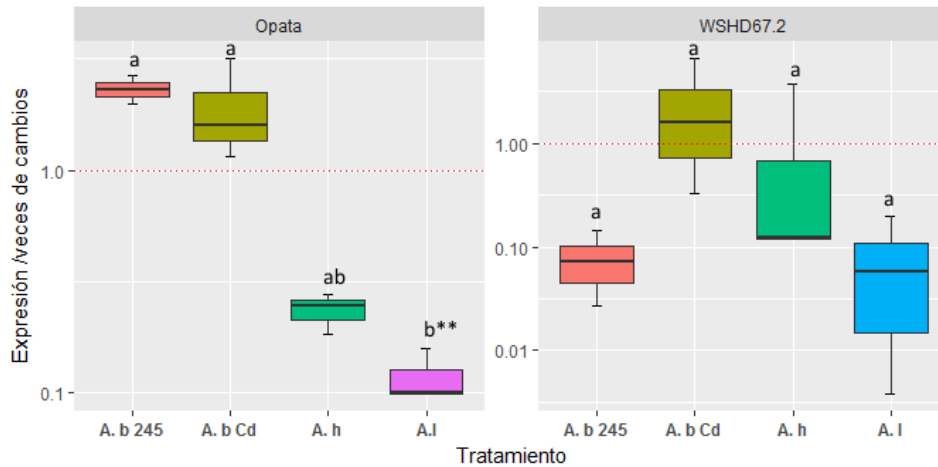
Expresión relativa del gen WAK3 normalizada con el gen RPL29 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas



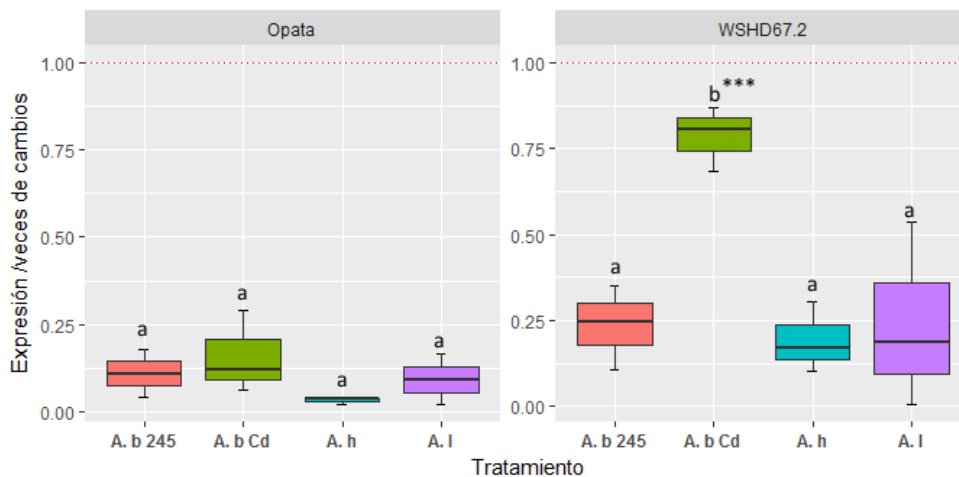
Anexo G

Expresión relativa del gen que codifica para Fosfatidil inositol N glucosinil transferasa, normalizada con el gen RPL29 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas.

Anexo H



Expresión relativa del gen XHT5 normalizada con el gen RPL29 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas.



Anexo I

Expresión relativa del gen que codifica para Poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferasa normalizada con el gen RPL29 en raíz de trigo Ópata y sintético WSHD67.2 al utilizar cuatro tratamientos bacterianos *A. brasilense* SP245, *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* y *A. halopraeferans*. Las diferencias significativas se observan con letras diferentes sobre las cajas.