



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS  
RADICULARES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) A LA  
ADEHSIÓN DE *Azospirillum brasilense* Cd

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Agricultura Sustentable)

Presenta

**MERIT DEL ROCÍO MORA RUIZ**

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2010

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

### ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 8 del Mes de noviembre del 2010, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Expresión diferencial de proteínas radicales de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd"**

Presentada por el alumno:

Merit del Rocio Mora Ruiz

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Agricultura de Zonas Áridas


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

#### LA COMISION REVISORA

  
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. José Luis Díaz León Álvarez  
CO-TUTOR

Dr. Hans-Peter Mock  
CO-TUTOR

  
DRA. ELINA SAVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL Y REVISORES DE TESIS**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Directora de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. José Luis Díaz de León Álvarez

Co-Tutor

Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

Dr. Hans-Peter Mock

Co-Tutor

, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben (IPK)

## **JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Directora de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. José Luis Díaz de León Álvarez

Co-Tutor

Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

Dr. Hans-Peter Mock

Co-Tutor

Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben (IPK)

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Suplente

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

## RESUMEN

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) es uno de los principales cultivos empleados para la alimentación a nivel mundial. Dentro de los factores abióticos el que más limita su rendimiento es la salinidad. Una fuente adicional de salinización y de aumento en los costos de producción es el uso indiscriminado de fertilizante nitrogenado. Por lo que el uso de variedades tolerantes a salinidad y el uso complementario de biofertilizantes, a base de *Azospirillum brasilense*, permitirá disminuir los efectos negativos de la salinidad, mejorar el rendimiento y disminuir los costos de producción durante su cultivo. Sin embargo, el efecto benéfico de *Azospirillum* como biofertilizante, a nivel de campo, ha mostrado ser inconsistente. La caracterización fenotípica de la adhesión de *A. brasilense* ha demostrado que es un proceso genotipo-dependiente (Adriana Rojas Hernández; Tesis de doctorado en desarrollo, U.A.S.; datos sin publicar). Y por tanto, se ha sugerido que las inconsistencias reportadas se deben a la incapacidad de *A. brasilense* de adherirse a cualquier genotipo. El presente trabajo se enfocó a estudiar si el fenotipo de adhesión de *A. brasilense* está correlacionado con una expresión diferencial de proteínas radiculares en trigos harineros y hexaploides sintéticos polimórficos a la adhesión de *A. brasilense* Cd, durante los primeros estadios de interacción planta-bacteria. Para esto, se analizaron los proteomas radiculares de los genotipos: Chinese spring (2n=42; AABBDD), Opatá (2n=42; AABBDD), y el sintético hexaploide Norwich (2n=42; AABBDD). A los genotipos Opatá y el sintético hexaploide se les adhiere *A. brasilense* mientras que al genotipo Chinese spring no. Plántulas de los tres genotipos fueron cultivadas hidropónicamente en cajas de Petri, irrigadas con medio Hoagland (media fuerza iónica) sin o con 150 mM NaCl, en condiciones controladas de luz y temperatura, durante 6 días. Al término de éste tiempo, se cosecharon las raíces para la extracción de proteínas solubles. Los extractos proteicos fueron resueltos por medio de electroforesis de isoelectroenfoque (1ª dimensión) seguida de electroforesis 2D SDS-PAGE. Proteínas con expresión diferencial fueron removidas del SDS-PAGE y procesadas para determinar su secuencia vía el análisis MALDI TOF/TOF MS y MS/MS y así determinar su identidad. En ausencia de estrés salino, para el genotipo Chinese spring se detectaron dos proteínas reguladas a la alta (up-regulated = UR). El genotipo Norwich mostró dos proteínas UR y una regulada a la baja (down-regulated = DR). Y en el caso del genotipo Opatá, se encontraron nueve proteínas UR. Solo un 42.1% de la secuencias obtenidas concordaron con secuencias conocidas. La identidad de éstas fue: una metionina adenosiltransferasa, una Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y dos malato deshidrogenasa en la variedad Opatá, todas con un patrón de expresión UR. Mientras que para la variedad Norwich se identificó la proteína UDP-D-Gluconato descarboxilasa (UR), una como malato deshidrogenasa (UR), una HSP70 (DR) y una proteína hipotética (DR). La UDP-D-gluconato descarboxilasa, Malato deshidrogenasa y la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa intervienen en el metabolismo de carbohidratos, lo que sugiere su participación en la estimulación de elongación celular y induciendo el crecimiento radicular. Mientras que la sobreexpresión de la metionina adenosiltransferasa podría estar ligada a la síntesis de la fitohormona etileno, lo que conllevaría un aumento en la producción de pelos radiculares. En condiciones de estrés salino se detectó una proteína UR en Chinese spring y para Opatá una proteína UR y

cinco proteínas DR De estas últimas ninguna secuencia concordó con las reportadas en las bases de datos consultadas.

Palabras clave: Trigo, *A. brasilense* Cd y proteínas.

## ABSTRACT

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the main crops used for food worldwide. Among the abiotic factors that limits the performance is salinity. An additional source of salinity and increase in production costs is the indiscriminate use of nitrogen fertilizer. So, the use of salinity tolerant varieties and the complementary use of biofertilizers, *Azospirillum brasilense*-based, will reduce the negative effects of salinity, improve performance and reduce production costs for its cultivation. However, the beneficial effect of *Azospirillum* as biofertilizer, at field level has proven to be inconsistent. Phenotypic characterization of the adhesion of *A. brasilense* showed to be a genotype-dependent process (Adriana Rojas Hernández; PhD thesis, under develop UAS, unpublished data). And therefore, it has been suggested that inconsistencies could be associated to the failure of *A. brasilense* to adhere to any genotype. The present work is aimed to establish if the phenotype of adhesion of *A. brasilense* is correlated with root differential protein expression in bread wheat and synthetic hexaploid bread wheats and polymorphism to the adhesion of *A. brasilense* Cd, during the early stages of plant-bacteria interaction. We analyzed the root proteomes of Chinese Spring (2n = 42; AABBDD) Opata (2n = 42; AABBDD) and Norwich synthetic hexaploid (2n = 42; AABBDD) genotypes. *A. brasilense* adhere to genotypes Opata and Norwich while Chinese Spring genotype does no. Seedlings of the three genotypes were grown hydroponically in a Petri dish system, and were irrigated with half Hoagland solution without or with 150 mM NaCl, under controlled conditions of light and temperature for 6 days. At the end of this time, the roots were harvested for the extraction of soluble proteins. Protein extracts were resolved by isoelectric focusing electrophoresis (1st dimension) followed by 2D SDS-PAGE electrophoresis. Differentially expressed proteins were removed from the SDS-PAGE and processed to determine its sequence analysis via MALDI TOF / TOF MS and MS / MS to determine its identity. In the absence of salt stress, two proteins up-regulated (UR) were detected for Chinese spring genotype. The Norwich genotype showed two proteins UR and one down regulated (DR). In contrast the genotype Opata presented nine proteins UR. Only 42.1% of the sequences obtained were related with known sequences. The identity of these proteins was: one methionine adenosyltransferase, one glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and two malate dehydrogenase in Opata, all UR. As for the variety Norwich, it was identified one UDP-D-Glucuronate decarboxylase (UR), one as malate dehydrogenase (UR), one as a HSP70 (DR) and one hypothetical protein (DR). UDP-D-glucuronate decarboxylase, malate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase involved in the metabolism of carbohydrates, suggesting their rol in cell elongation and root growth. While overexpression of methionine adenosyltransferase could be linked to the synthesis of the phytohormone ethylene, which would cause an increase in the production of root hairs. Under salt stress, it was detected one Chinese spring and Opata one UR protein and five proteins DR. None of the obtained sequence agreed with those reported in the databases searched.

Key words: Wheat, *A. brasilense* Cd, and proteins.

## DEDICATORIA

### *A mis padres:*

*En efecto, no todas las decisiones fueron correctas, pero estoy segura que todas fueron tomadas con amor y en el recuento de los daños.. ¿Cuáles daños?.*

### *A mi Bsho:*

*A qué velocidad se mueven los árboles..A qué ritmo se movía tu corazón... Cómo pensar en una fruta sin pensar en ti.. Dame tu mano debajo de este castaño, con pies fríos y manos calientes, dejaremos iniciales en su corteza de mármol..Tómame de la mano en las orillas de este lago donde vienen a beber las hojas de los árboles más amables y más largos..Dame un beso o te lo robo, bajo el cielo verde de este árbol estrellado.. Dame un tallo tierno y te plantaré un bosque de algas y silencio. Dame una razón para mover el mundo y habrá un árbol que sostenga la casa de tus siestas. Raíces aéreas de una botánica confusa que se mece en el silencio de tus ojos... No hay mala vida bajo el ala de estas sombras, no hay dualidad bajo la mirada única de esta verde hermosura. No hay silencio ni ruido, hay campanas aéreas que tañen por ti.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Antes que todo deseo agradecer a CONACYT (núm. de beca 224132) por el apoyo financiero brindado para inscripción y manutención que me permitió llevar a cabo la presente tesis. Al CIBNOR por brindarme todas las facilidades para el desarrollo de mis estudios y experimentación. Igualmente, agradezco al Dr. José Luis Díaz De León Álvarez por otorgarme una beca complementaria de manutención y trasportación, a través de su proyecto: “Caracterización molecular de trigo cultivado en ambientes salinos y en presencia de bacterias promotoras de crecimiento” (Convenio bilateral México-Alemania; CONACYT-BMBF 2008-2010), gracias a la cual recibí el entrenamiento necesario en el Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben, Alemania para el desarrollo experimental de la tesis.

Gracias a mi comité tutorial: a la Dra. Thelma Castellanos Cervantes, por extenderme la mano cuando más lo necesitaba, por su tiempo y orientación. Al Dr. José Luis Díaz de León Álvarez, por sus valiosas enseñanzas, guía y paciencia conmigo. Y al Dr. Hans-Peter Mock, por recibirme en su grupo y por sus excelentes consejos.

Gracias al M. en C. Ángel Carrillo, a los laboratorio de Edafología, Bromatología, Bioquímica, Fisiología Comparada, Proteómica y Microbiología Ambiental del CIBNOR, al grupo ABC-IPK especialmente a la Dra. Katja Witzel, Dra. Andrea Matros, Annegret Wolf, y Yanelis Capdesuner por toda la ayuda brindada. Al Dr. Andreas Börner por facilitar las semillas empleadas en esta tesis.

Al grupo de trabajo del museo de la UABCS por el asilo y los cafecines. A Alito, Anet, Bruce, Charlie, Edwin, Marce, Naye, mi Persona, Pérez y Pris por su valiosa



amistad, por todos esos enfoques diferentes para ver las cosas que me han permitido aprender y divertirme a la par, por el tiempécín de relax, la ayuda en los momentos difíciles y por cada sonrisa que han puesto en mi cara.

A las chicas del cubículo I, especialmente a Vero, Dany, Paty, Viri y Mariana por todos los gratos e inolvidables momentos que pasamos juntas y por todo el ánimo que me dieron para llegar a concluir este trabajo.

A Omarcito, porque aunque no estás....sigues estando; a mi panino Osquitar, por ser una de mis más grandes inspiraciones profesionales; a ma´ Tere y pa´Osquitar, así como a la abue Ome´y a toda la familia y a la nueva familia, gracias por las porras y por los ejemplos de vida que me han dado.

A mi vakita, porque todas esas diferencias que nos hacen ser como el agua y el aceite, me han concedido conocer el mundo a través de otros ojos, porque he podido comprender que no necesitas ser idéntico a alguien para quererlo con todo tu ser.

A mis padres por no levantarme cuando estaba caída y alentarme para hacerlo por mi misma; por no pelear mis batallas por mí y a cambio darme las herramientas para luchar; porque no solo me mostraron que tengo alas, sino que me enseñaron a volar; por enseñarme a abrir los ojos para ver lo hermoso de la vida. Gracias ma´ por enseñarme a tener fortaleza para seguir y gracias a ti pa´ por demostrarme que la pasión por la vida es esencial para no desvanecerte por dentro.

Finalmente, gracias a ti Bsht, por aguantar las malas y las peores, porque gracias a ti muchos de mis sueños no se perdieron en la inmensidad de la desesperación y la desidia. Gracias por completar mi sonrisa de cada día, por romper las ataduras de mi

mente, por poner las lajas en mi camino, por arrullar mis sueños y por hacerme comprender que siempre se puede perseverar un poco más.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 El trigo .....	1
1.2 Efecto de la salinidad en el trigo .....	3
1.3 El género <i>Azospirillum</i> .....	5
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	11
2.1 Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum</i> en el trigo.....	8
2.2 La proteómica en plantas .....	9
2.3 Proteínas radiculares relacionadas con la presencia de Microorganismos .....	13
2.4 Proteínas relacionadas al proceso de adhesión <i>Azospirillum</i> - Trigo.....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	22
6.1 Esterilización, germinación y crecimiento de semillas de trigo. .	22
6.2 Cultivo de la cepa de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	25
6.3 Experimento de inoculación.....	25
6.4. Extracción de proteínas radiculares.....	26
6.5 Solubilización de proteínas para electroforesis 2-D.....	27
6.6 Cuantificación de proteínas totales.....	28

6.7 Separación en Primera Dimensión de Proteínas: Focalización isoelectrica.....	28
6.8 Electroforesis en segunda dimensión: SDS-PAGE .....	29
6.9 Visualización de proteínas .....	29
6.10 Secado del Gel .....	30
6.11 Obtención y procesamiento de imágenes, y análisis de datos..	30
6.12 Identificación de proteínas por análisis MALDI-TOF MS.....	31
6.13 Identificación por espectrometría de masas tandem (MS/MS)...	32
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
7.1 Germinación de las semillas de trigo de los cvs. Chinese spring, Opata y del hexaploide sintético Norwich en condiciones sin y con estrés salino.....	33
7.2 Rendimiento de proteínas radiculares.....	33
7.3 Patrón 2D de proteomas de los cvs. Chinese spring, Opata y del hexaploide sintético Norwich controles .....	34
7.4 Patrón 2D de los proteomas de Chinese spring, Norwich y Opata inoculadas con <i>A. brasilense</i> Cd .....	35
7.5 Proteínas con expresión diferencial de Chinese spring inoculado con <i>A. brasilense</i> Cd.....	38
7.6 Proteínas con expresión diferencial de Opata inoculada con <i>A. brasilense</i> Cd. ....	41
7.7 Proteínas con expresión diferencial de Norwich en condiciones de inoculación con <i>A. brasilense</i> Cd.....	47

7.8 Patrón 2D de los proteomas de Chinese spring, Opata y Norwich control y bajo estrés salino.....	53
7.9 Descripción del patrón 2D de los proteomas de Chinese spring y Opata condiciones de inoculación bajo estrés salino.....	54
7.10 Proteínas con expresión diferencial de Chinese spring inoculado con <i>A. brasilense</i> Cd.....	57
7.11 Proteínas con expresión diferencial de Opaten condiciones de inoculación con <i>A. brasilense</i> Cd.....	59
7.12 Comparación de los experimentos sin estrés salino y en condiciones de estrés salino.....	64
7.13 Identificación de proteínas en condiciones de inoculación, sin y bajo estrés salino.....	65
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
8.1 Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en el proteoma de las raíces de trigo sin estrés salino.....	72
8.2 Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd atenuada en el proteoma de las raíces de trigo sin estrés salino.....	83
8.3 Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en el proteoma de las raíces de trigo en condiciones de estrés salino.....	84
8.4 Comparación del cambio en el proteoma de las raíces de trigo inoculadas con <i>Azospirillum brasilense</i> Cd sin estrés salino vs estrés salino.....	86
8.5 Efectos de la inoculación de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd atenuada	

en el proteoma de las raíces de trigo en condiciones de estrés salino..	87
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>11. LITERATURA CITADA</b> .....	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las dos primeras repeticiones biológicas del experimento sin estrés salino llevado a cabo en el IPK-Gatersleben, Alemania.....	23
Figura 2. Representación esquemática de la tercera repetición biológica del experimento sin estrés salino llevado a cabo en el CIBNOR-México.....	24
Figura 3. Representación esquemática del experimento bajo condiciones de estrés salino, la extracción de proteínas se llevó a cabo en el CIBNOR-México.....	24
Figura 4. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas radiculares de trigo ( <i>T. aestivum</i> L.) por variedad para el primer experimento.....	34
Figura 5. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas radiculares de las variedades trigo ( <i>T. aestivum</i> L.) Chinese spring, Norwich y Opata para las réplicas técnicas control y tratamiento del segundo experimento.....	36
Figura 6. Gel de cv. Chinese spring control (a) e inoculada con <i>A. brasilense</i> Cd (b) .....	39
Figura 7. Gel de cv. Opata control (a) e inoculada con <i>A. brasilense</i> Cd (b) .....	43

Figura 8. Gel del hexaploide sintético Norwich control (a) e inoculado con <i>A. brasilense</i> Cd (b).....	48
Figura 9. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas radicales de las variedades trigo Chinese spring y Opata del experimento en condiciones de estrés salino.....	54
Figura 10. Patrón de expresión de la proteína 1357 de la variedad Opata.....	56
Figura 11. G de la cv. Chinese spring control (a) e inoculado con <i>A. brasilense</i> Cd (b) en condiciones de estrés salino.....	58
Figura 12. Gel de la variedad Opata control (a) e inoculad con <i>A. brasilense</i> Cd (b) en condiciones de estrés salino.....	61
Figura 13. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1077. ....	66
Figura 14. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 499.....	66
Figura 15. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1174.....	67
Figura 16. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1068.....	69
Figura 17. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1182. ....	69
Figura 18. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1324.....	70



Figura 19. Síntesis de UDP-D-ácido glucorónico y UDP-D-xilosa..	75
Figura 20. Reacción de formación de oxalacetato a partir de malato catalizada por la MDH.....	76
Figura 21. Síntesis de 3-Fosfolicerato a partir de gliceraldehído -3-fosfato teniendo como intermediario el 1,3-Bifosfoglicerato....	80
Figura 22. Síntesis de S-adenosilmetionina a partir de metionina catalizada por la MAT.....	81

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Principales productores de trigo a nivel mundial para el 2008.....	2
Tabla II. Clasificación del trigo en México según sus usos Potenciales.....	2
Tabla III. Proteína con expresión diferencial en presencia de <i>A. Brasilense</i> Cd.....	37
Tabla IV. Patrón de expresión de las proteínas que presentaron expresión diferencial ante la presencia de <i>A. brasilense</i> Cd en la cv. Chinese spring.....	40
Tabla V. Patrón de expresión de las proteínas que presentaron expresión diferencial ante la presencia de <i>A. brasilense</i> Cd en la variedad Opata.....	44
Tabla VI. Patrón de expresión de las proteínas con menor expresión en la variedad Norwich.....	49
Tabla VII. Patrón de expresión de las proteínas sobreexpresadas en la variedad Norwich.....	52
Tabla VIII. Proteínas con expresión diferencial en presencia de <i>A. brasilense</i> en los experimentos en condiciones de estrés salino.....	55
Tabla IX. Patrón de expresión de la proteína 2074 de Chinese spring.....	59
Tabla X. Patrón de expresión de las proteínas con menor expresión de Opata.....	62

Tabla XI. Patrón de expresión de la proteína 2309.....	63
Tabla XII. Proteínas de la raíz del trigo Norwich en interacción con <i>A. brasilense</i> Cd en el experimento sin estrés salino, identificadas por MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS. ....	68
Tabla XIII. Proteínas de la raíz del trigo cv. Opata en interacción con <i>A. brasilense</i> Cd en el experimento sin estrés salino, identificadas por MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS.....	71

**LISTA DE IMAGENES**

Imagen 1. Raíces de plántulas de 6 días de trigo cv. Opata  
cultivadas en HSH..... 26

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$	micro
2DE	electroforesis de doble dimensi3n
A	amperes
ABS	alb3mina de suero bovino
ACN	acetonitrilo
ACP	an3lisis de componentes principales
ADN	3cido desoxirribonucleico
ADNr	3cido desoxirribonucleico ribos3mico
AHL	N-acil- L-homoserina lactonas
ANDEVA	an3lisis de varianza
cCBB	coloidal Coomassie Brilliant Blue
cel.	c3lulas
CHAPS	3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-propanosulfonato
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biol3gicas del Noroeste
cm	cent3metro
cv.	variedad (cultivada) l3nea
Da	Daltons
DSMZ	Colecci3n Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares
DTT	DL-Ditiotreitol
ESTs	marcador de secuencia expresada
FAO	Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentaci3n

g	gramo
h	hora
HSH	solución Hoagland de media fuerza iónica
HSP	proteína de choque térmico.
IEF	focalización isoelectrica
IPG	gradiente inmovilizado de pH
IPK	The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research
ITIS	Sistema Integrado de Información Taxonómica
K	kilo
L	litro
LB	Luria-Bertani
M	mol o millones
m	mili o metro
MALDI-TOF MS	espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz en “tiempo de vuelo”
MDH	malato deshidrogenasa
Mpb	millones de pares de bases
min.	minutos
MOMP	proteína principal de membrana externa
n	nano
NCBI	Centro Nacional de Información de Biotecnología
N.I.	proteína no identificada
N.D.	proteína no detectada

OMP	proteínas de membrana externa
p	grado de significancia estadística
PGPR	rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas
PMF	huella peptídica
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
sp.	especie
spp.	especies
T	toneladas
TA	temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
TIGR	El Instituto de Investigaciones Genómicas
TFA	ácido trifluoroacético
U	unidades
UABCS	Universidad Autónoma de Baja California Sur
UAS	Universidad Autónoma de Sinaloa
UFC	unidades formadoras de colonias
ups	unidades prácticas de salinidad
V	voltios
v/v	relación volumen-volumen
w/v	relación peso-volumen
x g	fuerza gravitacional

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El trigo

El trigo es una planta monocotiledónea perteneciente al género *Triticum*, su clasificación taxonómica (ITIS, 2009) es la siguiente:

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Liliopsida

Subclase Commelinidae

Orden Cyperales

Familia Poaceae

Género *Triticum*

Las variedades del género *Triticum* comprenden especies diploides, tetraploides y hexaploides originadas de la hibridación interespecífica de dos o más diferentes especies diploides (Dubcovsky y Dvorak, 2007).

Entre los cultivos dedicados a la alimentación, el trigo es una de las fuentes más abundantes de energía y proteínas para la población mundial. Para 2008 la FAO reporta una producción mundial de 689 millones de toneladas (MT) de trigo, siendo los países con más alta producción China, India y Estados Unidos de América (Tabla I). En México la producción nacional fue de cuatro millones de toneladas, ocupando el 27° lugar a nivel mundial (FAO, 2008). El trigo es un cereal que se cultiva en más de 20 estados de la



República Mexicana, sin embargo, el 80% de la producción se concentra en la zona norte (principalmente en el noroeste) y en Guanajuato (Bautista *et al.*, 2007).

Tabla I. Principales productores de trigo a nivel mundial para el 2008

	<b>País</b>	<b>Producción (MT)</b>
<b>1</b>	China	112
<b>2</b>	India	78
<b>3</b>	Estados unidos de América	68
<b>4</b>	Federación Rusa	63
<b>5</b>	Francia	39

En México las variedades de trigo se clasifican por su calidad en cinco grupos, con base en la especie botánica a la que pertenecen, a las características de dureza o textura de su grano y calidad de proteína o tipo de gluten. Estas características son las que determinan principalmente su uso potencial en la industria alimentaria (Tabla II), siendo el trigo harinero suave o blando (*Triticum aestivum* L.) el que más se cultiva (Bautista *et al.*, 2007).

Tabla II. Clasificación del trigo en México según sus usos potenciales (modificada de Bautista *et al.*, 2007).

<b>Trigo</b>	<b>Textura de grano /endoespermo</b>	<b>Tipo de gluten</b>	<b>Usos</b>
<b>Grupo 1</b>	Duro a semi-duro	Fuerte y extensible	Panificación mecanizada, como harina para pan de

---

			caja.
<b>Grupo 2</b>	Duro a semi-duro	Medio fuerte y extensible	Panificación manual y semi-mecanizada.
<b>Grupo 3</b>	Suave (blando)	Débil y extensible	Elaboración de galletas, tortillas y en panificación artesanal
<b>Grupo 4</b>	Duro a semi-duro	Medio fuerte y tenaz	No es panificable por su alta tenacidad. En repostería se mezcla con trigo de gluten fuerte para hacer pasteles.
<b>Grupo 5</b>	Muy duro y cristalino. Endoespermo con alto contenido de caroteonoides.	Fuerte y tenaz	No panificable. Se emplea en la industria de pastas alimenticias.

---

## 1.2 Efecto de la salinidad en el trigo

La producción agrícola se ve constantemente afectada por factores bióticos o abióticos, *e. g.* sequía, salinidad, inundaciones, plagas fungales, plagas bacterianas, etc. En la actualidad la salinización de los suelos agrícolas es uno de los factores abióticos limitantes y de estrés más relevantes, y actualmente es considerada un problema grave en la agricultura. Las tierras de cultivo alrededor del mundo se deterioran a pasos agigantados debido a la irrigación con aguas marginales o salinas, y aunado a ello el uso de programas de excesiva fertilización, produciendo tierras infértiles y de esta manera induciendo el proceso de desertificación en ellos. Los suelos impactados por salinidad se

han convertido en uno de los factores principales de la limitante productiva alrededor del mundo para la mayoría de cultivos (Shannon y Grieve, 1999).

El estrés salino tiene diversos efectos perjudiciales sobre el trigo, debido a que las altas concentraciones de sal tienen efectos dañinos en la germinación de las semillas y en el crecimiento y desarrollo de la planta (Rahman *et al.*, 2008).

A nivel celular y tisular, disminuye inicialmente el potencial osmótico lo que retarda o evita la disponibilidad de agua libre. Además los constituyentes de la sal o sales, los iones, pueden poseer diversa toxicidad para la planta (Kingsbury y Epstein, 1986, 1986). Por ejemplo, se ha demostrado que el catión  $\text{Na}^+$  posee mayor toxicidad que cationes como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , o  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , cuando el anión  $\text{Cl}^-$  se mantiene constante, mientras que los aniones  $\text{Cl}^-$  son menos tóxicos que el  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{PO}_4^{2-}$ , cuando el catión  $\text{Na}^+$  se mantiene constante (Díaz De León *et al.*, 1995). La salinidad también limita la actividad fotosintética (El-Shintinawy, 2000) y el crecimiento, en este último debido a una disminución en el movimiento de nutrientes, interrupción de la división celular y daños al hipocotilo (Rahman *et al.*, 2008).

Para resolver la problemática del estrés salino y un excesivo uso de fertilización nitrogenada, se pueden utilizar como estrategias el desarrollo de cultivos tolerantes a salinidad (Díaz De León *et al.*, 2000; Qadir *et al.*, 2000; Mujeeb-Kazi y Díaz De León, 2002; Díaz De León *et al.*, 2010). Mientras que para disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, *e. g.* urea o sales de amonios se puede recurrir al uso de biofertilizantes manufacturados con bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras de crecimiento (PGPR), tales como *Rhizobium* para leguminosas (relación simbiótica),

*Azotobacter* y *Azospirillum* spp. (relación no simbiótica; Bacilio *et al.*, 2004).o bien con hongos micorrízicos (Amaya-Carpio *et al.*, 2009).

### **1.3 El género *Azospirillum***

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, siendo *A. lipoferum* la especie tipo. Beijerinck (1925) describió a la bacteria *Spirillum lipoferum*, esta bacteria estuvo olvidada por varias décadas. Actualmente, en base a estudios moleculares del gen 16S ARNr se reconoce ocho especies dentro del género *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (Tarrant *et al.*, 1978), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999), *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001) y *A. oryzae* (Cheng-Hui Xie y Yocota, 2005) constituyen un subgrupo, mientras que *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989) y *A. amazonense* (Magalhaes *et al.*, 1983) un segundo subgrupo (Hartmann y Baldani, 2006).

Las células de las bacterias del género *Azospirillum*, son vibroides, pleomorficas con un diámetro celular promedio de 1  $\mu\text{m}$  (Caballero-Mellado, 1998; Madigan *et al.*, 2003). Generalmente son Gram-negativas pero se ha observado variabilidad Gram en *A. brasilense* (Tarrant *et al.*, 1978).

El metabolismo de *Azospirilla* es típicamente microaerofílico con  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones. En el caso de *A. brasilense* y *A. lipoferum* el  $\text{NO}_3$  puede reemplazar al  $\text{O}_2$  en la respiración y bajo condiciones alcalinas se forma  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$ . Además pueden crecer en condiciones anaeróbicas y fijar  $\text{N}_2$  (Hartmann y Baldani, 2006).

Las bacterias del género *Azospirillum* tienen una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Estos microorganismos son de vida libre, microaerófilos y se localizan principalmente en suelo y rizósferas, en donde se hallan en grandes número (generalmente superiores a  $10^7/g$ ; Madigan *et al.*, 2003; Aguilar-Piedras, 2008). Muestran ocurrencia generalizada en cereales de importancia económica tales como, maíz, arroz y trigo (Jain y Patriquin, 1984; Bashan, 1998;) y son consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR), debido a que fijan  $N_2$ , producen fitohormonas las cuales ejerce efectos positivos sobre el crecimiento de plantas (Tien *et al.*, 1979; Levanony y Bashan, 1989; Okon y Vanderleyden, 1997).

La capacidad de *Azospirillum* para colonizar la rizósfera, aunque no ha sido completamente entendida, se presume depende de muchas propiedades de la bacteria, como quimiotaxis hacia los exudados de las raíces, un metabolismo versátil incluyendo la fijación de nitrógeno, antagonismo hacia la competencia de microorganismos, la formación de quistes que les permiten sobrevivir a condiciones adversas y lo más importante, la habilidad de unirse las raíces de las plantas y a las partículas de suelo (Michielis *et al.*, 1991).

En cuanto a la tolerancia a ambientes salinos del género *Azospirillum*, además de *Azospirillum halopraeferens*, que tolera altos niveles de salinidad (Reinhold *et al.*, 1987), la mayoría de las cepas de *Azospirillum* sp. toleran solamente limitados niveles de salinidad (NaCl), *e. g.* *A. brasilense* Cd puede tolerar 2% NaCl. La tolerancia a la salinidad de *Azospirillum* ha sido establecida en este orden: *A. halopraeferens* > *A. irakense* > *A. brasilense* > *A. lipoferum* > *A. amazonense* (Hartmann *et al.*, 1988; Khammass *et al.*, 1989). Para controlar el estrés osmótico las células de *Azospirillum*

acumulan solutos compatibles *e. g.* trehalosa, glicina, bataina y glutamato (Hartmann y Baldani, 2006).

En la actualidad su uso comercial de *Azospirillum* como biofertilizante se ha extendido a diferentes países, incluido México (Caballero-Mellado, 1998).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Efectos de la inoculación de *Azospirillum* en el trigo.

La actividad biológica y microbiológica en los suelos agrícolas tiene un papel preponderante para favorecer una alta producción de cultivos agroindustriales. (Lynch, 2002; Osinski *et al.*, 2003). Durante su crecimiento en condiciones ambientales naturales, las plantas continuamente experimentan numerosas interacciones con microorganismos del suelo. Las raíces y los microorganismos del suelo están comprometidas en una comunicación química altamente específica, permitiendo con esto interacciones biológicas significativas (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; De la Peña *et al.*, 2008).

Las rizobacterias del género *Azospirillum* son conocidas por colonizar la rizósfera de plantas *e. g.* trigo, arroz, maíz, caña de azúcar, caña de azúcar y promover el crecimiento de estas (Michielis *et al.*, 1991). Los efectos positivos del género *Azospirillum* sobre el trigo (*Triticum aestivum*) son principalmente la promoción del crecimiento de raíces debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento, *e. g.* auxinas, y el intercambio de compuestos nitrogenados debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. La evidencia sobre la actividad benéfica de *Azospirillum*, presentadas hasta hoy, implican un impacto en la morfogénesis de las raíces al promover su crecimiento (sobreproducción de pelos radiculares y raíces laterales), consecuentemente aumentando el área de absorción de nutrientes y agua (Bashan y Levanony, 1990, Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

Algunos estudios que reportan deformaciones en las raíces debido a la inoculación con *Azospirillum*, han documentado dos tipos de deformaciones: 1) “tuning

forks” (pelos de la raíz en los cuales las ramificaciones tienen la misma longitud) y 2) pelos de raíz con ramificaciones que no tienen la misma longitud (Jain y Patriquin, 1984). Al presente, no hay evidencia de que las bacterias del género *Azospirillum*, aisladas del sistema radicular del trigo, sean patógenas (Bashan, 1998). Se ha reportado que al inocular  $10^5$  a  $10^6$  UFC de *Azospirillum brasilense* a plántulas de trigo, provoca un aumento en la elongación de la raíz y en la superficie de ésta, lo que permite tener una mayor superficie de absorción de nutrientes. Sin embargo al inocular de  $10^8$  a  $10^9$  UFC se provoca una inhibición en el desarrollo de la raíz. Estos resultados sugieren que la inhibición observada está relacionada con existencia de número críticos de sitios para la colonización de la bacteria en la raíz, lo que conlleva problemas de crecimiento en esta última (Kapulnik *et al.*, 1985).

Otros estudios, en los que se inocularon cepas de *Azospirillum* que expresaban constitutivamente el gen *gusA*, con el objetivo de visualizar agregados celulares y células individuales de *Azospirillum*, ha sugerido que los sitios de colonización endofítica inicial de *Azospirillum* en el trigo son los pelos radiculares, puntos de emergencia de raíces laterales y en espacios intracelulares de la epidermis de la raíz. Posteriormente se observa colonización en la superficie de la raíz (Vanden Broek *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 2002).

## **2.2 La proteómica en plantas**

Las proteínas se encuentran entre las moléculas más estudiadas en plantas, incluyendo determinación de estructura, propiedades y función biológica (Chambers *et al.*, 2000).

La proteómica, que ha surgido como un complemento a la técnicas genómicas, es



definida como un sistema de estudio de proteínas presente en una célula, un tejido, un órgano o un organismo en un momento particular durante su ciclo de vida (Agrawal y Rakwal, 2006; Zhang y Riechers, 2008).

Actualmente, los estudios de proteómica en plantas han tenido un notable crecimiento. Existen varias razones por las que el estudio proteómico aplicado a tejidos y organismos vegetales se está convirtiendo en un área de estudio en expansión en comparación con los estudios a nivel genético. Las investigaciones encaminadas a la secuenciación de genomas de especies vegetales no revelan información acerca de la cantidad y número de proteínas activas que se encuentra en los tejidos vivos. A pesar de que existe información completa y detallada del genoma de diferentes especies vegetales, el estudio de los genes ofrece poca información acerca de la función que desempeñan las proteínas que codifican o de las variaciones de la expresión y síntesis de las diferentes proteínas como respuesta a estímulos. Un inconveniente añadido es que el estudio de los genomas y los transcriptomas tampoco aporta respuestas acerca de cuáles son las posibles modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, ubiquitinación) que pueden sufrir las proteínas durante el proceso de maduración hasta que son capaces de desempeñar una función determinada. Sin embargo, mediante el estudio proteómico de tejidos vegetales se pueden abordar preguntas prácticas que permitan identificar proteínas involucradas en diversos procesos (Pandey y Mann, 2000; Maeder y Guthrie, 2008).

La investigación proteómica actual está dirigida a identificar nuevas proteínas en relación con su función y en última instancia develar como está controlada su expresión dentro de redes de regulación. Los trabajos clásicos de construcción de proteomas

descriptivos de orígenes complejos tal como el proteoma del tallo del arroz (han ido derivando hacia proteomas ligados a la función, analizando subproteomas de orgánulos propios de plantas, como el cloroplasto (Komatsu *et al.*, 1999; Peltier *et al.*, 2000; Casado-Vela, 2004).

Sin embargo, aunque, durante varios años se han reportado grandes progresos científicos usando técnicas de proteómica, en humanos y levaduras, los progresos con respecto a plantas son lentos (Zhang y Riechers, 2008). Las técnicas de proteómica han sido usadas en diversas plantas, especialmente en cultivos de importancia comercial y malas hierbas. Básicamente, los estudios de proteómica en plantas se circunscriben principalmente a proteomas subcelulares, incluyendo cloroplastos, mitocondria, núcleo y membrana plasmática (Peltier *et al.*, 2000; González-Camacho y Medina, 2007; Mehta *et al.*, 2008).

A pesar del desarrollo de técnicas para la extracción de proteínas y su identificación, siguen existiendo problemáticas para la proteómica de plantas (Zhang y Riechers, 2008). La separación de proteínas vegetales por electroforesis bidimensional en parte, tiene las mismas limitaciones que las encontradas para proteínas de otros orígenes, *e.g.* las proteínas hidrofóbicas escapan al análisis por electroforesis 2D (Santoni *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 1999a). Los procedimientos aceptados para la extracción selectiva de proteínas hidrofóbicas, tales como la separación de fases del Triton X-114, no encuentran continuidad en la incorporación y resolución de dichas proteínas en geles bidimensionales (Santoni *et al.*, 1999 b, Casado-Vela, 2004).

Con respecto a los análisis de proteómica de raíces (también llamada en inglés rooteomics), son aún insipientes cuando son comparados con otros tejidos vegetales y

todavía más comparado con el realizado en bacterias, levaduras y mamíferos (Agrawal y Rakwal, 2006; Mehta *et al.*, 2008).

Los análisis de proteómica de raíces, presentan varios desafíos, entre los que destacan la baja concentración proteica en las proteínas de raíces, la poca cantidad de tejido y las limitaciones en los protocolos de extracción que actualmente están disponibles. Otro punto importante radica en aquellos estudios de proteómica de raíces que, al tratar de identificar proteínas, se encuentran con la ausencia de accesos similares cuando las secuencias de los péptidos son buscadas en las bases de datos actuales. Aunado a esto, cuando se analiza estructural y funcionalmente proyectos de secuencias de genoma, cerca del 30% de los genes secuenciados representan proteínas hipotéticas o éstos no tienen éxito (Mehta *et al.*, 2008). Además de las dificultades inherentes a la falta de información genómica y proteómica específica de la mayoría de organismos no-modelo, hay que tener siempre en cuenta la posibilidad de que las diferencias observadas se deban a alteraciones no relacionadas directamente con el tratamiento que se quiere probar, sino que sean respuestas inespecíficas al estrés, alteraciones experimentales o a factores colaterales desconocidos (Cieslak y Ribera, 2009).

Sin embargo, actualmente el número de bases de datos va creciendo a medida que avanzan los proyectos proteómicos. Dichos desarrollos van a jugar con toda seguridad un papel clave en la explotación de la enorme cantidad de datos que empieza a producirse por proyectos de investigación de proteómica funcional (Casado-Vela, 2004).

Es importante también, enfatizar la investigación prometedora del análisis de proteómica de raíces que puede llevar a la identificación de proteínas y genes de

relevancia agronómica, para ser usado en el desarrollo de una agricultura sustentable en el futuro (Mehta *et al.*, 2008).

### **2.3 Proteínas radiculares relacionadas con la presencia de microorganismos**

El tejido radicular representa una importante estructura para la planta durante su crecimiento y desarrollo. El sistema de raíces está comprometido en la adquisición y asimilación de nutrientes, así como con la interacción con microbios rizosféricos, que pueden ser deletéreos o beneficiosos para ésta (Kohler *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2008). Básicamente, los estudios sobre la proteómica radicular ante la presencia de microorganismos están enfocados en aquellos microorganismos de efectos deletéreos sobre la planta. Sin embargo, Mehta *et al.* (2008) mencionan que la proteómica en plantas no ha sido desarrollada a un nivel suficiente de complejidad para identificar y estudiar proteínas de plantas relacionadas con la presencia de microorganismos hospederos radiculares.

Un estudio pionero de proteómica se llevó a cabo con la simbiosis *Melilotus alba* y *Sinorhizobium meliloti* cepa 1021, revelando 250 proteínas sobreexpresadas o “up-regulated” en tejido nodular y 20 proteínas reguladas a la baja o “down-regulated” en tejido radicular. De las proteínas inducidas, 180 fueron de origen bacteroide, mientras que las otras 70 parecen ser nuevas nodulinas (Natera *et al.*, 2000).

Las aplicaciones de la proteómica en *Medicago truncatula* reportan que esta leguminosa es capaz de detectar concentraciones desde nanomolares hasta micromolares de N-acil- L-homoserina lactonas (AHL) excretadas tanto por la bacteria simbiótica *Sinorhizobium meliloti*, como por el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*. Se

identificaron 150 proteínas, tales como, proteínas PR, peroxidasas, superóxido dismutasa y proteínas inductoras de respuesta hipersensitiva (HIR1) como respuesta a señales *quórum sensing* debido a la presencia de AHL (Mathesius *et al.*, 2003).

Otro estudio llevado a cabo con *M. truncatula* consistió en inocular sus raíces con la bacteria fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti*. Como respuesta ante la presencia de la bacteria, se observó la expresión de una leghemoglobina inducida en los nódulos de la raíz (Mehta *et al.*, 2008).

De la Peña *et al.* (2008) realizaron análisis proteómicos y comparación de proteínas secretadas durante estados tempranos de interacción entre las raíces de *Arabidopsis thaliana* y *Medicago sativa*, con dos bacterias *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 y *Sinorhizobium meliloti* cepa Rm1021. En este estudio se identificaron más de 100 proteínas secretadas en la interacción de *Arabidopsis thaliana* y *M. sativa* con *S. meliloti* o *P. syringae*. En la interacción *M. sativa*-*S. meliloti* se detectó el incremento en la secreción de siete proteínas radiculares, tales como hidrolasas, peptidasas y peroxidasas. En la interacción *A. thaliana*-*P. syringae* se observó el incremento de varias proteínas vegetales relacionadas con la defensa en estadios tempranos de interacción. También se encontró que la segregación de proteínas puede ser más rápida dependiendo de la interacción, en el caso de *M. sativa* en presencia de *S. meliloti*, se observó una rápida segregación proteica, pero no en presencia de *P. syringae*. En la interacción de *M. sativa* con *S. meliloti* se detectó un decline de la secreción de peroxidasa después de 12 h, sugiriendo que esto puede ser una señal para la nodulación.

Si bien, existen algunos estudios que analizan el proteoma radicular de las plantas en la interacción planta-microorganismo, tales como los mencionados anteriormente, éstos son escasos. En el caso específico del proteoma del trigo (*Triticum aestivum*) ante la presencia de *Azospirillum brasilense*, se puede decir que los estudios son nulos, ya que en esta relación es no simbiótica y se ha estudiado básicamente la participación de la bacteria y no la de la planta.

#### **2.4 Proteínas relacionadas al proceso de adhesión *Azospirillum*-Trigo**

Muchos estudios han descrito la adhesión de células de *Azospirillum* spp. tanto a las raíces de plantas como a superficies inertes. Adriana Rojas Hernández y Rojas *et al.* (Tesis de Doctorado en desarrollo; datos sin publicar) describen que la adhesión de *Azospirillum brasilense* probada en trigos harineros y sintéticos es polimórfica y variedad dependiente. En su tesis doctoral, Rojas (2007-2011) ha demostrado que el harinero cv. Opatá y el hexaploide sintético cv. Norwich son capaces de adherir a la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd, mientras que al trigo harinero cv. Chinese Spring no le adhiere. Sin embargo el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo esta adhesión aun es un tema de hipótesis conflictivas.

Michielis *et al.* (1991) propusieron dos modos diferentes de adhesión de *Azospirillum brasilense* Sp7 a las raíces del trigo. Una fase de adsorción primaria que es rápida, débil y controlada por compuestos proteicos en conjunto con la participación del flagelo polar. La segunda fase (llamada anclaje) es más fuerte e irreversible, en esta se observa la producción de material fibrilar, el cual se supone está formado por un polisacárido extracelular de *Azospirillum* y que sirve para conecta las células bacterianas

con las raíces. Este material fibrilar ha sido observado en las raíces de varias plantas de cultivo (Levanony y Bahan, 1991) y es probablemente el principal factor en la colonización efectiva de raíces, que finalmente mejora el crecimiento de plantas (Bashan y Holguin, 1993).

También se ha sugerido que las lectinas juegan un papel como receptores de polisacáridos de la superficie bacteriana (Del Gallo *et al.*, 1989). Bahan y Levanony (1988) reportaron que la unión de *A. brasilense* a la arena y a las raíces de trigo podría ser eliminada por un tratamiento de proteasas en la bacteria, lo cual soporta la participación de las proteínas, tipo lectinas, de la bacteria en el proceso de adhesión.

Posteriormente Castellanos *et al.* (1998) encontraron proteínas como lectinas en la superficie celular en *A. brasilense* (Sp245, Cd y Sp6) y *A. lipoferum* (1842, 779, JA2, 37). Sugiriendo que, dichas lectinas participan en el reconocimiento de ciertos azúcares, principalmente fucosa y glucosa, en la superficie de raíces.

Más recientemente Yegorenkova *et al.* (2001) al estudiar la adhesión de *Azospirillum* en el trigo y encontraron que la formación de complejos lectina-polisacárido provocan un incremento en la deformación de pelos de raíz.

Asimismo, hay evidencia que indica la participación de las proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. brasilense* en la formación de agregados celulares (Burdman *et al.*, 1999). Se ha propuesto que las OMPs (específicamente las porinas) juegan un papel en la adhesión de varias bacterias Gram-negativas (Burdman *et al.*, 2000a). Dentro de las OMPs, la proteína principal de membrana externa (MOMPs) de *A. brasilense* constituye cerca del 60% del total de las OMPs, está formada por 367 aminoácidos y tiene un peso molecular de 38,753 kDa. Esta proteína muestra una alta

afinidad a las raíces de cereales en comparación con raíces de otras plantas. Al estudiar la secuencia de la MOMP de *A. brasilense* se encontró que cuenta con dominios expuestos en la superficie celular que pueden estar involucrados en el proceso de adhesión (Okon y Vanderleyden, 1997; Burdman *et al.*, 2000a; Burdman *et al.*, 2000b). También se ha propuesto que esta MOMP podría ser una adhesina que además de participar en el proceso de adhesión, participa en el proceso de colonización de raíces (Burdman *et al.*, 2001). Otro estudio que se realizó con OMPs de *A. brasilense* fue el llevado a cabo por Burdman *et al.* (2000a), quienes no encontraron diferencias entre el perfil de OMPs de las cepas de *A. brasilense* Cd, Sp7 y Sp245, por lo que sugieren el gen que codifica la MOMP está altamente conservado en estas cepas.

Al presente, no se conocen proteínas radiculares de trigo que interactúen con proteínas excretadas o asociadas a la pared celular de *A. brasilense* Cd. Por tal motivo, es de nuestro interés, como primer paso, estudiar si el fenotipo de adhesión de *A. brasilense* Cd se correlaciona con cambios sustanciales en el proteoma radicular de trigos a los cuáles se adhieren *A. brasilense* Cd así como de aquellos a los que no se adhiere esta bacteria. Con esta caracterización fenotípica de adhesión y que sugiere que al ser variedad-dependiente, la inconsistencia de *Azospirillum* para promover, a nivel de campo, un mayor rendimiento se debe a que no todos los trigos harineros poseen la capacidad de adherir a *Azospirillum*. Por lo que, al estudiar el proteoma radicular podremos iniciar el proceso de identificar los genes de la planta que se encuentran relacionados al proceso de adhesión y con ello poder identificar con mayor precisión marcadores moleculares asociados a éste carácter.



### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de biofertilizantes que contienen microorganismos PGPRs, tiende a captar un creciente interés, no sólo en estudios de investigación sino también en su aplicación comercial para evaluar sus efectos benéficos en diferentes cultivos agroindustriales. Los reportes experimentales o de su aplicación a nivel campo se han centrado en describir sus efectos sobre una implantación más rápida, mayor crecimiento de raíces, tolerancia mejorada a patógenos, fijación biológica no simbiótica de nitrógeno y solubilización de nutrientes (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). El interés práctico en el uso de biofertilizantes se incrementa debido a que los costos de producción en los cultivos tienden a elevarse debido al continuo incremento en los precios de fertilizantes químicos *e. g.* urea y compuestos derivados de amonio, y por tanto la necesidad de abatir su uso y complementarlo con biofertilizantes. Por lo que, se exigen mejoras importantes en los inóculos biológicos que deriven en inducir una mayor eficiencia de las plantas en la absorción de los nutrientes y de la solución de suelo (Ferraris *et al.*, 2008).

El uso de *A. brasilense* como inoculante biológico en trigo conllevaría mejoras en la producción de este cultivo. Sin embargo, se han observado inconsistencias en los efectos benéficos al usar esta bacteria como biofertilizante en la producción del trigo. En algunas ocasiones se obtiene un aumento significativo en el rendimiento del cultivo y en otras no, sin que se lleguen a saber aún las causas exactas de estas variaciones en los resultados de rendimiento. Estudios de caracterización fenotípica realizados por Adriana Rojas Hernández (Tesis de doctorado bajo desarrollo; Rojas *et al.*, datos sin publicar) de han demostrado que el carácter de adhesión de *A. brasilense* Cd es variedad-dependiente

y que por tanto tales inconsistencia se debe a la respuesta polimórfica de los trigos utilizados.

Para poder tener un mejor control en el uso de *A. brasilense* como inoculantes biológicos del trigo, es necesario, como primer paso entonces estudiar si existe correlación entre el fenotipo de adhesión con cambios en el proteoma radicular de genotipos a los que se adhiere *A. brasilense* Cd y de esta manera entender el proceso por medio del cual se establece la relación planta-microorganismo. Es por esto que el presente trabajo pretende analizar la expresión diferencial de proteínas radiculares de trigos (*Triticum aestivum*) polimórficos a la adhesión de *Azospirillum brasilense* CD, con la finalidad de conocer más acerca de los eventos moleculares, a nivel radicular que acompañan el proceso de reconocimiento, atracción y adhesión. Por lo que, al estudiar el proteoma radicular podremos iniciar el proceso de identificar los genes de la planta que se expresan durante la presencia de así como durante el proceso de adhesión y con ello poder identificar con mayor precisión marcadores moleculares asociados a éste carácter.

#### **4. HIPÓTESIS**

El fenotipo de adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd a trigo harinero es genotipo dependiente, lo que hace suponer que el proteoma radicular de los genotipos a los que se adhiere la bacteria se verá modificado en presencia de la bacteria. Se espera por lo tanto, un conjunto de proteínas radiculares similares en genotipos a los que se adhiere *Azospirillum brasilense* Cd.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Analizar la expresión diferencial de proteínas radiculares en trigos harineros (*Triticum aestivum*; 2n=42; AABBDD) y hexaploides sintéticos (*T. durum* x *T. tauschii*; 2n=42 AABBDD) polimórficos a la adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd.

### Objetivos específicos

Realizar experimentos de inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) con polimorfismo a la adhesión de la bacteria bajo condiciones de cultivo sin y con estrés salino.

Aislar proteomas radiculares de plántulas de trigo con polimorfismo a la adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd, bajo condiciones de cultivo sin y con estrés salino.

Identificar proteínas radiculares de trigo (*Triticum aestivum*) expresadas durante el proceso de adhesión de *Azospirillum brasilense* Cd.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Esterilización, germinación y crecimiento de semillas de trigo

Las variedades de trigo (*Triticum aestivum*) empleadas para el experimento sin estrés salino (Figuras 1 y 2) fueron el hexaploide sintético Norwich (*T. durum* x *T. tauschii*) cv. y los trigos harineros cvs. Opata y Chinese spring los cuales presentan polimorfismo a la adhesión de *Azospirillum brasiliense* Cd. Mientras que para el experimento bajo condiciones de estrés salino (Figura 3) se emplearon los trigos harineros cvs. Opata y Chinese spring. El trigo harinero cv. Opata y el hexaploide sintético cv. Norwich adhieren bacterias mientras el cultivar Chinese spring no (Adriana Rojas Hernández. Tesis doctoral UAS-UABCS; Rojas *et al.*, enviado). Los granos de las tres variedades fueron obtenidos de la colección del Dr. José Luis Díaz De León y del Genbank del IPK (Dr. Andreas Börner). Para la germinación de las semillas se tomaron 100 granos de cada variedad y fueron esterilizadas con 1.8% (v/v) NaOCl (50 mL / 50 semilla). Para ello se colocaron 50 semillas en un matraz Kitazato de 100 mL y el matraz fue colocado en condiciones de presión reducida empleando una bomba de vacío durante 15 min. El vacío fue liberado cada minuto después del minuto 10 e inmediatamente reaplicado (higienización por filtración al vacío), posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril dentro de una campana de flujo laminar.

Las semillas higienizadas se colocaron en cajas de Petri cuadradas de 12 cm por lado, con una densidad de 25 semillas/ caja de Petri. Al fondo de las cajas de Petri se colocó una malla de plástico como soporte de las raíces de las plántulas y se adicionaron 40 mL de solución modificada de Hoagland de media fuerza iónica (HSH; Hoagland y Arnon, 1950). El crecimiento de plántulas bajo estrés salino se llevó a cabo utilizando

HSH conteniendo 150 mM NaCl. Las cajas de Petri fueron cubiertas con papel aluminio, con orificios en la posición donde se colocarían las semillas y sobre ellas se colocó la tapa de la caja de Petri.

Las semillas fueron cultivadas durante 6 días en un invernadero con temperatura de entre 20°C-22°C y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después del tercer día las cajas de Petri fueron descubiertas y la solución HSH fue cambiada periódicamente cada 12 h hasta completar 6 días de cultivo.

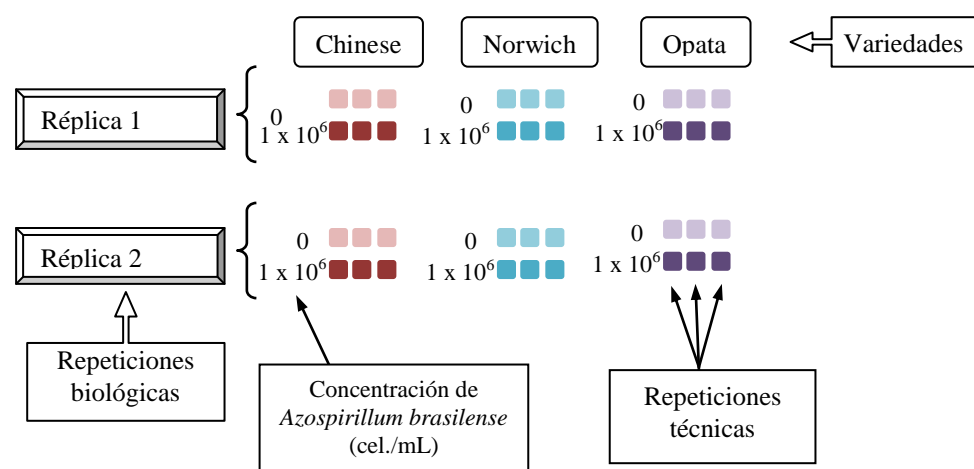


Figura 1. Representación esquemática de las dos primeras repeticiones biológicas del experimento sin estrés salino llevado a cabo en el IPK-Gatersleben, Alemania. En tonalidad de rojos se muestran las réplicas para Chinese spring, en azules Norwich y en púrpura Opata. Los tonos más claros para todos los colores representen las réplicas técnicas en condiciones no inoculantes y los tonos oscuros incluyen aquellas réplicas que fueron inoculadas con *A. brasilense*.

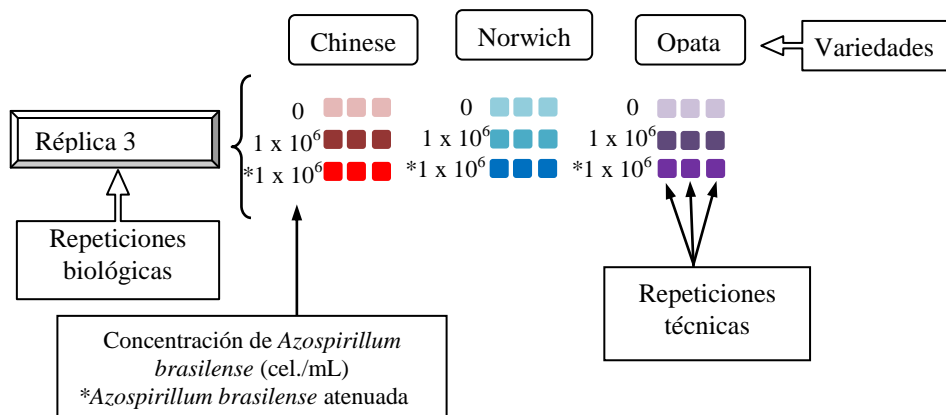


Figura 2. Representación esquemática de la tercera repetición biológica del experimento sin estrés salino llevado a cabo en el CIBNOR-México. En tonalidad de rojos se muestran las réplicas para Chinese spring, en azules Norwich y en púrpura Opata. Las variaciones de un mismo color corresponden al inóculo de *A. brasilense* con el que tuvieron contacto las raíces de trigo.

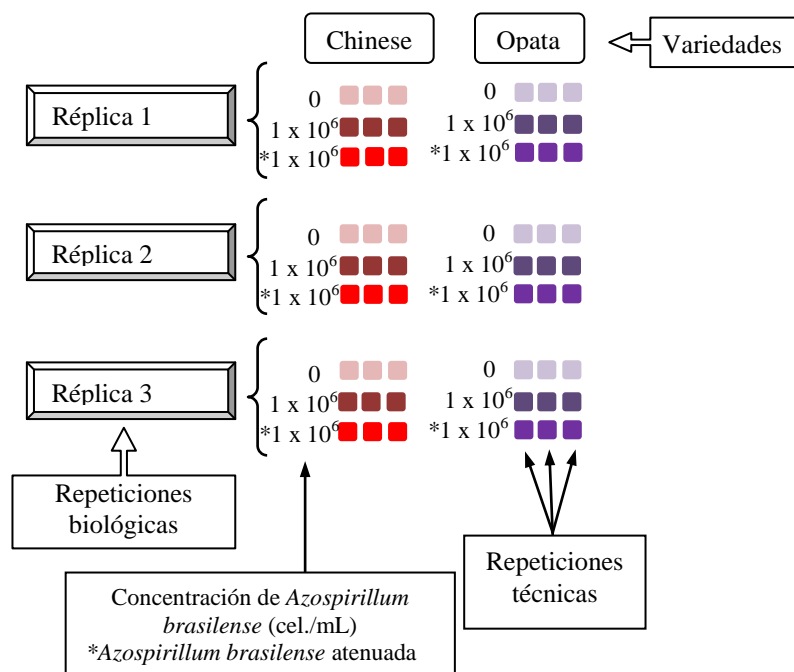


Figura 3. Representación esquemática del experimento bajo condiciones de estrés salino, la extracción de proteínas se llevó a cabo en el CIBNOR-México, mientras que la

electroforesis 2D, análisis de imagen e identificación se realizaron en el IPK-Gatersleben, Alemania. En tonalidad de rojos se muestran las réplicas para Chinese spring, en azules Norwich y en púrpura Opata. Las variaciones de un mismo color corresponden al inóculo de *A. brasilense* con el que tuvieron contacto las raíces de trigo.

## **6.2 Cultivo de la cepa de *Azospirillum brasilense***

La cepa de *Azospirillum brasilense* DSM 1843 fue obtenida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, por sus siglas en inglés) y se reactivó en el medio de cultivo 221 DSMZ, pH 7.0. La temperatura de cultivo fue 37°C. Después de la reactivación, la bacteria se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) pH 7.0, a 31°C y agitación a 90 rpm. Para los experimentos con la bacteria atenuada *A. brasiliense* fue inactivada sometiéndola a 70°C durante media hora.

## **6.3 Experimento de inoculación**

Para el experimento de inoculación, se tomaron 50 plántulas de cada variedad cultivadas por 6 días (Imagen 1), se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se transfirieron a cajas de Petri que contenían una solución de 0.85% (w/v) NaCl y  $10^6$  células de *Azospirillum brasilense* Cd/mL. Las raíces estuvieron completamente embebidas en la solución durante 6 h. Pasado este tiempo, se tomaron las plántulas y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las raíces de las 50 plántulas inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd y las raíces de las 50 plántulas que no se inocularon, se lavaron tres veces, se secaron y se cortaron con ayuda de un escalpelo y fueron transferidas a tubos Falcon de 50 mL previamente colocados en nitrógeno líquido, se



sumergieron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en la extracción de proteínas totales.



Imagen 1. Raíces de plántulas de 6 días de trigo cv. Oyata cultivadas en HSH.

#### **6.4 Extracción de proteínas radiculares**

La extracción de proteínas radiculares totales se realizó siguiendo el método de precipitación de proteínas de Damerval *et al.* (1986). Las raíces almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se colocaron en un mortero que contenía nitrógeno líquido y se procedió a macerarlas hasta homogenizar.

Inmediatamente, se transfirió 1 g del homogenado (Balanza electrónica Sartorius AG Mod. BB200) a tubos Falcon de 10 mL. A continuación se agregaron 10 mL de solución de precipitado (10% w/v TCA, 0.07% 2-mercaptoetanol en Acetona) y se mezcló en el vortex (Scientific Industries Vortex Genie 2).

La suspensión de proteínas se dividió en alícuotas de 1 mL, se sumergieron en nitrógeno líquido durante 30 s y fueron transferidas a un temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3 h,

la suspensión fue mezclada manualmente en intervalos de 5 minutos (hasta el minuto 15) con el fin de incrementar la coprecipitación de proteínas. Pasado este tiempo, el material precipitado fue recolectado por centrifugación (18000 U/min=36220 x g, 4°C, 15 min; Microcentrifuge Hettich-Mikro22P) y el sobrenadante fue removido por succión (bomba de vacío). Se procedió a lavar el pellet con 1.5 mL de solución de lavado (0.07% (v/v) 2-mercaptoetanol en acetona), se resuspendió el precipitado utilizando vortex y se sumergió en nitrógeno líquido por 30 s y se incubó nuevamente durante 3 h a -20°C. De nuevo se transfirieron las muestras al menos 2 h a -20°C y se mezclaron a mano como previamente se describió. Al término de la incubación se centrifugó la muestra, se removió el sobrenadante por succión y se volvió a lavar el precipitado. Un tercer ciclo fue repetido, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se secó en centrifugada al vacío (30°C, 10 min). El precipitado proteico fue conservado a -20°C.

### **6.5 Solubilización de proteínas para electroforesis 2-D**

Para la solubilización de proteínas, por cada 10 mg de precipitado proteico se les agregó 500µL de buffer de rehidratación (8 M urea, 2% CHAPS, 20 mM DTT y 0.5% buffer IPG 3-10 -anfolinas; GE Healthcare). Las muestras fueron mezclada en vortex y colocadas 5 min en un baño de ultrasonido (Sonorex RK2) a temperatura ambiente e incubadas a 37°C a 50 rpm (Eppendorf Thermomixer 5436) durante 1 h. Posteriormente la suspensión fue centrifugada (18000 U/min=36220 x g, TA o 20°C, 15 min; Microcentrifuge Hettich-Mikro22P) y para separar el pellet del sobrenadante, la solución fue filtrada con membranas de poro de 45 µm (Ultrafree-MC, Millipore, Eschborn, Alemania).

## **6.6 Cuantificación de proteínas totales**

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando el kit 2D Quant (GE Healthcare) siguiendo el protocolo indicado para el Kit y empleando como estándar Albúmina de Suero Bovino (ABS).

## **6.7 Separación en Primera Dimensión de Proteínas: Focalización isoelectrónica.**

La separación en primera dimensión y segunda dimensión se llevaron a cabo con el método descrito por Schlesier y Mock (2006). Para una mejor separación de proteínas se probaron geles con anfólicas en el intervalo de pH 3-10 y 4-7. Para su visualización en doble dimensión (SDS-PAGE), se probaron dos tamaños de gel (7 cm y 13 cm). Después de observar los geles obtenidos se concluyó el mejor pH era 3-10, ya que con el de 4-7 se perdían proteínas que se encontraban fuera de este intervalo. Sin embargo, al utilizar un pH con un intervalo mayor, la definición de las proteínas en geles de 7 cm no era buena, por lo que se decidió que, para tener una mejor visualización de dichas proteínas se trabajaría con geles de 13 cm. Se evitó también con esto, problemas de contaminación al cortar las proteínas, debido a que, en geles muy pequeños se corre el riesgo de que, al cortar manualmente se tomen fragmentos de la proteína contigua a la deseada.

Para la focalización se emplearon contenedores de tiras de isoelectroenfoque (tiras IPG) de 13 cm, pH 3-10 (GE Healthcare), sobre las cuales se colocaron 250  $\mu$ l de una mezcla buffer de rehidratación-muestra (con 200  $\mu$ g de muestra). La separación en primera dimensión se llevó a cabo usando el sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) con los siguientes parámetros 14 h rehidratación, 1 h gradiente 250 V, 1 h gradiente 500 V, 1

h gradiente 40000 V y 5:35 h 4000 V con un total de aproximadamente 25 KVh a temperatura ambiente. Durante todo el proceso de isoelectroenfoque la intensidad de la corriente está limitada a 50  $\mu$ A con la finalidad de evitar el sobrecalentamiento y degradación de las muestras (Tastet *et al.*, 2003). Tras la transferencia, las tiras se almacenaron en tubos con tapón de rosca. Para la electroforesis en segunda dimensión, las tiras focalizadas fueron equilibradas durante 15 minutos en 5 mL de buffer de equilibrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 2% (w/v) SDS, 30% v/v glicerina, 20mM DTT y 1% de azul de bromofenol).

### **6.8 Electroforesis en segunda dimensión: SDS-PAGE**

Para la electroforesis en segunda dimensión: SDS-PAGE se trabajó con geles verticales, siguiendo el método de Laemmli (1970). Las tiras focalizadas se colocaron sobre un gel de 12.5% de poliacrilamida y 1.0 mm de espesor, previo a la colocación de la tira, para evitar el movimiento de esta y que quedara fija al solidificar, se agragaron 1.5-2mL de agarosa 0.5%. La separación se llevó a cabo con un equipo Hoefer S600 apparatus (GE Healthcare) con un voltaje de 75 V por 0:30 h y a continuación 150V por 4:30 h. Para asegurar la reproducibilidad técnica de la separación de proteínas, se realizaron tres geles 2D por muestra.

### **6.9 Visualización de proteínas**

Después de la electroforesis, las proteínas fueron visualizadas con el método de tinción coloidal Coomassie Brilliant Blue (cCBB) que permite detectar una concentración tan baja como 10 ng de proteínas por proteína. Para ello, los geles fueron lavados dos veces

con agua destilada durante 10 min y a continuación se tiñeron por 3 h con 100 mL de solución colorante (5% sulfato de aluminio-(14-18)-hidratado, 0.002% Coomassie Brilliant Blue G250, 10% etanol 96% y 2% ácido orto-fosfórico) en movimiento. Finalizado este tiempo, se procedió a enjuagar muy bien los geles con agua destilada y se agregaron 100 mL de solución descolorante durante 1 h (10% etanol 96% y 2% ácido orto-fosfórico) en agitación suave. Finalmente los geles fueron lavados por 5 min con agua destilada y guardados a 4°C

### **6.10 Secado del Gel**

Para secar los geles, se sacaron de refrigeración y se esperó a que estuvieran a temperatura ambiente. A continuación se les agregó 100 mL de solución para secado (95% etanol 96% y 2% glicerina) y se colocaron en movimiento durante 10 min. Cuando hubieron transcurrido 5 min, se procedió a sumergir hojas de celofán en solución de secado de geles por cinco min (dos hojas de celofán por cada gel). Pasado el tiempo, se colocaron las hojas de celofán en la placa base del casete y se colocó el gel sobre el papel celofán. Después se cubrió el gel con una segunda hoja de papel celofán y la placa superior del casete fue colocada encima, alineando el celofán, el gel y la base. Después se colocó el sistema verticalmente por dos min para drenar el exceso de solución, se dejaron pasar 36 h hasta que el gel estuviera seco y se procedió a remover el casete.

### **6.11 Obtención y procesamiento de imágenes, y análisis de datos.**

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando el escáner UMAX Power Look III (Umax Systems, Willich, Alemania) y el software Phoretix Powerscan (se anexa disco

compacto con imágenes de geles). Después de que los geles fueron escaneados, se continuó con el análisis de imágenes que se realizó empleando el software Progenesis SameSpots v. 4.1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), se usaron los parámetros establecidos por el programa y el total de proteínas en el área del gel fue reducida (área de proteínas  $\leq 150$ ). Finalmente se seleccionaron las proteínas que presentaban expresión diferencial y un resultado del ANDEVA de  $p < 0.05$ .

### **6.12 Identificación de proteínas por análisis MALDI-TOF MS**

La técnica MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry) permite determinar la masa de los péptidos resultantes de la digestión enzimática de proteínas en gel, generando un espectro denominado huella dactilar peptídica de masas (Papin *et al.*, 1993). Os Para la identificación de proteínas mediante la técnica espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) se empleó el protocolo de digestión en gel con tripsina de Witzel *et al.* (2007). En primera instancia, se procedió a cortar manualmente las proteínas de los geles 2D. Las proteínas seleccionadas se cortaron en tres geles de al menos dos experimentos diferentes. Los fragmentos de gel se lavaron durante 30 min con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de 10mM de bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) + 50% (v/v) de acetonitrilo (ACN). Posteriormente los fragmentos de gel fueron secados en una centrifuga de vacío durante 10 min y digeridos con tripsina (tripsina porcina, Promega V511A), 10 ng/  $\mu\text{L}$  se disolvieron en 5 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 5% ACN. Las proteínas fueron incubadas 5 h a 37°C. Después la digestión fue parada usando 1  $\mu\text{L}$  de 1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) y las muestras se incubaron durante toda la noche a 5°C.

Se tomaron 0.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se mezclaron con 1  $\mu\text{L}$  de solución matrix compuesta de 89% de TA90 (90% ACN+0.1% TFA), 10% de  $\alpha$ -Cyano (7mg  $\alpha$ -Cyano/1 mL de TA90) y 1% de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ .

Los espectros de masa fueron obtenidos usando un equipo ultrafleXtreme MALDI TOF/TOF MS (Bruker Daltonics, Germany). Antes del análisis MS se realizó una calibración externa usando 10 péptidos estándar. Para la identificación de proteínas se empleó el software MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Perkins *et al.*, 1999) buscando en las bases de datos TIGR y harvEST, y en la base de datos no redundante (nr) de secuencias *Viridiplantae* de NCBI. La tolerancia de masas fue de 50 ppm, permitiendo modificaciones de las variables: oxidación (Met), propianamida (Cys) y carbamidometil (Cys).

### **6.13 Identificación por espectrometría de masas tándem (MS/MS)**

En los casos en las que la identificación MALDI-TOF MS no reportó secuencias similares a las conocidas, se procedió a realizar un análisis MS/MS o también llamada espectrometría de masas en tándem. Esta técnica combina dos espectrómetros de masas y al final de la segunda espectrometría se obtienen iones que son producto de un precursor originado de la primera espectrometría. Los espectros MS/MS fueron comparados con las bases de datos TIGR y harvEST, y en la base de datos no redundante (nr) de secuencias *Viridiplantae* de NCBI. La tolerancia de masas fue de 50 ppm, permitiendo modificaciones de la variables: oxidación (Met), propianamida (Cys) y carbamidometil (Cys).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Germinación y crecimiento de las semillas de trigo de los cvs. Chinese spring, Opata y del hexaploide sintético Norwich en condiciones sin y con estrés salino.**

La germinación de los genotipos empleados varió dependiendo de las condiciones de cultivo. La germinación de los genotipos en condiciones no estresantes fue 96%, 98% y 99% para Opata, Chinese spring y Norwich, respectivamente. Sin embargo, bajo estrés salino se modificaron ligeramente, ya que se obtuvieron porcentajes del 90% y 91% para Opata y Chinese spring respectivamente. Por otro lado, independientemente de las condiciones de no estrés o estrés salino, el genotipo Norwich fue el que tardó más tiempo en germinar. Las plántulas de 6 días de edad desarrollaron un sistema radicular suficiente para el aislamiento de proteínas radiculares.

### **7.2 Rendimiento de proteínas radiculares**

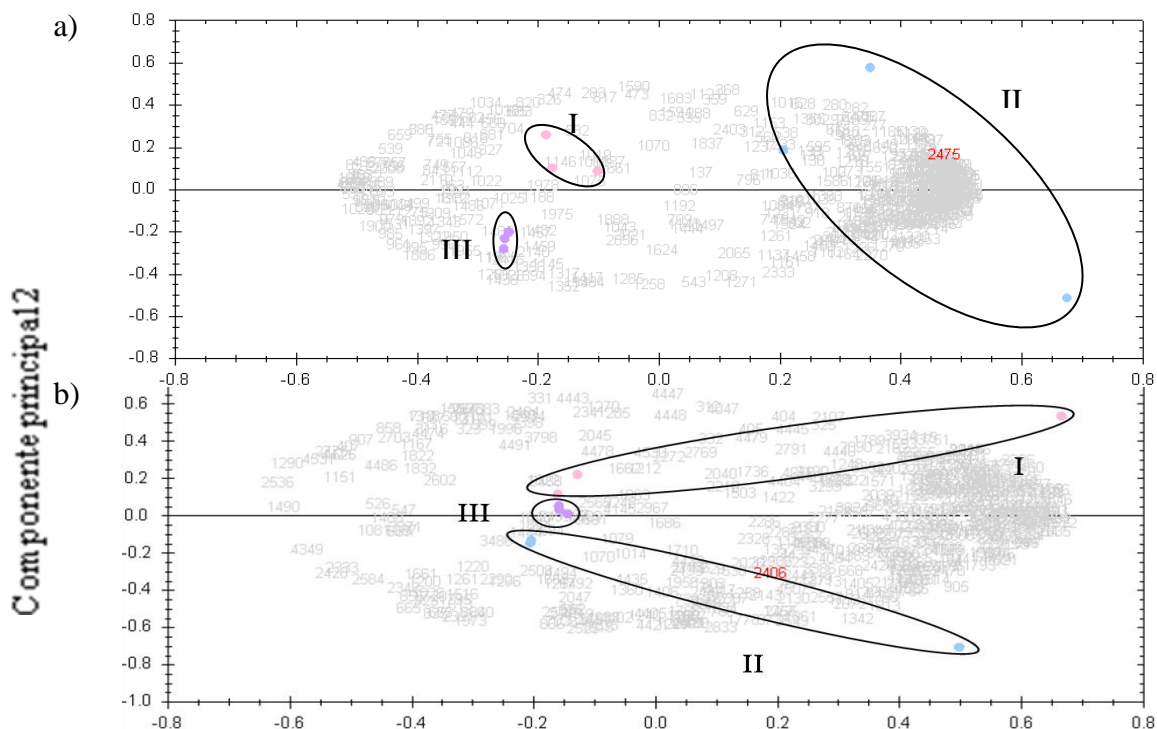
A las 50 plántulas cosechadas por variedad y por tratamiento, en cada uno de los experimentos, les fue disectado su sistema radicular, se recolectó y se procedió a aislar las proteínas solubles radiculares. El rendimiento aproximado por cada tratamiento y por variedad fue de 30mg de extracto. Después del proceso de precipitación, lavado y solubilización, el rendimiento final estuvo dentro del intervalo de 0.9500-3.2490  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el experimento en ausencia de estrés salino y entre 1.1029-2.3840  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el experimento en condiciones de estrés salino.



### 7.3 Patrones 2D de proteomas de los cvs. Chinese spring, Opata y del hexaploide sintético Norwich en los controles

#### a) Análisis de componentes principales

Con el objeto observar la agrupación de los patrones del proteoma radicular por variedad, se llevaron a cabo los análisis de componentes principales (ACP) de las proteínas para cada experimento, se encontró que se formaban agrupaciones por variedad. La Figura 4 corresponde al ACP del primer experimento, para este caso se observa que la variedad Opata se agrupó mejor en comparación con las variedades Chinese spring y Norwich. En el caso de la variedad Norwich se observó una mayor segregación, dicha segregación no fue exclusiva en el ACP del primer experimento, sino que se observó también en los ACP's de los experimento uno y tres (no se muestran los ACP's). Se observa también que las variedades Chinese spring y Opata tienen menor distancia entre ellas en comparación con Norwich, con quien tienen una separación mucho más fuerte.



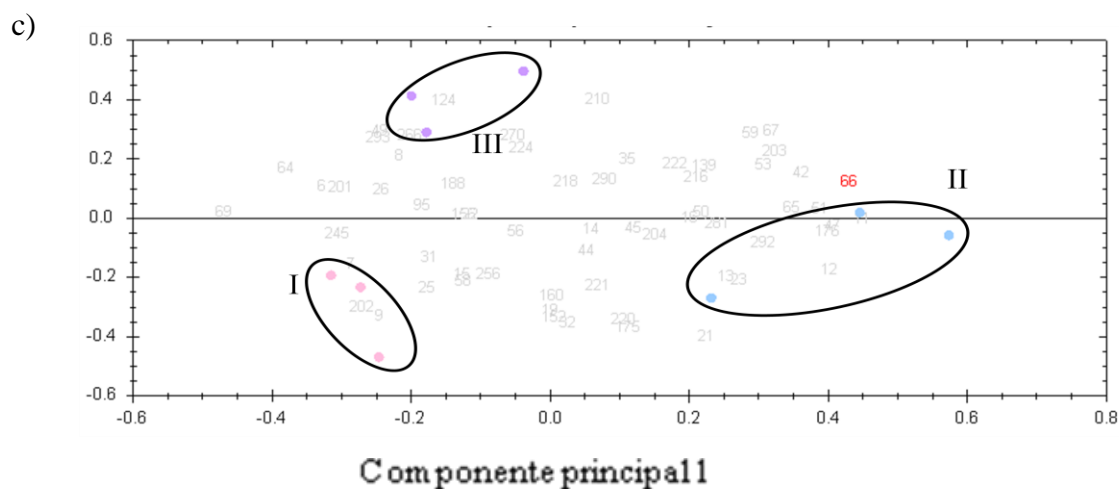


Figura 4. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas radiculares de trigo (*T. aestivum* L.) por variedad para el primer (a), segundo (b) y tercer (c) experimento. Para la realización del ACP se seleccionaron todas las proteínas detectados por el software de análisis de imágenes. El grupo I con los puntos en color rosado representan los tres geles control de Chinese spring, el grupo II con los puntos azules los geles control de Norwich y el grupo III con los puntos púrpuras de Opata.

#### 7.4 Patrón 2D de los proteomas de Chinese spring, Norwich y Opata inoculadas con *A. brasilense* Cd

##### a) Análisis de componentes principales

Con el objeto de revisar la reproducibilidad técnica, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de proteínas ( $p < 0.05$ ) por variedad para cada experimento. Los ACP's mostraron que los geles control formaron agrupados distintamente a los geles tratamientos, observándose una clara separación entre ellos. La Figura 5 muestra la agrupación antes mencionada para el caso del experimento número dos.

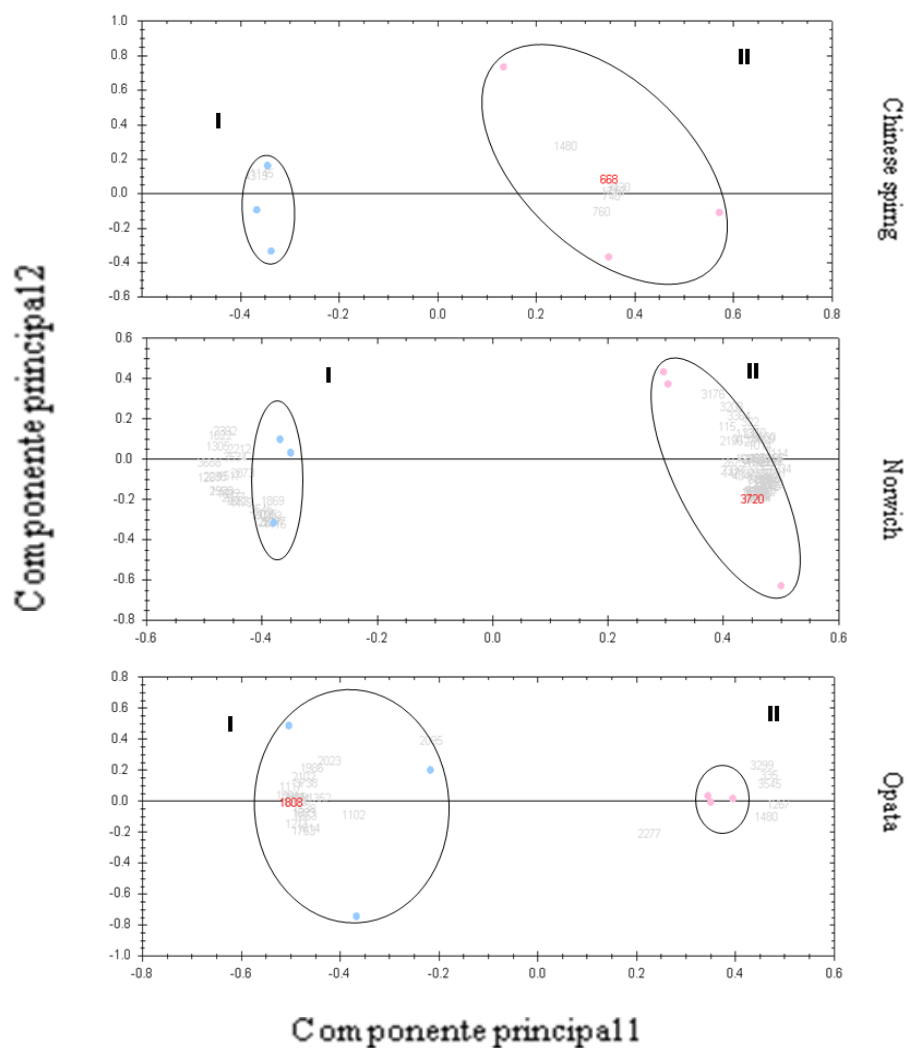


Figura 5. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas radicales de las variedades trigo (*T. aestivum* L.) Chinese spring, Norwich y Opata para las réplicas técnicas control y tratamiento del segundo experimento. Las proteínas que se incluyeron en el ACP fueron aquellos que tuvieron un  $p < 0.05$  en el análisis de imágenes. En cada uno de los análisis el grupo I con los puntos en color azul representan las réplicas técnicas del control y el grupo II con los puntos rosados representan las réplicas técnicas del tratamiento.

### b) Proteínas con expresión diferencial en cada variedad

En la Tabla III se puede observar el número de proteínas que presentaron expresión diferencial debido a la inoculación con *A. brasilense* Cd y que se encontraba consistentemente presente en al menos dos experimentos por variedad. El genotipo Chinese spring presentó un patrón 2D similar en ausencia o en presencia de *A. brasilense* Cd, con solo dos proteínas con expresión diferencial detectadas en el análisis de imagen. Por otro lado, los genotipos Opata y Norwich presentaron una mayor variación en el número de proteínas expresadas diferencialmente. El hexaploide sintético Norwich presentó dos proteínas sobreexpresadas y once proteínas que disminuyeron su expresión, mientras que el genotipo Opata tuvo nueve proteínas sobreexpresadas.

Tabla III. Proteínas con expresión diferencial en presencia de *A. brasilense* Cd.

<b>Variedad</b>	<b>Reguladas a la baja</b>	<b>Reguladas a la alta</b>
Chinese spring	-	2
Opata	-	9
Norwich	11	2

### c) Proteínas con expresión diferencial ante la presencia de la bacteria atenuada.

La inoculación de raíces con *A. brasilense* Cd atenuada dio como resultado la detección de cuatro proteínas con expresión diferencial en el genotipo Chinese spring. El genotipo

Norwich presentó cinco proteínas con expresión diferencial, mientras que el genotipo Opata. Ninguna de estas proteínas concordó con las que disminuyeron su expresión o se sobreexpresaron en el experimento con bacterias viables. Estas proteínas con expresión diferencial en presencia de *A. brasilense* Cd atenuada no fueron cortadas para su identificación, ya que el protocolo exige al menos dos réplicas experimentales biológicas.

### **7.5 Proteínas con expresión diferencial de Chinese spring inoculado con *A. brasilense* Cd.**

Para las dos proteínas que presentaron expresión diferencial en presencia de la bacteria se obtuvieron los patrones de expresión en base a la media del volumen normalizado de cada réplica técnica y cada experimento (Tabla IV). Para el caso de la variedad Chinese spring se encontraron solamente proteínas sobreexpresadas.

#### **a) Proteínas sobreexpresadas.**

En Chinese spring se detectaron dos proteínas sobreexpresadas en presencia de *A. brasilense* Cd. La Figura 6 (b) muestra la ubicación de las proteínas, ambas tienen un peso molecular aproximado de entre 60-100 KDa y un pH de entre 4-7. La proteína 588 tiene un peso molecular y un pH mayor que la 821. La Tabla IV muestra los patrones de expresión, donde la media de los volúmenes normalizados obtenidos de los geles inoculados con *A. brasilense* Cd son mayores que los obtenidos a partir de los controles. Para la proteína 821 se detectó expresión diferencial en el experimento 1 y 2, mientras que la proteína 588 se encontró diferencialmente expresada en los experimentos 1 y 3.

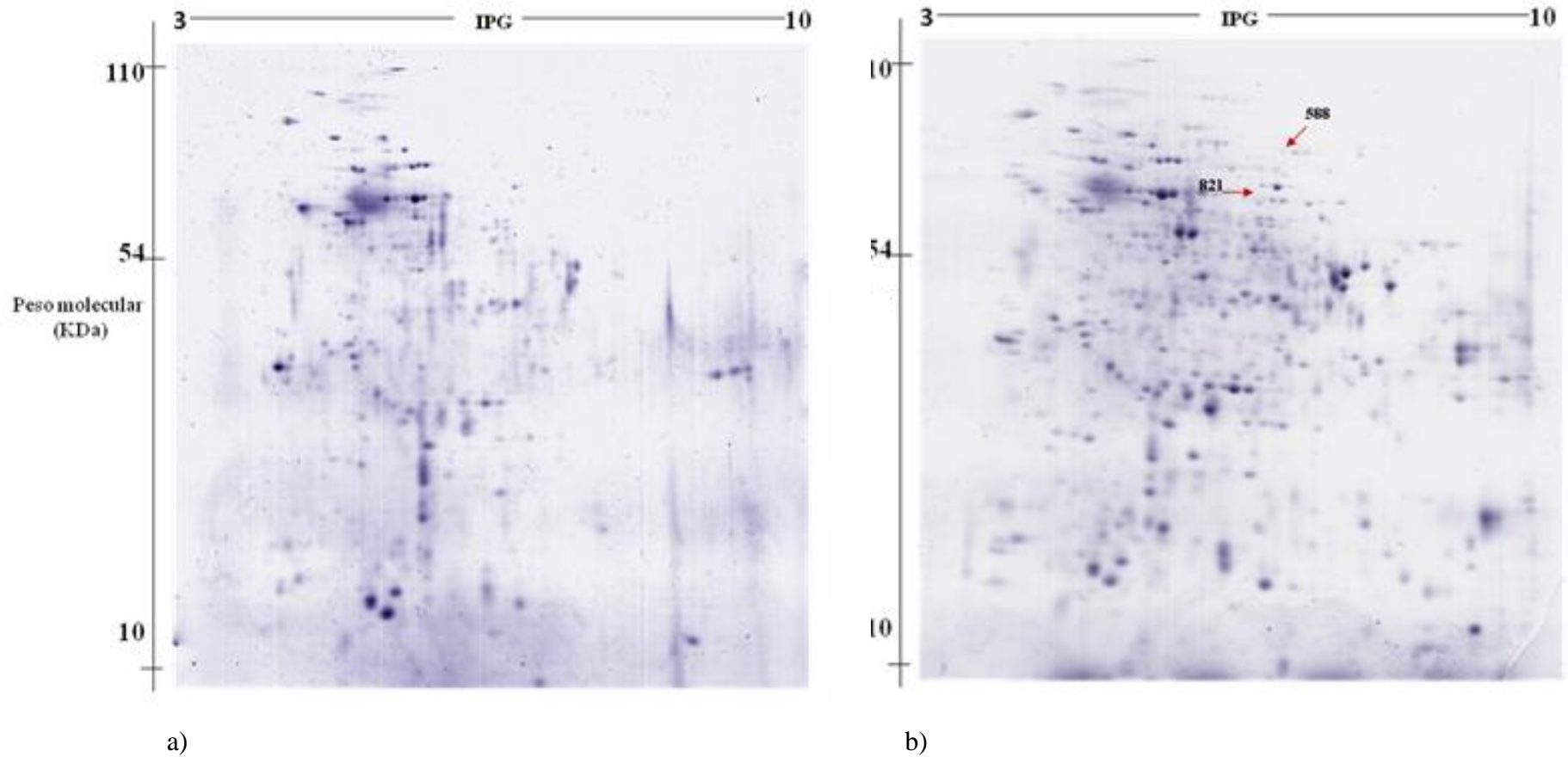


Figura 6. Gel de cv. Chinese spring control (a) e inoculada con *A. brasilense* Cd (b). En flechas rojas se marcan las proteínas sobreexpresadas para en este genotipo.

Tabla IV. Patrón de expresión de las proteínas que presentaron expresión diferencial ante la presencia de *A. brasilense* Cd en la cv. Chinese spring. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas realizadas.

Núm <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>		
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento
821*	N.I.			N. D.
588	N.I.		N. D.	

a: \* indica las proteínas que se eligieron para el análisis MALDI TOF/TOF MS y MS/MS en base a la intensidad de las proteínas.

b: N.I. indica proteína no identificada.

c: Patrón de expresión en base al volumen normalizado de las proteínas. Cada gráfica corresponde a un experimento, N.D. indica que no se detectó diferencia significativa para esa proteína en el experimento. Dentro de cada gráfica, en el eje “x”, las primeras tres barras (de izquierda a derecha) corresponden a las tres réplicas técnicas del control y las últimas tres barras corresponden al tratamiento, el eje “y” equivale al volumen normalizado de cada proteína x 10000.

#### **b) Proteínas seleccionados para análisis de identificación MALDI TOF/TOF MS y el análisis MS/MS**

Para el análisis de identificación, se eligieron las proteínas con mayor intensidad, considerando que de esta manera se tendría una mayor probabilidad de identificarlos, ya que las proteínas con baja intensidad no presentan la cantidad suficiente para proporcionar un espectro de péptidos adecuado que permita compararse con las bases de datos. Otras características que se tomaron en cuenta para la selección de las proteínas que serían identificados son que se encontraran presentes en al menos dos experimentos y que presentaran el mismo patrón de regulación. En el caso de la variedad Chinese spring, de un total de dos proteínas, se seleccionó la proteína 821 (marcado con \* en la Tabla IV).

#### **7.6 Proteínas con expresión diferencial de Opata inoculada con *A. brasilense* Cd.**

En la variedad Opata se presentaron únicamente proteínas con expresión diferencia sobreexpresadas, tal como sucedió con la Chinese spring.



**a) Número total de proteínas sobreexpresadas.**

Se encontraron nueve proteínas sobreexpresadas ante la presencia de *A. brasilense* Cd en Opata. La ubicación de las proteínas se puede observar en la Figura 7, estas proteínas presentan un pH ácido o cercano a neutro y aparentemente cuentan con un peso molecular que va de aproximadamente 40-90 KDa, concentrándose principalmente en los 50 KDa. Sus correspondientes patrones de expresión se muestran en la Tabla V y A, excepto de la proteína 1196 que fue detectada en los experimentos 1 y 3, las demás proteínas sobreexpresadas se detectaron en los experimentos 1 y 2.

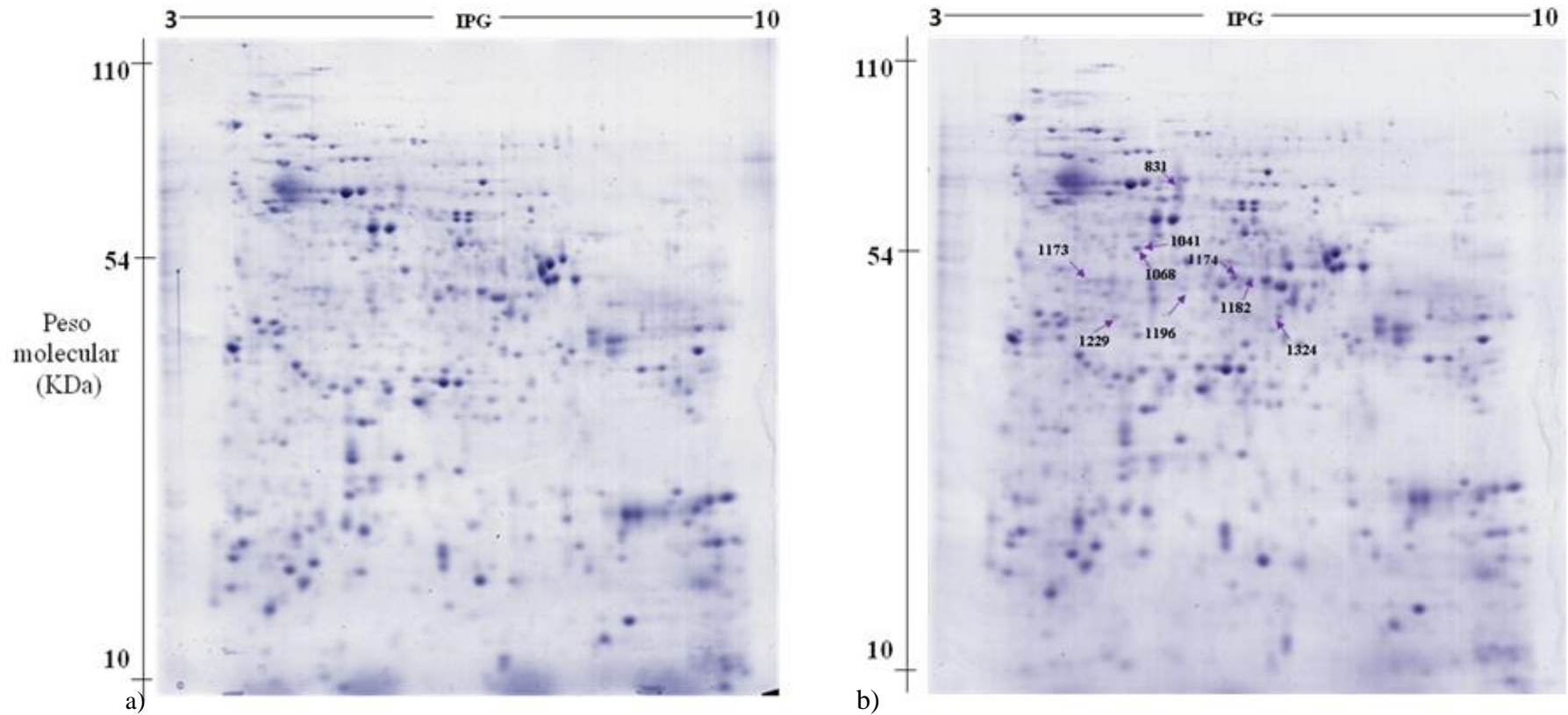


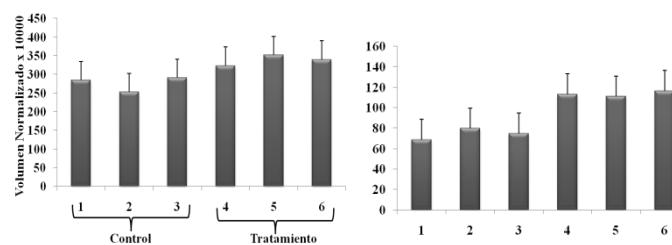
Figura 7. Gel de cv. Opata control (a) e inoculada con *A. brasilense* Cd (b). En flechas púrpuras se marcan las proteínas sobreexpresadas para en este genotipo.

Tabla V. Patrón de expresión de las proteínas que presentaron expresión diferencial ante la presencia de *A. brasilense* Cd en la variedad Opata. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas para los tres experimentos y las tres réplicas técnicas realizadas.

Núm <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>		
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
831*	N.I.			N. D.
1041*	N.I.			N. D.
1068*	Metionina adenosiltransferasa			N. D.

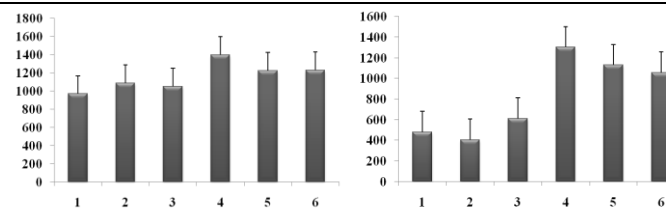
1173\*

N.I.



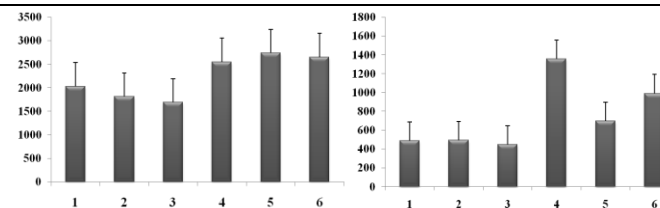
N. D.

1174\*

Malato  
deshidrogenasa

N. D.

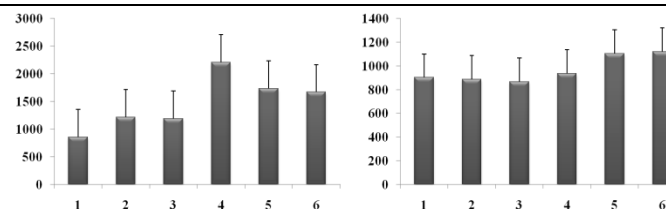
1182\*

Gliceraldehido-3-  
fosfato-  
deshidrogenasa

N. D.

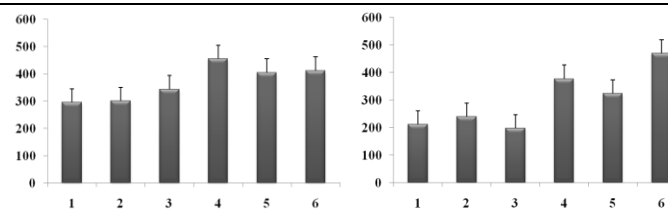
1229

N.I.



N. D.

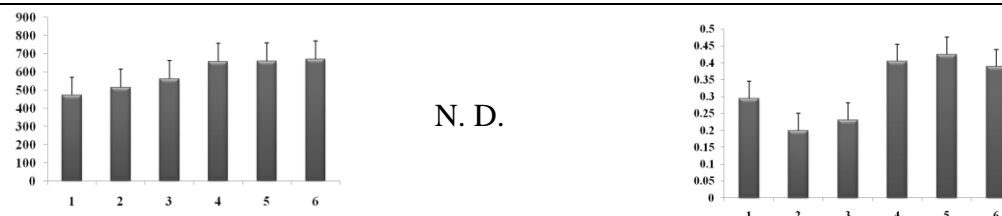
1324\*

Malato  
deshidrogenasa

N. D.

1196\*

N.I.



N. D.

**b) Proteínas seleccionadas para análisis de identificación MALDI TOF/TOF MS y el análisis MS/MS**

El genotipo Opata presentó un total de nueve proteínas sobreexpresadas, de las cuales se seleccionaron ocho proteínas en base a su intensidad para el análisis de identificación. Las proteínas marcadas con \* en la Tabla V son las que fueron cortadas y posteriormente sometidas al análisis de identificación.

**7.7 Proteínas con expresión diferencial de Norwich en condiciones de inoculación con *A. brasilense* Cd.**

La variedad Norwich, a diferencia de Chinese spring y Opata, quienes solo presentaron proteínas sobreexpresadas, presentó proteínas tanto que aumentaban como que disminuían su expresión.

**a) Número total de proteínas que disminuyeron su expresión.**

En la variedad Norwich las proteínas que disminuyeron su expresión fueron más abundantes que las sobreexpresadas. Se detectaron once proteínas que disminuyeron su expresión (Figura 8-a). El peso molecular de estas proteínas estuvo aproximadamente entre 40-100 KDa y un pH ácido o ligeramente básico. Los patrones de expresión de estas proteínas se presentan en la Tabla VI, todas las proteínas se detectaron en los experimentos 1 y 2.

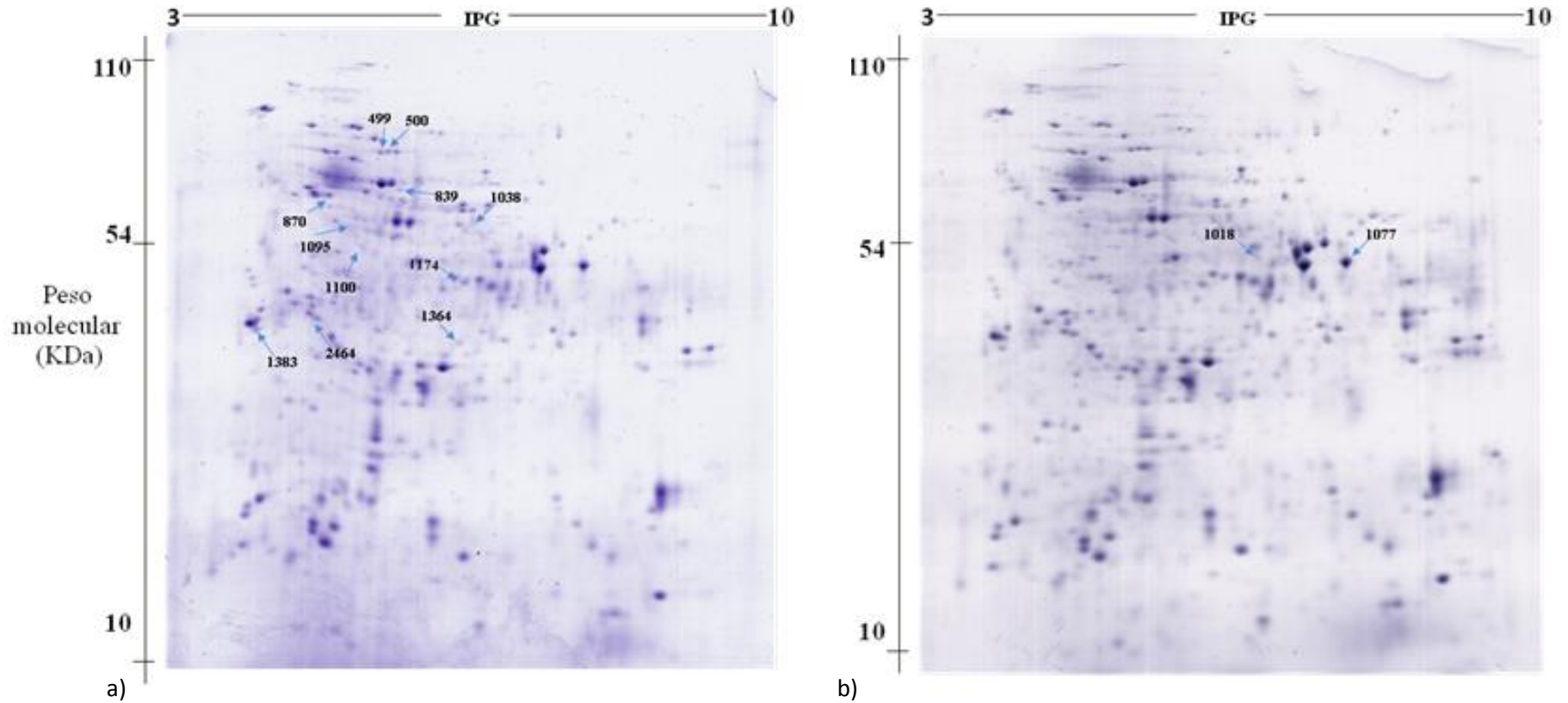


Figura 8. Gel del hexaploide sintético Norwich control (a) en el cual se marcan las proteínas que disminuyeron su expresión Norwich inoculado con *A. brasilense* Cd (b), en flechas azules se marcan las proteínas sobreexpresadas para en este genotipo.

Tabla VI. Patrón de expresión de las proteínas que disminuyeron su expresión en la variedad Norwich. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas.

Núm <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>		
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
499*	Proteína hipotética			N. D.
500*	HSP70			N. D.
839*	N.I.			N. D.



870*	N.I.		N. D.
1038	N.I.		N. D.
1095	N.I.		N. D.
1100	N.I.		N. D.

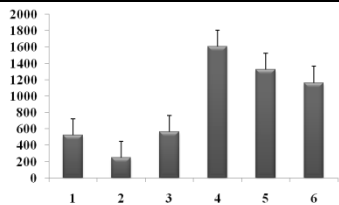
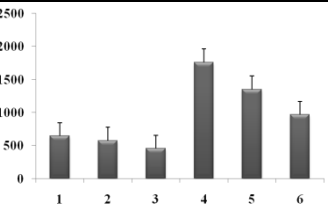
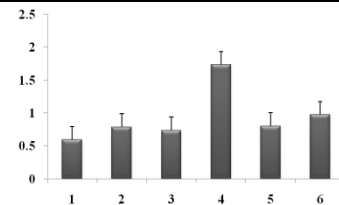
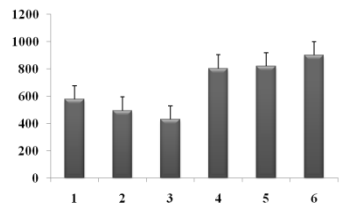
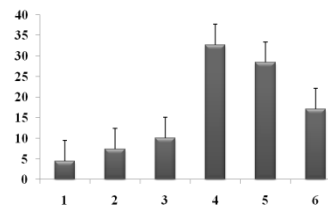
1174*	Malato deshidrogenasa		N. D.
1364*	N.I.		N. D.
1383*	N.I.		N. D.
2464*	N.I.		N. D.

**a) Número total de proteínas sobreexpresadas.**

En cuanto a las proteínas sobreexpresadas de Norwich, se detectaron dos proteínas (Figura 8-b) con un peso molecular de alrededor de 50 KDa y pH cercano al neutro y básico. Los patrones de expresión (Tabla VII) del spot 1077 mostraron expresión

diferencial para los tres experimentos, teniendo para los dos primeros en el control una volumen normalizado aproximado de 500 mil y para el tercero de 750. En presencia de *A. brasilense* se encontró para la proteína 1077 en los dos primeros experimentos una máxima de la media del volumen normalizado de aproximadamente 1800, y en el tercer experimento fue de 1.7 mil. Con respecto a la proteína 1018 se detectó una media del volumen normalizado máxima menor de 600, mientras que para los que se inocularon con la bacteria tuvieron un volumen normalizado menor de 800.

Tabla VII. Patrón de expresión de las proteínas sobreexpresadas en la variedad Norwich. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas.

Núm <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>		
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
1077*	UDP-D-Gluconato decarboxilasa			
1018*	N.I.			N. D.

## **b) Proteínas seleccionados para el análisis de identificación MALDI TOF/TOF MS y el análisis MS/MS**

Para el análisis de identificación se procedió a cortar proteínas de la variedad Norwich sobreexpresadas y que disminuyeron su expresión. Se eligieron nueve proteínas cuya expresión disminuyó y dos proteínas sobreexpresadas (marcados con \* en las Tablas VI y VII respectivamente). Norwich fue el genotipo del cual se cortó un mayor número de proteínas para su identificación, gracias a su alta intensidad.

### **7.8 Patrón 2D de los proteomas de Chinese spring, Opata y Norwich control y bajo estrés salino.**

El experimento de inoculación de *A. brasilense* Cd en las raíces de trigo bajo condiciones de estrés salino se llevó a cabo utilizando HSH que contenía 150mM de NaCl (conductancia eléctrica (CE)=12dSm<sup>-1</sup>) Se seleccionó esta concentración de NaCl ya que, las variedades empleadas para este experimento, Chinese spring y Opata son medianamente halotolerantes a ésta CE (Díaz De León *et al.*, 2000). La variedad Norwich no fue empleada en este experimento por falta de disponibilidad de semillas.

## 7.9 Descripción del patrón 2D de los proteomas de Opata y Chinese spring condiciones de inoculación bajo estrés salino.

### a) Análisis de componentes principales

Para revisar la reproducibilidad técnica en este experimento, se llevó a cabo un ACP de proteínas ( $p < 0.05$ ) por variedad para cada experimento. El ACP arrojó que las réplicas técnicas tanto de Opata como de Chinese spring se separan en control y tratamiento (Figura 9), este comportamiento se expone también en los experimentos uno y tres (no se muestran los ACP). Al comprobarse la reproducibilidad técnica, se procedió a utilizar estas imágenes para los experimentos comparativos control-tratamiento.

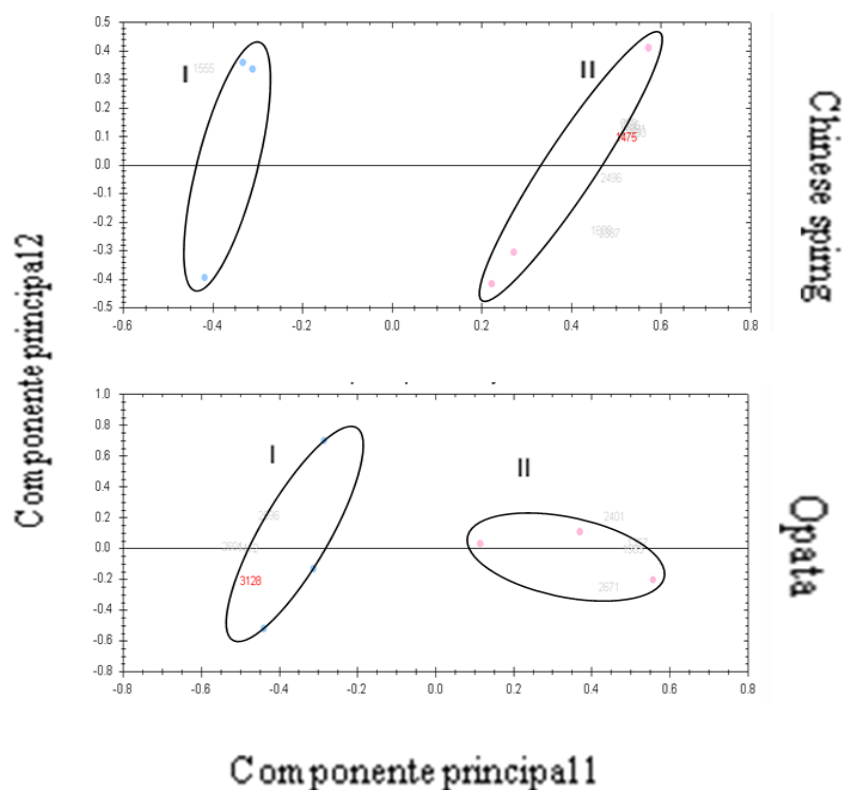


Figura 9. Análisis de componentes principales de la expresión de proteínas de las raíces de las variedades trigo (*Triticum aestivum*) Chinese spring y Opata para las tres réplicas

técnicas del control y tratamiento de la segunda réplica biológica en el experimento en condiciones de estrés salino. Las proteínas incluidas en el ACP tuvieron un  $p < 0.05$  en el análisis de imágenes. El grupo I con los puntos en color azul representan las réplicas técnicas del control y el grupo II con los puntos rosados las réplicas técnicas del tratamiento.

### c) Proteínas con expresión diferencial

Con respecto a las proteínas que presentaron expresión diferencial al inocular las raíces con *A. brasilense* Cd, se detectó una proteína con expresión diferencial en Chinese spring que disminuía su intensidad ante la presencia de la bacteria, mientras que Opata presentó seis proteínas con expresión diferencial al inocularse con *A. brasilense* Cd. Al comparar las proteínas con expresión diferencial de Chinese spring y Opata, no se observaron proteínas con la misma ubicación en los geles 2D en ambas variedades.

Tabla VIII. Proteínas con expresión diferencial en presencia de *A. brasilense* Cd en los experimentos en condiciones de estrés salino.

<b>Variedad</b>	<b>Infraexpresadas</b>	<b>Sobreexpresadas</b>
<b>Chinese spring</b>	<b>1</b>	<b>-</b>
<b>Opata</b>	<b>1</b>	<b>5</b>

#### d) Proteínas con expresión diferencial ante la presencia de la bacteria atenuada

Para los tres experimentos en condiciones de estrés salino, se adicionó un control negativo, la presencia de la bacteria atenuada a 70°C por media hora. En la comparación del análisis de imágenes entre los geles de las muestras control y aquellas que fueron inoculadas con la bacteria atenuada, en Chinese spring no se observó ninguna proteína con expresión diferencial, mientras que en la variedad Opata se encontró una proteína que disminuyó su expresión marcada como 1357, que estuvo presente en al menos dos experimentos. Para esta proteína también se obtuvieron los patrones de expresión que se observan en la Figura 10, donde los patrones de expresión para ambas replicas tienen la misma regulación. Esta proteína no fue sometida a identificación y no se encontró consistentemente presente al comparar control-*A. brasilense* Cd sin atenuar.

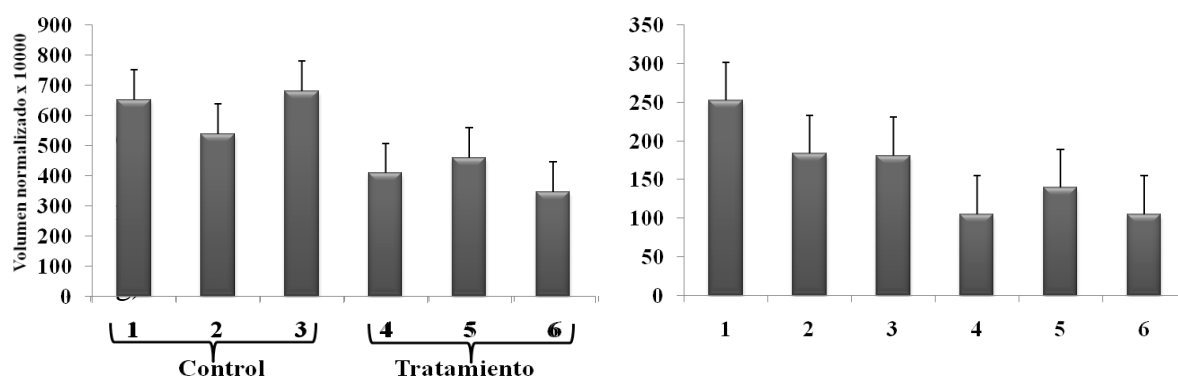


Figura 10. Patrón de expresión de la proteína 1357 de la variedad Opata. De izquierda a derecha, patrón encontrado en la réplica biológica número 1 y número 2.

### **7.10 Proteínas con expresión diferencial de Chinese spring inoculado con *A. brasilense* Cd en condiciones de estrés salino.**

#### **a) Número total de proteínas que disminuyeron su expresión.**

En la variedad Chinese spring se detectó una proteína cuya expresión disminuyó, en la Figura 11 se puede observar su ubicación en el gel. La proteína 2074 presenta un pH aproximado de entre 4-5 y un peso molecular de entre 40-50 KDa. En la siguiente Tabla IX se encuentra el patrón de expresión para dicha proteína, en los geles control se alcanzó una media del volumen normalizado máxima de 500 mil, mientras que para las muestra inoculada con *A. brasilense* Cd se alcanzó una media del volumen normalizado máxima de 800 mil.



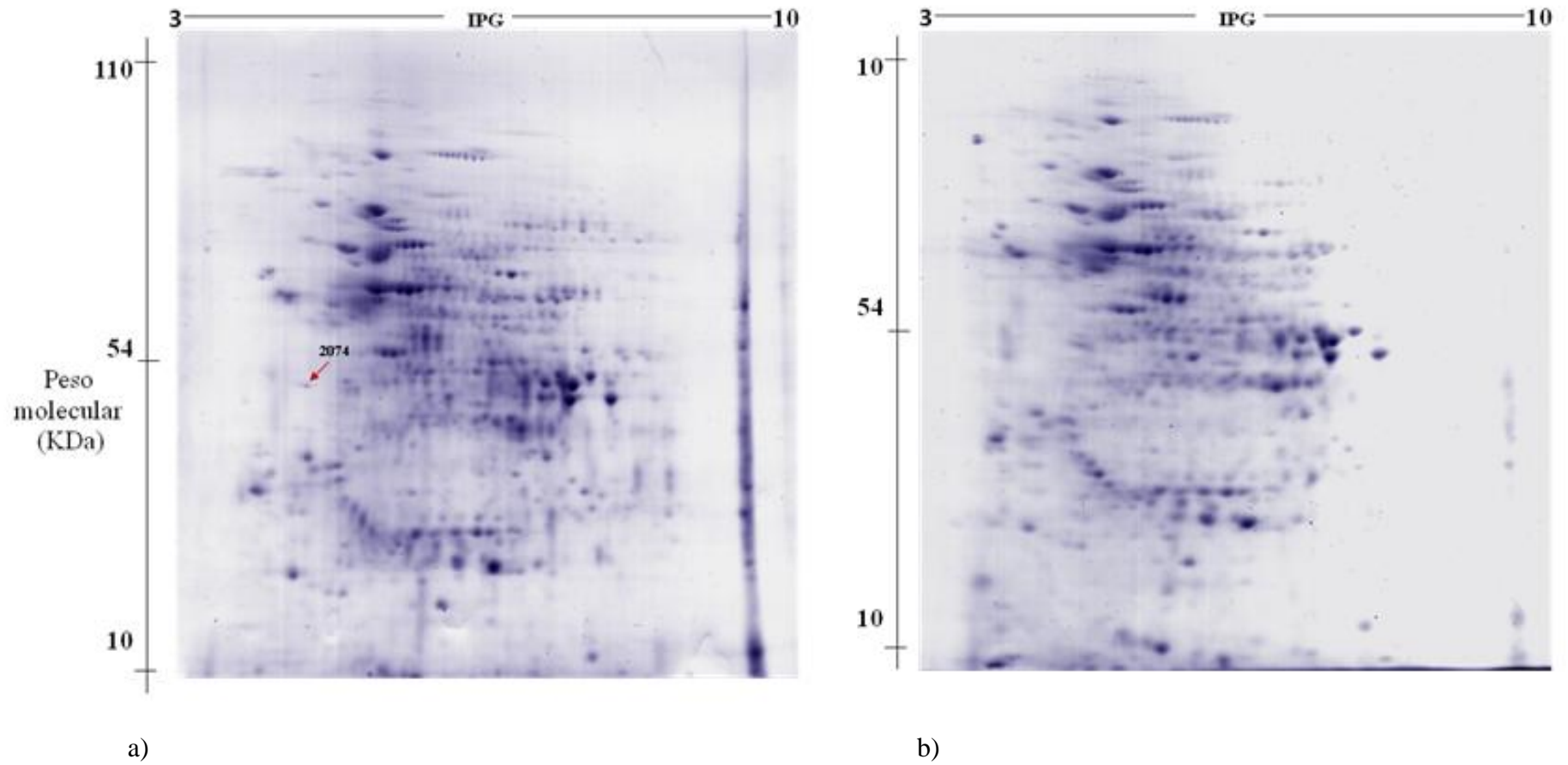


Figura 11. Gel de la cv. Chinese spring control (a) en el que se marca con una flecha roja la proteína 2074 y Chinese spring inoculado con *A. brasilense* Cd (b) en condiciones de estrés salino.

Tabla IX. Patrón de expresión de la proteína 2074 de Chinese spring. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas.

Núm <sup>a</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento
2074			N. D.

### b) Proteínas seleccionadas para el análisis de identificación MALDI TOF/TOF MS y el análisis MS/MS

La proteína 2074 de la variedad Chinese spring no fue utilizado para los análisis de identificación debido a la baja intensidad que éste presentaba.

### 7.11 Proteínas con expresión diferencial de Opata en condiciones de inoculación con *A. brasilense* Cd y con estrés salino.

#### a) Número total de proteínas que disminuyeron su expresión.

Al inocular las raíces de trigo cv. Opata se detectaron en total seis proteínas con expresión diferencial, de los cuales cinco disminuyeron su expresión. La Figura 12 (a) muestra las proteínas en el gel, estas proteínas se ubican a lo largo de todo el intervalo de pH, habiendo tanto proteínas en pH ácido, como básico y su peso molecular se

encuentra entre 10-50 KDa. En la Tabla X se presentan los patrones de expresión, en el que se observa que la proteína 2313 se detecto en todos los experimentos, mientras que el resto presentó expresión diferencial solamente en los experimentos 2 y 3.

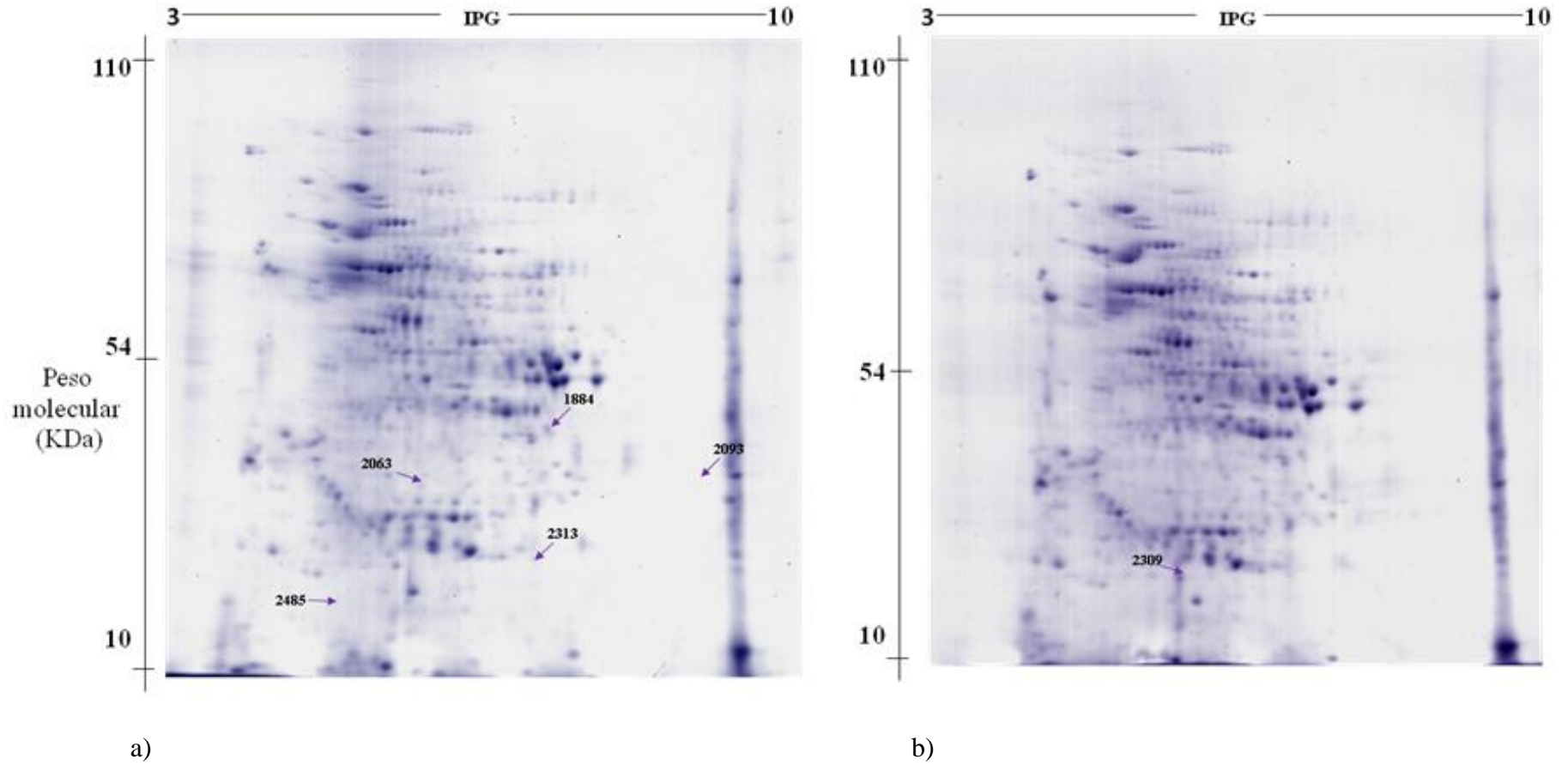
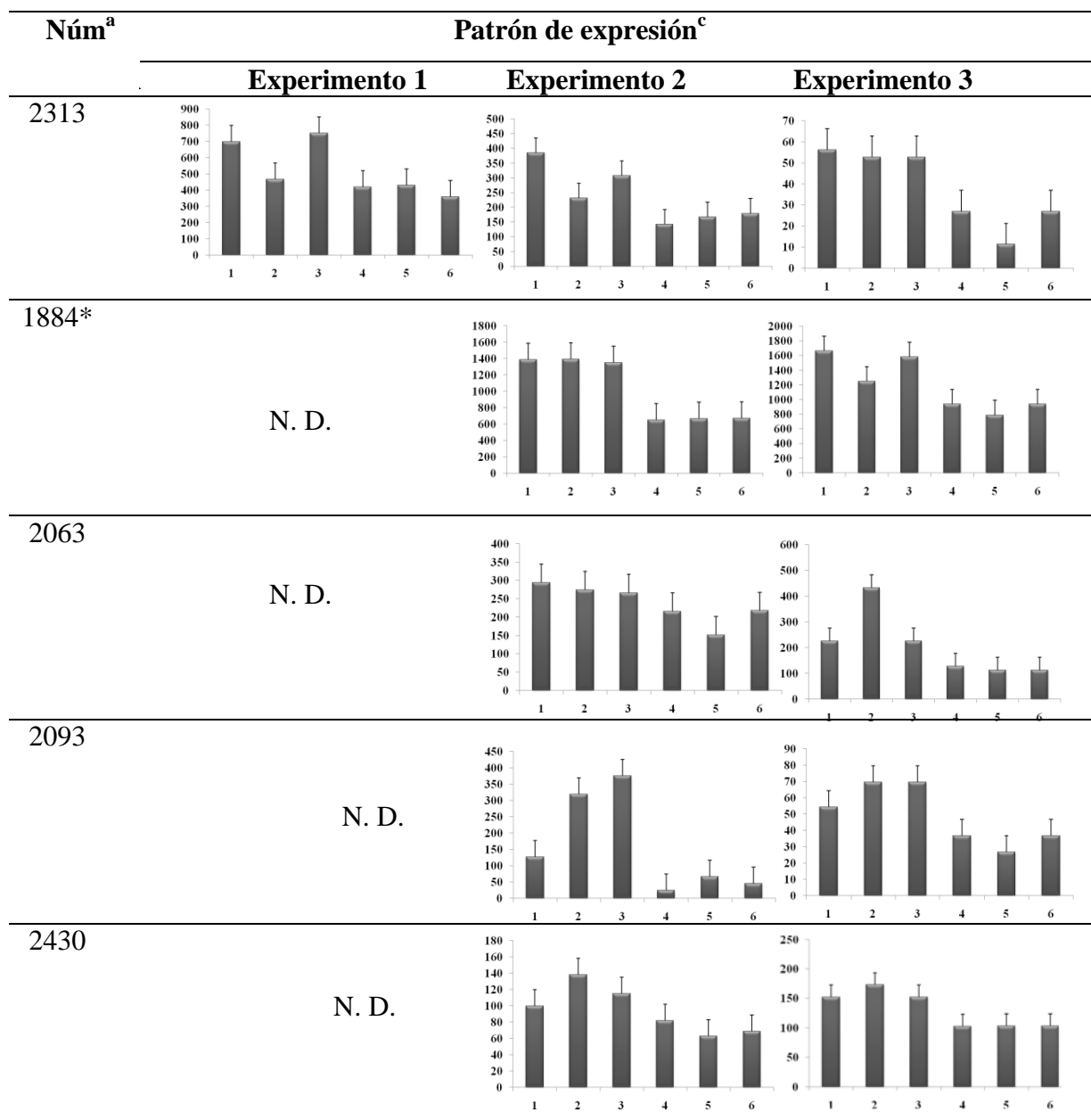


Figura 12. Gel del cv. Opata en condiciones de estrés salino control (a), en flechas púrpura se marcan las proteínas que disminuyeron su expresión en presencia de *A. brasilense* Cd. Opata inoculado con *A. brasilense* Cd (b), se marcan con una flecha las proteínas 2309 sobreexpresada.

Tabla X. Patrón de expresión de las proteínas que disminuyeron su expresión de Opata. Se presentan las gráficas a partir de la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas.



**b) Número total de proteínas sobreexpresadas.**

En cuanto a las proteínas sobreexpresadas de Opata, se detectó una proteína, en la Figura 12 (b) muestra su ubicación, lo que indica que su peso molecular es de aproximadamente entre 20-40 KDa y su pH es ligeramente ácido. El patrón de expresión se visualiza en la Tabla XI, en el segundo experimento la media del volumen normalizado para los controles alcanzó un máximo de 800 mil y para el inoculado con *A. brasilense* Cd se detectó un máximo de mil.

Tabla XI. Patrón de expresión de la proteína 2309 en base a la proporción relativa [%] de la media del volumen normalizado de las proteínas de los tres experimentos y las tres réplicas técnicas.

Núm <sup>a</sup>	Patrón de expresión <sup>c</sup>																														
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3																												
2309*	N. D.	<table border="1"> <caption>Data for Experimento 2 (Left Chart)</caption> <thead> <tr><th>Replica</th><th>Value</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>~800</td></tr> <tr><td>2</td><td>~650</td></tr> <tr><td>3</td><td>~700</td></tr> <tr><td>4</td><td>~1050</td></tr> <tr><td>5</td><td>~850</td></tr> <tr><td>6</td><td>~900</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <caption>Data for Experimento 3 (Right Chart)</caption> <thead> <tr><th>Replica</th><th>Value</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>~400</td></tr> <tr><td>2</td><td>~350</td></tr> <tr><td>3</td><td>~350</td></tr> <tr><td>4</td><td>~550</td></tr> <tr><td>5</td><td>~850</td></tr> <tr><td>6</td><td>~550</td></tr> </tbody> </table>		Replica	Value	1	~800	2	~650	3	~700	4	~1050	5	~850	6	~900	Replica	Value	1	~400	2	~350	3	~350	4	~550	5	~850	6	~550
Replica	Value																														
1	~800																														
2	~650																														
3	~700																														
4	~1050																														
5	~850																														
6	~900																														
Replica	Value																														
1	~400																														
2	~350																														
3	~350																														
4	~550																														
5	~850																														
6	~550																														

**c) Número total de proteínas cortadas que disminuyeron su expresión y sobreexpresadas.**

Para la identificación por MALDI TOF/TOF MS con la técnica analítica de huella peptídica y el análisis MS/MS se eligieron las proteínas 1884 y 2309 que disminuyeron

su expresión. Solamente se eligieron dos proteínas, ya que la intensidad del resto era muy baja, se puede observar en la Figura 11 y 12 que estas son prácticamente imperceptibles al ojo humano y por lo tanto resulta difícil extraerlos manualmente de los geles 2D y una concentración proteica tan baja se vería reflejada en problemas para la identificación.

Las secuencias de las dos proteínas seleccionadas no concordaron con secuencia alguna de las bases de datos utilizadas. Por lo que al momento son proteínas no identificadas.

#### **7.12 Comparación de los experimentos sin estrés salino y en condiciones de estrés salino.**

Al comparar las proteínas con expresión diferencial en los experimentos en ausencia de estrés salino y aquellos encontrados en el experimento con estrés salino, ninguna de estas proteínas se ubicó en los dos experimentos. Sin embargo, es necesario aclarar que no se realizó un análisis con el software de análisis de imagen en el que se compararan estos experimentos, para conocer las diferencias, por ejemplo, entre las imágenes obtenida de las muestra control en ausencia de estrés salino comparadas con las de estrés salino.

### **7.13 Identificación de proteínas en condiciones de inoculación, sin y bajo estrés salino.**

Las proteínas marcados con \* en las Tabla IV, V, VI, VII y X fueron aquellos seleccionados para la identificación y fueron cortados manualmente de geles 2D. En total para el experimento de inoculación en ausencia de estrés salino se seleccionaron 19 proteínas (una de Chinese spring, ocho de Opata y diez de Norwich) para el análisis de identificación. Para cada proteína se obtuvo un espectro MALDI TOF/TOF MS y un espectro del análisis MS/MS que fue comparado con las bases de datos NCBI, TIGR y harvEST. De las 19 proteínas procesadas para su identificación, originadas del experimento de inoculación sin estrés salino, fueron identificadas siete proteínas y una proteína hipotética (Tablas XII y XIII), lo que corresponde al 42.1% del total de proteínas sometidas a identificación. Mientras que las dos proteínas del experimento en condiciones de estrés salino no fueron asociadas a las secuencias descritas en las bases de datos consultadas.

#### **a) Chinese spring**

En el caso de la variedad Chinese spring, las proteínas procesadas no fueron identificadas en las bases de datos con las que se compararon, tanto del experimento de inoculación sin estrés salino, como en el experimento de inoculación en condiciones de estrés salino.



## b) Norwich

Para la variedad Norwich, se lograron identificar tres proteínas y una proteína hipotética.

A continuación se presentan los espectros MALDI obtenidos para algunas proteínas identificadas en la variedad Norwich.

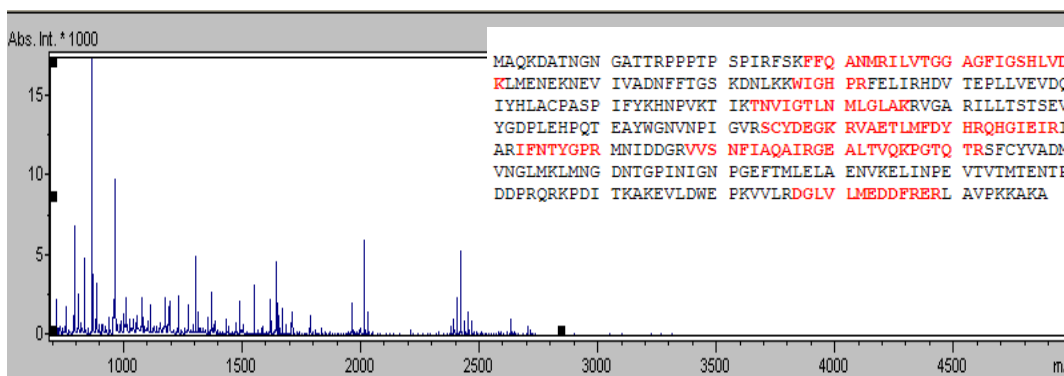


Figura 13. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1077.

La proteína fue identificada como UDP-D-Gluconato decarboxilasa (gi:50659026).

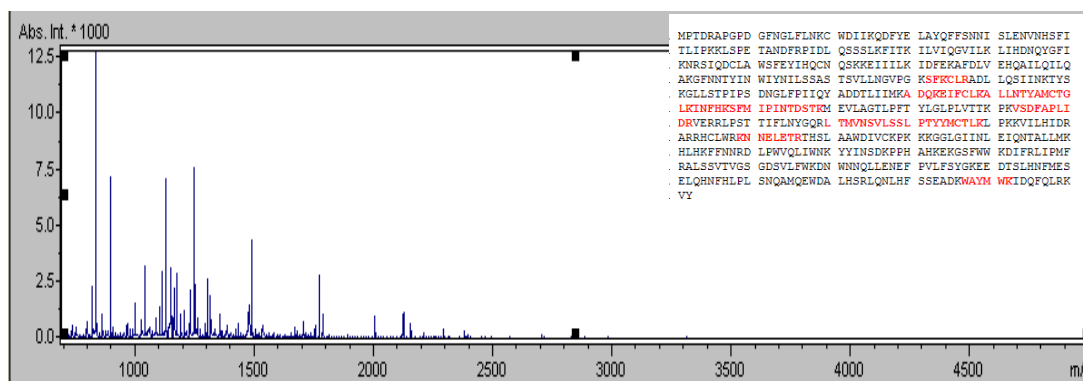


Figura 14. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 499. La proteína fue identificada como una proteína hipotética en *Oryza sativa* (gi:57863881).

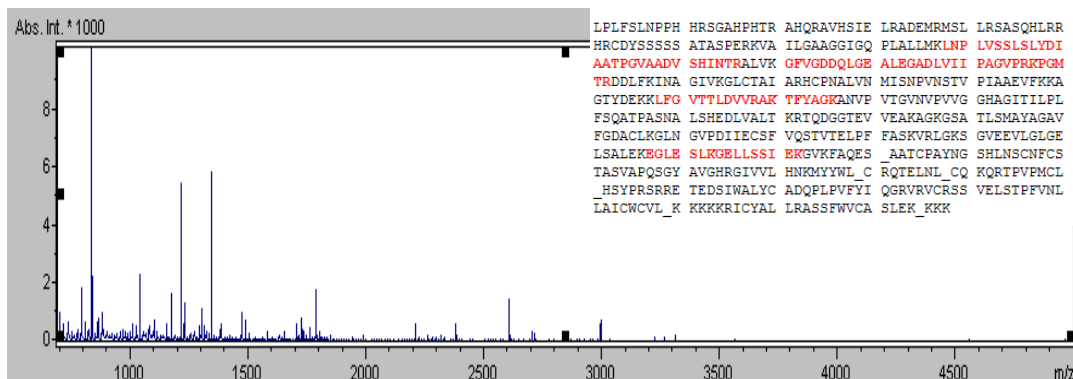


Figura 15. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1174.

La proteína fue identificada como Malato deshidrogenasa (gi:37928995).

En la Tabla XII se encuentran las proteínas identificadas para Norwich y la proteína correspondiente a cada una de estas. Se presentan también los números de accesos para las diferentes bases de datos en las que se buscaron, los espacios en blancos para esta sección indican que la proteína no fue identificada en la base de datos.

Tabla XII. Proteínas de la raíz del trigo Norwich en interacción con *Azospirillum brasilense* Cd en el experimento sin estrés salino, identificadas por MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS.

Núm <sup>a</sup>	Identidad de la proteína	Num. de acceso <sup>b</sup>			PM (KDa)/pI <sup>c</sup>	C. S. <sup>d</sup>	E <sup>e</sup>	NP <sup>f</sup>
		NCBI	TIGR	harvEST				
1077	UDP-D-Gluconato decarboxilasa, <i>Hordeum vulgare</i> .	gi:50659026	TC493	35_14654	53.391/8.54	38	U	14
499	Proteína hipotética, <i>Oryza sativa</i> .	gi:57863881			39.592/6.64	16	U	8
500	HSP70, <i>Hordeum vulgare</i>	gi:476003		35_47882	66.975/5.76	22	D	9
1174	Malato deshidrogenasa, <i>Triticum aestivum</i> .	gi:37928995	TC369527	35_36841	24.332/6.6	64	D	11

a: Número de proteína.

b: Número de acceso de la base de datos de NCBI, TIGR y harvEST

c: Peso molecular teórico en KDa /punto isoeléctrico teórico.

d: Cobertura de la secuencia de la proteína buscada por MASCOT

e: E indica la expresión de la proteína U, sobreexpresadas ; D, que disminuyeron su expresión.

f: Número de péptidos identificados en la proteína.

### c) Opata

Para la variedad Opata, se lograron identificar cuatro proteínas. Las Figuras 25, 26 y 27 muestran espectros MALDI de dichas proteínas, el espectro para la proteína 1174 correspondiente a la malato deshidrogenasa se puede observar en la Figura 24 en el apartado de Norwich.

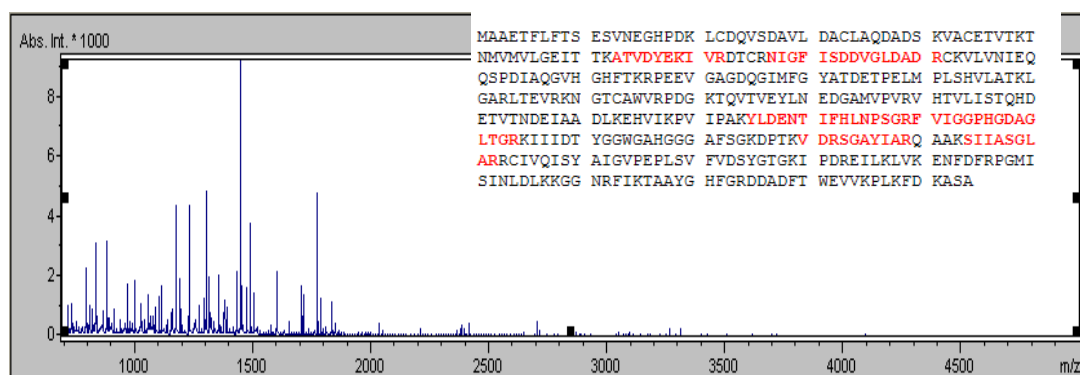


Figura 16. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1068. La proteína fue identificada como Metionina adenosiltransferasa (gi:122220777).

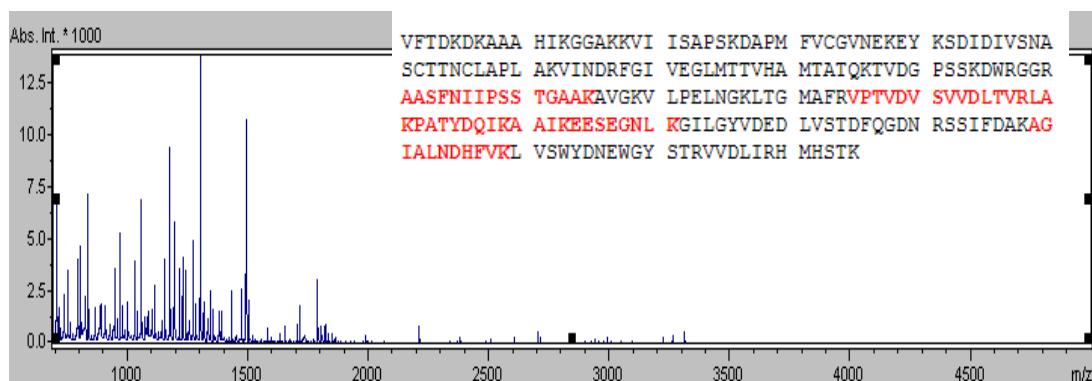


Figura 17. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1182. La proteína fue identificada como Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (gi:7579064).

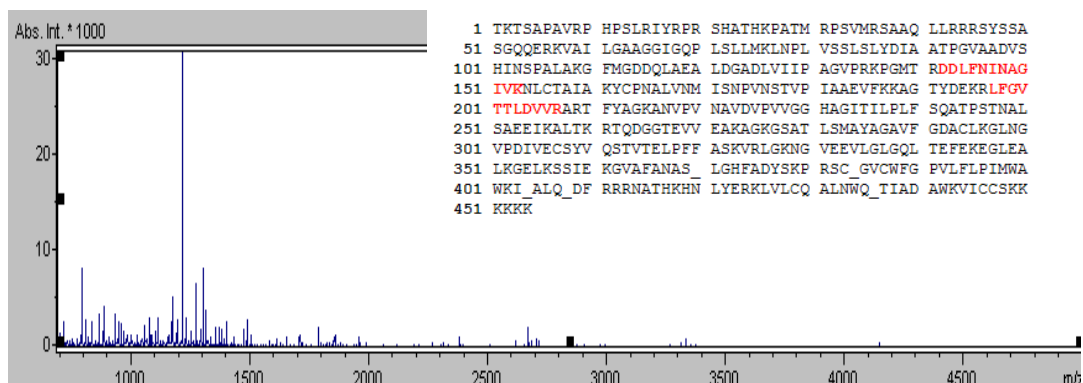


Figura 18. Espectro obtenido del análisis MALDI TOF/TOF MS para la proteína 1324. La proteína fue identificada como Malato deshidrogenasa (gi:2827080).

En la Tabla XIII se encuentra la lista de proteínas identificadas para Opata, así como la proteína que le corresponde a cada una de estas y algunas características teóricas como peso molecular y punto isoeléctrico. A excepción de la glicerladehído-3-fosfato-deshidrogenasa, el resto de las proteínas fueron identificadas en las tres bases de datos con las que se compararon los espectros.

Tabla XIII. Proteínas de la raíz del trigo cv. Opata en interacción con *Azospirillum brasilense* Cd en el experimento sin estrés salino, identificadas por MALDI-TOF/TOF MS y MS/MS.

Núm <sup>a</sup>	Identidad de la proteína	Num. de acceso <sup>b</sup>			PM (KDa)/pI <sup>c</sup>	C. S. <sup>d</sup>	E <sup>e</sup>	NP <sup>f</sup>
		NCBI	TIGR	harvEST				
1068	Metionina adenosiltransferasa, <i>Hordeum vulgare</i> .	gi:122220777	TC452907	35_368	42.739/5.51	18	U	7
1174	Malato deshidrogenasa <i>Triticum aestivum</i>	gi:37928995	TC369527	35_36841	24.332/6.6	64	U	11
1182	Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, <i>Triticum aestivum</i> .	gi:7579064			25.277/7.83	26	U	5
1324	Malato deshidrogenasa, <i>Medicago sativa</i> .	gi:2827080	TC370105	35_169	24.332/6.6	64	U	5

a: Número de proteína.

b: Número de acceso de la base de datos de NCBI, TIGR y harvEST

c: Peso molecular teórico en KDa /punto isoeléctrico teórico.

d: Cobertura de la secuencia de la proteína buscada por MASCOT

e: E indica la expresión de la proteína U, sobreexpresadas; D, que disminuyeron su expresión.

f: Número de péptidos identificados en la proteína.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd en el proteoma de las raíces de trigo sin estrés salino.

Al comparar el proteoma radicular de los tratamientos control y del tratamiento de inoculación con *A. brasilense*, se identificaron proteínas que se expresaron diferencialmente. El presente trabajo se basa fundamentalmente en los trabajos previamente realizados por Adriana Rojas Hernández y Rojas *et al.* (Tesis de Doctorado en desarrollo, U.A.S.; datos sin publicar) los cuales demuestran que la adhesión que *A. brasilense* Cd a trigos harineros es función del genotipo. En esta caracterización fenotípica se encontró que el cultivar Opata (con pedigree denificado), el cultivar Chinese spring (sin pedigree conocido) y el hexaploide sintético Norwich son polimórficos a la adhesión de la bacteria *A. brasilense* Cd. La bacteria se adhiere a los genotios Opata y el hexaploide sintético Norwich, mientras que no lo hace el genotipo Chinese spring. En base a estos datos primarios, la presente tesis establece como premisa que el fenotipo observado está altamente relacionado con una batería sistémica de proteínas que se expresan como respuesta a la detección de la presencia de la bacteria, así como los procesos de absorción, anclaje y colonización. Por lo que se tuvo como hipótesis que el genotipo Chinese spring no presentaría cambios en su proteoma al inocular sus raíces con *A. brasilense* Cd, mientras que en el caso de las variedades Opata y Norwich se esperarían patrones proteómicos alterados. Los resultados obtenidos del análisis de imágenes de patrones proteómicos 2D de los proteomas de las tres variedades en interacción con *A. brasilense* muestran que el genotipo Opata presentó nueve proteínas sobreexpresadas. En el caso de Norwich se encontraron dos proteínas sobreexpresadas y nueve cuya intensidad disminuyó (Tabla III).

Estos cambios observados en Opata y Norwich son altamente significativos ya que el genotipo Chinese spring únicamente presentó dos proteínas sobreexpresadas. A la vista de estos resultados la hipótesis de trabajo resulta ser verdadera.

De un total de 24 proteínas que presentaron expresión diferencial en las tres variedades (Tabla III), se eligieron, en base a su intensidad 19 proteínas para su hidrólisis y busecuenta identificación vía análisis MALDI-TOF MS (Tablas IV, V, VI y VII). De las 19 proteínas que se confrontaron con las bases de datos NCBI, harvEST y TIGR, se identificaron siete proteínas y una proteína hipotética (Tabla XII y XIII) lo que corresponde al 42.1% del total de proteínas. El resto de secuencias no se identificaron con secuencias conocidas previamente descritas en los bancos de datos.

#### **a) HSP70**

En el caso del experimento sin estrés salino desarrollado en la presente tesis, se detectó una HSP70 (proteína 500, Figura 10). Un estudio realizado por Petrak *et al.* (2008) identificó proteínas de choque térmico (*heat shock*), específicamente HSP60 y HSP27, argumentando que, la presencia de las proteínas de choque térmico y otras proteínas relacionadas con estrés se explica debido a que en gran parte de los experimentos, los tejidos estudiados se encontraban estresados bajo condiciones fisiológicas anormales (tejidos con tumores, tejidos enfermos o estados tóxicos). Como parte de la familia de HSPs, la HSP70 es inducida en respuesta a estrés ambiental, físico y químico, limitando los daños y facilitando la recuperación celular (Beere, 2004). Esta proteína se ha encontrado en la mayoría de los compartimentos celulares, incluyendo citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria y cloroplasto (Nover, 1991). Es importante considerar que las raíces de trigo



no se encontraban bajo condiciones fisiológicas anormales. Aunado a esto la expresión la proteína homóloga a la proteína de shock térmico HSP70 disminuyó. Estudios realizados en la interacción de *Trichoderma harzianum* T22 en las raíces del maíz reportan HSP70 con un aumento y disminución de expresión (Shoresh y Harman, 2008) sugiriendo que diferentes patrones de expresión de las HSP70 indican diferentes funciones. En este caso la reducción en la expresión de la HSP ante la presencia de *A. brasilense* puede darse como respuesta a la presencia de *A. brasilense*.

#### **b) UDP-D-Glucoronato descarboxilasa**

En el experimento de inoculación sin estrés salino también se observó la sobreexpresión de la UDP-D-glucoronato descarboxilasa en los geles obtenidos a partir de las muestras de raíz que no se encontraron en interacción con la bacteria, en comparación con los geles de las muestras que estuvieron en contacto con la bacteria (proteína 1077, Figura 8)

La UDP-D-glucoronato descarboxilasa es una enzima que cataliza la biosíntesis de UDP-D-xilosa (Figura 19; Zhang *et al.*, 2005). La UDP-D-xilosa (UDP-Xyl) es un azúcar involucrado en la síntesis de hemicelulosas (xiloglucano, xilano) de las paredes celulares de diversas plantas y metabolitos menores de las plantas (Harper y Bar-Peled, 2002).

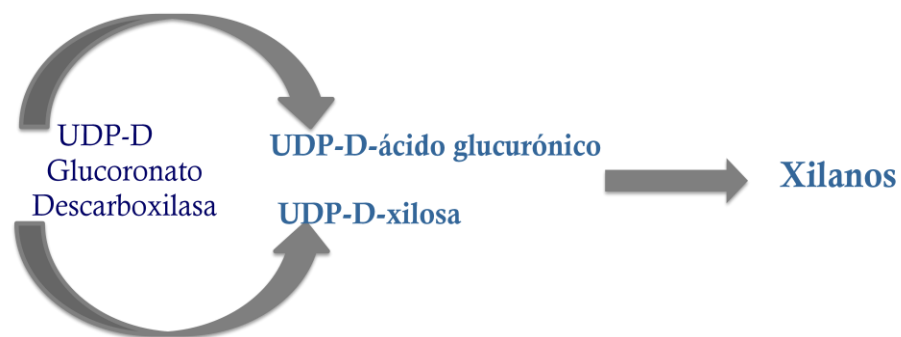


Figura 19. Síntesis de UDP-D-ácido glucurónico y UDP-D-xilosa teniendo como catalizador la UDP-D-glucoronato descarboxilasa.

La regulación de esta enzima es muy importante para entender la participación del carbono dentro de la vía de hemicelulosa desde el almidón, sucrosa y celulosa, los cuales involucran procesos irreversibles. Evidencia bioquímica sugiere que la expresión de UDP-glucosa deshidrogenasa y UDP-glucoronato descarboxilasa puede controlar el flujo de carbono dentro de la hemicelulosa dentro de diferentes tejidos vasculares (Harper y Bar-Peled, 2002; Bindschedler *et al.*, 2005). La sobreexpresión de la UDP-D-glucoronato descarboxilasa como efecto de la presencia de *A. brasilense* indica que la vía bioquímica en la que esta participa permite el incremento de la síntesis de la pared celular en las raíces de Trigo inoculadas con *A. brasilense*. Lo que también explica la estimulación de elongación celular y producción extraordinaria de pelos radiculares en presencia de *Azospirillum*.

### c) Malato deshidrogenasa

En cuanto a la malato deshidrogenasa, esta enzima fue detectada en tres proteínas, dos correspondientes a la variedad Opata y uno en la variedad Norwich. Sin embargo la

regulación en ambas variedades fue diferente, en la variedad Opata se observó que la expresión de la enzima fue en aumento, mientras que en la variedad Norwich el patrón de expresión disminuyó.

La malato deshidrogenasa (MDH; E. C. 1.1.1.37) es una enzima que participa en la deshidrogenación del malato para transformarlo en oxalacetato, como parte de una de las etapas de oxidación de los carbohidratos y de los ácidos grasos. Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un ion hidruro desde el malato al  $\text{NAD}^+$  para formar NADH, el otro átomo de hidrógeno abandona el grupo hidroxilo del malato y aparece como ion  $\text{H}^+$  libre (Figura 20; Melo y Cuamatzi, 2006).

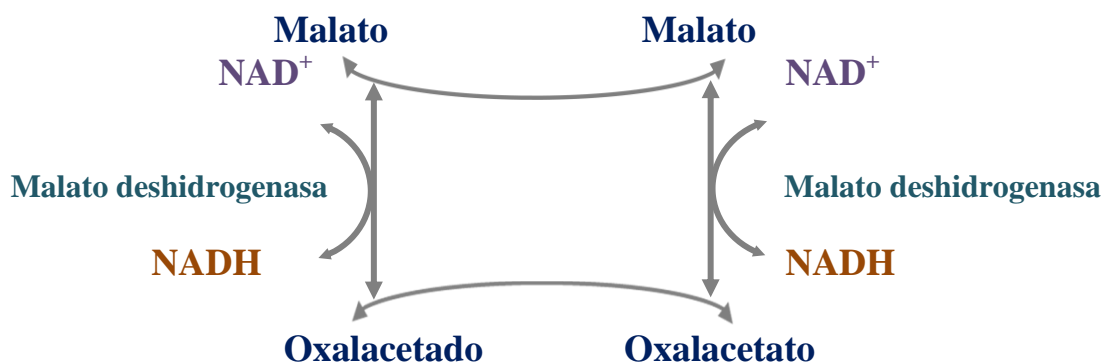


Figura 20. Reacción reversible de la formación de oxalacetato a partir de malato catalizada por la MDH.

En plantas, la MDH se encuentra localizada en el citoplasma, la mitocondria, peroxisomas, glioxisomas y cloroplastos (Beevers, 1979; Sternberg y Ting, 1979; Martinoia y Rentsch 1994; Córdoba-Pedregosa *et al.*, 1998). Esta enzima clave en la vía de los ácidos

tricarboxílicos, puede ser activada después de la inoculación de las raíces con *Azospirillum*. El incremento de la MDH podría indicar que el metabolismo de carbohidratos es modulado debido a la colonización de *A. brasilense* a las raíces del trigo. Fallik *et al.* (1988) sugieren que la respuesta obtenida con plantas que fueron inoculadas con *Azospirillum* incrementa la actividad específica de enzimas como la alcohol deshidrogenasa, ácido fosfatasa, la glutamina sintetasa, piruvato kinasa, shikimate deshidrogenasa y malato deshidrogenasa en extractos de raíces.

Se ha observado que la actividad de la MDH incrementó un 67% y un 45% al inocular plantas de tomate con  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente (Hadas y Okon, 1987). Shores y Harman (2008) encontraron que la MDH tuvo una sobreexpresión expresan durante la interacción de *T. harzianum*-maíz, identificando tres proteínas como MDH. Este mismo comportamiento presentó la enzima en la variedad Opatá, en la que la malato deshidrogenasa tuvo una expresión diferencial al comparar control-tratamiento y un patrón de expresión sobreexpresada (Tabla V). El aumento de esta enzima se podría explicar debido a que la acción de la malato deshidrogenasa permitiría satisfacer las demandas de malato como recurso energético para las bacterias y de las células de la planta. Con esto se tendría una alta tasa de reducción de oxalacetato controlada prácticamente por parte de la enzima. A su vez, se cumplirían los requerimientos de una concentración suficientes de oxalacetato, ya que se ha observado que en algunas zonas de las raíces se requiere una concentración significativa de oxalacetato para la asimilación y transporte del nitrógeno fijado, para lo cual es importante que la conversión del oxalacetato por la malato deshidrogenasa este controlada (Appels y Haaker, 1988).

Asimismo, la malato deshidrogenasa interviene en síntesis de ácido málico que es un exudado radical que es producido por diferentes plantas incluyendo el trigo (Fang *et al.*, 2008) aunque en esta última se ha relacionado estrechamente en la tolerancia o sensibilidad al aluminio (Delhaize *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 2003). Se sabe que algunos exudados radicales *e.g.* fenólicos, ácidos orgánicos y azúcares, permiten atraer microorganismos benéficos (Herrera-Estrella *et al.*, 1999). En el caso específico de malato (forma ionizada del ácido málico) se ha encontrado que en plantas como la soya, provocar una respuesta quimiotáctica fuerte en microorganismos benéficos como *Bradyrhizobium japonicum* (Barbour *et al.*, 1991). También se ha demostrado que el malato puede ser atrayente de *Rhizobium* spp. (Gaworzewska y Carlile, 1982; Gotz *et al.*, 1982; Aguilar *et al.*, 1988; Bergman *et al.*, 1988). En la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, el sustrato generado por el hospedero al que el bacteroide tuvo mayor afinidad fue el malato (Udvardy *et al.*, 1997). Se sugiere por lo tanto que, un incremento de malato deshidrogenasa conllevaría un aumento en la síntesis de malato que a su vez podría estar funcionando como atrayente químico de *A. brasilense*. Además, se han presentado reportes que muestran que en adición de ácidos orgánicos a maíz inoculado con *A. brasilense* se promueve la incorporación de nitrógeno atmosféricos en la planta, y en especial el malato estimula la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria (Rennie, 1980), lo que conllevaría mayores beneficios para la planta y en este caso específicamente para el trigo. Se explica con esto la presencia de la MDH sobreexpresada, sin embargo, en los resultados obtenidos se identificaron tres proteínas como malato deshidrogenasa, dos de las cuales estuvieron sobreexpresadas, mientras que en la variedad Norwich disminuyó su expresión (Tabla VI). Se ha sugerido que la producción negativa del malato generalmente ocurre en plantas afectadas por

microorganismos patógenos, en donde hay una reducción en los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la actividad de las enzimas que participan en este (Hadas y Okon, 1987). Pero como ya se mencionó, *A. brasilense* no es un organismo patógeno.

#### **d) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**

En los resultados obtenidos, también se detectó la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; E.C.1.2.1.12) sobreexpresada en el experimento sin estrés salino en la variedad Opata (Tabla VII). La GAPDH se encarga de catalizar la última fase de la glucólisis. Un aldehído (gliceraldehído 3-fosfato) es oxidado a un ácido carboxílico, con la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH. Además de NADH, la reacción produce 1,3-biofosfoglicerato que tiene una elevada energía libre negativa de hidrólisis, lo que le permite participar en una reacción posterior que produce ATP (Figura 21). La reacción es fácilmente reversible en las células y es utilizada tanto en la vía glucolítica como en la gluconeogénica (Devlin, 2004).

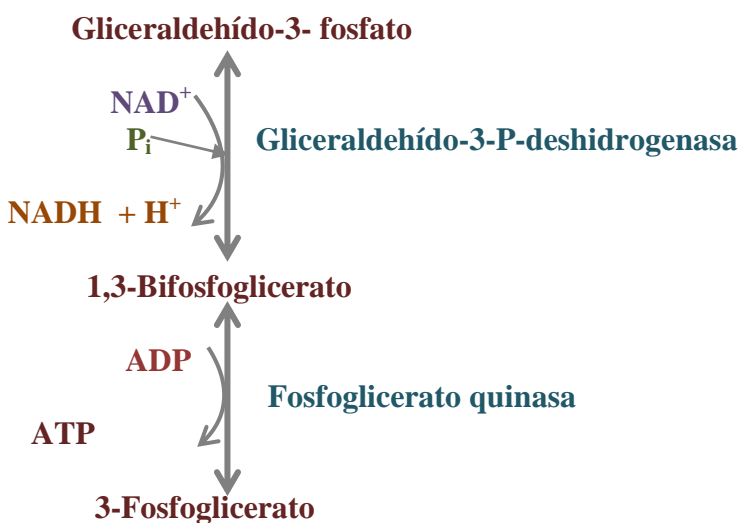


Figura 21. Síntesis de 3-Fosfoglicerato a partir de gliceraldehído-3-fosfato teniendo como intermediario el 1,3-Bifosfoglicerato. La GAPDH participa en la formación de éste último compuesto.

Variaciones en la expresión de la GAPDH ha sido reportada en diferentes plantas. Se ha observado un incremento una sobreexpresión del gen GAPDH 4 bajo condiciones anóxicas en maíz (Manjunath y Sachs, 1997). A su vez Sobhanian *et al.* (2010) encontraron descenso en la expresión de la GAPDH en hojas de soya cuando se trataba a la planta con 40mM de NaCl. Mientras que Shores y Harman (2008) encontraron que al inocular plantas de tomate con *A. brasilense* se presentaba sobreexpresión de GAPDH, estos autores identificaron 17 proteínas sobreexpresadas correspondientes a la enzima. La sobreexpresión de la esta proteína se relaciona con el metabolismo de carbohidratos, específicamente en la glicólisis. El incremento en la expresión de la GAPDH ante la presencia de *A. brasilense* podría explicarse debido a que, el incremento en la síntesis de esta enzima indicaría un aumento en la producción de ATP (Figura 21), resultando en un

mayor crecimiento de la planta. El efecto que la presencia de *A. brasilense* Cd tiene sobre la expresión de GAPDH podría a su vez explicar parte de los beneficios que la bacteria ofrece como promotora de crecimiento. La expresión diferencial de esta proteína podría estar ligada a la expresión de la MAT que también interviene en el metabolismo de carbohidratos.

#### e) Metionina adenosiltransferasa

Por su parte, la metionina adenosiltransferasa (MAT; E.C.2.5.1.6) también llamada S-adenosylmetionina sintetasa se detectó en el experimento sin estrés salino en Opata, esta enzima de clase transferasa, cataliza la formación de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de metionina y ATP (Figura 22; Arshad y Frankenberg, 2002).

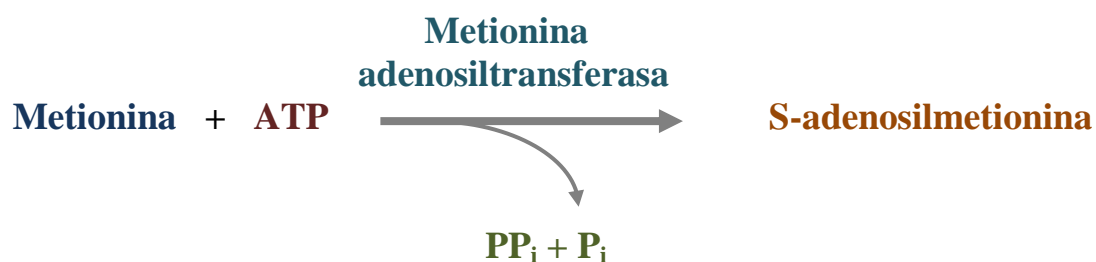


Figura 22. Síntesis de S-adenosilmetionina a partir de metionina catalizada por la MAT.

A su vez, la metionina y la SAM son los mayores precursores efectivos de la fitohormona etileno (Rao, 2000). La SAM es convertida a ácido-1-amino ciclopropano carboxílico (ACC) a partir de la ACC sintasa y a su vez la ACC se transforma en etileno por la ACC oxidasa (De La Cruz, 2010). El etileno es una fitohormona que tiene múltiples



efectos sobre el desarrollo de la planta, involucrándose en respuestas de estrés (Broekaert *et al.*, 2006) maduración de frutas, senescencia, desarrollo de pelos radiculares y diferenciación de raíces adventicias (Alosa y Ecker, 2001). El etileno es producido en diferentes partes de la planta como las hojas, flores, frutos y raíces, jugando un papel importante en la regulación de procesos como la germinación y senescencia (Yang y Hoffman, 1984), considerándose también una molécula esencial en la señalización en respuestas de resistencia inducida (Bostock *et al.*, 2001). Se ha encontrado que al tratar al maíz con Al, la producción de etileno a través de la vía metabólica de metionina incrementa (Lidon *et al.*, 1995). Además se ha observado que la presencia de bacterias como *Pseudomonas* (Long *et al.*, 2008), *Bacillus* y *Pseudomonas* modulan la síntesis de etileno en plantas (Beattie, 2007). Ribaudó *et al.* (2006) detectaron un aumento en la producción de etileno al inocular *Azospirillum brasilense* FT326 en tomate y sugieren que el etileno es un regulador positivo del desarrollo de pelos radiculares y consecuentemente del incremento en la superficie radicular. Encontraron también que suplementos de etileno imitan los efectos de la inoculación bacteriana y la adición de un inhibidor de la síntesis de etileno o de su actividad fisiológica bloquea completamente la promoción de crecimiento de *A. brasilense*. Es posible que *A. brasilense* induzca la sobreexpresión de la MAT, tal como se observó en el presente estudio (Tabla V). El incremento de esta enzima desata a su vez, la señalización para aumentar la biosíntesis de etileno. Sugiriendo entonces, que la actividad promotora de crecimiento que se genera al inocular *A. brasilense* está ligada con señales que regulan la expresión de la MAT y la síntesis de etileno, lo que conllevaría un mayor crecimiento en las raíces.

Un punto que es importante mencionar en cuanto a las proteínas identificadas en el presente trabajo, es que son proteínas que tuvieron expresión diferencial respuesta a la presencia de *A. brasilense* Cd. El estudio abordado no implicó determinar si tales proteínas podrían establecer contacto directo con la bacteria, ser sintetizadas y expulsadas al medio exterior, ya que la extracción de proteína se realizó a partir las raíces totales.

## **8.2 Efectos de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd atenuada en el proteoma de las raíces de trigo sin estrés salino.**

En cuanto a los experimentos que se llevaron a cabo con la bacteria atenuada, para el primer experimento (sin estrés salino) se encontraron cuatro proteínas con expresión diferencial en Chinese spring, cinco en Norwich y tres en Opata. Estas proteínas no concordaron con ninguna encontrada en el experimento control-*A. brasilense* Cd. A partir de esto se sugiere que las proteínas expresadas diferencialmente en el experimento control-bacteria sin atenuar, se expresan diferencialmente solo cuando se inocula la bacteria activa. Las proteínas expresadas diferencialmente al inocular la bacteria atenuada podrían entonces expresarse como producto del reconocimiento de las raíces a las moléculas de superficie celular de *A. brasilense* Cd, ya que esta respuesta no requeriría que la bacteria se encontrara activa.

### **8.3 Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd en el proteoma de las raíces de trigo en condiciones de estrés salino.**

Un factor limitante en la producción de trigo harinero es la salinidad de los suelos agrícolas así como de las fuentes de irrigación. Este problema se agrava con el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados. Adicionalmente, el uso de fertilizantes nitrogenados aumenta considerablemente los costos de producción de trigo harinero. Por estas razones, fue importante que se observara si *A. brasilense* induce la misma respuesta radicular de los genotipos de trigo experimentados. El análisis comparativo de los proteomas de los genotipos, bajo estrés salino (150 mM de NaCl), mostraron la presencia de proteínas sobreexpresadas en Chinese spring y para Opata una proteína sobreexpresada y cinco proteínas que disminuyeron su expresión. En este experimento bajo condiciones de estrés salino se observó que el número de proteínas en la variedad Opata era mayor que en la variedad Chinese spring, tal como se observó en los patrones proteicos 2D en ausencia de estrés salino. La presencia de un número más alto de proteínas con expresión diferencial en la variedad que adhiere a la bacteria (Opata) en comparación con la que no la adhiere (Chinese spring; Adriana Rojas Hernández (2007-2011), Tesis de Doctorado en desarrollo) permite afirmar la hipótesis en la que se esperaban un mayor número de cambios en el proteoma de las variedades en las que sí se entabla una relación planta-bacteria en comparación con la que no la adhieren. Para este caso no se realizó un experimento con la variedad Norwich (falta de disponibilidad de semillas), sin embargo, es probable que la variedad Norwich en este experimento también hubiera presentado un mayor número de cambios en su proteoma en comparación con Chinese spring, ya que se ha observado que las variedades adhieren (Norwich y Opata) o no (Chinese spring) a *Azospirillum brasilense*

Cd independientemente de si han crecido en condiciones bajo estrés salino o no (Rojas *et al.*, Tesis de Doctorado en desarrollo; datos sin publicar). Con respecto a los beneficios que produce la inoculación del biofertilizante con relación a la presencia de estrés salino, se ha observado un efecto ameliorativo del estrés (Creus *et al.*, 1997).

Del total de proteínas que disminuyeron y aumentaron su expresión, se seleccionaron dos proteínas, ya que estos contaban con una buena concentración proteica aparente y era posible cortarlos manualmente. Las secuencias de estas proteínas no se identificaron con las contenidas en las bases de datos consultadas. Por otra lado, una de las principales limitantes al tratar de identificar proteínas, es la ausencia de accesos similares al buscar las secuencias de los péptidos en las bases de datos actuales (Mehta *et al.*, 2008). Y a pesar de que la información en las bases de datos de proteínas está en crecimiento (Casado-Vela, 2004), se considera que la proteómica en plantas no ha sido desarrollada a un nivel suficiente de complejidad para identificar y estudiar proteínas de plantas relacionadas con la presencia de microorganismos hospederos radiculares (Mehta *et al.*, 2008).

Aunado a esto, cuando se analiza estructural y funcionalmente proyectos de secuencias de genoma, cerca del 30% de los genes secuenciados representan proteínas hipotéticas o éstas no son identificadas exitosamente (Mehta *et al.*, 2008), tal como sucedió con la proteína 499 (Figura 10, Tabla XII), cuya identificación la arrojó como proteína hipotética. Además ya que el trigo no es un organismo modelo, se encuentran las dificultades inherentes a la falta de información genómica y proteómica específica de la mayoría de organismos no-modelo (Cieslak y Ribera, 2009). Actualmente encontramos que el trigo es una planta cuyo genoma no ha sido 100% secuenciado, El Consorcio Internacional para la

Secuenciación del Genoma del Trigo reporta que para agosto de 2010 se tenía un 95% del genoma del trigo y se trabaja para descifrar el 5% restante <sup>2</sup>. Por el momento la información de las bases de datos de proteínas no cuentan con la suficiente información para identificar parte de las proteínas se expresaron diferencialmente en este trabajo. Por lo tanto, se requieren más estudios para conocer a más profundidad las proteínas y rutas metabólicas que participan en la relación trigo-*Azospirillum brasilense* Cd.

#### **8.4 Comparación del cambio en el proteoma de las raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd sin estrés salino vs estrés salino.**

Al comparar la localización en gel de las proteínas con expresión diferencial que se encontraron en el experimento sin estrés salino (Figuras 6, 7 y 8) y con estrés salino (Figuras 11 y 12), se observó que ninguna de las proteínas se ubicó en sitios similares en ambos experimentos. Esto no significa que no se trate de la misma proteína, en la Tabla V se puede observar que Opata presentó dos proteínas diferentes (proteínas 1174 y 1324) cuya identidad es la misma (malato deshidrogenasa). Esto puede ocurrir en el caso de que las proteínas sean isoformas que se generan debido a modificaciones postraduccionales o bien porque se originen de familias de multigenes (Fontes *et al.*, 1991; Shores y Harman, 2008). Entonces, no se descarta que las proteínas con expresión diferencial detectadas para los experimentos sin y con estrés salinos posean la misma identidad.

Con respecto al número de proteínas encontradas en los experimentos sin y con estrés salino, en la variedad Chinese spring se presentaron dos proteínas con expresión diferencial en el experimento sin estrés salino (Tabla III), mientras que en el de estrés

salino se detectó una proteína (Tabla VIII). Para Opata sin estrés salino se detectaron nueve proteínas y con estrés salino seis. En el caso de Norwich solo se tuvo el número para el experimento sin estrés salino (Tabla III), ya que no se trabajó con esta variedad en los experimentos con estrés salino.

### **8.5 Efectos de la inoculación de *Azospirillum brasilense* Cd atenuada en el proteoma de las raíces de trigo en condiciones de estrés salino.**

Para los experimentos en condiciones de estrés salino, en donde se realizó la comparación del análisis de imágenes entre los geles de las muestras control y aquellas que fueron inoculadas con la bacteria atenuada, en Chinese spring no se observó ninguna proteína con expresión diferencial, mientras que en la variedad Opata se encontró una proteína que disminuyó su expresión (proteína 1357). Se ha reportado que cuando se atenúan bacterias, la capacidad de estas para actuar sobre las raíces disminuye, inhibiendo la capacidad de adherirse a las superficies (Prithiviraj *et al.*, 2005) y por lo tanto de producir los efectos perjudiciales y benéficos (como es el caso de *A. brasilense*) que generan sobre la planta. En este caso, solamente se observó una proteína ante la presencia de la bacteria atenuada que estuviera presente en al menos dos réplicas biológicas, por lo que se infiere que a excepción de la proteína 1357, no hay proteína que se expresen diferencialmente ante la presencia de la bacteria atenuada. Además la proteína 1357 no presentó expresión diferencial al compararse control-*A. brasilense* sin atenuar. Por lo que, tal como sucedió en el caso de los experimentos sin estrés salino, se infiere que las proteínas expresadas diferencialmente al

inocular *A. brasilense* sin atenuar sobre las raíces del trigo, solamente se expresan diferencialmente cuando la bacteria esta activa.

## 9. CONCLUSIONES

- 1) Los genotipos cuyo fenotipo radicular se asocia con la adhesión de *A. brasilense* Cd mostraron un mayor número de proteínas con expresión diferencial en comparación con el genotipo que no presenta adhesión de *A. brasilense* Cd. tanto en condiciones sin estrés salino, como en condiciones con estrés salino.
- 2) El proteoma del hexaploide sintético Norwich al ser inoculado con *A. brasilense* Cd, en condiciones sin estrés salino, presentó expresión protéica diferencial, y las proteínas sobreexpresadas y que disminuyeron su expresión se identificaron como: DP-D-Glucuronato descarboxilasa (sobreexpresada), malato deshidrogenas (sobreexpresada), HSP70 (expresión disminuida) y una proteína hipotética (expresión disminuida).
- 3) El proteoma de Opata al ser inoculado con *A. brasilense* en condiciones sin estrés salino, presentó expresión protéica diferencial, y las proteínas identificadas fueron: metionina adenosiltransferasa, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (todas sobreexpresadas).
- 4) La sobreexpresión de la UDP-D-glucoronato descarboxilasa, malato deshidrogenasa y gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa se relacionaron con metabolismo de los carbohidratos lo que indica que se incrementa su síntesis, proveyendo a la planta de una mayor cantidad de energía y carbono para su crecimiento. Mientras la evidencia de sobreexpresión de la metionina adenosiltransferasa sugiere la participación de la fitohormona etileno en la respuesta de la inoculación de *A. brasilense*.
- 5) Las proteínas que presentaron expresión diferencial debido a la inoculación de *A. brasilense* en el experimento sin estrés salino no presentan la misma ubicación en los



geles 2D que las proteínas con expresión diferencial en el experimento en condiciones de estrés salino.

- 6) En condiciones de estrés salino, el patrón proteico radicular del control y el que se inoculó con la bacteria atenuada en las variedades Chinese spring y Opata, no presentó proteínas con expresión diferencial.
- 7) La hipótesis planteada es verdadera. Al carácter de adhesión de *A. brasilense* Cd se le correlaciona un cambio marcado en el proteoma radicular.

## 10. LITERATURA CITADA

- Agrawal, G. y R. Rakwal. 2006. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. **Mass Spectrom. Rev.** 25: 1-53.
- Aguilar, M. M., A. M. Ashby, A. J. M. Richards, G. J. Loake, M. D. Watson y C. H. Shaw. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **J. Gen. Microbiol.** 134:2741-2746.
- Aguilar-Piedras, J., M. Xiqui-Vásquez, S. García-García y B. Baca. 2008. Indole-acetic acid production in *Azospirillum*. **Rev. Latinoam. Microbiol.** 50 (1-2): 29-37.
- Amaya-Carpio, L., F. T. Davies, T. Fox y C. He. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer influence photosynthesis, root phosphatase activity, nutrition, and growth of *Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*. **Photosynthetica.** 47(1):1-10.
- Appels, M. y H. Haaker. 1988. Identification of cytoplasmic nodule-associated forms of malate dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. **Eur. J. Biochem.** 171(3): 515–522.
- Arshad, M. y W. Frankenberger. 2002. **Etylene**. Kluwer Academic/Plenums Publishers. E.U.A. 342 pp.
- Bacilio, M., H. Rodríguez, M. Moreno, J. Hernandez y Y. Bashan. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp*-tagged *Azospirillum lipoferum*. **Biol. Fertil. Soils.** 40:188-193.
- Barbour, M., R. D. Hattermann y G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Exudates. **Appl Environ Microbiol.** 57(9): 2635-2639.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. **Can. J. Microbiol.** 44:168-173.

- Bashan, Y. y G. Holguin. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** 139, 379-385.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Can. J. Microbiol.** 36: 591-608.
- Bautista, R. J., P. Pérez-Herrera, E. Villaseñor, M. Gómez-Valdez, M. Mendoza- Lozano y R. Monterde-Gabilondo. 2007. **Calidad de la cosecha del trigo en México. Ciclo otoño-invierno 2005-2006.** Publicación Especial del CONASIST. México. 24p.
- Beattie, G. 2007. Survey of Plant-Associated Bacteria. En: **Plant-Associated Bacteria.** Ed. Gnanamanickam. Springer. Holanda. 718 pp.
- Beere, H. The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. 2004. **J. Cell Sci.** 117, 2641-2651.
- Beevers, H. 1979. Microbodies in higher plants. **Annu Rev Plant. Physiol.** 30:159-193.
- Bergman, K., M. Gulash-Hoffee, R. E. Hovestadt, R. C. Larosiliere, R. G. Ronco II y L. Su. 1988. Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. **J. Bacteriol.** 170:3249-3254.
- Bindschedler, L. V., E. Wheatley, E. Gay, J. Cole, A. Cottage y G. P. Bolwell. 2005. Characterisation and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. **Plant. Mol. Biol.** 57: 285–301
- Bostock, R., R. Karban, J. Thaler, P. Weyman, y D. Gilchrist. 2001. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **Eur. J. Plant Pathol.** 107:103-111

- Brencic, A. y S. C. Winans. 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 69: 155-194.
- Broekaert, W. F., S. L. Delaure, M. F. De Bolle y B. P. Cammuel BPA. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.** 44: 393–416.
- Burdman, S., Y. Okon, y E. Jurkevitch. 2000a. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit. Rev. Microbiol.** 26:91-110.
- Burdman, S., E. Jurkevitch, B. Schwartsburd y Y. Okon. 1999. Involvement of outer membrane proteins in aggregation of *Azospirillum brasilense*. **Microbiol.** 145:1145-115.
- Burdman, S., G. Dulguerova, Y. Okon y E. JHurkevitch. 2001. Purification of the Major Outer Membrane Protein of *Azospirillum brasilense*, Its Affinity to Plant Roots, and Its Involvement in Cell Aggregation. **MPMI.** 14(4): 555–561.
- Burdman, S., R. De Mot, J. Vanderleyden, Y. Okon y E. Jurkevitch. 2000b. Identification and characterization of the *omaA* gene encoding the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*. **DNA Seq.** 11:225-257.
- Caballero-Mellado, J. 1998. **El género *Azospirillum***. Capitulo 14. Website::[www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_14/Capitulo14.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_14/Capitulo14.pdf)
- Caballero-Mellado, J., M.G. Carcano-Montiel y M.A. Mascarua-Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis.** 13: 243-253.

- Casado-Vela, J. 2004. Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate ("*Lycopersicon esculentum*" M.). Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. **Tesis de doctorado**. Universidad de Alicante. España. 321 pp.
- Catellanos, T., F. Ascencio y Y. Bashan. 1998. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. **Curr. Microbiol.** (36) 241-244.
- Chambers, G., L. Lawrie, P. Cash y G. Murray. 2000. Proteomics: a new approach to the study of disease. **J Pathol.** 192(3): 280-288.
- Chang, A., D. Crowley y A. Page. 2003. **Assesing Bioavaiiability of Metals in Biosolids-Treated Soils**. Water Enviroment Research Foundation. Inglaterra. 209pp.
- Cheng-Hui, X. y A. Yokota. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55:1435-1438.
- Chhabra, B. S., T. P. Yadava y R. K. Behl. 1992. Variability for seed ageing and storability in wheat. **Wheat Infor. Ser.** 75:68-71.
- Cieslak, A. e I. Ribera. 2009. Aplicaciones de proteómica en ecología y evolución. **Ecosistemas.** 18(1): 34-43.
- Córdoba-Pedregosa, M. C., J. A., González-Reyes, A. Serrano, J. M. Villalba, P. Navas y F. Córdoba. 1998. Plasmalemma-associated malat dehydrogenase activity in onion root cells. **Protoplasma.** 205: 29-36.
- Creus, C., R. Sueldo y C. Barassi. 1997. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. **Plant Physiol. Biochem.** 35(12):939-944.

- Damerval C., D. de Vienne, M. Zivy y H. Thiellement. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis** 7(1): 52 - 54.
- De la Cruz, J., G. Vela, L. Dorantes y H. García. 2010. Ethylene efecto on ACC content and ACC oxidase during ripening of “Marado” papaya. **Rev. Fitotec. Mex.** 33(2):133-140.
- De la Peña, C., Z. Lei, B. Watson, L. Summer y J. M. Vivanco. 2008. Root-Microbe Communication through Protein Secretion. **J. Biol. Chem.** 283(37): 25247-25255.
- Del Gallo, M., M. Negi y C. Neyra. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** 171(6): 3504-3510.
- Delhaize, E., P. Ryan y P. Randall. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.), II. Aluminum-Stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiol.** 103: 695-702.
- Díaz De León, J .L., R. Zavala-Fonseca, R. Escoppinichi y A. Mujeeb-Kazi. 2000. Identification of four bread cultivars tolerant to salinity following sea water field evaluations as varietal candidates for Baja California, México. **Annual Wheat Newsletter** 46:90-91.
- Díaz De León, J. l. , M. Carrillo, as. Rajaram y A. Kazi. 1995. Rapid Screening of salt tolerant wheats. **Cer. Res. Comm.** 38(1):15-22.
- Díaz de León, J. L., R. Escoppinichi, R. Zavala, T. Castellanos, M. Röder y A. Mujeeb-Ka 2010. Phenotyping and genotyping of wheat possessing salt tolerance. **Cer. Res. Comm.** 38(1):15-22.

- Dolatabadian, A., S. A. M. Modarres-Sanavy y M. Sharifi. 2009. Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. **Plant Soil Sci.** 59(5): 456-464.
- Dubcovsky, J. y J. Dvorak. 2007. Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. **Science.** 316: 1862-1866.
- Eckert, B., O. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffels y A. Hartmann. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51:17-26.
- El-Shintinawy, F. 2000. Photosynthesis in two wheat cultivars differing in salt susceptibility. **Photosynthetica** 38: 615-620.
- Fallik, E., Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil. Biol. Biochem.** 20(1):45-49.
- Fang, Z., Z. An y Y. Li. 2008. Dynamic change of organic acids secreted from wheat roots in Mn deficiency. **Front. Agric. China.** 2(1):50-54.
- Ferraris, G., L. Couretot y M. Díaz Zorita. 2008. Respuesta de trigo a tratamientos con *Azospirillum* sp. según niveles tecnológicos. CD Rom. **VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Invernal de Cereales de siembra otoño –Invernal.** I Encuentro del Mercosur.
- Fontes E. B., B. B. Shank, R. L. Wrobel, S. P. Moose, G. R. O'Brian, E. T. Wurtzel y R. S. Boston. 1991. Characterization of an immunoglobulin binding protein homolog in the maize floury-2 endosperm mutant. **Plant Cell.** 3(5). 483-96.

- Gaworzewska, E. T., y M. J. Carlile. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. **J. Gen. Microbiol.** 128:1179-1188.
- González-Camacho, F. y F. Medina. 2007. Extraction of nuclear proteins from root meristematic cells. **Methods Mol. Biol.** 355: 63-72.
- Gotz, R., N. Limmer, K. Ober, y R. Schmitt. 1982. Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. **J. Gen. Microbiol.** 128:789-798.
- Hadas, R. y Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. **Biol. Fertil. Soils.** 5:241-247.
- Harper, A. Y M. Bar-Peled. 2002. Biosynthesis of UDP-xylose. Cloning and characterization of a novel *Arabidopsis* gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. **Plant Physiol.** 130(4): 2188-2198.
- Harrington, J. F. 1973. Problems of seed storage. En **Seed Ecology**. Ed. W. Heydecker Butterworths. Inglaterra. 251-264 pp.
- Hartmann, A. y J. Baldani. 2006. The Genus *Azospirillum*. **The Prokaryotes.** 5: 115-140.
- Hartmann, A., F. Hain y B. Robert. 1988. Influence of amino acids on Nitrogen Fixation ability and grown of *Azospirillum* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 54 (1): 87-93
- Herrera-Estrella, L., A. Guevara-García y J. López-Bucio. 1999. **Heavy Metal Adaptation, Embryonic Encyclopedia of Life Sciences.** Macmillan Publishers.
- Hoagland, D. R. y D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station.** Circular 347:1-32.



- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. **Appl Environ Microbiol.** 48 (6):1208-1213.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Can. J. Microbiol.** 31(10): 881–887.
- Khammas, K. M., E. Ageron, P. A. D. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** 140:679–693.
- Kingsbury, R. y E. Epstein, 1986. Salt Sensitivity in Wheat: a case for specific ion toxicity. **Plant Physiol.** 80:651-654.
- Kohler, A., C. Delaruelle, D. Martin, N. Encelot y F. Martin. 2003. The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. **FEBS Lett.** 542: 37-41.
- Komatsu, S., A. Muhammad y R. Rakwal. 1999. Separation and characterization of proteins from green and etiolated shoots of rice (*Oryza sativa* L.): towards a rice proteome. **Electrophoresis.** 20 (3): 630-636.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-885.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1989. Enhancement of cell división in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. **Can. J. Bot.** 67:2213-2216.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. **Plant Soil.** 137:91-97.

- Lidon, F. C., M. Barreiro y F. Henriques. 1995. Interactions between biomass production and ethylene biosynthesis in coppertreated rice. **J. Plant Nutr.** 18: 1301-1314
- Long, H. H., D. Schmidt y I. Baldwin. 2008. Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses. **PLoS ONE.** 3(7): e2702.
- Lynch, J. M. 2002. Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. **Biodegradation.** 13 (1): 21-27.
- Madan, S., G. Talwar, R. K. Behl y U. Verma. 1989. Effect of accelerated ageing on germination seedling vigor and beta-amylase activity in wheat. **Res. & Dev. Reporter.** 6:48-54.
- Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 2009. **Brock Biology of Microorganisms.** Prentice Hall. E.U.A. 1019 pp.
- Maeder, C. y C. Guthrie. 2008. Modifications target spliceosome dynamics. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 15(5): 426-428.
- Magalhaes, F. M. M., J. I. Baldani, S. M. Souto, J. R. Kuykendall y J. Döbereiner. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Cienc.** 55:417-430.
- Manjunath, S. y M. Sachs. 1997 Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Mol. Biol.** 33(1):97-112.
- Martinoia, E. y D. Rentsch. 1994. Malate compartmentation: responses to a complex metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mot. Bio.** 145: 447-467.

- Mathesius, U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anolles, B. Rolfe y W. Bauer. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial *quorum-sensing* signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 100: 1444-1449.
- Mehta, A., B. Magalhaes, D. Souza, E. Vasconcelos, L. Silva, M. Grossi-de-Sa, O. Franco, P. da Costa y T. Rocha. 2008. Roteomics: The Challenge of Discovering Plant Defense-Related Proteins in Roots. **Curr Protein Pept Sci.** 9: 108-116.
- Melo, V. y O. Cuamatzi. 2006. **Bioquímica de los procesos metabólicos.** Reverté. España. 350 pp.
- Michielis, K., I. Chris y J. Vnaderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** 137: 2241-2246.
- Mujeeb-Kazi, A. y Díaz De León, J.L. 2002. Conventional and alien genetic diversity for salt tolerant wheats: Focus on current status and new germplasm development. En: **Prospects for saline agriculture.** Ed. Ahmad R. y K. A. Malik. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 69-82 pp.
- Natera, S.H.A., N. Guerreiro y M. Djordjevic. 2000. Proteome Analysis of Differentially Displayed Proteins As a Tool for the Investigation of Symbiosis. **Mol. Plant Microbe Interact.** 13: 995-1009.
- Nover, L. 1991. HSFs and HSPs-a stressful program on transcription factors and chaperones. Stress Proteins and the Heat Shock Response, sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY USA, April 29-May 2, 1991. **New Biol.** 3(9):855-859.
- Okon, Y y J. Vanderleyden. 1997. Root associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News.** 63: 366-370.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2007. FAOSTAT-Producción agrícola. Web-site: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Osinski, E., U. Miier, W. Büchs, J. Weickel y B. Matzdorf. 2003. Application of biotic indicators for evaluation of sustainable land use current procedures and future developments. **Agric. Ecosyst. Environ.** 98: 407-421.
- Pandey, A y M. Mann. 2000. Proteomics to study genes and genomes. **Nature.** 405 (6788): 837-846.
- Pappin, D.J.C., P. Hojrup y A.J. Bleasby. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Curr. Biol.** 3 (6): 327-332.
- Peltier, J. B., G. Friso, D. Kalume, P. Roepstorff, F. Nilsson, I. Adamska y K. van Wijk. 2000. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. **Plant Cell.** 12: 319-342.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy y J. S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis** 20 (18): 3551-67.
- Persello-Cartieaux, F., L. Nussaume y C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell Environ.** 24: 189-199.
- Petrak, J., R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny y C. Vulpe. 2008. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. **Proteomics.** 8(9):1744-1749.
- Prithiviraj, B., H. P. Bais, T. Weir, B. Suresh, E. Najarro, B. V. Dayakar, H. P. Schweizer y J. m. Vivanco. 2005. Down regulation of virulence factor of *Pseudomonas*

- aeruginosa* by salicylic acid attenuated its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **Infect. and Immun.** 73(9):5319-5328.
- Puente, M. L., E. J. García y A. Peticari. 2009. Effect of the bacterial concentración of *Azospirillum brasilense* in the inoculums and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World J. Agric. Sci.** 5(5):604-608.
- Qadir, M. A. Ghafoor y G. Murtaza. 2000. Amelioration strategies for saline soils: a review. **Land Degrad Dev.** 11:501–521.
- Rahman, M., U. Soomro, M. Zahoor-ul Haq y S. Gul. 2008. Effects of NaCl Salinity on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. **World J. Agric. Sci.** 4(3): 398-403.
- Ramos, H., L. Roncato-Maccari, E. Souza, J. Soares-Ramos, M. Hungria y F. Pedrosa. 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gtp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **J. Biotechnol.** 97(3):243-252.
- Rao, A. V. 2000. Principles of Weed Science. **Science Publishers. Inc.** E.U.A. 541 pp.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kesters, S. Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with the roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37:43–51.
- Rennie, R. 1980. <sup>15</sup>N isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. **Can. J. Bot.** 58: 21–24.
- Ribaudo, C., E. Krumpholz, F. Cassán, R. Bottini, M. Cantore y J. Curá. 2006. *Azospirillum* sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **J. Plant Growth Regul.** 24:175-185.

- Santoni, V., D. Rouquié, P. Doumas, M. Mansion, M. Boutry, H. Degand, P. Dupree, L. Packman, J. Sherrier y T. Primek, G. Bauw, E. Posada, P. Rouzé, P. Dehais, I. Sahnoun, I. Barlier y M. Rossignol. 1998. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. **Plant J.** 16(4):633-641.
- Santoni, V., P. Doumas, D. Rouquié, M. Mansion, T. Rabilloud y M. Rossignol. 1999a. Large scale characterization of plant plasma membrane proteins. **Biochimie.** 81 (6): 655-661.
- Santoni, V., T. Rabilloud, P. Doumas, D. Rouquié, M. Mansion, S. Kieffer, J. Garin y M. Rossignol. 1999b. Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. **Electrophoresis.** 20 (4-5): 705-711.
- Schlesier, B. y H. P. Mock. 2006. Protein isolation and second dimension electrophoretic separation. **Methods Mol. Biol.** 323, 381-391.
- Shannon, M. y C. Grieve. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Sci Hortic.** 78:5-38.
- Shoresh, M. y G. Harman. 2008. The molecular basis of shoot response of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomi approach. **Plant Physiol.** 147:2147-2163.
- Siddiqui, S. U., Ali, A. y M. F. Chaudhary. 2008. Germination behavior of wheat (*Triticum aestivum*) varieties to artificial ageing under varying temperature and humidity. **Pak. J. Bot.** 40(3):1121-1127.
- Sly, L. I. y E. Stackebrandt. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 49:541-544.

- Sobhanian, H., R. Razavizadeh, Y. Nanjo, A. Ehsanpour, F. Jazii, N. Motamed y S. Komatsu. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Sci.** 8:19.
- Sternberg, L. y I. Ting. 1979. Inheritance of microbody malate dehydrogenase in *Opuntia basilaris*. **J. Herd.** 70(3):220.
- Tarrant, J., N. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. And towh species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb.nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. **Can J. Microbiol.** 24:267-298 pp.
- Tarrant, J. J., N. R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerink) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** 24:967–980.
- Tastet, C., P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer y T. Rabilloud, T. 2003. A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. **Electrophoresis.** 24, 1787-1794.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl Millet (*Peninsetum americanum* L.). **Appl. Environ. Microbiol.** 37:1016-1024
- Udvardy, M. K. y D. A. Day, Metabolite transport across symbiotic membranes of root nodules, 1997. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48. 493–523
- Vande Broek, A., J. Michielis, A. Van Gool y J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and

- expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 6:592-600.
- Wilson, C., S. M. Lesch y C. M. Grieve, 2000. Growth stage modulates salinity tolerance of New Zealand Spinach (*Tetragonia tetragonoides*, Pall) and Red Orach (*Atriplex hortensis* L.). **Annals of Botany.** 85:501-509.
- Witzel, K., G. K. Surabhi, G. Jyothsnakumari, C. Sudhakar, A. Matros y and H.P. Mock. 2007. Quantitative proteome analysis of barley seeds using Ruthenium (II)-tris-(bathophenanthroline-disulphonate) staining. **J. Proteome Res.** 6 (4): 1325-1333.
- Yang, S. y N. Hoffman. 1984. Ethilene biosynthesis and is regulation in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 35:155-189.
- Yegorenkova, I. V., S.A. Konnova, V. N. Sachuk y V. V. Ignatov. 2001. *Azospirillum brasilense* colonization of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. **Plant and Soil.** 231: 275-282.
- Zhang, Q. y D. Riechers. 2008. Proteomics: An Emerging Technology for Weed Science Research. **Weed Science.** 56(2):306-313.
- Zhang, Q., N. Shriley, J. Lahnstein y G. B. Fincher. 2005. Characterization and expression patterns of UDP-D-Glucuronate Decarboxylase genes in Barley. **Plant Physiol.** 138(1):131-141.

1. <http://www.itis.gov>
2. <http://www.wheatgenome.org>