

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE RAÍZ DE *Zea mays*
EXPUESTO A CEPAS BACTERIANAS BENÉFICAS DE *Bacillus subtilis*
DE ORIGEN RIZOSFÉRICO Y ENDÓFITO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Aurora Xihuitl Huerta Robles

DIRECTOR:

Dr. Rafael Villa Angulo

CODIRECTOR:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B. C.

Agosto, 2019

AGRADEZCO A CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO DE ESTA TESIS MEDIANTE EL APOYO DE LOS SIGUIENTE PROYECTOS:

Transferencia de nitrógeno orgánico a través de simbiosis bacteriana diseñada, como una estrategia para evitar la degradación de suelos por fertilizantes nitrogenados y aumenta la productividad de cultivos con importancia alimenticia. **PROYECTOS DE DESARROLLO CIENTIFICO PARA ATENDER PROBLEMAS NACIONALES 2013-212875**

Fortalecimiento y ampliación de las capacidades analíticas de equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF a MALDI-IMAGING para su uso en grupos de investigación de las áreas agro biotecnológicas, microbiológicas y de biotecnología farmacéutica. Apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica. **CONVOCATORIA 2016-269607.**

RESUMEN

La producción comercial de plantas con fines alimenticios depende de la fertilización con nitrógeno sintético, especialmente amonio, nitratos urea. En México se consumen en promedio de 61 a 100 kg ha⁻¹año⁻¹ de N-fertilizantes que representan del 25 al 35% de los costos de producción. Sin embargo las plantas son más susceptibles a enfermedades, se degrada la materia orgánica del suelo y se favorece la contaminación ambiental por volatilización o lixiviación de la fuente nitrogenada.

Las plantas adquieren una porción significativa de sus requerimientos nutrimentales a través de las interacciones simbióticas con microorganismos no patógenos, además de la promoción del crecimiento por la producción de fitohormonas, compuestos volátiles, compuestos de defensa y enzimas. Bajo este contexto, se tenemos un interés especial en aquellos microorganismos que se han especializado como endófitos beneficios para las plantas, que no son bacterias rizobiales u hongos micorrizicos. Por lo que es necesario saber cuáles son los mecanismos clave para que ocurran las interacciones. Esta información ayudara a optimizar la producción de biomasa de los cultivos importantes usando biofertilizantes, aún en ambientes empobrecidos, quizás hasta por la misma fertilización química. Este proyecto de investigación busca evaluar la expresión de genes asociados a la interacción planta-bacteria en la raíz y durante el proceso de transferencia de nitrógeno orgánico en maíz (*Zea mays*). Estas evidencias moleculares analizadas conjuntamente con herramientas bioinformáticas, permitira acercarnos al mecanismo mediante el cual las raíces internalizan selectivamente sus microorganismos benéficos y facilitan la adquisición de nitrógeno orgánico presente en el suelo. La utilización de los datos obtenidos apoya soluciones agro-biotecnológicas de bajo impacto ecológico, con el uso de bacterias endófitas nativas, como agentes de control y fertilización en los cultivos de importancia agricola.

INDICE

Resumen.

Introducción.

Justificación.

Objetivos.

Objetivo General.

Objetivos Específicos.

Antecedentes.

Materiales, Reactivos y Equipos.

Metodología.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones y perspectivas.

Bibliografía.

JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés por el uso de bacterias y hongos como auxiliares en la obtención de nutrientes por las plantas, además de la posibilidad de brindar protección contra patógenos que afectan los cultivos de manera importante.

Sin embargo, aún se desconocen aspectos básicos de los procesos moleculares involucrados en la obtención de nutrientes a través de las raíces en simbiosis con bacterias endófitas, así como del proceso de colonización, ausente de órganos especializados y signos de daño celular.

La integración computacional de diferentes tipos de datos, es necesaria para permitir la disección de este sistema tan complejo y dinámico, representado por las plantas y endófitos específicos, para atender los desafíos del futuro, en la manipulación de las interacciones planta-microorganismo, para optimizar la producción de biomasa de los cultivos (Farrar, 2014).

Este trabajo, pretende reunir evidencia que al ser analizada en su conjunto con ayuda de herramientas informáticas, permita elucidar el mecanismo mediante el cual las raíces internalizan selectivamente microorganismos benéficos y facilitan la adquisición de nitrógeno orgánico presente en el suelo.

La utilización de los datos obtenidos podrá darnos información precisa para sugerir soluciones agro-biotecnológicas de bajo impacto ecológico, con el uso de bacterias endófitas nativas, como agentes de control y fertilización.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la expresión de genes asociados a la interacción planta-endófito, durante el proceso de transferencia de nitrógeno orgánico en cultivos de maíz

Objetivos particulares:

1. Identificación y evaluación de genes de banano regulados durante los ensayos de colonización con bacterias endófitas, rizobacterias y *Escherichia coli*, mediante microarreglos.
2. Análisis y evaluación del desarrollo morfológico de las plantas de maíz durante los ensayos de colonización.
3. Cuantificación relativa de los transcritos de banano, durante el desarrollo de los ensayos de colonización, mediante PCR tiempo real.
4. Integración computacional de datos colectados en los experimentos de simbiosis.

ANTECEDENTES

MAIZ

El maíz moderno pertenece al género *Zea*, fue domesticado en el sur de México hace alrededor de 9000 años, era un pasto tropical anual conocido como teosinte y su antecesor era el *Zea mays ssp. Parviglumis*, el cual aún sobrevive en la naturaleza. El maíz (*Zea mays ssp. mays*) fue cultivado y esparcido por los indígenas a través de América y así dio origen a las diferentes variedades de maíz que conocemos (Matsuoka *et al.*, 2002).

En el siglo XX los científicos se dieron a la tarea de crear semillas mejoradas de cultivares específicos e híbridos con la finalidad de asegurar cultivos sanos y con altos niveles de producción. Sin embargo, el exceso en el uso de fertilizantes y pesticidas favorecen a la aparición de plagas más resistentes. A pesar de los esfuerzos por crear la semilla perfecta se ha reportado que el maíz silvestre es más resistente que sus contrapartes modernas, esto quizá se deba a la pérdida de alelos y/o la pérdida de la cascara protectora que las envuelve en las nuevas variedades de granos, todo esto como consecuencia de la crianza y domesticación del maíz (Wang *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2014). El incremento en la susceptibilidad a enfermedades en el maíz moderno se ha atribuido principalmente a cambios en el genoma de la planta por la creación de nuevas variedades de granos híbridos.

En México se producen alrededor de 18.2 millones de toneladas en una superficie de 8.5 millones de hectáreas, un total de 3.2 millones de personas se benefician de esta actividad. Alrededor del 90% de la producción total de maíz es blanco es destinado para consumo humano (SAGARPA). Los principales problemas que presentan los agricultores son: la falta de apoyos, los altos costos de los insumos y servicios, la pérdida por cuestiones climáticas y plagas, agregando a esto la falta de capacitación, la pérdida de fertilidad del suelo y la poca infraestructura. El INEGI en el 2014 anuncio que además de la falta de apoyos reportada por más del 83% de los productores, el precio de los fertilizantes se había disparado hasta un 14.3 por ciento en los últimos 6 años, aunado a esto las pérdidas por cuestiones climáticas, plagas y enfermedades que afectan al 74% de los productores. 48.6 por ciento de

las unidades de producción presentan pérdida en la fertilidad del suelo, estudios realizados demuestran que la falta en la rotación de cultivos, así como la calidad de los fertilizantes utilizados son los principales causantes de la erosión. Asimismo, pocos son los productores que hacen el uso de nuevas tecnologías en sus procesos, como el control biológico de plagas o la biofertilización (ENA, 2014).



Figura 2. Cultivo de maíz blanco en Jalisco. Foto tomada de PanoramaAgrario (2016).

MICROORGANISMOS RIZÓSFERICOS Y BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO

Las bacterias promotoras de crecimiento (BPC) favorecen el desarrollo de las plantas, directa e indirectamente. Por lo tanto, estas bacterias pueden funcionar oportunamente como bio-fertilizantes, fitoreguladores o como controladores de estrés (Lugtenberg & Kamilova, 2009) sustituyendo a los compuestos químicos

usados en la agricultura. Estos microorganismos tienen la capacidad de fijar nitrógeno y asimilarlo, producir hormonas de crecimiento y enzimas que inhiben la formación de etileno dentro de los tejidos de las plantas. Las BPC se clasifican en dos grupos: rizósfericas y endosféricas. La rizósfera comprende todo el volumen de tierra adyacente a las raíces, mientras que la endosfera representa todo el tejido interno desde la raíz hasta el meristemo apical (Timm *et al.*, 2015).

Las bacterias que habitan la rizósfera y endosfera son llamadas rizobacterias y endófitos respectivamente. Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas enriquecen el suelo con nutrientes tales como nitrógeno, mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, fósforo y potasio a través de la solubilización del suelo (Patel *et al.*, 2015; Pii *et al.*, 2015; Zahid *et al.*, 2015). Algunas bacterias que han sido identificadas como promotoras de crecimiento en plantas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Ochrobacterium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* y *Enterobacteria* (Hassan *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Abaid-Ullah *et al.*, 2015). Los efectos positivos de estas especies se han observado en diferentes cultivos tales como la caña de azúcar, maíz, trigo, arroz, canola, girasol, entre otros. Los efectos han sido observados tanto *in-vitro* como *in-vivo* bajo condiciones climáticas variables. (Hassan *et al.*, 2011; El-Sayed *et al.*, 2014).

Especie de planta	Bacteria	Características agronómicas
<i>Saccharum officinarum</i>	<i>Paenibacillus</i> <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Enterobacter</i> <i>Pediococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Arthrobacter</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y solubilización de potasio.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	Fijación de nitrógeno y producción de AIA.

	<i>Lysinibacillus</i>	
<i>Zea mays</i>	<i>Azospirillum</i> <i>Achromobacter</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Bacillus</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de AIA.
<i>Phytophthora parasitica</i> <i>Dastur</i>	<i>Serratia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>	Sidéforos, solubilización de fosfatos y actividad proteolítica.
<i>Oryza sativa</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	Fijación de nitrógeno y producción de AIA.

Tabla 1. Bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de diferentes especies de plantas con propiedades agronómicas notables.

Los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* están reportados como microorganismos predominantes en el suelo y también han sido aislados de la rizósfera de diferentes tipos de plantas (Costa *et al.*, 2014; Govindasamy *et al.*, 2011). Existen diversos estudios en los cuales se reportan efectos benéficos de estos géneros de bacterias para aumentar el índice de germinación de las semillas (Chen *et al.*, 2013; Haggag & Timmusk, 2008; Kumar *et al.*, 2012; Shaharoon *et al.*, 2007). Estos microorganismos son capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante la fijación nitrógeno, solubilización de los fosfatos y la producción de fitohormonas, así como la ACC deaminasa; a la vez que compuestos antagónicos tales como enzimas hidrolíticas, sideroforos y una amplia gama de antibióticos (Costa *et al.*, 2014; Govindasamy *et al.*, 2011; Parke & Gurian-Sherman, 2001; Suárez-Moreno *et al.*, 2012).

Los efectos de las bacterias promotoras del crecimiento en plantas varían dependiendo el tipo de cultivo, tipo de suelo y condiciones climáticas. Es por eso la importancia del cultivo de cepas específicas de cada región es importante para

obtener el máximo aprovechamiento y aporte de nutrientes por inoculo (Farag *et al.*, 2013; Habibi *et al.*, 2014).

FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno es el nutriente que más limita a las cosechas y es uno de los elementos claves en la nutrición mineral. El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmosfera (el 78% está constituido por nitrógeno); irónicamente es el más difícil de conseguir, esto se debe a que el nitrógeno atmosférico (N_2) es inerte y no puede ser asimilado por las plantas o animales. Para que pueda ser utilizado, hay que romper esos enlaces y fijar o unir el nitrógeno a otros elementos, como al hidrógeno u oxígeno, solo así, bajo la forma de iones de nitrato (NO_3) o amonio (NH_4) las plantas son capaces de tomar el nitrógeno e iniciar la fabricación de aminoácidos y por consecuencia sus proteínas (Baca, 2000).

Hace poco más de 15 años se descubrió que el proceso que se llevaba a cabo de forma industrial para la formación de nitrógeno asimilable (NH_4 y NO_3), lo podían realizar de forma natural algunas bacterias y algas unicelulares mediante un método enzimático. *Herbaspirillum*, *Enterobacteriaceae*, *Stenotrophomonas*, *Acidovorax*

Pseudomonas, *Azospirillum* y *Acidovorax* son algunos géneros bacterianos reportados como fijadores de nitrógeno.

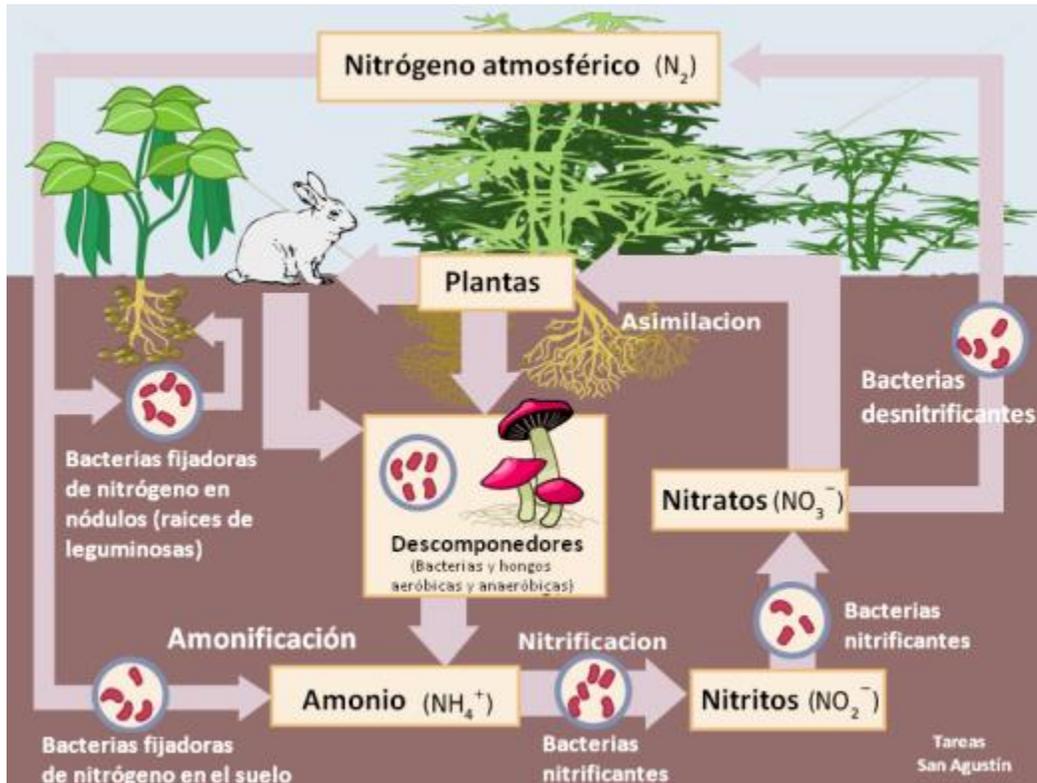


Figura 3. Ciclo de la fijación biológica del nitrógeno imagen tomada de Wikipedia (2007).

Todos los microorganismos que convierten el N_2 en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa; esta enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa (Postgate, 1982).

SOLUBILIZACION DE FOSFATOS

El fósforo también es considerado como un macroelemento fundamental para el crecimiento y desarrollo de la planta. El ciclo del fósforo se puede describir como abierto o sedimentario, ya que no existe un intercambio con la atmósfera. Los microorganismos juegan un rol importante en el ciclo del fósforo. Este proceso ocurre mediante la oxidación y reducción cíclica del fósforo, donde las reacciones

de la transferencia de electrones entre las diferentes fases de oxidación van de fósforo (-3) a fosfato (+5). Los principales mecanismos para la solubilización de fosfato por parte de las bacterias es la producción de ácidos orgánicos tales como: ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico y ácido propiónico y fosfatasas acidas las cuales se encargan específicamente de liberar el fosforo del ácido fítico (Saghir *et al.*, 2014). La concentración de fosforo soluble en el suelo es usualmente baja, normalmente a niveles de 1 ppm o menos. Las plantas específicamente son capaces de tomar diferentes formas de fosforo del suelo pero la mayor parte es tomada en forma de HPO_4^{2-} o H_2PO_4^- (Rodríguez & Fraga, 1999).

El uso de bacterias solubilizadoras de fosfatos como inoculantes incrementan la toma de fosforo por la planta y aumenta el rendimiento del cultivo. Géneros como *Pseudomonas*, *kurthia*, *Bacillus* y *Escherichia* se encuentran entre los mayores solubilizadores de fosfatos (Liu *et al.*, 2014).

REGULADORES DE CRECIMIENTO

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés), los reguladores son definidos como cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la intención de, mediante una acción fisiológica acelerar o retardar la tasa de crecimiento, maduración o por otra parte alterar el comportamiento de la planta o su producción. Las hormonas son compuestos orgánicos que son efectivas a muy bajas concentraciones, usualmente sintetizadas en una parte de la planta y después movilizadas a otro punto, estas hormonas interactúan con tejidos específicos para causar respuestas fisiológicas, usualmente 2 o más hormonas son responsables de estos cambios. Basados en su estructura química y su efecto sobre la planta, las hormonas pueden ser divididas en 5 grupos: auxinas, gibelinas, citoquinina, etileno y un grupo llamado inhibidores el cual incluye ácido abscísico (ABA), fenoles y alcaloides (Saghir *et al.*, 2014).

Tanto las auxinas como la citoquininas inducen la división celular y el crecimiento de estas, además de provocar dormancia en las semillas, floración, frutos y senescencia de la planta. Las giberelinas es otro regulador del crecimiento que

afecta a la germinación de las semillas, estimula el crecimiento de las plantas y retrasa el envejecimiento (Miransari & Smith 2009).

El ácido abscísico es uno de los más fuertes inhibidores del crecimiento y germinación, además de promover la dormancia de las semillas. Por otra parte, el ABA ayuda a las plantas a soportar el estrés abiótico. Estudios en el maíz revelan que la producción de ácido abscísico en conjunto con giberelinas contribuyen significativamente a aliviar el estrés hídrico, produciendo el mismo efecto que las bacterias promotoras del crecimiento. El etileno como hormona inhibitoria en las plantas regula muchos procesos fisiológicos como la germinación, desarrollo de pelos radiculares, senescencia de órganos y hojas y maduración de frutos. (Saghir *et al.*, 2014). El etileno en las plantas es considerado una hormona de estrés la cual es sintetizada en la planta y que aumenta por un sinnúmero de factores bióticos y abióticos, en altas concentraciones el etileno es capaz de inhibir el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

ACC DEAMINASA

La enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa es capaz de mitigar el estrés por etileno. Las bacterias capaces de producir ACC deaminasa primeramente deben adherirse a la superficie de la planta (usualmente semillas o raíz). Junto con otros compuestos de bajo peso molecular, algo de ACC de la planta es exudado por las semillas, raíces u hojas y es tomada por la bacteria asociada al tejido y posteriormente anclada por una ACC deaminasa. El ACC es el precursor inmediato del etileno (C_2H_4) SAM es convertido a ACC por la enzima ACC sintasa; ACC es convertido en etileno por ACC oxidasa, pero cuando la ACC es hidrolizado por la ACC deaminasa resulta en la formación NH_3 y α -ketobutirato y de esta manera es capaz de reducir los niveles de etileno y evitar el estrés producido por las altas concentraciones (**Figura 4**), algunas de las bacterias reportadas como productoras de ACC deaminasa pertenecen a géneros como *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*. Las bacterias utilizan NH_3 producido por la hidrólisis del ACC como fuente de nitrógeno y de esta manera evita la acumulación de etileno dentro

de la planta, que de otra manera inhibiría el crecimiento. Al mismo tiempo que los niveles de ACC aumentan, también la producción de ACC deaminasa por parte de la bacteria, así el aumento en la producción del etileno decrece significativamente (entre 50-90%). Debido a que el ACC oxidasa tiene mayor afinidad a la molécula de ACC, es importante que las ACC deaminasas actúen antes para evitar la formación de grandes cantidades de etileno (Saghir *et al.*, 2014).

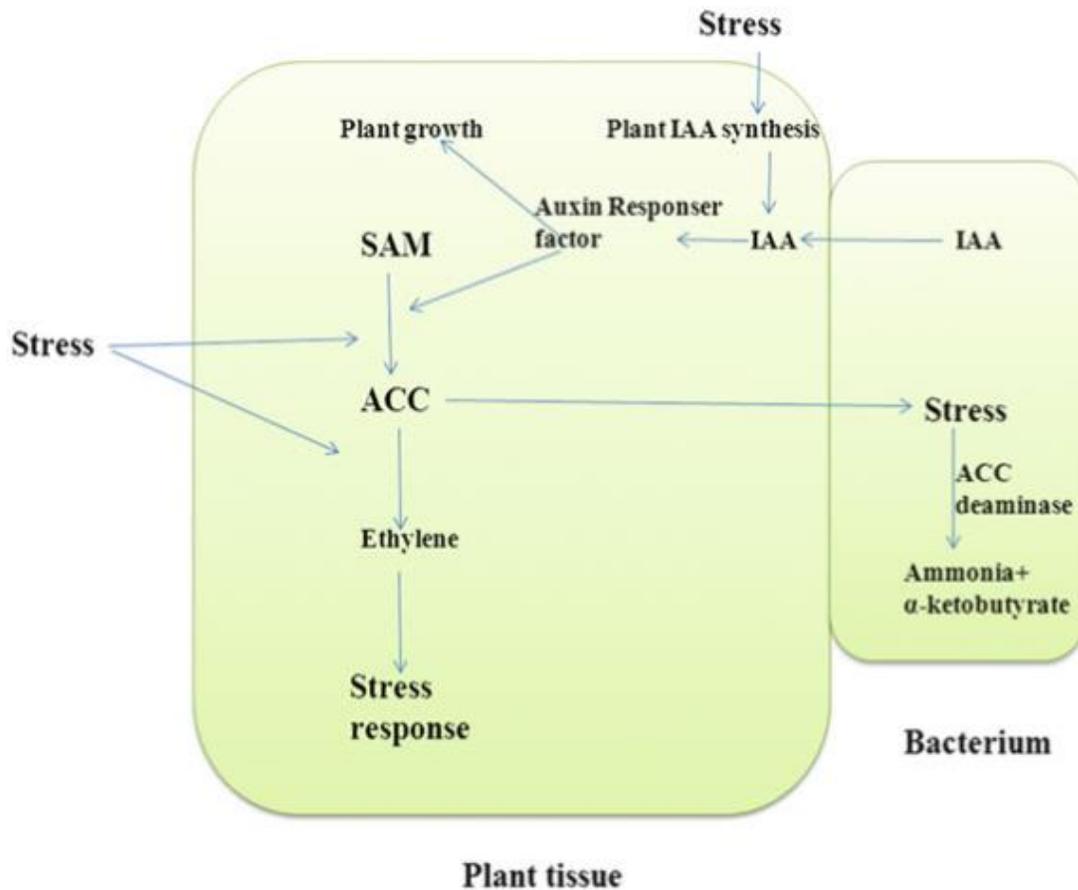


Figura 4. Modelo esquemático de la asociación bacteria-planta para la reducción del etileno mediante ACC deaminasa. ACC 1-aminociclopropano-1-carboxilato, IAA ácido indolacético, SAM S-adenosil metionina. Figura tomada de Saghir *et al.* (2014)

SIDEROFOROS

El hierro es esencial para muchos procesos biológicos como la respiración y la síntesis de DNA. A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en la tierra, la disposición del hierro en diversos ambientes es limitada debido a la baja solubilidad que presenta el Fe^{3+} . En ambientes aeróbicos el hierro se acumula en diversas fases minerales, tales como óxidos de hierro e hidróxidos, lo cual lo hace inaccesible para las plantas y otros organismos. Algunos microbios en cambio, desarrollaron una estrategia en la cual mediante la liberación de sideróforos (del Griego: acarreador de hierro) tanto hongos como bacterias, secretan compuestos

S.No.	Siderophores	Producing organisms
1	Hydroxamate	
A	Ferrichrome	<i>Ustilago sphaerogena</i>
B	Desferrioxamine B (deferoxamine)	<i>Streptomyces pilosus, Streptomyces coelicolor</i>
C	Desferrioxamine E	<i>Streptomyces coelicolor</i>
D	Fusarinine C	<i>Fusarium roseum</i>
E	Ornibactin	<i>Burkholderia cepacia</i>
2	Catecholate	
A	Enterobactin	<i>Escherichia coli</i>
B	Bacillibactin	<i>Bacillus subtilis, Bacillus anthracis</i>
C	Vibriobactin	<i>Vibrio cholera</i>
3	Mixed ligands	
A	Azotobactin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
B	Pyoverdine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	Yersiniabactin	<i>Yersinia pestis</i>

quelantes de hierro de alta afinidad de bajo peso molecular el cual toma el hierro de su fase mineral mediante la formación de complejos de Fe^{3+} el cual puede ser tomado mediante mecanismos de transporte activo (Saghir et al., 2014). Burd en 1998 comprobó bacterias productoras de sideróforos eran capaces de proteger a las plantas contra la toxicidad causada por los metales pesados.

Tabla 2. Ejemplos de algunos hongos y bacterias productoras de sideróforos.

Tomada de Saghir et al. (2014)

CONTROL BIOLÓGICO

Otra propiedad importante de los microorganismos es la aplicación como agentes de control biológico de plagas en plantas. Los organismos patógenos que afectan la salud de las plantas son una gran amenaza para la industria agrícola y la estabilidad del ecosistema. Desde hace un par de décadas los agricultores se han vuelto más y más dependientes al uso de agroquímicos como un método relativamente confiable para la protección del cultivo. El aumento en la aplicación de químicos tiene varios efectos negativos como por ejemplo el desarrollo de organismos patógenos resistentes a diferentes agentes de control, además del incremento en el costo de los pesticidas. Existe un gran número de enfermedades en las cuales las soluciones químicas son limitadas, inefectivas o inexistentes; obligando a voltear hacia otro lado en búsqueda de nuevas alternativas. Así es como el control biológico es puesto en consideración como una alternativa o como suplemento en la búsqueda de reducir el uso de químicos en la agricultura. Los mecanismos de biocontrol más conocidos utilizados por los microorganismos son la competencia por el mismo nicho o sustrato, la producción de compuestos aleloquímicos inhibitorios y la inducción del sistema de resistencia contra patógenos o estrés abiótico (Compant, 2005). Para que las bacterias sean efectivas, deben colonizar las raíces de plantas, internalizarse y sobrevivir al menos hasta ejercer su efecto positivo sobre el nicho donde se desarrolle, además implica el uso de microorganismos nativos no patogénicos que sean capaces de reducir la actividad de los patógenos de las plantas y a su vez reprimir la enfermedad (Ashwini *et al.*, 2014). Por lo tanto, controlar estos patógenos usando microorganismos como biocontrol ayudara a aumentar los rendimientos en los cultivos de maíz.

Un agente de biocontrol debe poseer ciertas características como 1) ser un eficiente colonizador de la raíz para ser capaz de liberar el antibiótico dentro de los tejidos de la raíz, 2) protegerse de sus depredadores (protozoos) en la rizósfera y seguir ejerciendo un efecto sobre la planta y 3) liberar antibiótico en nichos específicos donde sean requeridos. Las bacterias pueden directamente inhibir patógenos mediante propiedades antagónicas, competencia por hierro, detoxificación o degradación de factores de virulencia o indirectamente mediante la inducción de

sistemas de respuesta a patógenos (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Ciertas bacterias endófitas son capaces de inhibir el crecimiento de hongos o bacterias patógenas por uno o varios mecanismos.

La íntima relación que mantiene las bacterias endófitas con la planta puede ser utilizada para desarrollar biofertilizantes eficientes y agentes de biocontrol (Sevilla & Kennedy, 2000) en la búsqueda de una agricultura sustentable capaz de soportar los requerimientos alimentarios futuros.

FERTILIZANTES QUÍMICOS

Las estrategias comúnmente utilizadas para el manejo de los cultivos involucran el uso de pesticidas, fertilizantes y prácticas tales como, la rotación del cultivo, la implementación de compuestos orgánicos, uso de cultivares resistentes a patógenos (Raaijmakers *et al.*, 2009) además de la baja eficiencia de algunas de estas técnicas, hay creciente inquietud ambiental y de salud por todos aquellos residuos resultado del uso de pesticidas y fertilizantes. Estas malas prácticas agronómicas directamente favorecen al desarrollo de patógenos más resistentes.

Los agricultores con la finalidad de subsanar la deficiencia de los nutrientes y a su vez aumentar los rendimientos de los cultivos hacen uso de los fertilizantes. Se sabe que el uso irracional de fertilizantes químicos deriva en una infinidad de problemas ambientales, principalmente contaminación de aguas subterráneas lo cual a su vez genera la evaporación de gases contaminantes (Lockhart *et al.*, 2013; Wu & Ma, 2015).

El uso de fertilizantes inorgánicos desde hace casi dos siglos ha traído como consecuencia la erosión de los suelos, a la vez que la carga de nutrientes se ve afectada y con esto la estabilidad del suelo y del microbioma que en él habita. La deposición de nitrógeno (N) puede interrumpir la interacción bacteria-planta, lo cual podría alterar las comunidades microbianas y las funciones del micro-ecosistema (Martinelli *et al.*, 2006). Además de que se ha demostrado en diferentes ecosistemas terrestres que las comunidades microbianas del suelo se ven profundamente afectadas por los diferentes de formas nitrógeno (Ramírez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Los contaminantes derivados de los fertilizantes nitrogenados y sus asociados en algunas situaciones se acumulan a niveles peligrosos o incluso tóxicos, causando eutrofización de mantos acuíferos y aguas subterráneas, enriqueciendo la atmosfera NH_3 o con N_2O . Las principales causas de lixiviación de NO_3 es causada por la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados en un intento por asegurar el máximo rendimiento. La lixiviación también tiene que ver con las características del suelo y el flujo de agua que exista (Miller & Cramer, 2005).

El amonio una forma de nitrógeno que presenta mayor resistencia a la lixiviación en el suelo, resulta ser más toxica para las plantas que el nitrato. De cualquier manera, la conversión de NH_4 a NO_3 (nitrificación) puede contribuir a la lixiviación de nitrógeno. Un estimado del total de N perdido por lixiviación de un fertilizante con su base en amonio va en un rango de 10 a 150 kg N ha^{-1} . La contaminación atmosférica por NH_3 por urea y sulfatos de amonio resultan en la volatilización de NH_3 . Se estima que alrededor del 15% al 25% de total de urea aplicada se volatiliza. La perdida por denitrificación va entre 5 y 10% del nitrógeno aplicado, del cual 10% es en forma de N_2O (Miller & Cramer, 2005).

TRANSPORTADORES DE NITROGENO

Las plantas responden a los altos y bajos niveles de nitrógeno en el suelo. Las concentraciones de nitrógeno inorgánico en el suelo pueden ir de un rango casi indetectable ($\sim 1 \mu\text{M}$) a 1 M. debido a esto las plantas han desarrollado complejos sistemas de absorción de N que le permiten tomar las diferentes formas de nitrógeno del suelo, aunque estas se encuentren en concentraciones muy bajas, permitiéndoles un desarrollo y crecimiento comparable a las plantas que se desarrollan en ambientes con mayor disposición de nitrógeno. Por otra parte, ciertas plantas han desarrollado mecanismos los cuales le permiten sobrevivir a la exposición a suelos tóxicos, particularmente esos con altos niveles de NH_4 (Britto & Kronzucker, s.f.). Para hacer más eficiente la toma de nitrógeno, las plantas crearon su propio sistema de transporte con diferentes características para adaptarse a las concentraciones de nitrógeno del medio. Se conocen dos tipos de sistemas de transportadores: Transportadores de baja afinidad (LAT's) y transportadores de alta

afinidad (HAT's). Los LAT's hacen posible la toma de N en altas concentraciones (>0.5mM), mientras que los HAT's permiten la absorción de N en bajas concentraciones (<0.5mM). Dentro de cada sistema co-existen 2 tipos de transportadores 1) constitutivo e 2) inducible. La expresión de estos cuatro tipos de transportadores es esencial para una eficiente toma de nitrógeno, y su expresión puede ser constitutiva o inducible, todo en función de la concentración externa de nitrógeno percibida por la planta.

TRANSPORTADORES DE NITRATOS

Dos familias de transportadores de nitratos han sido identificadas, NRT1/PTR y NRT2. Ambas familias de genes codifican para transportadores simportes de nitrato en conjunto con protones (H⁺) por medio de un mecanismo controlado por gradientes de pH a través de la membrana. Las plantas tienen 2 sistemas diferentes de toma de nitratos con la finalidad de hacer frente a las altas o bajas concentraciones de NO₃, por medio de transportadores de alta y baja afinidad. (HAT's y LAT's). En la raíz el nitrato es tomado por medio de HAT's cuando las concentraciones en el suelo van de 1 μM y 1mM y con LAT's cuando las concentraciones superan el 0.5 mM (Courty *et al.*, 2014). En el 2003 Glass describió la capacidad de los sistemas HAT's estimulándolos con diferentes concentraciones de NO₃, pero en presencia de glutamina o amonio estos transportadores sufrían una regulación negativa.

La familia de genes que codifica para la familia NTR2 son transportadores de alta afinidad, mientras que la familia NTR1/PTR codifican para LAT's. En el resto de la planta la familia NRT1 es responsable de la carga y descarga de NO₃ desde y hacia el xilema, mientras que la familia NRT2 se encargan del almacenamiento de NO₃ en vacuolas (Courty *et al.*, 2014).

El transcrito de NRT2.1 es inducido bajo bajas concentraciones de N y en presencia de NO₃, mientras que, bajo altas concentraciones de N, no importa cuál sea la forma es reprimido. La NRT2.1 se expresa principalmente en células epidermales de la raíz, sufre una regulación positiva en presencia de NO₃, luz o una fuente externa de carbono y es reprimida por el amonio.

TRANSPORTADORES DE AMONIO

El amonio por su parte es una de las formas en la que las plantas son capaces de asimilar el nitrógeno y la cual representa menor gasto energético para la planta. El amonio es tomado por uno más transportadores en la membrana plasmática de la raíz. El estudio fisiológico de la toma de amonio ha demostrado diferencias entre los transportadores por lo cual fueron denominados y separados en dos grupos. Uno de ellos denominado transportador de amonio de alta afinidad (HAT's), el cual predomina en bajas concentraciones de amonio. El segundo grupo encargado de la toma de amonio es denominado transportadores de baja afinidad (LAT's) el cual se expresa significativamente en altas concentraciones de NH_4 (arriba del 1mM). Se sugiere que los LAT's pueden transportar NH_4 por medio de canal de cationes o NH_3 a través de la membrana plasmática (Sohlenkamp *et al.*, 2000).

Los transportadores de amonio incluidos los de la familia AMT1 en plantas, son capaces de transportar metil amonio al igual que el amonio, esto es bueno debido a las plantas son capaces de tomar el carbono del metil amonio, contrastantemente la familia AMT2 no es capaz de hacerlo. El AMT2 se ha detectado en raíz y tallo. Los transcritos de este transportador se han encontrado expresados en células vasculares, corticales y en la parte apical de la raíz.

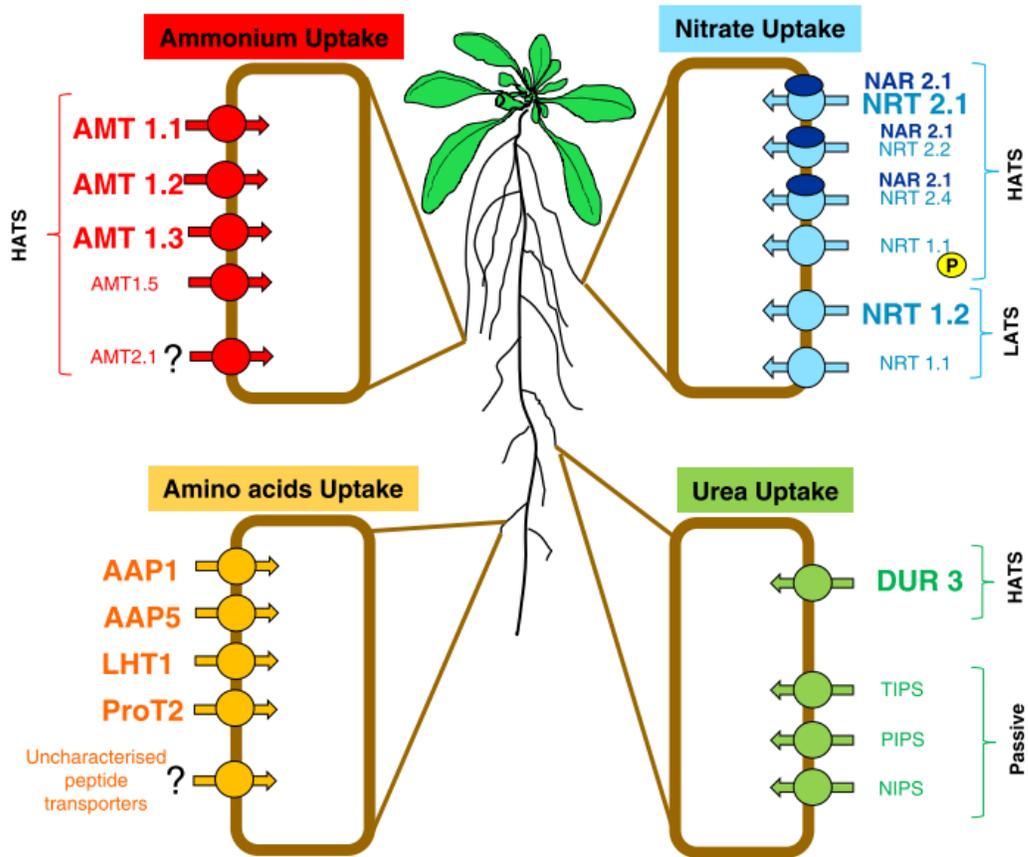


Figura 5: Representación esquemática de los diferentes tipos de transportadores de nitrógeno. Proteínas agrupadas por afinidad de sustrato (HAT's y LAT's) figura tomada de Nacry *et al.* (2013).

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Medios de cultivo Agar soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxon)

Agar cuenta estándar (BD Bioxon)

Caldo de soya tripticaseína (TSB) (MCD-LAB)

L-Triptófano (Sigma Aldrich)

Trizma base (Sigma Aldrich)

EDTA (Sigma Aldrich)

Sacarosa (HYCEL)

Cloruro de sodio (MERCK)

3,3'-diaminobencidina (DAB) (SIGMA)

TEMED (Sigma)

KITS PARA EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

MOBIO UltraClean™ para extracción de ADN

Wizard Genomic DNA Purification Kit para purificación de ADN

EQUIPO DE LABORATORIO

Centrifuga refrigerante Nuair MF 20-R

Termociclador NYX TECHNIK Analog Rocker Apollo™ by CLP

Foto-documentador Apollo™ de 115V y 60 Hz

Cámara bioclimática PRECISION Thermo Scientific

Fuente de poder EC3000P serie 90 programable de E-C

Fuente de poder Voltronix NYX TECHNIK

Microscopio ZEISS PrimoStar con objetivos de 5X, 10X, 40X y 100X

Ultra-congelador "Ultra Low Temperatura Freezer" Super -80°C (Haier BIOMEDICAL) modelo DW-80L388A

Agitador orbital Thermo Scientific Modelo 4320

Autoclave FelisaR Modelo FE-397 (1Kg/cm² psi)

Estufa modelo E-33 de Aparatos de Laboratorio B-6

Incubadora (VWR)

Balanza analítica Adventurer (Item No. AR2140)

Espectro UV-VIS "Espectrameter uv-vis" Perkin Elmer Lambda 25

Computadora Lenovo con Software Windows Vista

Vortex-Genie 2 modelo 6560

Refrigerante -20°C Kelvinator modelo HFM151K6W1

Cámara de electroforesis EASY-CASTTM modelo #B1A

Espectro de masas MALDI-TOF modelo Autoflex Speed Brucker

METODOS

EXTRACCIÓN DE BACTERIAS DE RIZOSFERA

En una campana de flujo laminar y con un bisturí previamente esterilizado y flameado, se raspó el exceso de tierra pegado a la raíz dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml. con 1 ml de solución salina al 0.9% y se realizaron diluciones seriadas. Las diluciones se llevaron a cabo colocando 900 µl de solución salina al 0.9% y 100 µl. del tubo anterior y posteriormente se plaqueó en agar tripticaseína de soya (TSA) colocando 100 µl. para realizar los aislados.

LAVADO DE RAÍZ

El lavado de raíz se llevó a cabo con etanol al 85%, cloro al 1.2% y agua destilada previamente esterilizada con la finalidad de desinfectar la raíz y evitar contaminación por bacterias y hongos presentes en la superficie de ésta. Se colocó la raíz en una canastilla porosa estéril y se realizó un primer lavado en etanol al 85% durante 30 segundos haciendo agitaciones momentáneas, posteriormente se hicieron dos lavados con cloro al 1.2% durante 10 minutos haciendo agitaciones regulares. Trascurridos los 10 minutos, se realizaron tres lavados en agua destilada; estos lavados duraron 5 minutos cada uno haciendo agitaciones esporádicas, para eliminar el cloro restante de la superficie de la raíz.

EXTRACCIÓN DE ENDÓFITOS DE RAÍZ.

Se maceró la raíz en 5 mililitros de agua destilada estéril, una vez completamente macerada se tomaron 100 µm del líquido y se colocaron en un tubo eppendorf de 1ml. con 900 µl de solución salina al 0.9% y se realizaron diluciones seriadas. Se plaqueó entre diluciones.

CONTEO DE BACTERIAS POR METODO DE PLAQUEO EN AGAR.

Se tomaron 100 µl de cada dilución y se plaqueó en agar cuanta estándar y se incubaron durante 3 días a 30 °C, posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

AISLADO DE BACTERIAS

Las bacterias fueron aisladas con base en sus características morfológicas y color de la colonia, además de tinción Gram. Las colonias purificadas fueron preservadas por triplicado en tubos eppendorf de 2 ml con 1.5 ml de agar tripticaseina de soya.

TINCIÓN GRAM

Se colocó una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos limpio. Se flameo el asa de siembra y se dejó enfriar. Se tomó una pequeña cantidad de colonia

de un cultivo de 24 hrs se homogenizó y extendió en la gota de agua para facilitar su secado. Se esperó a que el frotis se secase y se fijó con calor.

Se tiñó con cristal violeta (agregando suficiente colorante) y se dejó actuar por 1 minuto. Se lavó de nuevo con agua. Se inundó con yodo de gram, y se dejó actuar 1 minuto, y se lavó suavemente con agua. Se agregó safranina como tinción de contraste y se lavó de nuevo con agua. Se dejó secar y se examinó al microscopio con el objetivo 100X.

CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AUXINAS EN MEDIO LIQUIDO SUPLEMENTADO CON 5MM DE L-TRIPTOFANO.

Para llevar a cabo la cuantificación de auxinas liberadas al medio líquido en presencia de L-Triptofano se realizó una modificación al método presentado por Sawar y Kremer (1995). Se incubaron las bacterias durante 24 horas en cajas con TSA. Para preparar el inóculo, se tomó biomasa bacteriana de la caja y se resuspendió en 750 µl. en caldo de soya tripticaseína (TSB) al 50% y se incubaron 24 horas a 30 °C. Al finalizar el tiempo de incubación se resuspendió 50 µl. del cultivo en 750 µl. de TSB al 50% suplementado con 5 Mm de L-Triptofano y se incubó en oscuridad 3 días a 30 °C.

Para la cuantificación de auxinas se centrifugaron los tubos a 12 rpm durante 7 minutos. Se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml y a su vez se colocó la misma cantidad de reactivo de Salkowsky (Gordon & Weber, 1951), se dejó reaccionar por 45 minutos a temperatura ambiente. Un resultado positivo mostró una coloración rosada a rojo intenso. Se realizaron las lecturas con espectrofotómetro a 530 nm.

La curva de calibración se realizó utilizando indol (sigma) como referencia, se realizaron estándares desde 60 µg/ml hasta 0.46875 µg/ml.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO POR CRECIMIENTO EN MEDIO LIBRE DE NITRÓGENO NFB.

La prueba de la capacidad fijadora de nitrógeno de las diferentes cepas se llevó a cabo a través del análisis de la capacidad de crecimiento de bacterias en un medio selectivo libre de nitrógeno con dextrosa como fuente de carbono. La cepa se cultivó en TSA y se incubó por 24 hrs a 30 °C para preparar el inóculo se tomó una colonia aislada y se colocó en el centro de una caja petri en el medio NFB. Las bacterias nuevamente se dejaron incubar a 30 °C por 4 días más. El cambio de coloración del medio, a color azul indicó su capacidad de fijación de nitrógeno.

El medio se preparó de la siguiente manera (g/L): se pesaron 10 g/L de dextrosa, 1g/L de K_2HPO_4 , 0.2 g/L de sulfato de magnesio, 1 g/L de carbonato de calcio, 0.2 g/L de cloruro de sodio, 0.005 g/L de molibdato de sodio, 0.1% g/L de sulfuro ferroso y 15 g/L de agar bacteriológico. Finalmente se ajustó el pH a 6.8-7.2 con Hidróxido de sodio o ácido clorhídrico según correspondio.

MEDIO DE SIDEROFOROS PARA DETERMINAR QUELANTES DE HIERRO

Se realizó la detección de producción de sideróforos colocando las cepas en TSA e incubando por 24 hrs a 30 °C para preparar el inóculo. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se colocó en el centro de una caja petri en el medio de sideróforos alrededor de 4 días. Un resultado positivo se mostró con una coloración naranja/rosada alrededor de la colonia. El medio de cultivo se elaboró de la siguiente manera: se colocaron 60.5 μg de cromo azurol en 50 ml de H_2O desionizada y se mezcló con 10 ml de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ al 1 μM y 10 μg en agitación. Se agrega 72.9 μg de CTAB en 40 ml de agua esterilizada.

Se esteriliza una mezcla de 750 ml de H_2O , 15 gr de agar bacteriológico, 30.24 gr de pipes y 12 g de una solución al 50% de NaOH.

Ya esterilizada la solución se mezcla y se agita.

Nota: todo debe lavarse con HCl 6M y enjuagar con agua destilada desionizada al menos cinco veces.

ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS.

La producción de enzimas celulolíticas se determinó mediante la generación de un halo en el medio de cultivo. Para la preparación del medio se agregó 7.5 g de agar bacteriológico en 500 ml de agua destilada, 0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de $MgSO_4 \cdot H_2O$, $NH_4H_2PO_4$, 0.7 g de KCl y 5 g de sodio carboxi-metilcelulosa y se esterilizó.

MEDIO PARA PRUEBA CUALITATIVA DE ACTIVIDAD DE ACC-DEAMINASA

La determinación de la actividad de ACC deaminasa se basó en el método de Penrose & Glick (2003). Se preparó una solución 0.5 M de ACC (Sigma Aldrich), esterilizada por filtración con una membrana de 0.45 μm . El filtrado se recolectó y se almacenó congelándose a $-20\text{ }^\circ C$. La solución de ACC se descongeló, usándose solamente alícuotas de 300 μl por cada 50 ml de medio de sales DF.

Al ser sensible a la temperatura y la luz el ACC se agregó al medio a temperatura ambiente, homogenizando por agitación, se depositaron 15 ml de medio por caja de Petri. Después de agregar el ACC, se debe usar lo más pronto posible el medio. Las bacterias fueron lavadas en solución salina antes de ser pasadas al medio de ACC para eliminar posibles residuos del medio nutritivo en el que fueron cultivadas. Las placas con inóculo, fueron incubadas por 3 días, en oscuridad y sin superar los $35\text{ }^\circ C$, porque todas las ACC-deaminasas conocidas son inhibidas a esta temperatura y se evaluó diariamente el crecimiento bacteriano. Un resultado positivo se apreció con un crecimiento en el medio. La única fuente de nitrógeno en el medio fue el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo (ACC). La presencia de ACC induce la actividad de la enzima ACC-deaminasa que hidroliza el grupo amino, dejando α -cetobutirato y amoníaco.

ANALISIS MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFERICAS.

EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

Para la secuenciación e identificación de las bacterias se realizaron las extracciones con el kit MOBIO UltraClean™ de la siguiente manera. Se añadió 300 μl de MicroBead Ultraclean Solution en un eppendorf de 2ml y se colocó una asada

bacteriana. Posteriormente se añadió 50µl de Solución MD1 (Solución SDS y jabón), se mezcló en el vortex 5 segundos y se incubó 10 minutos a 65 °C, la mezcla fue transferida a un nuevo tubo (Microbead) y se vortexeó durante 10 minutos. Se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm y pasó el producto a Microtubos de 2ml proporcionados en el kit. Se añadió 100 µl de MD2 y se vortexeó 5 segundos. Se incubó por 5 minutos a 4 °C en hielo. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto y transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le añadió 900µl de MD3 y se mezcló por inversión. Se pasó la mitad del volumen a un nuevo tubo con membrana y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, se colocó el resto del volumen en la misma membrana y se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadió 300µl de MD4 a la membrana y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm, y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se añadió MD5 (25µl) y dejó reposar 5 minutos para después centrifugarlo a 14,000 rpm, este paso se repitió una vez más con la finalidad de conservar un producto concentrado con un volumen final de 50µl. Posteriormente se realizó un gel de agarosa para evaluar la calidad del ácido nucleico (ADN).

PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA PARA INTEGRIDAD DE ADN Y PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN.

Para la verificación de la integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE al 0.5x. Se utilizó un voltaje de 100V por 45 minutos.

Para disolver la agarosa se calentó por lapsos de 10 segundos en TBE hasta que la solución quedara completamente transparente. Se agregó la solución al porta gel evitando la formación de burbujas, y se colocó el peine para pozos esperando hasta que el gel solidifique.

Se agregó a la cámara un buffer de corrida (TBE 0.5X). Los pozos fueron cargados con ADN 6X buffer de carga, ADN y GelRed 1X. Se colocó marcador de peso molecular 1kb plus, se corrió a 100V por 60 minutos para el gel de integridad de ADN.

Posteriormente se realizó una PCR para la amplificación del fragmento 16S ADNr. los componentes para la reacción en cadena de la polimerasa, para un volumen

final de 25µl. Los reactivos utilizados para la amplificación de los fragmentos de 16SADNr, incluyendo la Taq polimerasa y los oligos seleccionados de acuerdo a los pares de bases en que cortan (27 Forward 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1525 Reverse 5' - AAGGAGGTGWTCCARCC-3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo de la siguiente manera: una desnaturalización inicial de 95 °C y un total de 30 ciclos que consistían en la desnaturalización a 95 °C, el alineamiento a 52 °C y la elongación de la cadena a 72 °C y una elongación final de igualmente 72 °C. Una vez terminada la reacción se mantuvieron las muestras a 4 °C, condición otorgada por el termociclador, hasta que se retiraban y se almacenaban a -80 °C. Las condiciones se determinaron una vez revisada la literatura (Hogg & Lehane, 1999; Oto & Suda, 2010).

La purificación se llevó a cabo con GenJet Gel Extraction Kit (Thermo®) de la siguiente manera: Para 100µl de ADN se agregan 500µl de binding Buffer y se mezcla por inversión, posteriormente se pasó el producto a la columna proporcionada y se centrifugó durante 1 minuto y 30 segundos a 10,000 rpm y 20 °C. y se eliminó el líquido. Después se añadió 500µl de Washing Buffer-Etanol a la membrana y se centrifugó durante 1 minuto y 30 segundos a 10,000 rpm y 20 °C y eliminó el líquido. Se añadió 200µl de Washing Buffer-etanol, se centrifugó y se tiró el líquido. Se añadió 25µl de Buffer de elución y dejó reposar 5 minutos. Para finalizar se centrifugó bajo las mismas condiciones y se añadió nuevamente 25µl de Buffer de elución y se centrifugó por última vez y se conservó el producto.

Una vez realizada la purificación se realizó un gel de integridad de agarosa para corroborar que la muestra de ADN quedó libre de contaminantes. Para obtener las secuencias se utilizaron los servicios de secuenciación de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), para su posterior análisis realizándose un blast de nucleótidos en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y Greengenes (greengenes.lbl.gov).

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.

se identificaron las bacterias mediante un perfil proteico con la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, en combinación con el BIO-TYPER

software. Para obtener el perfil proteico se agregaron 300 µl de H₂O en un tubo de 1.5 ml. Se tomó biomasa con un palillo y se colocó en un tubo de 1.5 ml y se vortexeó 5 seg. Posteriormente se agregó 900 µl de etanol y se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm. Se tiró el sobrenadante, cuidando de no tirar el pellet. Se repitió el paso para eliminar exceso de etanol. Se esperó aproximadamente 20 minutos a que el exceso de etanol se evaporara. Se agregó ácido fórmico al 70% dependiendo de la cantidad de pellet (10µl-50µl) y se agitó 2 segundos en un vortex. Se usó la misma cantidad de acetronilo y se vortexeó 2 segundos, se centrifugó 2 minutos a 12 rpm. Se tomó 5 µl de sobrenadante y se colocó en el pozo (procurando que cubriera todo el pozo y esperando a que seque). Al finalizar, se agrega lo antes posible 0.5 µl de matriz (que no exceda más de 10 minutos). Se espera a que seque y se leen en el espectrómetro de masas.

PRUEBAS DE GERMINACIÓN Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS

ANÁLISIS DE GERMINACIÓN MEDIANTE LA INTERACCIÓN BACTERIA-SEMILLA, TOMANDO COMO PARÁMETROS PRODUCCIÓN DE AUXINAS Y SU CAPACIDAD DE FIJADORA DE NITRÓGENO.

La selección de bacterias para inocular a las semillas se llevó a cabo tomando como parámetros su capacidad fijadora de nitrógeno y su producción de auxinas.

Para preparar el inóculo se sembraron las bacterias en 15 ml. de TSB en un tubo falcon de 50 ml por 24 hrs. Con las bacterias listas se realizaron 3 lavados con glucosa al 0.1% para eliminar el medio de cultivo. Los lavados se efectuaron de la siguiente manera: se centrifugó el tubo a 7,000 rpm a 4 °C y se tiró el sobrenadante posteriormente se agregaron 20 ml de glucosa al 0.1% y se resuspendió, este paso se repite el número de veces que se requiera. Concluidos los lavados las bacterias se ajustan a una absorbancia de 0.500 nm.

Las semillas de maíz que se utilizaron en el experimento fueron lavadas y desinfectadas. Los lavados para remover el fungicida de la superficie de la semilla se llevaron a cabo con agua destilada estéril en agitación. Los lavados se realizaron hasta dejar libre de fungicida a la semilla. Para desinfectarlas se le realizó un lavado

de 20 minutos con cloro al 1.2% y 3 lavados de 5 minutos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro. Se dejaron secar en una servilleta estéril.

Se inocularon las semillas de maíz embebiéndolas en 5 ml de bacterias ajustadas al 0.5 de absorbancia durante 1 hora en agitación.

Las semillas se sembraron en tubos falcon de 50 ml con 5 ml. de phytigel al 1.5% y se dejaron en oscuridad hasta su germinación, posteriormente se colocaron en una cámara bioclimática con 16 horas de luz y 8 oscuridad, a una temperatura de 30 °C.

EVALUACIÓN DE LA COLONIZACION

TINCIÓN CON 3,3'- DIAMINOBENCIDINA (DAB)

Se colocaron las plántulas en 3,3'- diaminobencidina (DAB) por 24 horas, cubriendo únicamente la raíz. Transcurridas las 24 horas se tomaron raíces completas y se le añadió azul de anilina al 1% por 15 minutos para generar un contraste, se eliminó el exceso con agua destilada estéril y se observaron al microscopio.

EXTRACCIÓN DE EMBRIONES DE MAIZ

Para la extracción de embriones de maíz, se obtuvieron mazorcas recién recolectadas de maíz blanco con la finalidad de encontrar granos suaves de los cuales se pudiera extraer el embrión con el menor daño posible. En caso de no contar con mazorcas se optó por granos secos, los cuales debían ser desinfectados para evitar contaminación por bacterias epifitas. Para desinfectarlos se les realizó un lavado de 20 minutos con cloro al 1.2% y 3 lavados de 5 minutos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro. Una vez desinfectados se dejaron remojando en agua destilada estéril con la finalidad de hacer blanda la semilla y poder extraer el embrión. Para la extracción del embrión se cortó la semilla con un bisturí en la parte opuesta al embrión para después desprender todo el endospermo pegado a éste. Para evitar que el embrión se deshidratara se colocaba en agua destilada estéril hasta su desinfección.

La desinfección del embrión se llevó a cabo realizando lavados con agua destilada estéril, para eliminar todo el exceso de endospermo. Una vez limpios los embriones se realizó un lavado con cloro al 0.9% durante 3 minutos, posteriormente se hicieron lavados con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de cloro, para después embeber los embriones en una solución de antibiótico. Los antibióticos utilizados fueron Penicilina G procaina (1mg/ml) y Streptomina sulfato (250 µg/ml) durante 1 hora y 30 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada y se pusieron a secar sobre gasas estériles.

Los embriones fueron sembrados en medio murashige y skoog (M&S) libre de fuentes de nitrógeno y con antibiótico al 5% con respecto a la cantidad utilizada en los lavados de embriones.

Los embriones fueron puestos en la cámara bioclimática con 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

INDUCCIÓN Y ANALISIS DE EXPRESIÓN DE GENES POR PCR TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (PCR-Q)

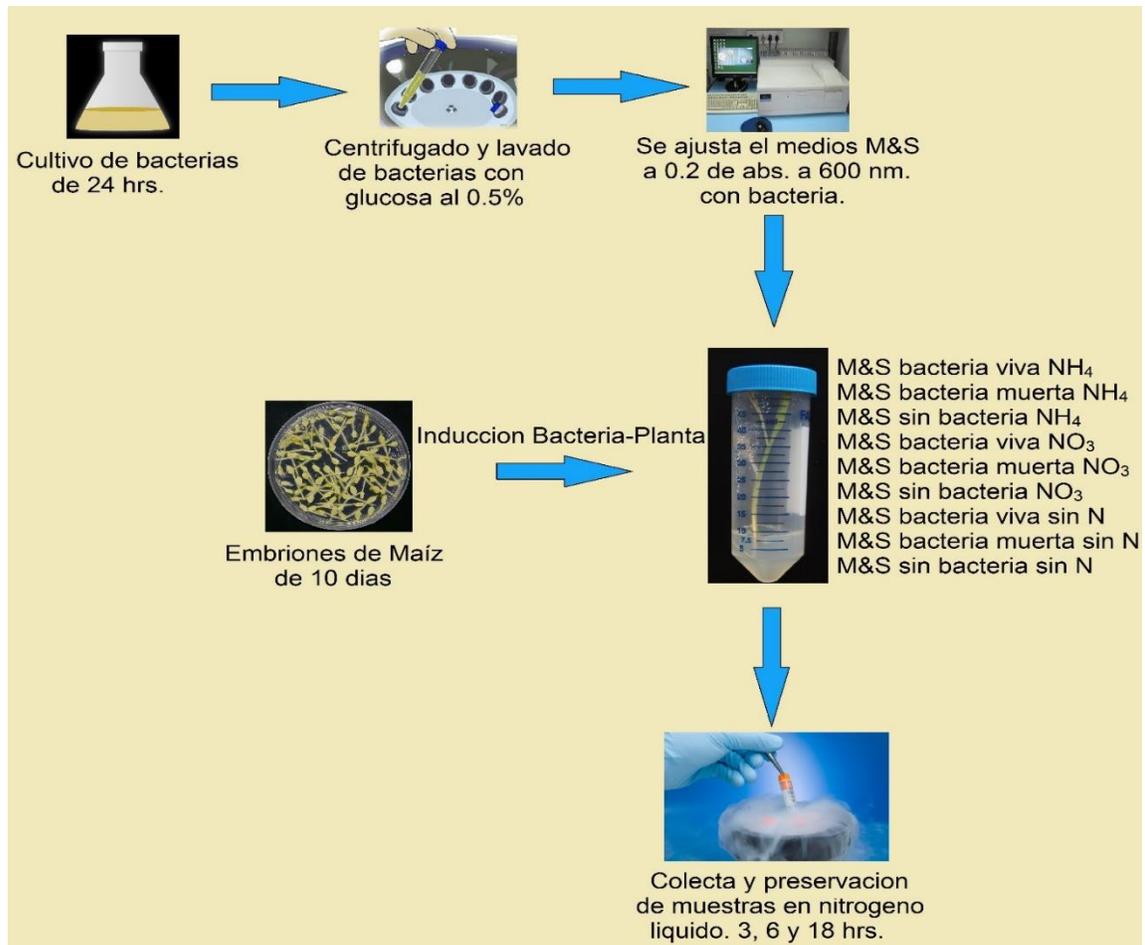
INDUCCIONES PARA DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES DE RAIZ

Las inducciones se llevaron a cabo a los 10 días post-germinación. Todas las inducciones se hicieron por duplicado para evitar la pérdida de muestras.

Los medios utilizados fueron M&S con NO₃, M&S con NH₄, M&S sin nitrógeno y con bacterias vivas y M&S sin nitrógeno con bacterias muertas. Los medios M&S sin nitrógeno y con bacterias fueron ajustados a una densidad óptica de 0.200 a 600 nm. El medio con bacterias muertas fue esterilizado en autoclave por 15 minutos y sometido a sonicación 10 minutos más.

Para las inducciones las plantas fueron puestas en un tubo falcon de 50 ml con rafia estéril y 5 ml del medio que correspondiera (M&S con nitrato, M&S con amonio, M&S bacterias vivas o M&S bacterias muertas). Las muestras fueron colectadas en diferentes tiempos (3, 6 y 18 hrs) y la raíz congelada con nitrógeno líquido para detener el proceso celular, hasta la extracción del RNA.

Figura 6. Esquematización del proceso de inducción bacteriana y preservación de muestras.



EXTRACCIÓN DE ARN DE PLANTA CON TRIZOL

Una vez que teníamos la raíz congelada con nitrógeno líquido fue macerada en un mortero. Las células fueron recuperadas y depositadas en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de TRIZOL y se vortexeó durante 5 segundos. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después agregarle 200 μl de cloroformo y se vortexeó 5 segundos. Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Después de centrifugar se

observaban 3 fases: la primera acuosa (ARN), la segunda color café (debris celular) y la tercera rosa (TRIZOL). Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo donde se le agregó 500µl de isopropanol y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm y se retiró el sobrenadante.

Nota: generalmente queda pellet, pero si no es así, no significa que no haya ARN, por eso es importante no tocar las paredes con las puntas.

Se agregó etanol al 75% preparado con H₂O DEPC y se vortexeó 5 segundos, en este momento se observaban hojuelas blancas en el tubo, en caso de no ser así, se raspa el tubo con una punta. Se centrifugó una vez más a 7,500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se dejó secar durante 20 minutos y se agregó 40µl de agua DEPC para resuspender el ARN.

SINTESIS DE cDNA

Una vez obtenido el ARN se realiza una electroforesis en gel agarosa al 1.2% con la finalidad de saber si la extracción de ARN fue exitosa.

Para llevar a cabo la síntesis del cADN es necesario eliminar todo el ADN que contamine nuestra muestra. Para esto se colocó el ARN en una reacción como se indica en la tabla 3. Se incubó a 37°C durante una hora, y finalmente se inactiva la enzima con 1 µl de solución stop (EDTA) a 65° C por 10 minutos.

Reactivo	Volumen
ARN en H ₂ O DEPC (100ng/µl)	3 µl
Buffer 10X	1 µl
Enzima ADNsa	3 µl
H ₂ O DECP	3 µl
	10 µl Volumen final

Tabla 3. Tratamiento con ADNsa (PROMEGA®)

Una vez que tenemos el ARN libre de contaminación con ADN se prepara la muestra para la síntesis de cDNA como se indica en la tabla 4.

Etapa	Reactivo	Volumen
Pre-RT	ARN tratado con ADNsa	3 μ l
	Oligo (dT) ₁₈	1 μ l
	H ₂ O DECP	1 μ l
RT	Buffer 5X	3 μ l
	<i>Ribolock</i>	0.5 μ l
	<i>dNTP Mix (10 mM c/u)</i>	2 μ l
	<i>Enzima Transcriptasa Reversa</i>	1 μ l
	H ₂ O DECP	8.5 μ l
		20 μ l Volumen final

Tabla 4. Síntesis de cDNA (Thermo®)

La etapa de Pre-RT consta de un ciclo a 65 °C durante 5 minutos. Una vez listo el ARN con el oligo dT unido a él, finalmente se hace la RT. Se realizó un mix como se indica en la tabla 4. Se colocó en el termociclador con los siguientes ciclos: un ciclo a 42 °C durante 60 minutos, seguido de un ciclo a 70 °C para la inactivación de la enzima y un ciclo infinito a 4 °C. una vez sintetizado el cADN fue almacenado a -20 °C hasta su uso .

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES DE RAÍZ, MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA PCR-Q

Para la cuantificación de la expresión de genes de raíz, se preparó un mix utilizando SYBR Green 2X (Thermo®), el oligo del gen de interés (10mM), cADN (200ng/μl) y agua destilada estéril para obtener un volumen final de 10μl.

Para la preparación del mix con el cual se cargó la placa, primeramente, se cuenta el número de muestras que se desea analizar por duplicado más dos muestras más, las cuales son nuestros dos controles negativos (H₂O) y que también se cargan en la placa, adicional a esto se toma en cuenta una muestra más por los errores de pipeteo posibles.

En el mix se carga por muestra 5μl de SYBR Green, 1μl de oligo del gen de interés a una concentración de 10mM (la cantidad de oligo que se adiciona al mix puede aumentar o disminuir dependiendo de la eficiencia del oligo). Para completar el mix se agrega la cantidad de agua necesaria para alcanzar los 10μl por reacción por muestra. Esto depende directamente la cantidad de cADN que se coloque para cada reacción, en caso de agregar 2μl de cDNA, se agregaran 2μl de agua, al agregar 4μl cDNA ya no es necesario agregar agua pues el volumen final de la reacción ya se alcanzó.

Nota: antes de pipetear cualquier reactivo esperar a que descongele completamente y vortexear ligeramente.

Nota: el cADN no se agrega al mix, el cADN se agrega directamente en la placa ya que cada muestra de cADN es un templado diferente.

Para cargar la placa de la PCR-q se recomienda vortexear el mix para homogenizar, posteriormente se coloca la cantidad que corresponde de mix en cada pozo y se completa con cDNA.

Las muestras fueron corridas en un termociclador Tiempo Real Step one de Applied Biosistem con el programa predeterminado en el método para uso de SYBR green.

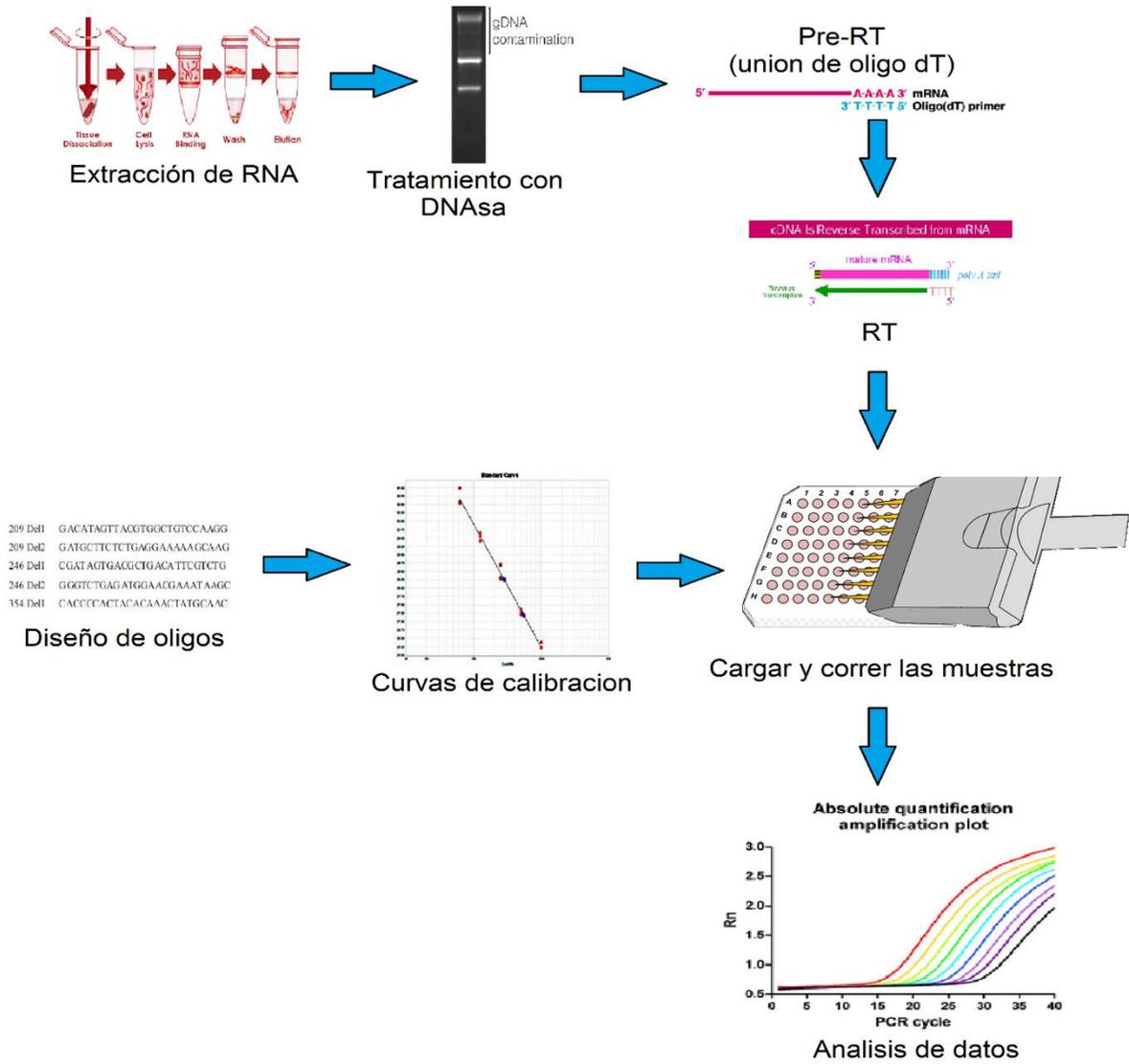


Figura 7. Representación esquemática de los pasos a seguir para la cuantificación relativa de genes.

Análisis del transcriptoma de la raíz de *Zea mays* tratada con dos cepas de *B. subtilis* endófito (Zm3.2) y Rizosférica (Zm5T2.1)

Se realizaron los ensayos de inducción en fibra de coco estéril irrigada con medio MS sin Nitrógeno, con bacteria o sin bacteria como se muestra en la figura 1.

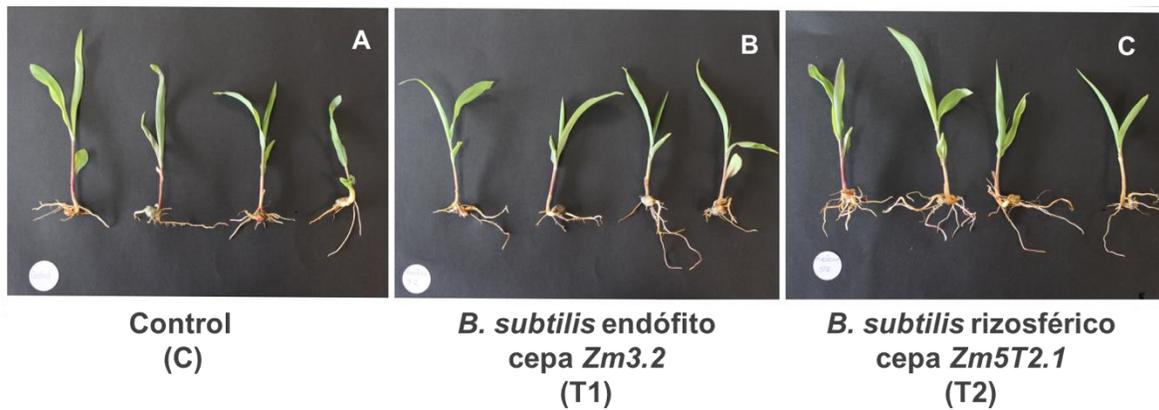


Fig.1 Plantas irrigadas con medio MS sin Nitrógeno con o sin *B. subtilis* 8 días post interacción de raíces con fibra de coco estéril.

Se extrajo el RNA total del pool de raíces y se purificaron 80 μ l de cada muestra con columnas de Zymo Research para RNA. En la figura 2 se muestra la integridad y la intensidad de las muestras obtenidas.

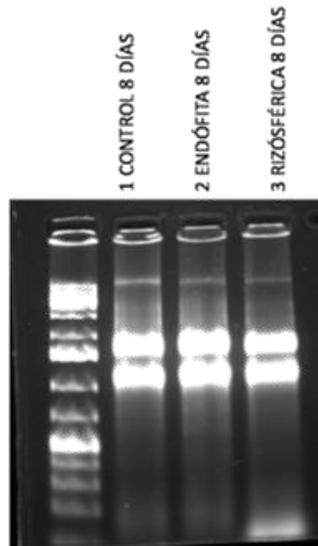


Fig. 2 2 μ l de RNA empleado para la síntesis de cDNA marcado con Cy3 (Control, línea 1, 423 ng/ μ l) o Cy5 (Tratamiento 1, línea 2, 252 ng/ μ l y Tratamiento 2, línea 3 276 ng/ μ l)

Las muestras de cDNA se hibridaron como se indica en la tabla 1, en un chip heterólogo de *Arabidopsis thaliana* (V.3.0.3) en la Unidad de Microarreglos de DNA del instituto de Fisiología celular en la UNAM.

Chip	Alexa 555 (Cy3)	Alexa 647 (Cy5)
16	Control 8 dpi (C)	Rizosferico 8 dpi (T2)
17	Control 8 dpi (C)	Endófito 8 dpi (T1)
18	Rizosferico 8 dpi (T2)	Endófito 8 dpi (T1)

Tabla 1 Protocolo de hibridación de chips de microarreglos con cDNA marcado con Cy3 y Cy5.

Los chips empleados se encuentran organizados en 12 meta filas x 4 meta columnas, con un total de 25 spots por cuadrícula de 25 filas x 25 columnas, como se muestra en la figura 3. Las imágenes se obtuvieron con GenePix Microarray Scanner.

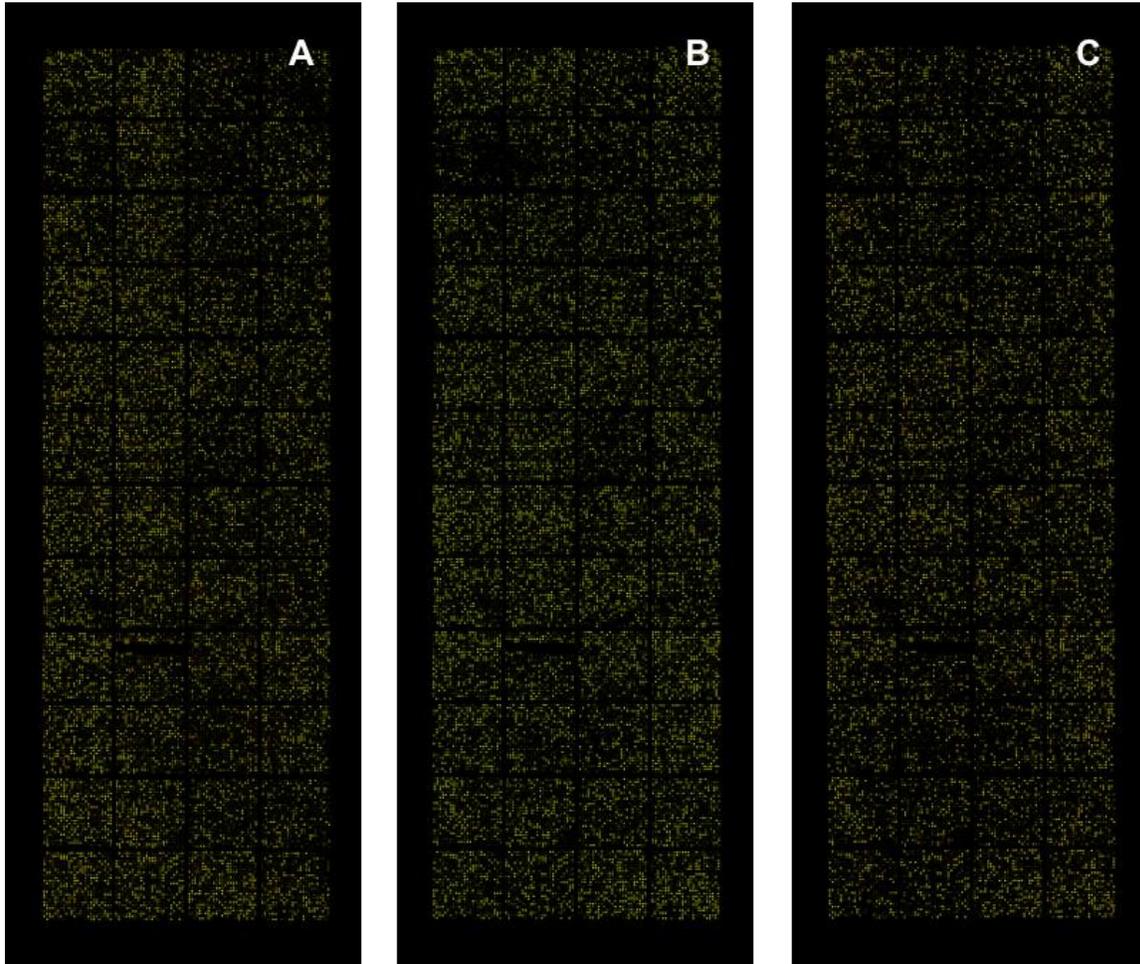


Fig. 3 Imágenes a color de los 3 chips de microarreglos. A Control vs Tratamiento 2, B Control vs Tratamiento 1 y C Tratamiento 2 vs Tratamiento 1.

Los archivos que contienen las medidas de las intensidades de los dos colores (Cy3 y Cy5) fueron leídas en el software R, con el paquete Limma (Linear models and differential expression for microarray data) de Bioconductor para determinar la expresión diferencial de los genes.

Después de corregir, normalizar y filtrar los datos se aplicó la estadística de Bayes para la obtención de la expresión diferencial estadísticamente significativa y se obtuvieron los resultados de la figura 4, cuando se contrastaron los tratamientos con el control.

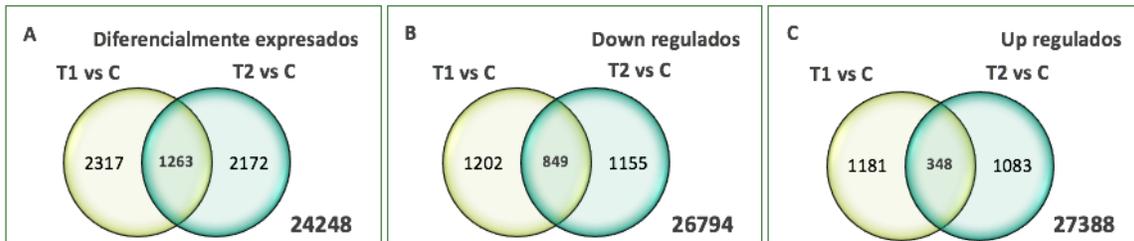


Fig.4 Diagramas de Venn representando la expresión diferencial de genes en las raíces de los dos tratamientos cuando se compara contra las raíces no tratadas tomadas como control. 1263 genes en común fueron diferencialmente expresados, de los cuales 849 se encontraron down regulados y 348 up regulados.

La gráfica de volcán de la figura 5 permite la visualización de los genes con alta significancia estadística, los que se encuentran más alejados del eje de las x, y también se puede visualizar el efecto en el fenómeno biológico con el \log_2 Fold Change. Se aprecia que existe una tendencia a los genes down regulados como lo indica la figura 4B.

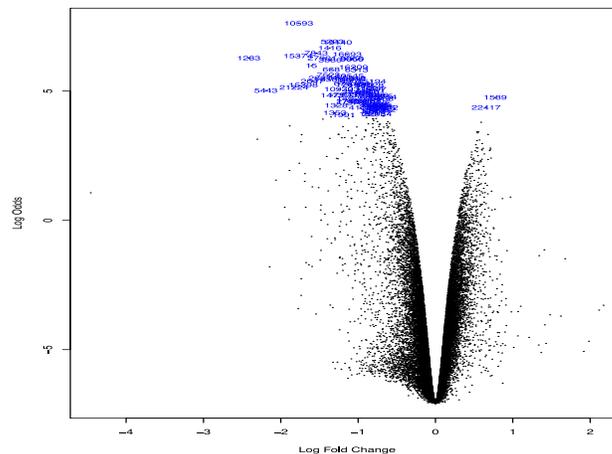


Fig.5 Expresión diferencial de los genes (Top=80) en común cuando se compararon las raíces del Tratamiento 1 vs Control y Tratamiento 2 vs Control.

En la figura 6 se muestra la tendencia de los genes en común diferencialmente expresados con valores de -4 a 4 de log Fold Change. Con la línea azul nos damos una idea de que existen genes que se regulan de la misma forma en ambos tratamientos y el color verde nos indica que mayoritariamente los genes resultaron down regulados en ambos tratamientos.

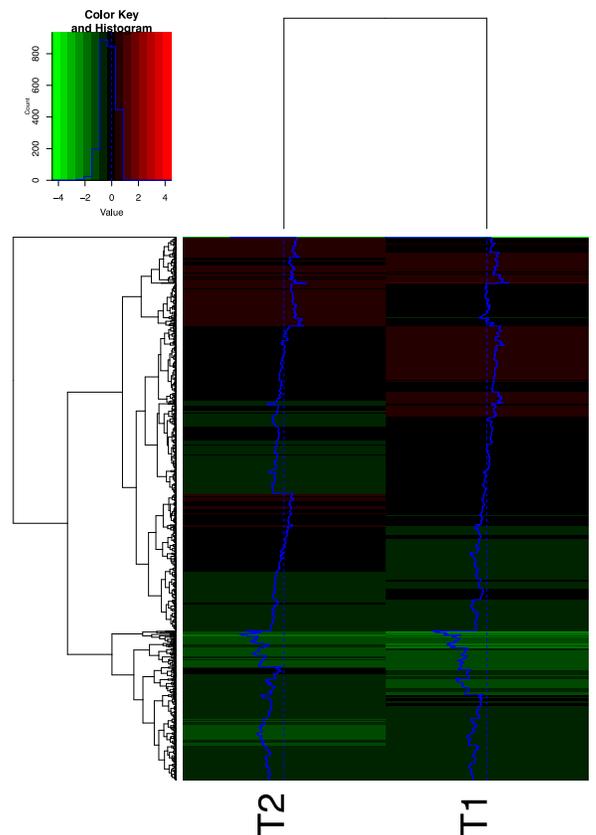


Fig.6 Mapa de calor representando el perfil de expresión de los 1263 genes diferencialmente expresados en común en las raíces tratadas con el Tratamiento 1 y el tratamiento 2 cuando se comparan contra el control.

Después del análisis en Limma de los genes diferencialmente expresados se usó el sistema de clasificación de PANTHER (www.pantherdb.org) que se encuentra conectado a Geneontología para interpretar los procesos biológicos en los que se involucran los genes que se expresaron diferencialmente en las raíces tratadas con *B. subtilis* endófito y rizosférico.

En cuestión de números son alrededor de 500 genes más los que se encuentran down regulados en ambos tratamientos, y las tendencias de clasificación en general se encuentran muy homogéneas, sin embargo, hay genes específicos que se diferencian en cada tratamiento.

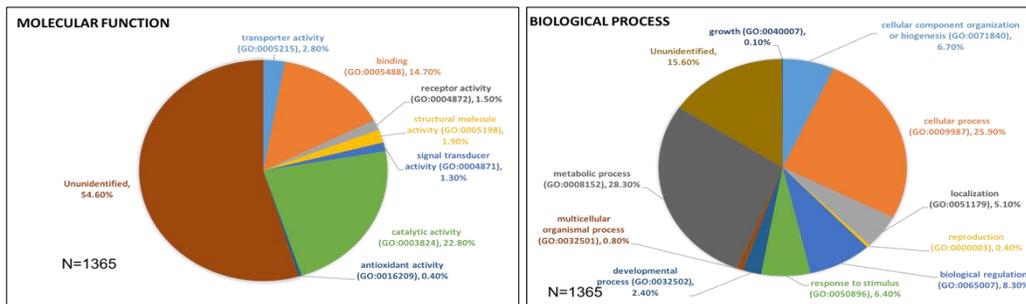


Fig. 7 Clasificación funcional de los genes up regulados en las raíces tratadas con *B. subtilis* Zm3.2 (endófito) clasificados según su función molecular (izquierda) o sus procesos biológicos (derecha).

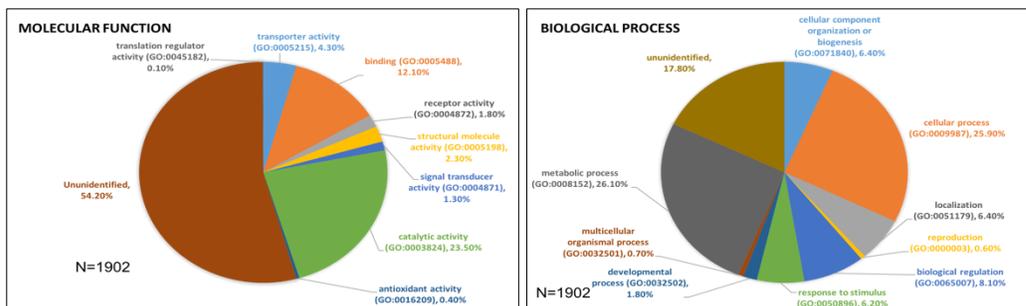


Fig. 8 Clasificación funcional de los genes down regulados en las raíces tratadas con *B. subtilis* Zm3.2 (endófito) clasificados según su función molecular (izquierda) o sus procesos biológicos (derecha).

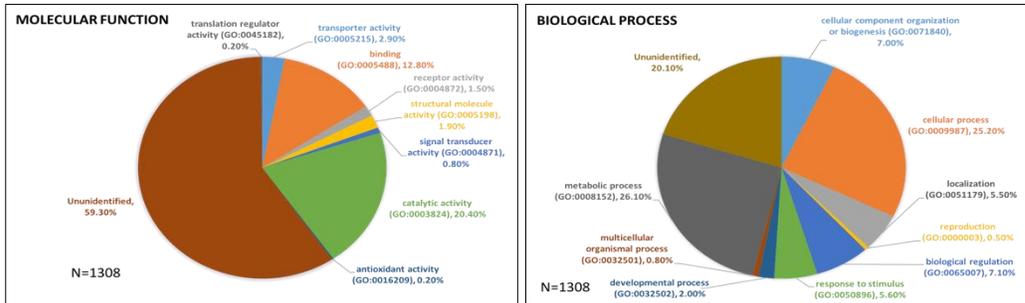


Fig. 9 Clasificación funcional de los genes up regulados en las raíces tratadas con *B. subtilis* Zm5T2.1 (rizosférica) clasificados según su función molecular (izquierda) o sus procesos biológicos (derecha).

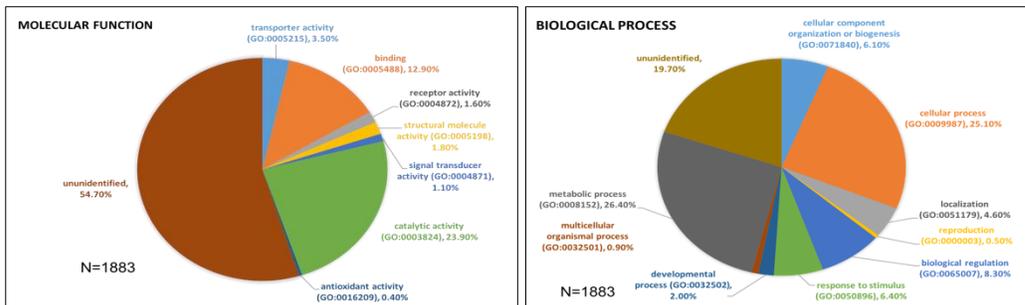


Fig. 10 Clasificación funcional de los genes down regulados en las raíces tratadas con *B. subtilis* Zm5T2.1 (rizosférica) clasificados según su función molecular (izquierda) o sus procesos biológicos (derecha).

Si comparamos los genes up regulados en cada tratamiento según su proceso biológico tenemos un 0.1% en el caso de la bacteria endófito que corresponde a una categoría denominada crecimiento (growth, GO:0040007) y es el único que se identificó en esta categoría y corresponde a un gen (At1g29500) que codifica una proteína de la subfamilia AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN SAUR61-RELATED (PTHR31175:SF29).

Analizando a detalle *B. subtilis* rizosférico también enciende genes like-SAUR, de tal forma que se comparte esta vía de señalización del metabolismo del triptófano, en la figura 11 se muestra el ejemplo.

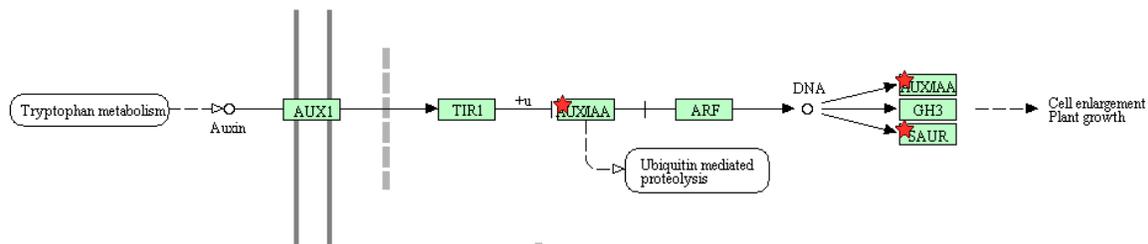


Fig. 11 Cascada de transducción de señales de hormonas vegetales generada por KEGG, los genes con estrella roja corresponden a genes sobre regulados en las raíces tratadas con ambos *B. subtilis*, rizosférico y endófito.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES DE TRANSPORTE DE NITRÓGENO MEDIANTE LA TÉCNICA PCR-Q.

En la agricultura moderna donde se hace uso de grandes cantidades de fertilizantes para aumentar el rendimiento de los cultivos, uno de los grandes retos es hacer que estos sean asimilados fácil y eficazmente por los cultivos. Para esto se han desarrollado estrategias que a través de la genética o creación de organismos genéticamente modificados puedan hacer que las raíces sean más grandes y además expresen de mejor forma aquellas proteínas involucradas en el transporte de los nutrientes. Nosotros en el laboratorio pensamos que la adición de microorganismos nativos de las propias plantas servirán como sus bio-inoculantes. Para esto seguimos dos líneas de investigación, en la primera hipotetizamos que las plantas bajo condiciones de limitación de nutrientes degradan a sus propias bacterias utilizándolas como fuente de nutrientes en las que participan especies de

oxígeno reactivas como las moléculas que oxidan a las células para así hacer más fácil la asimilación por las células vegetales. En la segunda buscamos que las bacterias a través de un proceso que denominamos diseño de simbiosis estimulen la mayor asimilación de los nutrientes a través de la inducción de genes relacionados con proteínas transportadoras de nitrógeno, fosforo y agua entre otros elementos nutricionales.

Después del aislado de bacterias endófitas y rizosféricas de la raíz del maíz, se determinó que algunas de estas bacterias inducían fuertemente la germinación de la semilla. Bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron predominantes tanto en rizósfera como dentro de los tejidos de la raíz. Los embriones de maíz fueron cultivados en medios M&S libre de nitrógeno durante 2 semanas. Las plántulas fueron transferidas a un medio M&S libre de nitrógeno semisólidos e inoculada con *B. subtilis* vivo o inactivo según correspondiera. cDNA se obtuvo del RNA aislado de cada una de las raíces inoculadas con *B. subtilis*. La expresión de genes de remodelación de pared celular, respuesta oxidativa (*catalasa* y *sod*) y transportadores de nitrato y amonio fueron medidos mediante la técnica PCR en tiempo real. La figura 14 muestra que la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas a las semillas de maíz dispara la expresión de genes relacionados con la remodelación de pared celular. La expresión de la celulosa sintasa fue inducida por la inoculación de ambos tratamientos con bacteria (Figura 14. A). Esta proteína está implicada en el enlace de polisacáridos no celulolíticos, el reconocimiento y la unión de células de *Bacillus* en la superficie de la raíz. Diferentes especies de *Bacillus* han sido reportadas por formar algún tipo de asociación rizosférica con la planta y otras veces como endófitas donde son capaces de proteger a la planta de infecciones por patógenos. Sin embargo, la adhesión a la raíz depende de la producción de exopolisacáridos. Los polisacáridos de las plantas en la pared celular actúan como una señalización ambiental que activa la formación de biofilm. Los genes de arabinogalactan (APG) fueron inducidos en menor cantidad que la celulosa sintasa. Las proteínas arabinogalactan están altamente glicosiladas y pertenecen a una superfamilia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Nguema-Ona *et al*, 2013). El AGP en la raíz de la planta juega un rol importante en la interacción planta-

microrganismo, como iniciador del dialogo y subsecuente colonización de la raíz. Además, el APG trabaja como repelente o atrayente de ciertos microorganismos en el suelo y en el desarrollo de estructuras de infección. Es importante notar que la bacteria muerta induce la activación de ambos genes. Es posible que remanentes tales como exopolisacáridos y otros componentes de la pared celular causen un efecto en genes importantes para la colonización de la raíz (externa o internamente). Diferencias no significativas fueron observadas en la expresión de expansinas y extensinas en las plántulas de maíz inoculadas con bacteria viva y bacteria muerta. Los genes expansina y extensina son importantes en la remodelación de la pared celular de la planta (Paungfoo-Lonhienne *et al*, 2010).

Durante el reconocimiento Planta-bacteria diferentes procesos bioquímicos permiten el aumento de especies de oxígeno reactivas (ROS), especialmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La figura 14. B muestra un aumento en la expresión del gen de catalasas inducido por la inoculación de la bacteria, mientras que superóxido dismutasa no mostro cambios en su expresión. Esto sugiere que la inducción de catalasa 2 fue un intento de las células vegetales para protegerse contra el estrés oxidativo producido por la inoculación de *B. subtilis*. La raíz y los pelos radiculares naturalmente acumulan H_2O_2 en las partes apicales durante su crecimiento (Hernandez-Barrera *et al*, 2013).

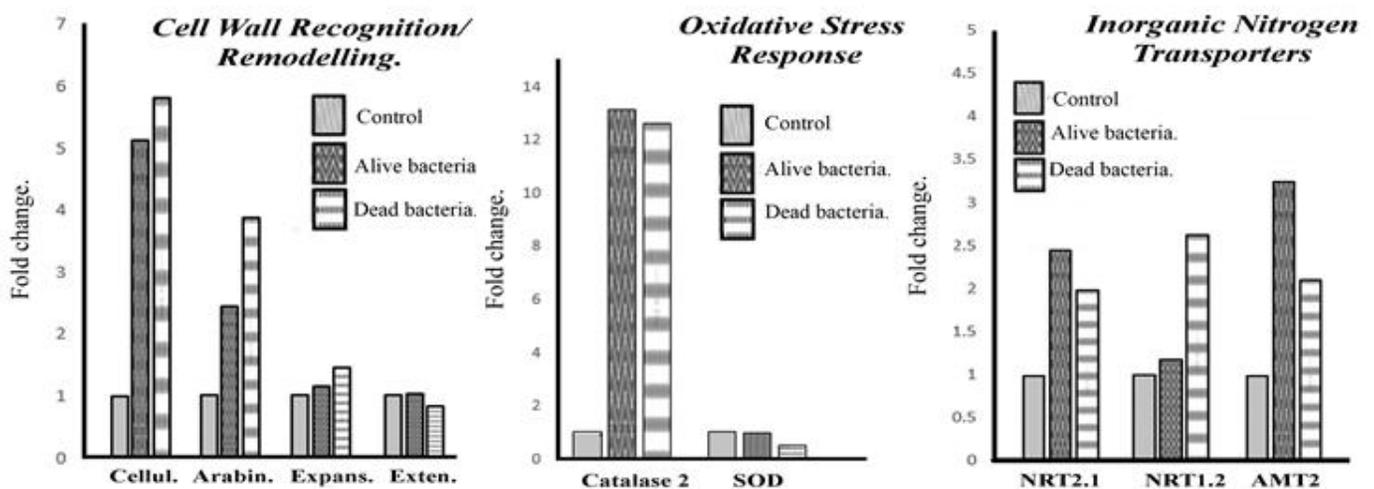
Medimos la expresión de genes relacionados con el transporte de nitrógeno, la remodelación de la pared celular y la producción de especies de oxígeno reactivas durante la interacción de una cepa de *Bacillus subtilis* rizosférica. Para el análisis de expresión mediante PCRq usamos como control endógeno el Factor de Elongación, debido a que fue el gen que mostro el comportamiento más estable durante el experimento. Este gen ya había sido reportado en 2014 como un gen estable para la medición de expresión del maíz cuando este es sometido a estrés abiótico o al tratamiento de fitohormonas (Lin *et al.*, 2014).

Un factor importante que favorece la adquisición de nutrientes en las plantas es la acumulación de transportadores de membrana en la raíz. La toma eficiente de nitrógeno del suelo depende de la expresión de transportadores de nitrato y amonio.

Las plántulas de maíz inoculadas con *B. subtilis* sobre regulan la expresión de genes de transporte de nitrógeno (NRT1.2, NRT1.2 y AMT2), lo cual indica que la toma de nutrientes mejoró.

Existen dos familias de transportadores de nitrato NRT1 y NRT2, ambas familias de genes codifican para simportadores que transportan nitrato con protones en un mecanismo dirigido por gradientes de protones a través de la membrana (buscar referencia). Los genes de la familia NRT2 codifican para transportadores de alta afinidad. Existen dos formas de transportadores de alta afinidad (HATS por sus siglas en ingles), una de ellas es inducible y estimulada por el nitrato en el medio externo y un sistema constitutivo cuando la planta jamás ha estado expuesta al nitrato. Estos resultados corresponden significativamente con los efectos en la promoción de crecimiento reportados en otros experimentos (Nogueira *et al*, 2001; Adesemoye *et al*, 2008; Beltran-Garcia *et al*, 2014; Araujo *et al*, 2015; Strehmel *et al*, 2016). La inoculación de bacterias endófitas en arroz indujo la expresión de genes de transporte de nitrógeno (Saha *et al*, 2016).

Figura 14. *Bacillus subtilis* sobre regula la expresión de genes de maíz en raíz relacionados con A) reconocimiento y remodelación de pared celular, B) respuesta antioxidante y C) adquisición de nitrógeno. Las raíces fueron colectadas 16 horas post inoculación bacteriana y la expresión de todos los genes fue medida mediante la técnica de PCR en tiempo real. Los



experimentos se realizaron por triplicado.

EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE NITRÓGENO INORGÁNICO

MEDIO M&S SIN NITRÓGENO

Con respecto al transportador de nitrato NRT 2.1 correspondiente a la familia de los HAT's (High Affinity Transporter) por sus siglas en inglés, necesitan muy bajas cantidades de NO_3 (1 μM a 1 mM) para que sean expresados. Se observó que la adición de la bacteria viva induce la expresión de este transportador entre 1.5 y 2 veces sobre el control (**Figura 15**). Sin embargo, la adición de la bacteria inactivada por calor y sonicada, provoca que la expresión del transportador aumente hasta 14 veces a las 6 hrs y a 18 hrs (**Figura 15**). El análisis con respecto al tiempo indica que la mayor inducción en ambas condiciones ocurre a las 6 horas postinoculación. Esto se le atribuyó a todos los componentes celulares difusos en el medio debido a la ruptura celular a causa de la esterilización y sonicación de la bacteria. Estos restos celulares de alguna manera estimulan la expresión de transportadores de nitrato de alta afinidad en la raíz. La expresión de estos HAT's indican la presencia de NO_3 en bajas concentraciones.

Bajo las mismas condiciones al momento de medir la expresión del gen NRT 1.2 perteneciente a la familia de los LAT's (Low Affinity transporter) por sus siglas en inglés, encontramos que la expresión de los transportadores NRT 1.2 con bacteria viva se mantuvo por arriba del control, lo cual demuestra que las bacterias son capaces de aumentar la expresión de estos transportadores haciendo más eficiente la toma de nutrientes. Mientras que la planta tratada con bacteria muerta se mantiene igual con relación al control, mostrando solo un aumento en la expresión de 0.5 veces hasta las 18 hrs probablemente la cantidad de NO_3 en el medio no alcancen las concentraciones necesarias para activar la expresión de

transportadores de baja afinidad, los cuales son expresados en presencia de altas concentraciones de NO_3 (por arriba de 0.5 mM).

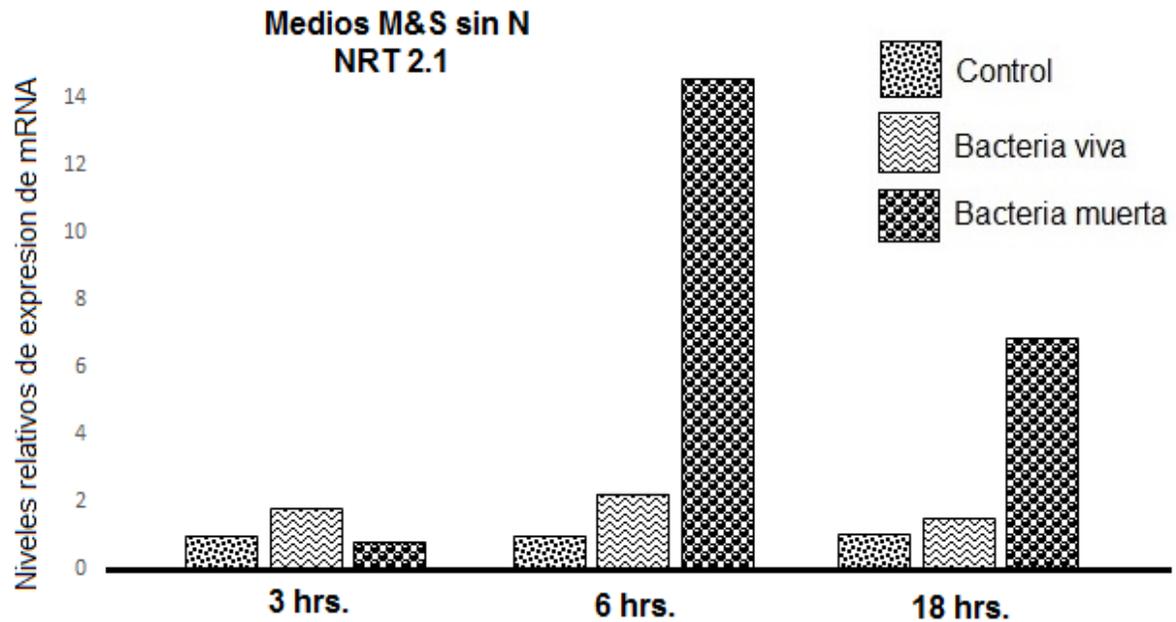


Figura 15. Niveles relativos de expresión de m RNA en medio M&S sin N. Transportador de nitratos NRT 2.1 de alta afinidad. Inducción con bacteria en medio libre de nitrógeno.

Comparando los resultados de los transportadores NTR 2.1 (HAT's) y NTR 1.2 (LAT's) (**figura 15** y **Figura 16**), se puede apreciar una mayor expresión de transportadores de nitrato de alta afinidad en medio libre de nitrógeno, tanto en bacteria muerta como viva. Concluyendo que las bacterias muertas aportan NO_3 en bajas cantidades por lo cual se ve un aumento en este tipo de transportadores en comparación con la **figura 16** y las bacterias vivas de ambos experimentos. Además, que las bacterias vivas, si bien no aportan inmediatamente una fuente de nitrógeno al medio son capaces de aumentar la expresión basal de los trasportadores de nitrato manteniéndolos siempre por arriba del control.

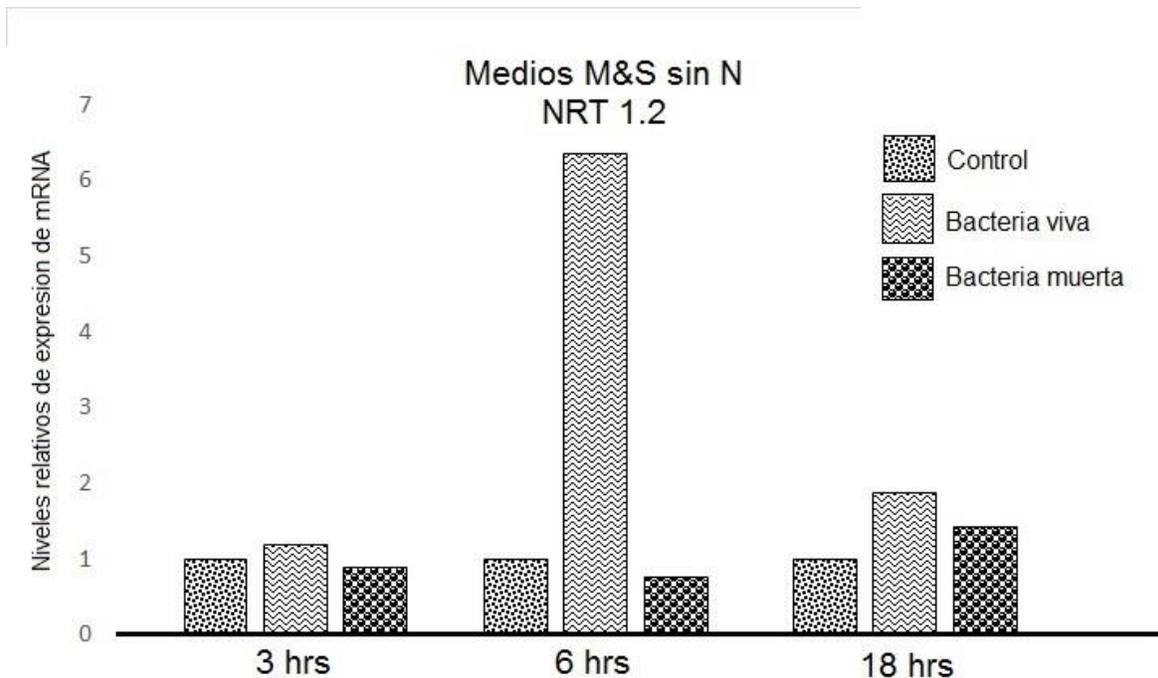


Figura 16. Niveles relativos de expresión de m RNA en medio M&S sin N. Transportador de nitratos NRT 1.2 de baja afinidad. Inducción de bacteria en medio libre de nitrógeno.

Cuando los resultados de los transportadores relacionados con la toma de amonio fueron analizados se descubrió un aumento hasta de 9 veces a las 6 hrs (**Figura 17**) con bacteria viva sugiriendo que las bacterias vivas fueron capaces de fijar nitrógeno en forma de amonio y por lo consiguiente aumentar o inducir la expresión de transportadores AMT 2.0 (HAT`s). En los tiempos 3 y 18 horas se aprecia una negativa de este gen tanto en bacteria muerta como en viva. A las 3 horas se cree que ausencia de NH_4 en el medio es la causante de esta regulación negativa, mientras que a las 18 hrs ésta regulación negativa se le atribuye a un sensing de la planta que al percibir altas concentraciones de nitrógeno genera una regulación negativa en los transportadores de amonio debido a que estos transportadores se saturan antes que los de NO_3 , además que la sobre expresión de los AMT`s genera efectos tóxicos sobre la planta (Ludewig, *et al.*, 2007).

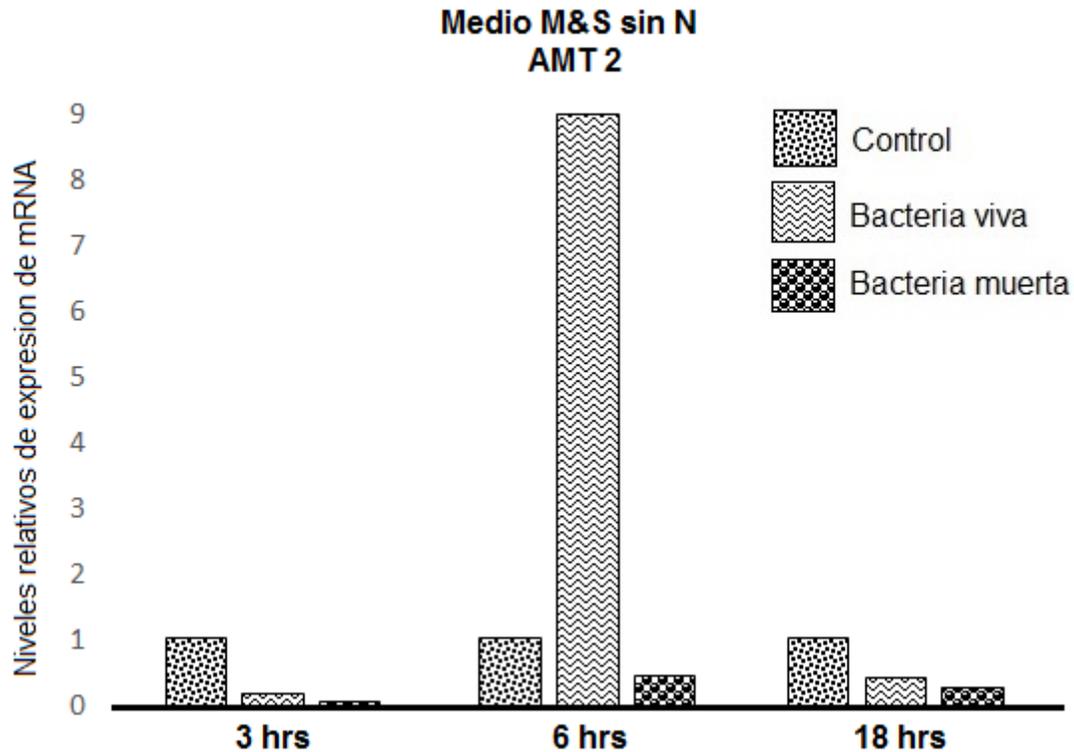


Figura 17. Niveles relativos de expresión de m RNA en medio M&S sin N. Transportador de amonio AMT 2.0 de alta afinidad. Inducción de bacteria en medio libre de nitrógeno.

MEDIO M&S CON 39 MM DE KNO₃

Un segundo set de plántulas fue suplementado con medio M&S y como fuente de nitrógeno se utilizó KNO₃. En la **figura 18** se muestra el comportamiento del transportador NTR 1.2 de baja afinidad. Una regulación negativa de estos transportadores se observa en todos los tiempos con respecto al control, en contraste con el comportamiento observado en plántulas en medio libre de nitrógeno (**Figura 16**) donde principalmente en bacteria viva mantiene una regulación positiva de este gen.

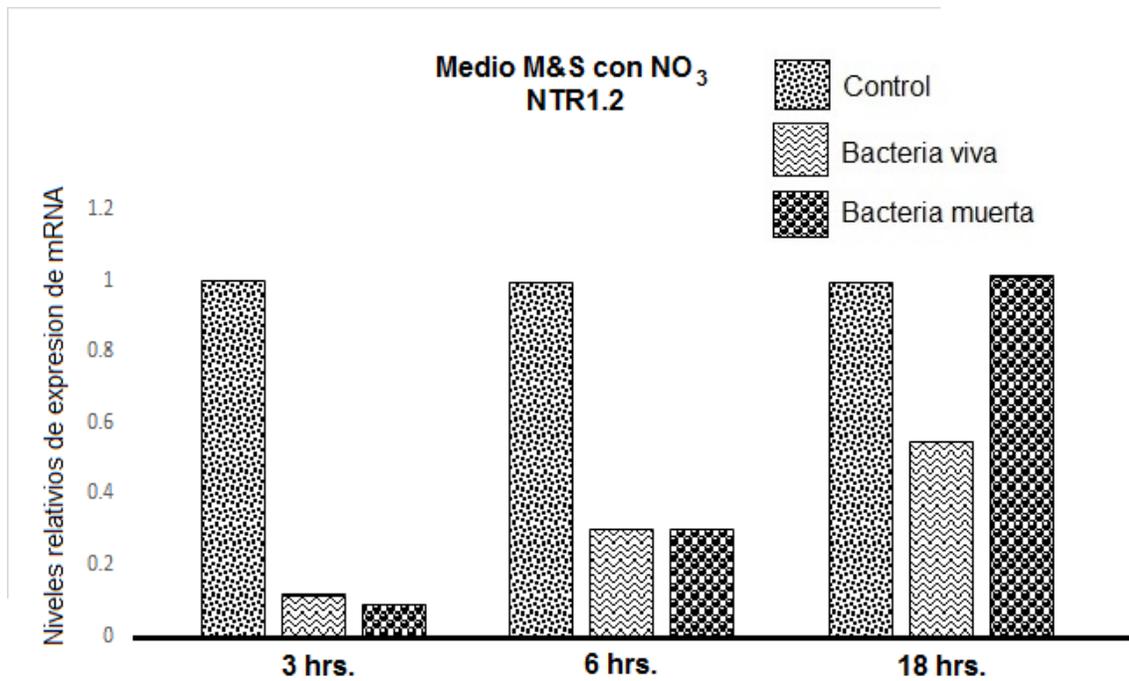


Figura 18. Niveles relativos de expresión de m RNA en medio M&S con KNO₃. Transportador de Nitrato NRT1.2 de baja afinidad.

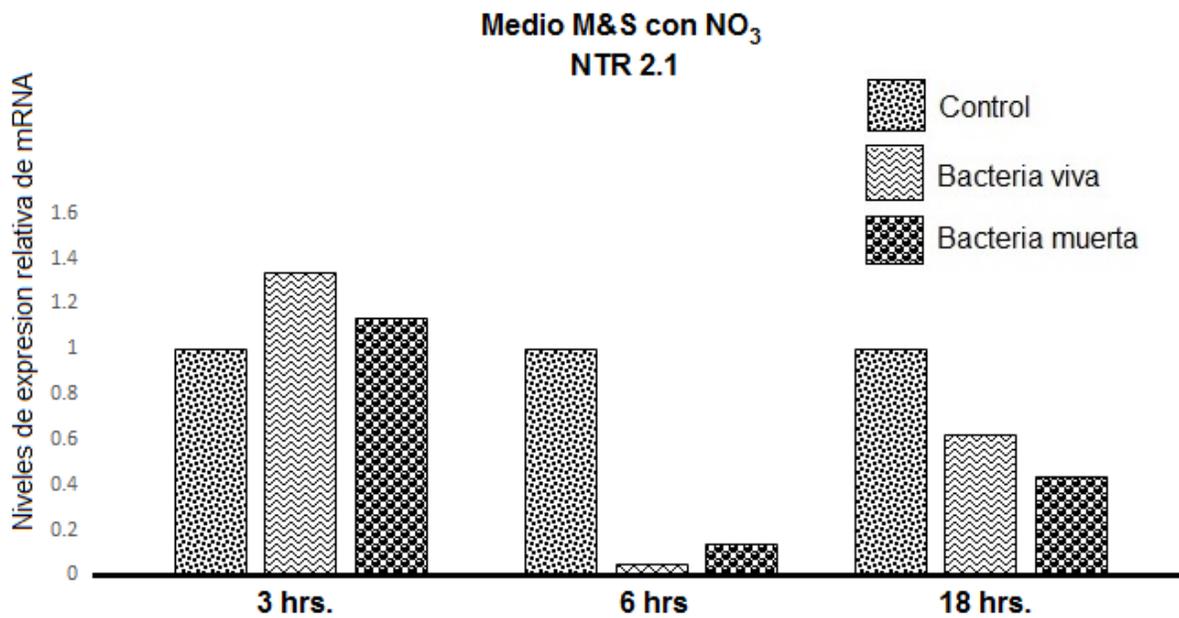


Figura 19. Niveles relativos de expresión de m RNA en medio M&S con KNO₃. Transportador de Nitrato NRT 2.1 de alta afinidad.

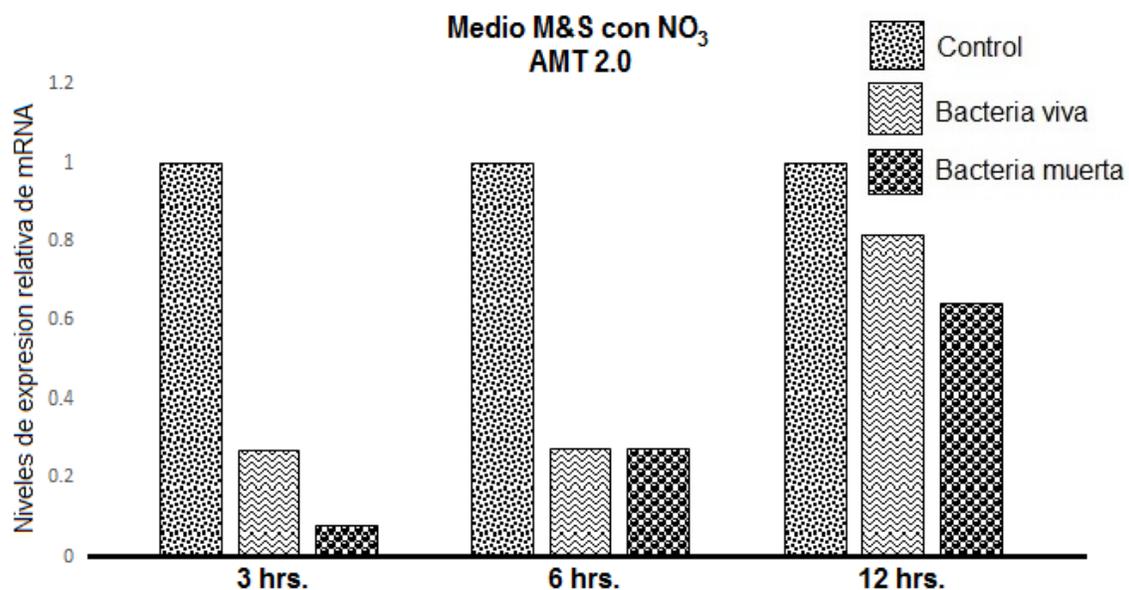
A pesar de que el medio estaba suplementado con nitrógeno (NO_3) no se vio una regulación positiva de este gen, pero, en el transcurso de las 18 hrs. del experimento se observó aumento gradual de los transportadores tipo NRT 1.2 tanto en bacteria muerta como viva. Un resultado similar se presentó al medir la expresión del gen NRT 2.1 de alta afinidad, donde solo en el primer tiempo es posible ver una regulación positiva del gen. Para explicar esto se deben comparar las dos figuras anteriores (**Figuras 18 y 19**) diferenciando bien la característica principal entre los HAT`s y los LAT`s. Como se puede apreciar al momento de medir el transportador NRT 1.2 (**figura 18**) la tendencia al pasar el tiempo es de aumento, esto mantiene concordancia con respecto al tipo de transportador al ser de baja afinidad que responde a altas cantidades de NO_3 . En un inicio se esperaba que el transportador de NRT 1.2 mantuviera una regulación positiva al aplicarle un estímulo de NO_3 , pero si recordamos las plantas venían de un medio libre de Nitrógeno, así que esta regulación negativa que va en aumento al pasar del tiempo se le atribuye al tiempo de adaptación de la plántula al medio rico en nitrato. Caso contrario sucede con el transportador de alta afinidad NRT 2.1 donde la gráfica muestra una tendencia a la baja con respecto al tiempo en la expresión de este transportador, el cual corresponde al comportamiento esperado con los altos niveles de nitrato en el medio.

Al medir el transportador de amonio AMT 2.0 se observó una regulación negativa con respecto al control acompañado de un aumento gradual de estos transportadores al paso del tiempo (**figura 20**). Este medio al contener nitrógeno en forma de nitrato y no de amonio no contiene el estímulo necesario para inducir la expresión de este transportador. Enfocándonos en bacteria viva, los niveles de expresión relativa van aumentando haciéndonos pensar que las bacterias fueron capaces de aportar cierta cantidad de NH_4 por medio de la fijación de nitrógeno atmosférico y así estimular la expresión de estos HAT`s de amonio. Por otra parte,

el aumento de estos transportadores en bacteria muerta se le puede atribuir a los deshechos productos de la lisis bacteriana causada por la sonicación.

Figura 20. Niveles relativos de expresión de mRNA en medio M&S con KNO_3 . Transportador de amonio AMT 2.0 de alta afinidad.

El comportamiento observado por las plántulas en presencia de nitrato da pie a pensar que la cantidad de nitrato en el medio de alguna manera afecta la expresión de transportadores de nitrógeno. Estos resultados corresponden por los



encontrados por Liu y Tsay en 2003, donde los transportadores, tanto de amonio como los de nitrato se ven reprimidos cuando las concentraciones de nitrógeno en cualquiera de sus formas es elevada, pero por mecanismos aun no bien identificados las bacterias son capaces de aumentar o estimular la expresión de estos transportadores haciendo mas eficiente la toma de nutrientes en suelos saturados de fertilizantes.

MEDIO M&S CON 29 MM DE NH_4Cl

El último set de plantas fue analizado en presencia de amonio (NH_4). Al igual que en el grupo de plantas tratadas con el medio libre de nitrógeno (**Figura 16**) los niveles de los transportadores NRT 1.2 mantuvieron una expresión por arriba de los controles a excepción de la muestra tomada a las 6 hrs (**Figura 21**), donde se

observa una regulación negativa, esto se le atribuye a un gradiente natural en la expresión de los transportadores cuando no hay presencia de nitrato en el medio, correspondiendo este gradiente a la fluctuación con respecto a la expresión de los transportadores NRT 1.2.

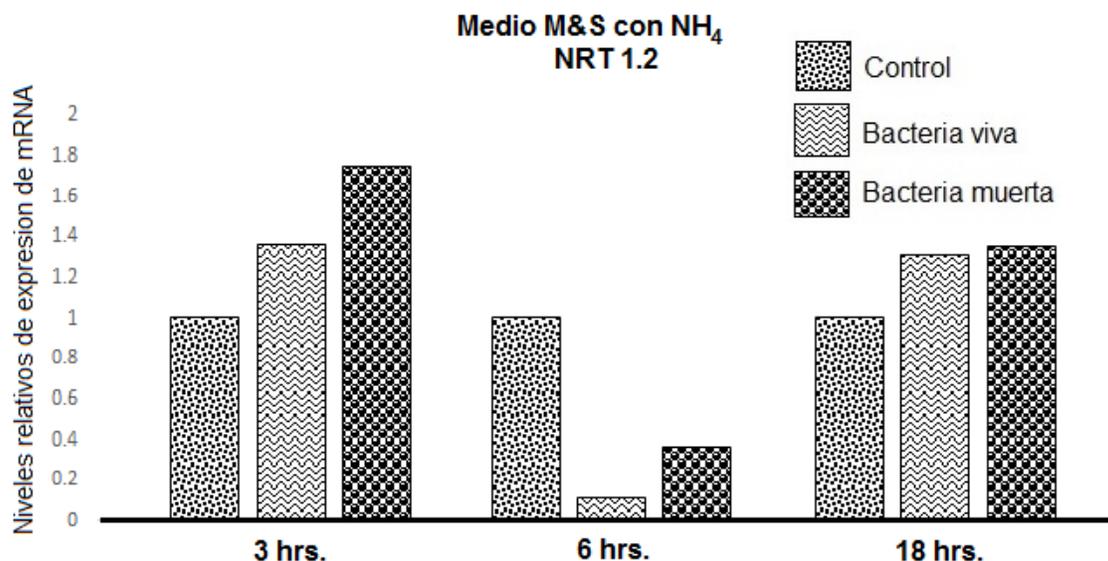


Figura 21. Niveles relativos de expresión de mRNA en medio M&S con NH₄Cl. Transportador de nitrato NRT 1.2 de baja afinidad.

Nuevamente, si comparamos los resultados obtenidos en el tratamiento sin fuente de nitrógeno (**Figura 15**) se aprecia un comportamiento similar a los obtenidos en el medio suplementado con amonio y bacteria (**figura 22**), demostrando que efectivamente los desechos bacterianos 1) aportan cierta cantidad de nitrato al medio como para activar la respuesta de los transportadores de nitrato de alta afinidad o 2) los desechos celulares al estar en contacto con la raíz estimulan por medio de otro mecanismo a la expresión de estos mismos transportadores.

Hablando del comportamiento de la planta con respecto a las bacterias vivas, no se aprecia un aumento ni una regulación negativa significativa con respecto al control, concluyendo que las bacterias en este tiempo no son capaces de generar algún tipo de estímulo hacia la planta con respecto a los transportadores, esto no quiere decir que las bacterias no tengan efecto sobre la planta, sino que posiblemente otro tipo de proceso se esté llevando a cabo.

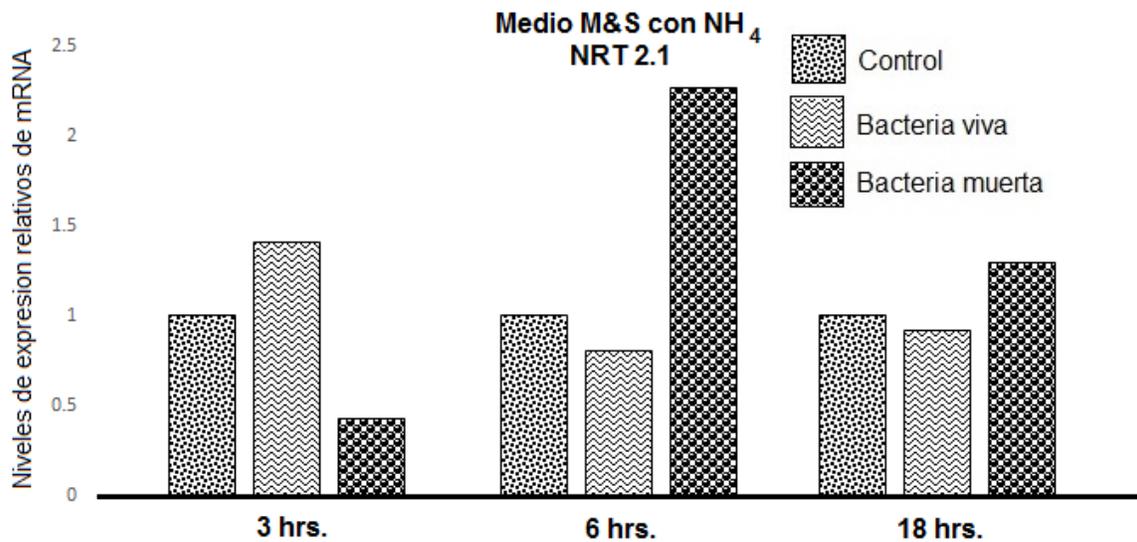


Figura 22. Niveles relativos de expresión de mRNA en medio M&S con NH₄Cl. Transportador de nitrato NRT 2.1 de alta afinidad.

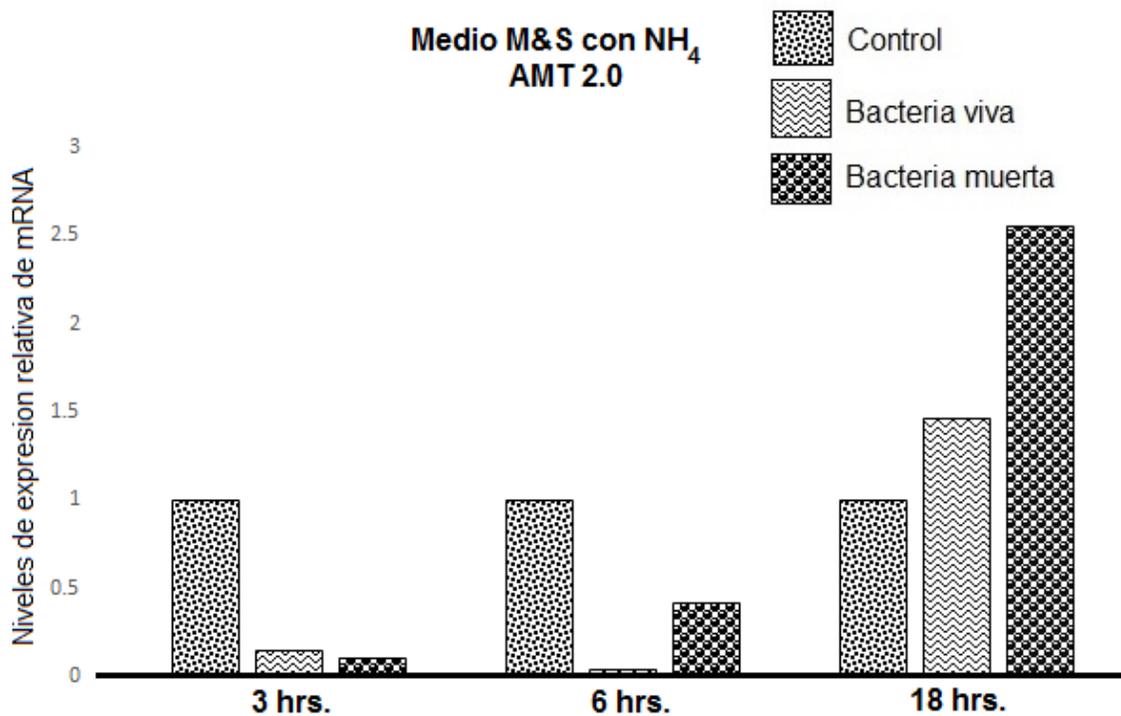


Figura 23. Niveles relativos de expresión de mRNA en medio M&S con NH₄Cl. Transportador de amonio AMT 2.0 de alta afinidad.

Al medir la expresión de los genes relacionados con el transporte de amonio en un medio suplementado con esta fuente de nitrógeno (**figura 23**) se observa un

incremento gradual que inicia con una regulación negativa a las 3 horas hasta las 18 horas donde la regulación pasa a ser positiva. Este incremento gradual de los transportadores AMT 2.0 se le atribuye al tiempo de adaptación que requiere la planta tras recibir el estímulo del amonio, además de que este transportador al ser de alta afinidad debería presentar una regulación negativa por la concentración de amonio en el medio. Esta regulación negativa se puede apreciar a las 3 y 6 horas, mientras que a las 18 horas ya presenta una regulación positiva de estos transportadores de hasta 1.5 veces con respecto al control, tal vez debido a la concentración del amonio que disminuyó a través de las horas o por posible acción de las bacterias. Comparando la expresión del AMT 2.0 en medio sin nitrógeno y el medio con amonio podemos observar la influencia de las bacterias y el medio sobre la expresión de este gen. Si se observa el comportamiento de la gráfica en el medio sin nitrógeno (**figura 17**) se puede observar que la expresión del gen es inducida por la bacteria viva y corresponde con el resultado al saber que la única manera de la cual ese medio podía obtener amonio era por la fijación de nitrógeno atmosférico y esto es posible sólo con la bacteria viva, agregando que la cantidad de amonio era mínima lo cual estimula las transportadores tipo HAT's. Mientras que en el medio suplementado con amonio (**Figura 23**) se inhibe la expresión de estos transportadores, además de que el efecto producido por la bacteria viva no es apreciable. Sin embargo, la bacteria muerta por alguna razón favorece la expresión bajo estas condiciones, tal vez porque ya no existe aporte de amonio al medio que lo sobresature y haciendo más factible la expresión de estos transportadores de amonio.

BIBLIOGRAFIA

Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (n.d.). Plant Nitrogen Transport and Its Regulation in Changing Soil Environments, 1–23. <https://doi.org/10.1300/J411v15n02>

Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2014). Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 4–16. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897897>

Liu, F. P., Liu, H. Q., Zhou, H. L., Dong, Z. G., Bai, X. H., Bai, P., & Qiao, J. J. (2014). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils*, 50(6), 927–937. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0913-z>

Ludewig, U., Neuhäuser, B., & Dynowski, M. (2007). Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2301–2308. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.034>

Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). *Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and Soil* (274). <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>

Nacry, P., Bouguyon, E., & Gojon, A. (2013). Nitrogen acquisition by roots: Physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370(1–2), 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>

Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wasseem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., ... Souza, E. M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>

Postgate, J. R. (1982). *Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. Philosophical*

Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 296(1082), 375–385.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0013>

Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Wheat seed embryo excision enables the creation of axenic seedlings and Koch's postulates testing of putative bacterial endophytes. *Scientific Reports*, (April), 25581. <https://doi.org/10.1038/srep25581>

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

Saghir, K., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). *Phosphate Solubilizing Microorganisms. Bioaugmentation Biostimulation and Biocontrol* (108). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5>

Sohlenkamp, C., Shelden, M., Howitt, S., & Udvardi, M. (2000). Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01153-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01153-4)

Feth el Zahar Haichar a, Catherine Santaella b, c, d, Thierry Heulin b, c, d, Wafa Achouak b, c, d. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. Elsevier, 77, 69-80.

Pankiewicz, V.C.S., Camilios-Neto, D., Bonato, P. *Plant Mol. Biol.* (2016) 90: 589. doi:10.1007/s11103-016-0430-6

FIRA (2014). panorama agroalimentario. octubre2014, de FIRA Sitio web:https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2014.pdf

Cocking EC (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169–175. doi:10.1023/A:1024106605806

Allan D., Graham P. (2002). *Soil Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation, other N₂-fixing symbiosis*. Elsevier, N/I, 7.

Kelly S. Ramirez, Christian L. Lauber, Rob Knight, Mark A. Bradford, Noah Fierer. (1 December 2010). Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 91, 3463–3470.

Hartmann A, Stoffels M, Eckert B, Kirchhof G, Schlöter M . (2000). Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. In: Triplett EW (ed) *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, 65, 727–736.

Sevilla M, Kennedy C . (2002). Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. *Horizon Scientific Press*, 76, 737–760.

Sprent JI, de Faria SM (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110:157–165. doi:10.1007/BF02226795

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918 .

Stéphane Compant a,1 , Christophe Clément b , Angela Sessitsch a,* . (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Elsevier*, 42, 669-678.

ugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–556.doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Sevilla M, Kennedy C (2000) Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus* , an endophyte of sugarcane. In: Triplett EW (ed)*Prokaryotic Nitrogen fixation: a model system for the analysis of biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 737–760 .

N. Ashwini S. Srividya. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3biotech*, 4, 127–136. 10.1007/s13205-013-0134-4

Stéphane Compant, Brion Duffy, Jerzy Nowak, Christophe. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 9.

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez G J, Buckler E, Doebley J. (30 de abril de 2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Pubmed*, 9, 99.

Wang H, Nussbaum-Wagler T, Li B, Zhao Q, Vigouroux Y, Faller M, Bomblies K, Lukens L, Doebley JF. (4 de agosto 2005). The origin of the naked grains of maize. *Nature*, 9, 714.

Lange E. S., Balmer D., Mauch-Mani B., Turlings T. C. (2014). Insect and pathogen attack and resistance in maize and its wild ancestors, the teosintes. *New Phytol.* 204, 329–341. 10.1111/nph.13005

Wilson D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274–276. 10.2307/3545919

White J. F., Bacon C. W. (2012). The secret world of endophytes in perspective. *Fungal Ecol.* 5, 287–288. 10.1016/j.funeco.2012.03.003

Mousa WK, Raizada MN. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective.. *Front Microbiol*, 4, 65.

Johnston-Monje D, Mousa WK, Lazarovits G, Raizada MN. (2014). Impact of swapping soils on the endophytic bacterial communities of pre-domesticated, ancient and modern maize.. *BMC Plant Biol.*, 14, 233.

Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (n.d.). Plant Nitrogen Transport and Its Regulation in Changing Soil Environments, 1–23. <https://doi.org/10.1300/J411v15n02>

Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2014). Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions.

Critical Reviews in Plant Sciences, 34(1–3), 4–16.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897897>

Liu, F. P., Liu, H. Q., Zhou, H. L., Dong, Z. G., Bai, X. H., Bai, P., & Qiao, J. J. (2014). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils*, 50(6), 927–937.
<https://doi.org/10.1007/s00374-014-0913-z>

Ludewig, U., Neuhäuser, B., & Dynowski, M. (2007). Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2301–2308. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.034>

Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). *Root nitrogen acquisition and assimilation*. *Plant and Soil* (274). <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>

Nacry, P., Bouguyon, E., & Gojon, A. (2013). Nitrogen acquisition by roots: Physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370(1–2), 1–29.
<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>

Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wasseem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., Souza, E. M. (2011). Genome of herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 7(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>

Postgate, J. R. (1982). Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 296(1082), 375–385.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0013>

Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Wheat seed embryo excision enables the creation of axenic seedlings and Koch's postulates testing of putative bacterial endophytes. *Scientific Reports*, 6(April), 25581. <https://doi.org/10.1038/srep25581>

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role

in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339.
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

Saghir, K., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). *Phosphate Solubilizing Microorganisms. Bioaugmentation Biostimulation and Biocontrol* (108).
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5>

Sohlenkamp, C., Shelden, M., Howitt, S., & Udvardi, M. (2000). Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters*.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01153-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01153-4)

Liu, K. H., and Tsay, Y. F. 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* 22: 1005–1013.

Hernandez-Barrera, A., Quinto, C., Johnson, E.A., Wu, H.M., Cheung, A.Y., Cardenas L., 2013. Using hyper as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells: a methods with virtually unlimited potential in plant biology. *Methods in Enzymol.* 527:275-290.

Nguema-Ona, E., Vické-Gibouin, M., Cannesan M, A., Driouich A. 2013. Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends Plant Sci.* 2013 Aug;18(8),440-9.

Paungfoo-Lonhienne, C., 2014. Effects of externally supplied protein on root morphology and biomass allocation in Arabidopsis. *Sci. Rep.*, 4, 5055.

ni. (2007). ciclo del nitrogeno. 2017, de wikipedia Sitio web:
https://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_del_nitr%C3%B3geno