

EFECTO DE LA RIZOBACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL *Azospirillum brasilense* SP245 EN LA FOSFOLIPASA D EN PLÁNTULAS DE TRIGO

EFFECT OF THE PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA *Azospirillum brasilense* SP245 ON THE PHOSPHOLIPASE D IN WHEAT SEEDLINGS

Roberto Daniel Iñaki Durán-Baltazar, Elda Castro-Mercado, Ernesto García-Pineda*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio A1', Morelia, Michoacán CP 58040, México. (egpineda@umich.mx), (egapineda04@gmail.com).

RESUMEN

Azospirillum brasilense es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal muy utilizada en agricultura. Los cambios moleculares estimulados en la planta por esta rizobacteria durante la interacción se conocen de manera parcial. Uno de los sitios primarios de contacto de la rizobacteria con la célula vegetal es la membrana plasmática. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de *A. brasilense* en la actividad de la fosfolipasa D (PLD) en raíces de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). La actividad de la enzima se determinó mediante la producción de ácido fosfatídico (AF), el cual es el producto de su catálisis. Plántulas inoculadas con una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹) de la rizobacteria mostraron una reducción en la producción de AF, en un periodo de inoculación de 5 a 15 min. Esta reducción reflejó un descenso en la actividad de la PLD. La disminución se mantuvo 12 a 48 h, tiempo de duración del estudio y coincidió con la disminución en el crecimiento de las plántulas. La adición exógena de AF estimuló el crecimiento de las plántulas. La producción de AF también disminuyó cuando se adicionó ácido indol-3-acético a las plántulas, lo que permitió sugerir un papel en la modulación de la actividad de la PLD. Los resultados mostraron que la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* Sp245 disminuye la actividad de la PLD.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, trigo, fitoestimulantes, fosfolipasa D, auxinas.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a growth-promoting rhizobacterium in plants, widely used in agriculture. The molecular changes stimulated in the plant by this rhizobacterium during interaction are partially known. One of the primary points of contact of rhizobacteria with the plant cell is the plasma membrane. The aim of this study was to analyze the effect of *A. brasilense* on the activity of phospholipase D (PLD) on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling roots. The enzyme activity was determined by the production of phosphatidic acid (PA), which is the product of PLD catalysis. Seedlings inoculated with a concentration of 10^6 colony forming units per milliliter (CFU mL⁻¹) of the rhizobacterium displayed a reduction in the production of PA in an inoculation period of 5 to 15 min. This reduction revealed a reduction in the activity of PLD. The reduction was maintained for 12 to 48 h, the duration of the study, and it correlated with the reduction in plant growth. The exogenous addition of PA stimulated the growth of the seedlings. The production of PA also decreased when indol-3-acetic acid was added to the seedlings, which suggested a role in the modulation of PLD activity. The results showed that the inoculation of wheat seedlings with *A. brasilense* Sp245 reduces the activity of PLD.

Key words: *Azospirillum brasilense*, wheat, phospholipase D, auxins.

INTRODUCTION

Bacteria that colonize plant roots and promote their growth are known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). The members of the *Azospirillum* genus are free life rhizobacteria that live in soils of diverse ecological conditions (Bashan *et al.*, 2004). *Azospirillum brasilense* is a model rhizobacterium, used to study

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 631-642. 2020.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias que colonizan las raíces de las plantas, y promueven su crecimiento se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Los miembros del género *Azospirillum* son rizobacterias de vida libre que habitan suelos de diversas condiciones ecológicas (Bashan *et al.*, 2004). *Azospirillum brasilense* es una rizobacteria modelo, utilizada para estudiar la promoción del crecimiento vegetal (Cassán *et al.*, 2015). Esta bacteria modifica la morfología y la fisiología del sistema radical de las plantas, e incrementa la proliferación y la elongación de la raíz (Khalid *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2009). Estos cambios aumentan la capacidad de las plantas para absorber nutrientes esenciales y agua (Richardson *et al.*, 2009). Los mecanismos para inducir estos cambios en la raíz incluyen la producción de fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (AIA), y el etileno, entre otras (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Sin embargo, los blancos moleculares primarios que activan los cambios en los tejidos de la raíz se desconocen y su estudio permitirá saber cuáles moléculas intervienen en la respuesta de las plantas a la rizobacteria.

La membrana celular es la estructura de la célula donde ocurre el contacto inicial de la planta con los microorganismos. Es uno de los sitios potenciales donde se inicia la respuesta de las plantas y también el proceso de estimulación del metabolismo relacionado con el crecimiento inducido por las rizobacterias. Los fosfolípidos son componentes estructurales principales de la membrana, a los cuales hidrolizan las fosfolipasas. Estas enzimas tienen una función importante durante el proceso normal de crecimiento y desarrollo en las plantas (Frank *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001).

La fosfolipasa D (PLD; EC 3.1.4.4) es la enzima principal que metaboliza fosfolípidos en las plantas. Esta enzima hidroliza fosfolípidos de membrana y produce ácido fosfatídico (AF), el cual funciona como un segundo mensajero en rutas de transducción de señales (Munnik, 2001). El AF se relaciona con procesos como la germinación (Ritchie y Gilroy, 1998), respuestas a heridas, daño por patógenos (Li y Wang, 2019; den Hartog *et al.*, 2001; van der Luit *et al.*, 2000), y senescencia (Fan *et al.*, 1997). Al menos hay 12 PLD en *Arabidopsis*, con distintas propiedades catalíticas y regulatorias y con diferentes preferencias

the promotion of plant growth (Cassán *et al.*, 2015). This bacterium modifies the morphology and physiology of the plant root system and increase proliferation and elongation of roots (Khalid *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2009). These changes increase the ability of plants to absorb essential nutrients and water (Richardson *et al.*, 2009). The mechanisms to induce these changes in the root include the production of phytohormones, such as indol-3-acetic acid (IAA), ethylene, and others (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). However, the primary molecular targets that activate the changes in root tissues are unknown, and their study will contribute to identify which molecules mediate in the response of plants to rhizobacterium.

Cell membrane is the structure of the cell in which plant initial contact with the microorganisms takes place. It is one of the potential sites where the plant responses begin, along with the stimulation process of the metabolism related to the growth induced by rhizobacteria. Phospholipids are main structural components of cell membrane, which are hydrolyzed by phospholipase enzymes. These enzymes play an important role during normal growth and development processes in plants (Frank *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001).

Phospholipase D (PLD; EC 3.1.4.4) is the main phospholipid metabolizing enzyme in plants. This enzyme hydrolyzes membrane phospholipids and it produces phosphatidic acid (PA), which acts as the second messenger in signal-transduction pathways (Munnik, 2001). PA is related to processes such as germination (Ritchie and Gilroy, 1998), responses to wounds, damage by pathogens (Li and Wang, 2019; den Hartog *et al.*, 2001; van der Luit *et al.*, 2000), and senescence (Fan *et al.*, 1997). There are at least 12 PLD in *Arabidopsis*, with different catalytic and regulatory properties and with different specific preferences for phospholipids (Wang, 2002, 2000). These isoforms are divided into six types (PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ and PLD ζ), based on homologies of isoforms genetic sequence and related enzyme activities (Bargmann and Munnik, 2006). Some isoforms participate in the changes in root morphology. For example, the PLD ϵ isoform promotes growth and biomass accumulation (Hong *et al.*, 2009). PLD activity is studied applying 1-butanol, a specific inhibitor of PA production dependent on PLD (Gardiner *et al.*, 2001).

específicas por fosfolípidos (Wang, 2002, 2000). Estas isoformas se dividen en seis clases (PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ and PLD ζ), con base en las homologías de su secuencia genética y actividades enzimáticas relacionadas (Bargmann y Munnik, 2006). Algunas isoformas participan en los cambios de la morfología de la raíz. Por ejemplo, la isoforma de la PLD ϵ promueve crecimiento y acumulación de biomasa (Hong *et al.*, 2009). La actividad de la PLD se estudia con la aplicación de 1-butanol, un inhibidor específico de la producción de AF, dependiente de la PLD (Gardiner *et al.*, 2001).

Todavía se desconoce la función de esta enzima durante la estimulación inicial de *A. brasilense* a las raíces de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar si la actividad de la PLD es mediadora de las repuestas estimuladas por *A. brasilense* en plántulas de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 es una rizobacteria endófito, aislada de raíces de trigo (Baldani *et al.*, 1986), y amablemente donada por la Dra. Gladys Alexandre, de la Universidad de Tennessee, EE. UU. La cepa bacteriana se mantuvo en medio Luria-Bertani (10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g L⁻¹ de NaCl, 0.186 g L⁻¹ de MgSO₄, 0.277 g L⁻¹ de CaCl₂, y 15 g L⁻¹ de agar).

Las bacterias crecieron en 50 mL de medio de cultivo durante 20 h (hasta la fase exponencial), a 27 °C, con agitación (0.21 x g) constante (Labnet 211DS, Edison, NJ, USA), para preparar el inoculo. El cultivo primero se centrifugó 10 min 12 000 x g (Terlab, Zapopan, Jal, México) y después se lavó dos veces con una solución de NaCl al 0.9%. Las bacterias se resuspendieron en 200 μ L de NaCl al 0.9% y se realizó un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las densidades del inóculo se ajustaron a la concentración final deseada en UFC por mL.

Germinación de las semillas y tratamientos

Las semillas de trigo (*T. aestivum*) usadas en el estudio fueron del cultivar Nana F2007, una variedad de trigo harinero para siembras de temporal en México. Nana F2007 es de ciclo precoz (85 a 134 d), una altura promedio de 84 cm, y las donó el Dr. Mario González Chavira, del Instituto Nacional de Investigaciones

The function of this enzyme during the initial stimulation of *A. brasilense* in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling roots is still unknown. Therefore, the aim of this investigation was to evaluate whether the activity of PLD mediates those responses stimulated by *A. brasilense* on wheat seedlings.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The wild strain *A. brasilense* Sp245 is an endophytic rhizobacterium, isolated from wheat roots (Baldani *et al.*, 1986), and kindly donated by Dr. Gladys Alexandre, from the University of Tennessee, U.S.A. The bacterial strain was maintained in Luria-Bertani medium (10 g L⁻¹ of tryptone, 5 g L⁻¹ of yeast extract, 5 g L⁻¹ of NaCl, 0.186 g L⁻¹ of MgSO₄, 0.277 g L⁻¹ of CaCl₂, and 15 g L⁻¹ of agar).

Bacteria grew in 50 mL of culture medium for 20 h (until the exponential phase), at 27 °C constantly stirred (0.21 x g) (Labnet 211DS, Edison, NJ, U.S.A.) for the inoculant preparation. The culture was first centrifuged for 10 min 12 000 x g (Terlab, Zapopan, Jal, Mexico), and then washed twice with a 0.9% NaCl solution. The bacteria were resuspended in 200 μ L of the 0.9% NaCl and the Colony Forming Units (CFU) were counted. The densities of the inoculant were adjusted to the final desired concentration in CFU per mL.

Germination of seeds and treatments

The wheat (*T. aestivum*) seeds used in the study were taken from the cultivar Nana F2007, a variety of bread wheat for seasonal planting in Mexico. Nana F2007 has a precocious cycle (85 to 134 d), with an average height of 84 cm, and were donated by Dr. Mario González Chavira, of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, Mexico. The seeds were submerged in a sodium dodecyl sulfate (SDS) solution at 1%, stirred for 3 min, and washed 3 times with sterile distilled water. They were then disinfected for 5 min with a chlorine solution at 1%, stirring constantly, and washed four times with sterile distilled water.

Germination took place on beds of cotton filter paper moistened in distilled water in Petri dishes in the dark, at 28 °C for 3 d. After germination, seedlings were selected by their homogeneity in size and transferred to Petri dishes containing solid MS (Murashige and Skoog 1962) medium, pH 5.7, with bacteria or chemical compounds which were added to the MS medium before it solidified at approximately 40 °C.

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campus Celaya, México. Las semillas se sumergieron en una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, se mantuvieron en agitación 3 min, y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Después se desinfectaron 5 min con una solución de cloro al 1% en agitación constante y se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril.

La germinación fue en camas de algodón de papel filtro humedecido con agua destilada estéril dentro de cajas Petri, en obscuridad a 28 °C durante 3 d. Después de que las semillas germinaron, las plántulas se seleccionaron por su homogeneidad en tamaño y se transfirieron a cajas Petri que contenían medio sólido MS (Murashige y Skoog 1962), pH 5.7, adicionado con bacterias o compuestos químicos, los cuales se adicionaron al medio MS antes de que solidificara, aproximadamente a 40 °C.

Cinco semillas germinadas se colocaron en cada caja, y se usaron cinco cajas por tratamiento (25 semillas en cada una), con dos concentraciones de inóculo, 1×10^6 y 4×10^6 UFC mL⁻¹. En los tratamientos con los compuestos químicos se utilizaron las siguientes concentraciones de 1-butanol, 1, 10 y 100 mM; etanol y propanol, 10 mM; ácido indol-3-acético, 1 μ M; ácido fosfatídico, 500 nM. Las longitudes de la hoja y la raíz, y el peso fresco total se analizaron después de tres días de crecimiento.

Raíces de plántulas de 4 d de germinación se sumergieron en una suspensión de bacterias con una concentración de 1×10^6 UFC mL⁻¹, o bien, en 1 μ M de ácido indol-3-acético, para las pruebas de la actividad de la PLD en diferentes instancias, y también se realizó la extracción de AF.

Extracción de ácido fosfatídico

Para la extracción de ácido fosfatídico, 200 mg de tejido de raíz se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido y el polvo se homogenizó en 1 mL de agua desionizada estéril. Las muestras se calentaron por ebullición en baño de agua durante 1 min para desactivar enzimas lipolíticas, y se dejaron enfriar. Los lípidos se extrajeron con modificaciones ligeras de acuerdo con el procedimiento descrito por Bligh y Dyer (1959). Las muestras se mezclaron con 1 mL de cloroformo durante 2 min, en agitador vórtex, se agregó 1 mL de agua, y se mezcló por 30 s. Luego se acidificaron con HCl 6N, se mezclaron durante 5 s y se centrifugaron 10 min a 13 000 x g. El sobrenadante se recuperó y secó bajo el flujo de nitrógeno gaseoso.

Las muestras se resuspendieron en metanol, se aplicaron en láminas para cromatografía en placa fina (TLC) y se desarrollaron en el sistema de solventes (60:35:8, v/v) cloroformo:metanol:amoniaco al 28% (Tanaka *et al.*, 2012). Las placas se revelaron con vapores de yodo durante 3 min. La identificación de AF se realizó con un estándar comercial. Los resultados se registraron con una cámara digital. Después se determinó

Five germinated seeds were placed in each Petri dish and five dishes were used per treatment (25 seeds each), with two concentrations of inoculant, 1×10^6 and 4×10^6 CFU mL⁻¹. For treatments, the following chemical compounds and concentrations were used: 1, 10 and 100 mM 1-butanol; 10 mM ethanol and propanol; 1 μ M indol-3-acetic acid; and 500 nM phosphatidic acid. Leaf length, root length and total fresh weight were analyzed after three days of growth.

Root seedlings 4 d after germination were submerged in a suspension of 1×10^6 UFC mL⁻¹ bacteria, or in 1 μ M of indol-3-acetic acid to assess PLD activity at different terms, and the PA extraction was also carried out.

Extraction of phosphatidic acid

For the extraction of phosphatidic acid, 200 mg of root tissue were crushed in a mortar with liquid nitrogen and the dust was homogenized in 1 mL of sterile deionized water. The samples were boiled for 1 min to neutralize lipolytic enzymes and allowed to cool. Lipids were extracted with slight modifications following the procedure described by Bligh and Dyer (1959). Samples were mixed with 1 mL of chloroform in a vortex stirrer, 1 mL of water was added then and mixed for 30 s. Later, they were acidified with 6N HCl, mixed for 5 s and centrifuged for 10 min at 13 000 x g. The supernatant was recovered and dried under the flow of gaseous nitrogen.

The samples were resuspended in methanol, applied on thin layer chromatography (TLC) plates, and developed in the chloroform:methanol:ammonia (60:35:8, v/v) 28% solvent system (Tanaka *et al.*, 2012). The plates were revealed with iodine vapors for 3 min. The PA was identified with a commercial standard. The results were recorded using a digital camera. Then, the amount of phosphorous in the samples was determined following the procedure by Mrsny *et al.* (1986). The samples were scraped from the plate using a spatula and placed in open glass tubes containing 500 μ L of perchloric acid. The mixture was homogenized by stirring for 1 min in a vortex and heated in a fume cupboard at 130 °C for 30 min. The tubes were left to cool in ice and after that 3 mL of water, 1 mL of 2.5% ammonium molybdate and 500 μ L of 10% ascorbic acid were added, and the samples were homogenized by stirring in a vortex for 1 min. The reaction was incubated for 1.5 h at 37 °C in water bath and the absorbance was registered at 820 nm in a spectrophotometer. In order to quantify the amount of phosphorous, a standard curve was created with NaH₂PO₄.

All chemical compounds were obtained from the Sigma-Aldrich company (St. Louis, MO, U.S.A.). The experiments were carried out in triplicate and statistical analysis for each experiment was performed.

la cantidad de fósforo de las muestras de acuerdo con el procedimiento de Mrsny *et al.* (1986). Las muestras se rasparon de la placa con una espátula y se colocaron en tubos de vidrio destapados con 500 μL de ácido perclórico. La mezcla se homogenizó por agitación en vórtex por 1 min y se calentó en una campana de extracción a 130 °C durante 30 min. Los tubos se enfriaron en hielo y se adicionaron 3 mL de agua, 1 mL de molibdato de amonio al 2.5% y 500 μL de ácido ascórbico al 10%, y las muestras se homogenizaron por agitación en vórtex durante 1 min. La reacción se incubó 1.5 h a 37 °C en baño María y se registró la absorbencia a 820 nm en espectrofotómetro. Para cuantificar la cantidad de fósforo se realizó una curva estándar con NaH_2PO_4 .

Todos los compuestos químicos se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los experimentos se realizaron por triplicado, y se realizó un análisis estadístico para cada experimento.

Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como medias $\pm$ desviación estándar (DE). El análisis incluyó ANDEVA y prueba de comparación de medias de Tukey para muestras independientes ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plántulas de trigo se inocularon con dos concentraciones 1×10^6 y 4×10^6 UFC mL^{-1} de inóculo de la rizobacteria para el análisis de su efecto sobre el crecimiento. Las dos concentraciones disminuyeron la longitud de la hoja y de la raíz, pero la reducción fue mayor en la raíz. El peso fresco aumentó de forma notable sólo con la concentración más alta (Figura 1). La concentración 1×10^6 UFC mL^{-1} se utilizó en los demás experimentos para evitar efectos no deseados, debidos a una concentración excesiva de inóculo.

Después se analizó la función de la enzima PLD sobre el crecimiento de plántulas de trigo, con el inhibidor 1-butanol. Para este experimento se usaron concentraciones de inhibidor de 1 a 100 mM. Después de 3 d de tratamiento se analizaron las longitudes de la hoja y de la raíz, las cuales disminuyeron en ambos tejidos y fue dependiente de la concentración del inhibidor (Figura 2A). Un análisis más detallado sobre la morfología de la raíz, tejido en el cual se analizó también el efecto de la rizobacteria sobre la PLD, mostró que el inhibidor redujo la longitud de los pelos de la raíz en presencia de *A. brasilense* (Figura 2B).

Statistical analysis

The experimental results were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). The analysis included an ANOVA and Tukey's mean comparison test for independent samples ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Wheat seedlings were inoculated with two different concentrations, 1×10^6 and 4×10^6 UFC mL^{-1} , of rhizobacterium inoculum to analyze at first the effect on the growth. Both concentrations decreased leaf and root lengths, although the decrease was higher in the roots. The fresh weight noticeably increased at the highest concentration alone (Figure 1). The 1×10^6 UFC mL^{-1} concentration was used for the subsequent experiments to avoid undesired effects due to an excessive concentration of inoculant.

The function of the PLD enzyme on the growth of wheat seedlings was analyzed with the inhibitor 1-butanol. For this experiment, different inhibitor concentrations ranging from 1 to 100 mM were used. After 3 d of treatment, leaf and root lengths were analyzed. There was a decrease in the length of both tissues, and it was dependent of the inhibitor concentration (Figure 2A). A detailed analysis of the root morphology, where rhizobacterium effect on PLD was also assessed, showed that the inhibitor reduced the length of root hairs in the presence of *A. brasilense* (Figure 2B).

In order to study the specificity of 1-butanol on seedlings growth, its effect was compared with two primary alcohols, ethanol, and propanol, using a concentration of 10 mM (Table 1).

The treatments with ethanol and propanol did not reduce the length of leaves and roots; moreover, a growth stimulating effect which was higher in the roots, was observed due to both alcohols. By contrast, 1-butanol reduced 50% the length of both organs, in comparison with untreated seedlings (control). Results suggest a specific inhibitory effect of 1-butanol on seedlings growth, perhaps due to a reduction in the production of PA, the catalytic product of the enzyme. The PA is the second messenger involved in the stimulation of growth and development in plants (Hong *et al.*, 2009; Munnik, 2001).

Rhizobacterium effect on the PLD activity was then analyzed. During the former 15 min, there

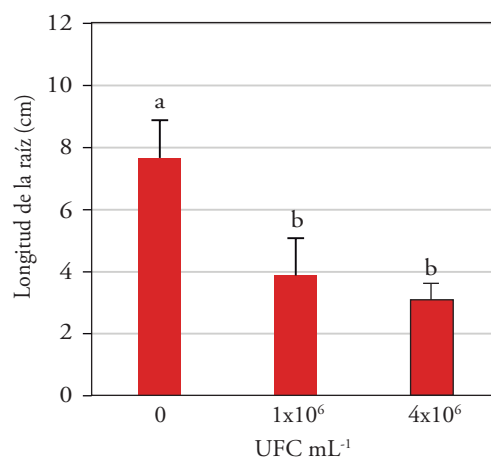
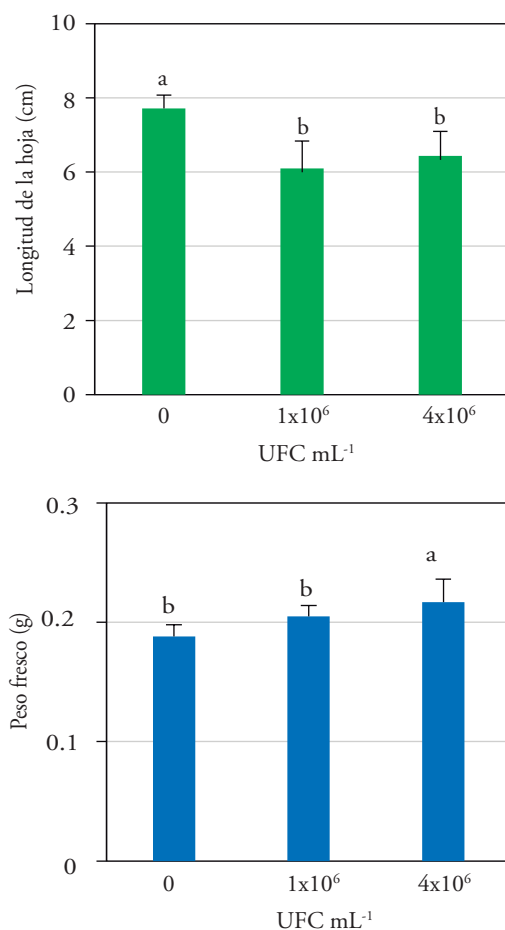


Figura 1. Efecto de dos concentraciones de *A. brasilense* (1×10^6 y 4×10^6 UFC mL⁻¹) en el crecimiento de plántulas de trigo (N=15). Los resultados experimentales se expresaron como media $\pm$ DE. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Figure 1. Effect of two concentrations of *A. brasilense* (1×10^6 and 4×10^6 UFC mL⁻¹) on the growth of wheat seedlings (N=15). The experimental results were expressed as mean $\pm$ SD. The letters on the bars indicate statistical differences among treatments.

Para estudiar si el efecto del 1-butanol es específico sobre el crecimiento de las plántulas, se comparó su efecto con el de los alcoholes primarios, etanol y propanol, con una concentración de 10 mM (Cuadro 1).

Los tratamientos con el etanol y el propanol no disminuyeron las longitudes de la hoja y de la raíz; incluso hubo un efecto estimulante en el crecimiento de estos dos órganos, en particular el crecimiento fue mayor en la raíz, con ambos alcoholes. En contraste, el 1-butanol redujo en 50% la longitud de los dos órganos, respecto a las plántulas sin tratamientos (testigo). Los resultados sugieren un efecto inhibitorio específico del 1-butanol sobre el crecimiento de las plántulas, que pudo deberse a una disminución en la producción de AF, el producto catalítico de la enzima. El AF es un segundo mensajero relacionado con la estimulación del crecimiento y desarrollo en las plantas (Hong *et al.*, 2009; Munnik, 2001).

was a reduction on PA production, and a further decrease at incubation terms of 24 to 48 h (Figure 3A). These results indicate that the interaction stimulated a reduction on PLD activity, that began within short interaction times. Also, indicating that the rhizobacterium is able to modify the enzyme activity, thus displaying effects on wheat seedlings growth. Experimental results suggest that the decrease of seedlings growth may be partially due to the inhibition of enzymatic activity.

In order to further analyze the enzyme effect on growth, seedlings were grown in presence of exogenous 500 nM PA added to the medium for 3 d, and leaf and root lengths were measured. PA stimulated the growth of both tissues in comparison to untreated control, indicating that PA production is important for seedlings growth (Figure 3B).

PA is the second messenger involved in germination, senescence, and responses to wounds

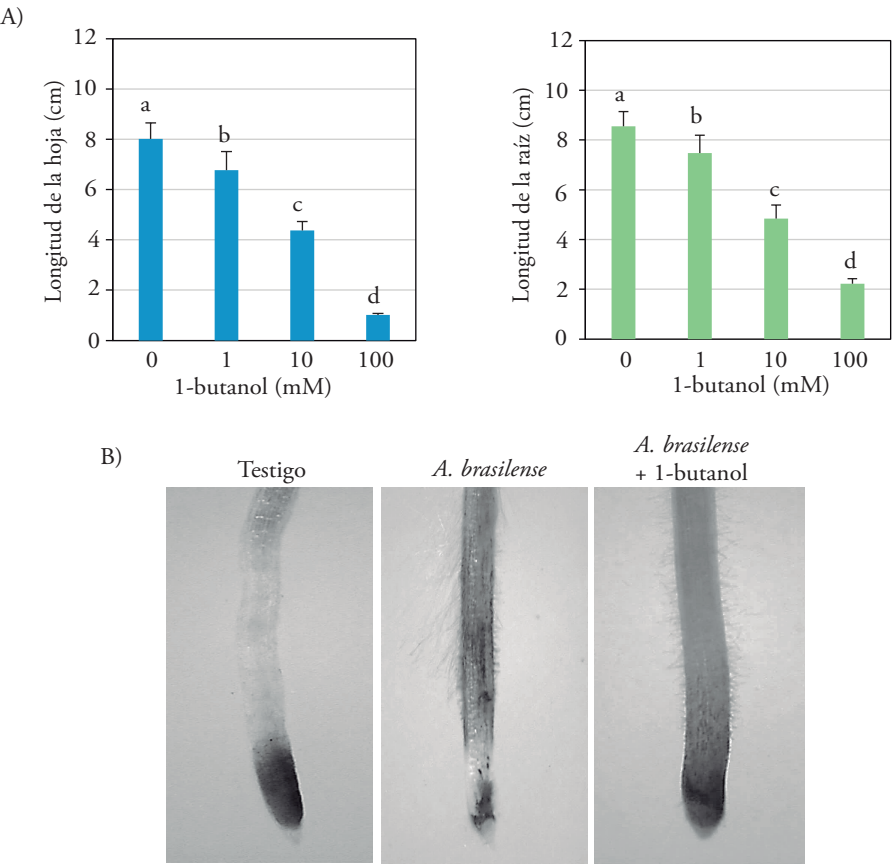


Figura 2. Efecto de 1-butanol sobre el crecimiento de las plántulas y la morfología de la raíz. A) efecto sobre el crecimiento de la hoja y la raíz, B) efecto 10 mM de 1-butanol sobre la morfología de la raíz (N=15). Los resultados experimentales se expresan como media $\pm$ DE. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre las concentraciones.

Figure 2. Effect of 1-butanol on seedlings growth and root morphology. A) effect on leaf and root growth, B) effect of 10 mM of 1-butanol on root morphology (N=15). The experimental results are expressed as mean $\pm$ SD. The letters on the bars indicate statistical differences among concentrations.

Después se analizó el efecto de la rizobacteria sobre la actividad de la PLD. Durante los primeros 15 min disminuyó la producción de AF, la cual fue mayor con tiempos de incubación de 24 a 48 h (Figura 3A). Estos resultados indican que la interacción estimuló una disminución en la actividad de la PLD, y que esta estimulación comienza en tiempos cortos de interacción. Además, que la rizobacteria es capaz de modificar la actividad de la enzima, lo cual tiene efecto en el crecimiento de las plántulas de trigo. Los resultados de este experimento sugieren que la reducción en el crecimiento de las plántulas se podría deber, en parte, a la inhibición de la actividad de la enzima.

Cuadro 1. Efecto de diferentes alcoholes sobre el crecimiento de plántulas de trigo.

Table 1. Effect of different alcohols on wheat growth seedlings.

Tratamiento	Crecimiento en longitud (%)	
	Hoja	Raíz
Testigo	100	100
1-butanol	57.79	53.45
Etanol	122.01	137.21
Propanol	101.14	142.85

Los alcoholes se aplicaron a una concentración de 10 mM ♦ Alcoholes were used at 10 mM.
Control= Plántulas testigo sin tratamiento ♦ Control=Untreated seedlings.

Para analizar con más detalle el efecto de la enzima sobre el crecimiento, plántulas se cultivaron en presencia de 500 nM de AF agregados al medio de crecimiento, durante 3 d, y las longitudes de la hoja y de la raíz se midieron. El AF estimuló el crecimiento de ambos tejidos, respecto al testigo no tratado, lo cual indica que su producción es importante para el crecimiento de la plántula (Figura 3B).

El AF es un segundo mensajero involucrado en la germinación, en la senescencia, en la respuesta a heridas y a patógenos (Ritchie y Gilroy, 1998; Fan *et al.*, 1997; den Hartog *et al.*, 2001). Además, algunos de sus blancos moleculares incluyen las proteínas cinasas y los canales de potasio (Lee *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 1999), lo cual manifiesta su importancia como estimulador de múltiples respuestas celulares. Los resultados de este estudio muestran que el potasio también podría tener una función durante la interacción de *A. brasilense* con plántulas de trigo.

A. brasilense es una rizobacteria que produce auxinas (AIA) como un mecanismo para estimular cambios en la morfología de las plantas. Por lo tanto, para analizar si las auxinas se involucran en la modulación de la actividad de la PLD, las raíces de las plántulas se sumergieron en 1 μ M de AIA durante 0, 5, 15, 30, 60 min y 12, 18, 24 h, para medir el contenido de AF. Este disminuyó según la concentración de AIA, en los primeros 60 min de tratamiento; a las 12 y 24 h, el contenido se redujo más y de forma sostenida (Figura 4). Lo anterior sugiere que la rizobacteria podría modular la actividad de la PLD con la intervención del AIA.

En *Arabidopsis*, se ha informado que una mutación, la cual anula la actividad de la PLD ϵ , disminuye el crecimiento de la raíz. Mientras que una sobreexpresión incrementa su crecimiento y la elongación de los pelos radicales; el nivel de AF disminuyó o aumentó de acuerdo con la actividad de la enzima (Hong *et al.*, 2009). Es probable que la disminución del tamaño de la raíz en plántulas de trigo inoculadas con la rizobacteria se deba a una disminución en la cantidad de AF.

Las clases de PLD en plantas son PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ , y PLD ζ , las cuales regulan procesos biológicos diversos (Wang *et al.*, 2006). Sin embargo, las estrategias experimentales aplicadas en nuestro estudio no permitieron distinguir con precisión cuál de estas clases estuvo relacionada con la respuesta a la rizobacteria.

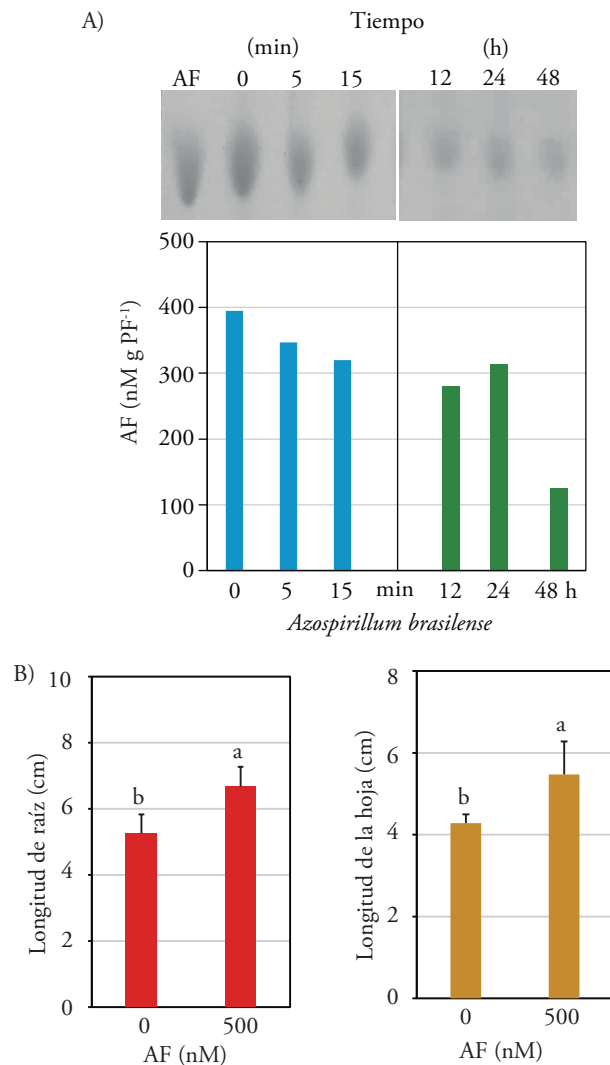


Figura 3. Efecto de *Azospirillum brasilense* sobre el contenido de AF en la raíz y del AF sobre el crecimiento de plántulas. A) Análisis de AF por TLC (la fotografía en el panel superior) y cuantificación por liberación de fósforo (panel inferior) (ver MM) en diferentes tiempos de interacción con la rizobacteria (N=3). Los resultados experimentales expresados como la media de un experimento representativo. B) Efecto del AF sobre el crecimiento de las plántulas (N=15). AF = ácido fosfatídico. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas entre tratamientos.

Figure 3. Effect of *Azospirillum brasilense* on the PA content on the root, and of PA on seedlings growth. A) PA analysis by TLC (photograph on the top panel) and quantification by phosphorous release (lower panel) (see MM) in different times of interaction with the rhizobacterium (N=3). Experimental results are expressed as the mean of a representative experiment. B) Effect of PA on seedlings growth (N=15). PA = phosphatidic acid. Letters on bars indicate statistical differences among treatments.

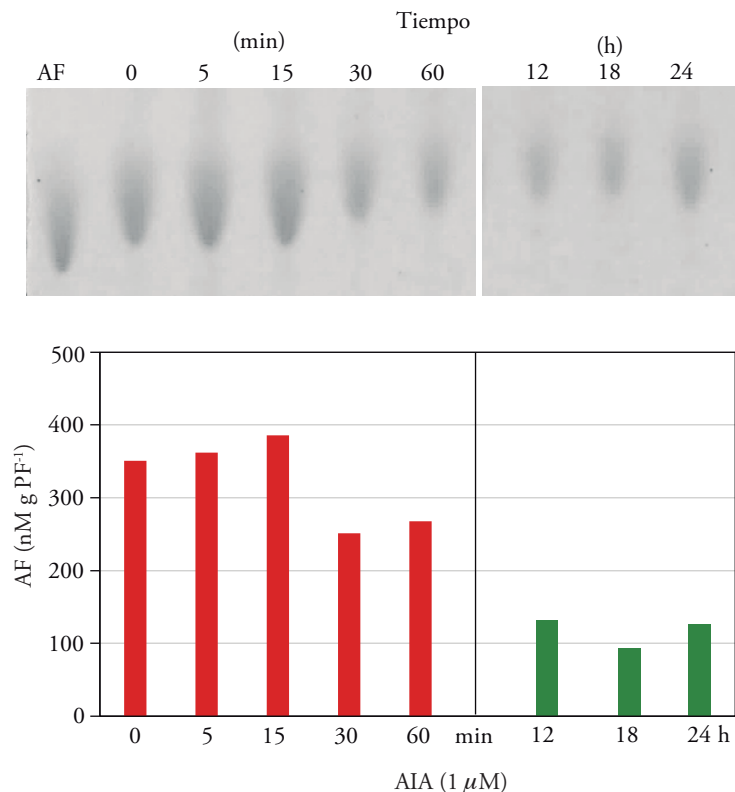


Figura 4. Efecto del AIA sobre el contenido de AF en la raíz.

Las raíces se trataron con 1 μ M de AIA, se incubaron por tiempos diferentes, se extrajo el AF y se analizó por TLC (fotografía en el panel superior). La cuantificación se realizó por liberación de fósforo (en el panel inferior, ver MM) AF (N=3). Los resultados experimentales se expresaron como la media de un experimento representativo.

Figure 4. Effect of AIA on the content of PA in the root.

The roots were treated with 1 μ M AIA, incubated for different times, and the PA was extracted by TLC (photograph in top panel). Quantification was performed with the release of phosphorous (lower panel, see MM) PA (N=3). Experimental results were expressed as the mean of a representative experiment.

Este estudio mostró evidencia de que la rizobacteria disminuye la actividad de la PLD. Un mecanismo probable para explicar este efecto es que la rizobacteria modula su actividad a través de la producción de auxinas, porque su adición exógena disminuyó la actividad. Otro posible mecanismo, no explorado hasta ahora, es que se podría regular a través de la producción de N-aciletanolaminas (NAEs) por la planta, estimulada por la rizobacteria. Las NAEs son un grupo de lípidos producidos por la hidrólisis catalizada por PLD de N-acilfosfatidiletanolamina, un lípido presente en cantidades bajas en la membrana plasmática (Schmid *et al.*, 1996).

In vitro, las NAEs son potentes inhibidores no competitivos de la actividad PLD α , y esta forma específica de PLD no produce NAEs, pero las clases PLD β y PLD γ sí las producen, lo cual sugiere la

and pathogens (Ritchie and Gilroy, 1998; Fan *et al.*, 1997; den Hartog *et al.*, 2001). PA molecular targets include kinase proteins and potassium channels (Lee *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 1999). These functions display PA relevance as a stimulator of multiple cell responses. The results of this study show that potassium may also have a role while the interaction of *A. brasilense* and wheat seedlings occurs.

Azospirillum brasilense is a rhizobacterium that produce auxins (AIA) as a mechanism to stimulate changes in the morphology of plants. Therefore, to analyze whether auxins are involved in the modulation of the PLD activity, root seedlings were immersed in 1 μ M AIA for 0, 5, 15, 30, 60 min and 12, 18, 24 h and PA content was quantified. A decrease in PA was detected depending on AIA concentration, in the first 60 min of treatments; and at 12 to 24 h,

posibilidad de que los lípidos mediadores, producidos por un tipo de PLD, regulen la actividad de otro tipo de PLD en plantas (Pappan *et al.*, 1998). Experimentos de Chapman (2004) y Blancaflor *et al.* (2003) apoyaron esta hipótesis, porque en ellos, semillas de *Arabidopsis* germinadas en presencia de N-lauriletanolamina (NAE 12:0), una NAE natural, mostraron una inhibición en la elongación de la raíz y una reducción en la formación de pelos de la raíz. Todavía se desconoce si *A. brasilense* estimula la producción de NAEs en las plantas, lo cual representa un aspecto interesante para investigaciones subsecuentes.

Los efectos positivos de *Azospirillum* sobre las plantas han llamado la atención debido a la necesidad de reducir la aplicación de agroquímicos en la agricultura, y se han desarrollado inoculantes basados en esta rizobacteria con aplicación comercial en cultivos de maíz, trigo, arroz y algodón (Coniglio *et al.*, 2019). El uso de *A. brasilense* es parte importante de la agricultura sostenible porque genera un incremento en la productividad de los cultivos y no es un riesgo para el ambiente, pues se trata de uno de los microorganismos del suelo.

El estudio de las respuestas bioquímicas y moleculares que se establecen durante su interacción con las plantas permitirá conocer con más detalle los mecanismos involucrados en los efectos benéficos que esta bacteria provoca en las plantas. Nuestros resultados revelaron una función de la PLD en las plántulas de trigo durante la interacción con *A. brasilense* y abren la probabilidad para explorar el nivel de participación de esta enzima en los cambios estimulados por la rizobacteria en plantas.

CONCLUSIONES

La inoculación de plántulas de trigo con la rizobacteria *Azospirillum brasilense* disminuyó la actividad de la enzima PLD y mostró que esta tiene una función importante durante la respuesta de la planta a la rizobacteria.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por el apoyo económico para realizar esta investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca

PA content showed constant further decrease (Figure 4). This suggest that rhizobacterium modulates PLD activity through AIA.

In *Arabidopsis* it was reported that a null mutation in PLD ϵ decrease root growth, whereas overexpression increases root hairs growth and elongation. The level of PA decreased or increased according to enzyme activity (Hong *et al.*, 2009). Probably, the decrease in root size of inoculated wheat seedlings with the rhizobacterium is due to a decrease in the amount of PA.

Plant PLD are grouped in a number of classes (PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ , and PLD ζ), which regulate several biological processes (Wang *et al.*, 2006). However, our experimental strategies did not allow to determine which PLD was related with the response to the rhizobacterium.

This showed evidence on the rhizobacterium reducing PLD activity. An expected mechanism to explain this effect is that rhizobacterium modulates that activity through auxins production, since their exogenous addition reduced PLD activity. Another possible mechanism, unexplored to date, is via the production of N-acylphosphatidylethanolamine (NAEs) by the plant and stimulated by the rhizobacterium. NAEs are a group of lipids produced by hydrolysis catalyzed by the PLD of N-acylphosphatidylethanolamine, a lipid found in low amounts in the plasmatic membrane (Schmid *et al.*, 1996).

In vitro, NAEs are powerful, non-competitive inhibitors of PLD α activity; this specific PLD isoenzyme does not produce NAEs, but they are produced by PLD β and PLD γ , suggesting the possibility that lipids produced by a type of PLD regulate the activity of another PLD type in plants (Pappan *et al.*, 1998). Experiments carried out by Chapman (2004) and Blancaflor *et al.* (2003) supported this hypothesis, for example, *Arabidopsis* seeds germinated in the presence of N-lauryl ethanolamine (NAE 12:0), a natural NAE, inhibited root elongation and reduced the formation of root hairs. Whether *A. brasilense* stimulates the production of NAEs in plants is yet unknown, but it is an interesting issue to further investigation.

The positive effects of *Azospirillum* on plants have drawn attention due to the need to reduce the amounts of agrochemicals used in agriculture, and inoculants have been developed based on this rhizobacterium with commercial uses on maize,

académica No. 598340 otorgada a R. Durán Baltazar, en el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la UMSNH.

LITERATURA CITADA

- Baldani, J. I., V. L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Dobereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bact.* 36: 86-93.
- Bargmann, B. O., and T. Munnik. 2006. The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 515-522.
- Bashan, Y., G. Holguin, and L. E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-77.
- Blancaflor, E. B., G. Hou, and K. D. Chapman. 2003. Elevated levels of *N*-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta* 217: 206-217.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Cassán, F. D., Y. Okon, and C. M. Creus. 2015. Handbook for *Azospirillum*. Technical issues and Protocols. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-06542-7
- Coniglio, A., Mora, V., Puente, M., and F. Cassán. 2019. *Azospirillum* as biofertilizer for sustainable agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a model of PGPR and field traceability. In: Zúñiga-Dávila D., González-Andrés F., Ormeño-Orrillo E. (eds) Microbial Probiotics for Agricultural Systems. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. 256 p.
- Chapman, K. D. 2004. The occurrence, metabolism, and prospective functions of *N*-acylethanolamines in plants. *Prog. Lipid Res.* 43: 302-327.
- den Hartog, M., A. Musgrave, and T. Munnik. 2001. Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J.* 25: 55-65.
- Fan, L., S. Zheng, and X. Wang. 1997. Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9: 2183-2196.
- Frank, W., T. Munnik, K. Kerkmann, F. Salamini, and D. Bartles. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-123.
- Gardiner, J. C., J. D. I. Harper, N. D. Weerakoon, D. A. Collings, S. Ritchie, S. Gilroy, R. J. Cyr, and J. Marc. 2001. A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell* 13: 2143-2158.
- Hong, Y., D. P. Devaiah, B. N. Thamasandra, S. C. Bahn, M. Li, R. Welti, and X. Wang. 2009. Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant J.* 58: 376-87.
- Jacob, T., S. Ritchie, S. M. Assmann, and S. Gilroy. 1999. Abscicic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12192-12197.
- wheat, rice, and cotton crops (Coniglio *et al.*, 2019). *A. brasilense* application is an important component for sustainable agriculture because it produces increases in crop productivity and does not pose risks on the environment, since it is part of soil microbiota.
- The study of biochemical and molecular responses established during the interaction of *Azospirillum* with plants will lead to know those mechanisms involved in the beneficial effects this bacterium produces in plants. Our results revealed a PDL function on wheat seedlings during the interaction with *A. brasilense* and open up the plausibility to explore the level of participation of PDL enzyme on those changes stimulated by the rhizobacterium in plants.

CONCLUSIONS

The inoculation of wheat seedlings with the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* decreased the activity of PLD enzyme and it showed an important function during the response of the plant to the rhizobacterium.

—End of the English version—

-----*-----

- Khalid, A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- Lee, S., H. Hirt, and Y. Lee. 2001. Phosphatidic acid activates a wound activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J.* 26: 479-486.
- Li, J., and X. Wang. 2019. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Science*. 279: 45-50.
- Mrsny, R. J., Volwerk, J. J., and O. H. Griffith. 1986. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem. Phys. Lip.* 39: 185-191
- Munnik, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6:227-233. *D. Sci. STKE* 111: pe42
- Murashige T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pappan, K., S. Austin-Brown, K. D. Chapman, and X. Wang. 1998. Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, beta and gamma. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 131-140.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill, and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in

- the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339.
- Ritchie, S., and S. Gilroy. 1998. Absciscic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2697-2702.
- Schmid, H. H., P. C. Schmid., and V. Natarajan. 1996. The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signaling. *Chem. Phys. Lipids* 80: 133-142.
- Steenhoudt, O., and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical, and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Tanaka, T., A. Kassai, M. Ohmoto, K. Morito, Y. Kashiwada, Y. Takaishi, M. Urikura, J. Morishige, K. Satouchi, and A. Tokumura. 2012. Quantification of phosphatidic acid in foodstuffs using a thin-layer-chromatography-imaging technique. *J. Agric. Food Chem.* 60: 4156-4161.
- van der Luit, A. H., T. Piatti, A. van Doorn, A. Musgrave, G. Felix, T. Boller, and T. Munnik. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1515.
- Wang, X. 2000. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 39: 109-149.
- Wang, X. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 408-414.
- Wang, X. M., S. P. Devaiah, W. H. Zhang, and R. Welti. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45: 250-278.
- Zien, C. A., C. Wang., X. Wang, and R. Welti. 2001. *In vitro* substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLD α to wound-induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1530: 236-248.