

Efecto de lipopolisacáridos y exopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Arturo Chávez Valenzuela, Manuel Méndez Gómez,
Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH

Resumen

Las rizobacterias estimulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas a las que colonizan. *Azospirillum brasilense* es una rizobacteria Gram negativa que tiene una cubierta externa formada por lipopolisacáridos y exopolisacáridos, las cuales tienen una función importante durante la interacción con las plantas, pero no existen reportes sobre su efecto en la promoción del crecimiento vegetal. En este estudio se analizó el papel de los lipopolisacáridos y de los exopolisacáridos de *A. brasilense* sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando dos cepas mutantes, *exoC* y *rmID*, afectadas en la producción de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, respectivamente. Ambas mutantes fueron incapaces de estimular los cambios morfológicos relacionados con el crecimiento, observados con la cepa silvestre Sp245, y promovieron de manera diferencial la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los resultados obtenidos permiten sugerir que los

polisacáridos de las rizobacterias son importantes para promover el crecimiento vegetal.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, exopolisacáridos, lipopolisacáridos, *Arabidopsis thaliana*, especies reactivas de oxígeno

Abstract

Effect of mutants of *Azospirillum brasilense* in the polysaccharides production on the plant growth of *Arabidopsis thaliana*

Rhizobacteria promote plant growth and development. *Azospirillum brasilense* is a Gram negative rhizobacterium with an external coat of lipopolysaccharides and exopolysaccharides, which have an important function during the interaction with plants, however there are no reports on its effect in plant growth promotion. In this study, the role of exopolysaccharides and lipopolysaccharides from *A. brasilense* on *Arabidopsis thaliana* plant growth, using two mutant strains, *exoC* and *rmID*, affected in the production of exopolysaccharides and lipopolysaccharides, respectively, was analyzed. Both mutants were unable to stimulate morphological changes related with plant growth as was observed with the wild type strain Sp245, and promote differentially the reactive oxygen species production (ROS). The results suggest that the polysaccharides from rhizobacteria are important in promoting plant growth.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, exopolysaccharides, lipopolysaccharides, *Arabidopsis thaliana*, reactive oxygen species.

Introducción

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento vegetal, proteger los cultivos y aumentar la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico. La mayoría son muy conocidas por afectar directamente el metabolismo de las plantas gracias a su capacidad de sintetizar fitohormonas (Matsumura et al., 2015). Las PGPR pueden ser endófitas, que son las que entran en las estructuras internas de las plantas, o diazótrofos, las de vida libre que fijan nitrógeno (N₂) atmosférico y que se asocian con el sistema radicular de las plantas. Algunos ejemplos de rizobacterias son: *Azospirillum sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Azotobacter sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Xanthomonas sp.* Las PGPR pueden

proveer de nitrógeno, fósforo e incluso algunos minerales que se encuentran en pocas cantidades para el desarrollo de la planta (Criollo et al., 2012).

Específicamente, el nombre del género *Azospirillum* proviene del Francés *Azote* nitrógeno y *Spirillum* pequeña espiral. Las bacterias que integran este género son reconocidas por su capacidad de fijar N_2 y han sido aisladas de zonas templadas, tropicales y subtropicales. Son bacterias Gram negativas, con motilidad y puede adaptar su flagelación a diferentes ambientes. Son bacterias con quimitaxis a diferentes compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos localizados en la rizosfera (Parra y Cuevas, 2002). Esta rizobacteria provoca alteraciones significativas en diferentes parámetros del desarrollo y crecimiento de las plantas que coloniza, aumentando el peso seco de la planta, el contenido de nitrógeno, el número de hojas, de granos y brotes, el peso y tamaño del grano, la altura de la planta, el tamaño de la hoja, el índice del área foliar y la tasa de germinación. Se ha visto que induce cambios en el sistema radical provocando un aumento en el número de raíces, el número y longitud de las raíces laterales, incrementando el peso seco de la raíz, así como la pronta aparición de los pelos radicales (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Los lipopolisacáridos son moléculas que forman parte de la superficie celular de bacterias Gram negativas y están asociados a la envoltura celular externa de la membrana. Son moléculas constituidas por tres componentes: un lípido, un núcleo de oligosacárido y un polisacárido-O. El lípido A está unido al núcleo de oligosacárido, generalmente constituido por el azúcar 3-desoxi-D-manno-2-octulosonato (KDO). El polisacárido está unido al núcleo oligosacárido y está formado por repeticiones de unidades de diferentes monómeros de azúcares, que se conocen como antígeno-O. El antígeno-O se ha utilizado para la clasificación de las bacterias Gram negativas (Erbs y Newman, 2003). Los lipopolisacáridos contribuyen a la permeabilidad de la membrana externa, ayudando a la supervivencia de la bacteria en ambientes hostiles. Son los encargados de la patogénesis bacteriana en las plantas y pueden excluir sustancias antimicrobianas excretadas por las plantas (Erbs y Newman, 2003). Participan en la adhesión a células y tejidos, una función crucial en su asociación con las plantas (Romero e Iregui, 2010).

Además de los lipopolisacáridos, las rizobacterias también producen exopolisacáridos, polisacáridos estructurales sintetizados por bacterias de todos los taxones (Nwodo et al., 2012). Los exopolisacáridos desempeñan varias funciones, entre ellas está la capacidad para formar biofilms (conjunto de bacterias que pueden

ser de una o varias especies) que protegen a las bacterias contra el estrés ambiental, del ataque de bacteriófagos, de compuestos antimicrobianos y del ataque de algunos protozoos depredadores de bacterias. Otra función que pueden desempeñar los exopolisacáridos es la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies biológicas ayudando en la colonización bacteriana (Marta 2011).

Se ha reportado la existencia de mutantes de *A. brasilense* en la producción de lipopolisacáridos y exopolisacáridos. La mutante *exoC* de *A. brasilense* fue reportada inicialmente por Michiels et al. (1988). Esta mutante no elimina la producción de los exopolisacáridos pero sí altera significativamente el tamaño de sus componentes (Michiels et al., 1988). El gen *exoC* codifica para una proteína que es homóloga a la proteína AlgC (fosfomanomutasa) presente en *Pseudomonas aeruginosa* (Fischer et al., 2003). La mutante *rmID* de *A. brasilense*, inicialmente reportada por Jofre et al. (2004), muestra una modificación en la producción de lipopolisacáridos y una alteración en la morfología de la colonia, incrementa la producción de exopolisacáridos y además son incapaces de colonizar el sistema radical del maíz. El gen *rmID* codifica para una enzima que sintetiza ramnosa, un componente de la pared celular de las bacterias (Bahat et al., 2004). Estas bacterias no forman agregados en cultivo, pero producen exopolisacáridos ricos en glucosa (Coronado et al., 2008). A pesar de la importancia de estas moléculas durante la interacción bacteria-planta, actualmente se desconoce si su producción está relacionada con la actividad promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de Reactive Oxygen Species) son necesarias para el desarrollo de las plantas ya que están implicadas en el crecimiento y diferenciación de la raíz. Entre las especies reactivas de oxígeno tenemos al O_2^- , el cual se produce en grandes cantidades en el meristemo y en la zona de elongación de la raíz. Está involucrado en el alargamiento de la raíz. Otra especie reactiva de oxígeno es el H_2O_2 . Este compuesto se localiza en la zona de diferenciación de la raíz donde cesa el alargamiento celular, restringe el crecimiento de la raíz y promueve la formación de pelos radicales (Dunand et al., 2007).

A. brasilense es ampliamente utilizado como biofertilizante debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, principalmente por la producción de fitohormonas. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la participación de los componentes de la pared celular bacteriana durante la interacción planta-bacteria. En este estudio se reporta el efecto de *A. brasilense* y de dos mutantes en la producción de polisacáridos, *exoC* y *rmID*, sobre el crecimiento *A. thaliana*.

Materiales y métodos

Cepas

Las cepa *Azospirillum brasilense* Sp245 y sus derivados mutantes en la producción de polisacáridos *exoC* (Michiels et al., 1988) y *rmID* (Jofre et al., 2004), fueron donadas por la DC Gladys Alexandre, de la Universidad de Tennessee, U.S.A.

Las cepas se mantuvieron en medio LB mínimo estéril (triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; cloruro de sodio (NaCl) 5 g/l; sulfato de magnesio (MgSO₄) 0.186 g/l; cloruro de calcio (CaCl₂) 0.277 g/l y agar bacteriológico 15 g/l), suplementado con tetraciclina a una concentración de 10 µg/ml. Se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M con un potenciómetro (Accumet Basic AB15; Fisher Scientific).

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* col 0, la cual fue donada por el DC José López Bucio, del Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A. thaliana se creció en el medio Murashige y Skoog (MS) al 0.2X adicionado con 1% de sacarosa y 0.8% de Agar Plant (Phyto Technology Laboratories).

Desinfección de semillas de *A. thaliana*

Se desinfectaron las semillas de *A. thaliana* en un tubo Eppendorf con 700 µl de alcohol etílico al 96%, en agitación durante 5 minutos en un Termomix Eppendorf a 1400 rpm. Se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 700 µl de cloro al 20%, y se agitó durante 5 minutos. Se realizaron 5 lavados con 700 µl de agua destilada estéril en agitación durante 30 segundos, cada lavado. Las semillas se colocaron en congelación durante 2 días para su siembra en medio MS sólido preparado en cajas Petri de 100 x 15 mm.

Inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense*

Se sembraron 20 semillas de *A. thaliana* en caja Petri, en una campana de flujo laminar. Las cajas fueron selladas con Parafilm y colocadas en una cámara de crecimiento PERCIVAL, a 21.8 °C, durante 6 días.

Se preparó un pre-inóculo de cada cepa en 3 ml de medio líquido LB adicionado con tetraciclina (30 µg/ml) y se incubó en agitación durante 16 h. Se tomaron 150 µl

del cultivo y se adicionaron a un matraz con 50 ml de medio líquido LB. Se incubó a 28°C en agitación constante a 180 rpm durante 16 horas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min. La pastilla de bacterias se re-suspendió en 1 ml de 0.85 % de NaCl y se centrifugó durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 1ml de 0.01 M de MgSO₄. Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para preparar el inóculo, utilizando diferentes diluciones de la suspensión. Las bacterias se inocularon en el medio antes de que solidificara. Se trasplantaron 10 plantas con 6 días de germinación de *A. thaliana* por caja y se sellaron con Parafilm. Las plántulas se incubaron durante otros 6 días. Después del tiempo de incubación se realizó el análisis de los parámetros de crecimiento, peso fresco del follaje, peso fresco de la raíz, longitud de la raíz principal y número de raíces laterales. La raíz principal fue medida con una regla de 30 cm, las raíces laterales se contaron con una lupa estereoscópica (Leica EZ 4D). El peso del tejido se cuantificó con una balanza analítica (Sartorius AX224).

Para analizar la colonización de la raíz, las raíces de las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *A. brasilense* se colectaron y se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de medio líquido LB y se agitaron en Vortex durante 1 min. Se tomaron 100 µl del medio con una micropipeta y se sembraron en una caja Petri de 100 x 15 con medio LB mínimo sólido. Las cajas se incubaron durante 24 h a 28°C y se analizó el número de UFC.

Tinción para analizar la producción de ERO

Para detectar la producción de anión superóxido (O₂⁻) en el tejido de raíz se utilizó la tinción con 0.1% de nitroblue tetrazolium (NBT) y para detectar la producción de peróxido de hidrógeno la tinción con 1 mg/ml de diaminobenzidina (DAB), durante 15 min (Thordal-Christensen 1997). Primero, las raíces se fijaron con 7% de hidróxido de sodio, después se incubaron en etanol al 60% durante 30 minutos a temperatura ambiente, después fueron rehidratadas en etanol al 40% por una noche, luego se colocaron en etanol al 20% durante 30 minutos, después en etanol al 10% y finalmente se mantuvieron en glicerol al 50%. Las plántulas se montaron en porta objetos (2 plantas por porta objetos) y se analizaron en un microscopio Domarsqui (Leica DFC 450 C). Los resultados se documentaron con fotografías.

Análisis estadístico

Se utilizaron 10 plantas por caja, con tres caja por tratamiento (n=30). Los experimentos se repitieron al menos tres veces. A los datos se les aplicó un análisis de ANOVA y la prueba de Tukey, $\alpha < 0.05$.

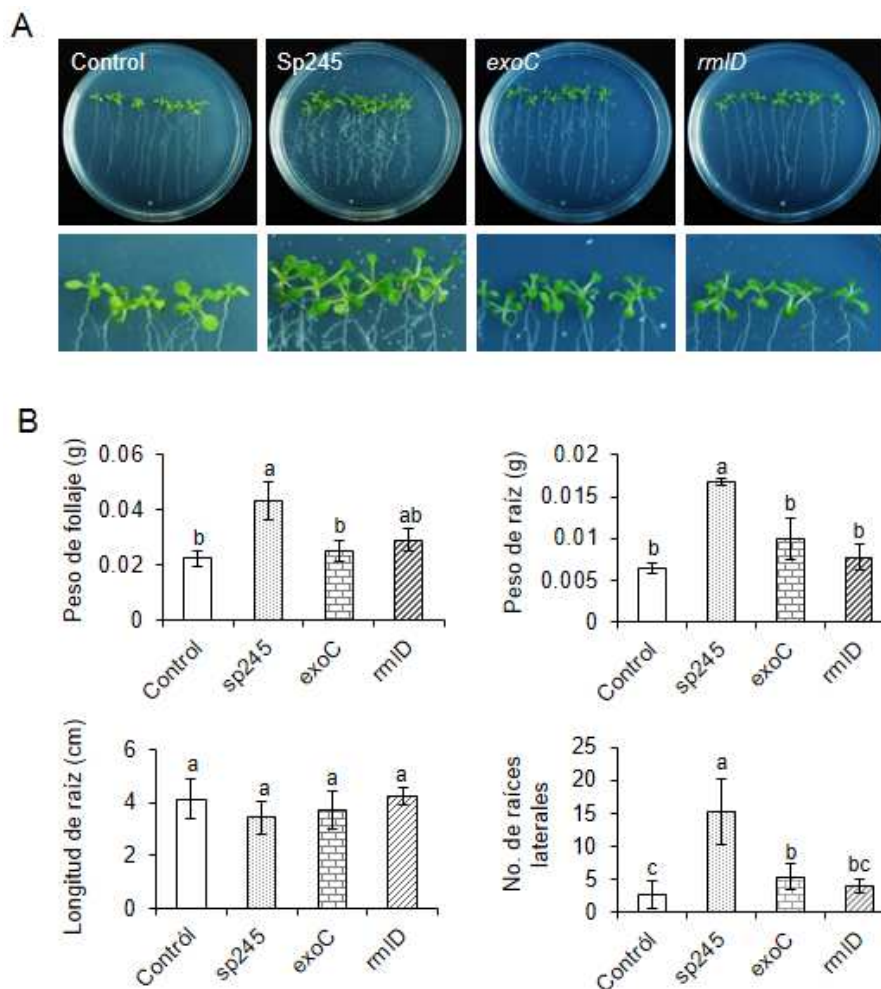


Figura 1. Efecto de *A. brasilense* sobre el crecimiento de *A. thaliana*. **A.** El panel superior muestra el crecimiento completo de las plántulas y el panel inferior muestra un acercamiento de la parte foliar de las plántulas. **B.** Las gráficas muestran el efecto de las cepas de *A. brasilense* sobre diferentes parámetros de crecimiento de *A. thaliana*. N = 30. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha < 0.05$.

Resultados

La cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 promovió cambios en la morfología de las plántulas de *A. thaliana*, que se manifestaron como un incremento en el tamaño del follaje y en la formación de raíces laterales (Fig. 1A). Los parámetros del peso fresco del follaje, peso fresco de la raíz y número de raíces laterales también mostraron un incremento en relación con el control. No se observaron cambios significativos en la longitud de la raíz principal (Fig. 1B).

Las cepas mutantes *exoC* y *rlmD* no promovieron los cambios morfológicos en *A. thaliana* como los observados con la cepa silvestre Sp245. El crecimiento del follaje fue similar al control y no se observó la formación de raíces laterales en plántulas (Fig. 1A), tampoco se observaron cambios en los parámetros de crecimiento con ninguna de las mutantes analizadas, en relación con el control (Fig. 1B).

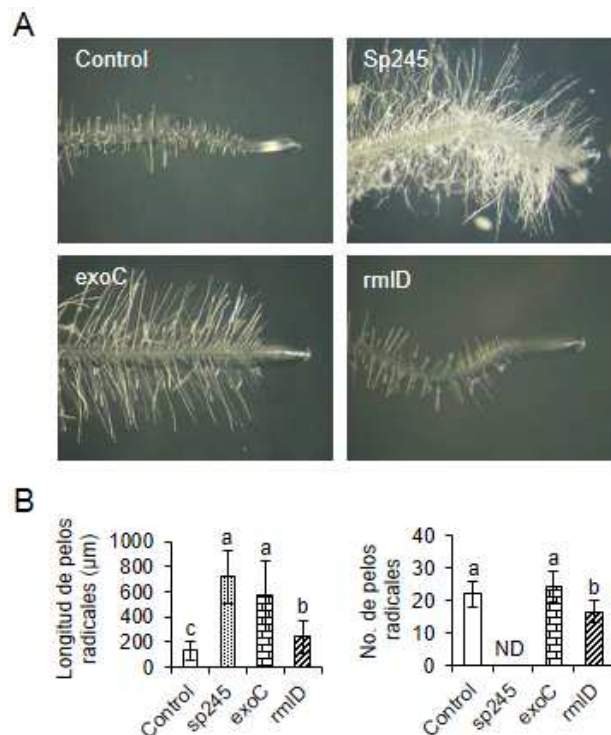


Figura 2. Efecto de *A. brasilense* sobre la morfología de la raíz de *A. thaliana*. **A.** Raíces de *A. thaliana* inoculadas con las diferentes cepas de *A. brasilense*. **B.** Cuantificación de parámetros de crecimiento de la raíz. N = 30. ND = no determinado. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha < 0.05$.

Un análisis más detallado sobre el efecto de las diferentes cepas en el crecimiento de la raíz mostró un incremento en la longitud y densidad de pelos radicales en las plántulas inoculadas con la cepa silvestre Sp245, cuya formación se desplazó a la punta de la raíz, en relación con las plántulas no inoculadas (Fig. 2A). El número y la longitud de pelos radicales fue similar en los tratamientos con la cepa silvestre y con la cepa *exoC*, pero las raíces de las plántulas tratadas con la cepa mutante *rmID* mostraron una morfología similar a las raíces de las plántulas no inoculadas, observándose sólo un ligero incremento en la longitud en relación con el control (Fig. 2B).

La colonización de la raíz de las plántulas, analizada por el número de UFC, mostró diferencias notables entre las tres cepas en su capacidad para asociarse con la raíz (Fig. 3). Se recuperaron aproximadamente 1×10^5 UFC/ml de las raíces inoculadas con la cepa Sp245, mientras que de la cepa mutante *rmID* 1×10^4 UFC/ml, y de la cepa *exoC* 1×10^2 UFC/ml (Fig. 3). La baja cantidad de bacterias recuperadas de las raíces después de la inoculación con la cepa *exoC* sugiere que los exopolisacáridos contribuyen de forma importante en el proceso de colonización de la raíz.

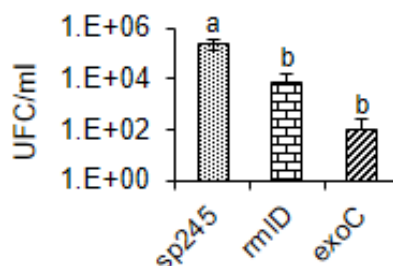


Figura 3. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* sobre la colonización de la raíz de *A. thaliana*. N = 30. Las barras representan la desviación estándar. Las letras arriba de las barras indican diferencias entre tratamiento. ANOVA, $\alpha < 0.05$.

El análisis histoquímico de la producción de especies reactivas de oxígeno, O_2^- y H_2O_2 , en raíces mostró que la concentración de O_2^- se incrementó en repuesta a la inoculación con la cepa Sp245, en relación con el control. Cuando las plantas fueron inoculadas con las cepas mutantes, con la mutante *exoC*, se observó una producción de O_2^- similar al control y una disminución en su producción cuando se inocularon con la mutante *rmID*. En el caso de la producción de H_2O_2 , se observó un cambio en el patrón de su producción en raíces de plántulas inoculadas con la cepa silvestre Sp245 en relación con el control, porque disminuyó en la punta de la raíz y su producción se concentró en zonas alejadas del meristemo, en la zona de

formación de pelos radicales. El patrón de producción en la mutante *exoC* fue similar al observado en el control, pero con la cepa mutante *rmID* su producción se desplazó hacia la punta de la raíz (Fig. 4).

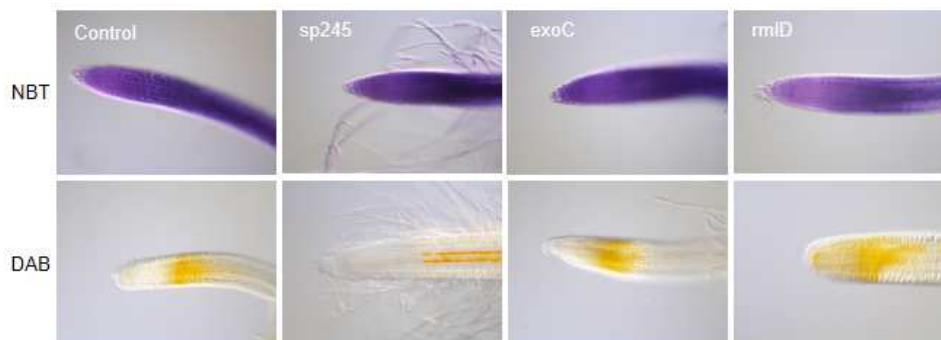


Figura 4. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* sobre la producción de O_2^- (NBT) y de H_2O_2 (DAB) en raíces de *A. thaliana*.

Discusión

Se ha reportado que una de las funciones de los exopolisacáridos es la de proporcionar protección a las bacterias en contra del medio ambiente (Kumar et al., 2007). En las rizobacterias su función parece estar también relacionada con la asociación de las bacterias con la raíz de la planta (Michiels et al., 1988). Los resultados reportados en este trabajo indican que los exopolisacáridos producidos por *A. brasilense* tienen además un papel importante durante la promoción del crecimiento vegetal, una función que no se había reportado previamente para estas moléculas. Esta sugerencia fue apoyada con experimentos realizados con dos cepas afectadas de manera diferente en la producción de exopolisacáridos, una de las cepas (*exoC*), está afectada en la producción de polisacáridos que se excretan al medio extracelular y la otra (*rmID*), está afectada en polisacáridos que forman parte de la pared secundaria de las bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos). Las dos cepas mutantes tuvieron efectos diferentes a la silvestre sobre la promoción del crecimiento vegetal y la colonización de la raíz, lo que sugiere que ambos tipos de polisacáridos están involucrados durante la asociación de la bacteria con la raíz de la planta y su función biológica sobre la misma.

Parece que los polisacáridos también juegan un papel importante en el establecimiento de relaciones simbióticas entre rizobacterias y plantas, como fue reportado por Hirsch (1999). Este autor utilizó también mutantes en la producción

de exopolisacáridos y observó una habilidad disminuida de las bacterias para infectar plantas.

Los resultados con las cepas mutantes también sugieren que es necesaria la integridad estructural de los lipopolisacáridos para su función biológica, porque se ha reportado que las alteraciones en las mutantes modifican la estructura de los lipopolisacáridos (Jofre et al., 2004).

Se conoce la estructura química de los lipopolisacáridos de un número de cepas de *Azospirillum*, incluida la cepa utilizada en este estudio (Boyko et al., 2011; Fedonenko et al., 2002; Sigida et al., 2015; 2014). Sin embargo, no se conoce la estructura de los lipopolisacáridos de las cepas mutantes utilizadas en este estudio, por lo tanto no se conoce su grado de modificación estructural.

Cuando se analizó el efecto de las diferentes cepas sobre la colonización de la raíz se observó que las cepas mutantes tienen una capacidad disminuida para colonizar la raíz, lo cual podría influir sobre su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Se requiere investigación adicional para saber si las mutantes también están afectadas en la producción de otras moléculas bioactivas relacionadas con la estimulación del crecimiento.

Finalmente, se analizaron los efectos de las diferentes cepas sobre la producción de las especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas juegan un papel de señalización muy importante en las plantas, regulando procesos como el crecimiento, el desarrollo y las respuestas de defensa (del Río 2015). Se observó que las diferentes cepas afectaron de forma diferentes su producción en la raíz, observándose una producción disminuida con las mutantes. Esta producción correlacionó con los efectos morfológicos observados en las plantas, lo que sugiere que las mutantes fueron incapaces de influir sobre los procesos bioquímicos relacionados con el crecimiento de las plantas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica, de la UMSNH por el apoyo financiero para la realización de este trabajo de investigación.

Los autores agradecen especialmente al DC José López Bucio del IIQB de la UMSNH, por las facilidades otorgadas para utilizar el materia y el equipo necesario para esta investigación.

Literatura citada

- Bahat, E. S., S. S. Castro y Y. Okon. 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 237: 195-203.
- Boyko, A. S., S. A. Konnova, Y. P. Fedonenko, E. L. Zdrovenko, O. N. Smol'kina, V. V. Kachala y V. V. Ignatov. 2011. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum*. Microbiol Res 166: 585-593.
- Coronado, E., E. Galindo y C. Peña. 2008. Papel del alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii* en cultivo sumergido. Revista Colombiana de Biotecnología.1: 10-16.
- Criollo, P. J., M. Obando, L. M. Sánchez y R. Bonilla. 2012. Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyasense. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 13: 189-195.
- Del Río, L. A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. J Exp Bot 66: 2827-2837.
- Dunand, C., M. Crèvecoeur y C. Penel. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. New Phytol 174: 332-341
- Erbs, G. y M. A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence. Mol Plant Pathol 4: 421-425.
- Fedonenko, Y. P., G. V. Zatonsky, S. A. Konnova, E. L. Zdrovenko y V. V. Ignatov. 2002. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. Carbohydr Res 337: 869-872.
- Fischer, S. E., M. J. Miguel y G.B. Mori. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. FEMS Microbiol Lett 219: 53-62.
- Hirsch, A. M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. Curr Opin Plant Biol 2: 320-326.
- Jofre, E., A. Lagares y G. Mori. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 231: 267-275.

- Kumar, A. S., K. Mody K y B. Jha. 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. J Basic Microbiol 47: 103-11.
- Marta, C. L. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. Department of Immunology, Jagiellonian University Medical College. 36: 51-55.
- Matsumura, E. E., V. S. Andrade, R. M. Stolf, O. J. A. Pais dos Santos, M. Hungria, y A. L. Martínez de Olivera. 2015. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. Ann Microbiol 65: 2187-2200.
- Michiels, K. W., Y. Vanderleyden, A. P. Van Gool, R. Ethan y A. R. Signer. 1988. Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* exoB and exoC mutations. J Bacteriol 11: 5401-5404.
- Nwodo, U. U., E. Green y A. L. Okoh. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int J Mol Sci 13: 14002-14015.
- Parra, Y. y F. Cuevas. 2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Cultivos Tropicales. 3: 31-41.
- Romero, S. H. y C. A. Iregui. 2010. El lipopolisacárido. Revista de Medicina Veterinaria. 19: 37-42.
- Sigida, E. N., Y. P. Fedonenko, A. S. Shashkov, E. L. Zdrovenko, S. A. Konnova, V. V. Ignatov y Y. A. Knirel. 2015. Structure of the polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Carbohy Res 416: 37-40.
- Sigida, E. N., Y. P. Fedonenko, A. S. Shashkov, V. S. Grinev, E. L. Zdrovenko, S. A. Konnova, V. V. Ignatov y Y. A. Knirel. 2014. Structural studies of the polysaccharides from the lipopolysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp246 and SpBr14. Carbohy Res 398: 40-44.
- Steenhoudt, O y 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.
- Thordal-Christensen, H., Z. Zhang, Y. Wei y D. B. Collinge. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. Plant J 11: 1187-1194