



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“La percepción de sacarosa por *Pseudomonas chlororaphis*
determina su patogenicidad o actividad como rizobacteria
promotora del crecimiento vegetal durante su interacción con
Arabidopsis thaliana”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

Hugo Alejandro Tinoco Tafolla

ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS JESÚS SALVADOR LÓPEZ BUCIO

CO-ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS HOMERO REYES DE LA CRUZ

MORELIA, MICH. AGOSTO DE 2023

Dedicatorias

A mi madre Alma Julia de la Soledad Tafolla Delgado por quererme, escucharme, cuidarme, apoyarme en todo momento y siempre estar segura de mí.

A mi padre Alejandro Tinoco Rodríguez por enseñarme a valorar todas las cosas, a ser humilde y a siempre darle otra perspectiva a las cosas.

A mi hermana Laura que, aunque siempre hemos parecido caras contrarias de la misma moneda me ha llevado a conocer la importancia, el valor y el significado de ser más humano.

A mi abuela Lucila por siempre haberme procurado y cuidado de mí.

A Belén Bustos Gutiérrez por acompañarme, apoyarme incondicionalmente y siempre transmitirme de esa energía y alegría que siempre me ayuda a disfrutar hasta del más pequeño detalle de la vida.

Agradecimientos

A la universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme los medios y recursos para mi formación académica.

Al Dr. Homero Reyes de la Cruz por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y orientarme para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jesús Salvador López Bucio por los conocimientos transmitidos a lo largo de mi estadía en el laboratorio, además de brindarme la confianza y asesoría para realizar este proyecto.

Al Dr. César que durante mi estadía en el laboratorio se comportó como una figura de confianza para resolver cualquier duda, además de brindarme el conocimiento necesario para entender los fundamentos y ocupar los equipos del laboratorio que fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos de la facultad con quienes compartí momentos muy importantes que me ayudaron a desarrollarme como futuro profesionista y persona, especialmente a Fátima Monserrat que durante el último año de licenciatura formo parte importante de mi desarrollo académico y además se convirtió en una valiosa amiga, a Paulina Márquez que ha sido una persona muy importante a lo largo de mi licenciatura, apoyándome en cada aspecto que le fuera posible, gran parte de mi formación académica y como persona se lo debo a ella.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de biotecnología molecular de plantas, especialmente a Lolita, Daniela, Pepe, Saúl e Iván por convertir el laboratorio en un lugar muy agradable para trabajar y brindarme sus conocimientos, experiencia y transmitirme la pasión que tienen por la ciencia.

Índice

1.-Introducción.....	10
2.- Interacción planta-microorganismo	11
2.1.- Rizosfera	11
2.2.- Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	12
2.3- Fitoestimulación.....	14
2.4.- Biofertilización	14
2.5.- Respuesta de defensa.....	16
2.6- Antagonismo	16
3.- <i>Pseudomonas</i>	17
3.1.- Factores de virulencia estructurales celulares	17
3.1.1- Lipopolisacáridos	17
3.1.2.- Flagelo	18
3.1.3.- Pilis.....	18
3.1.4.- Alginato	18
3.1.5.- Exopolisacáridos de tipo psl.....	19
3.1.6.- Formación de biopelícula.	19
3.2.- Factores de virulencia excretados por la bacteria.....	20
3.2.1.- Ramnolípidos	20
3.2.2.- Pioverdina y pioquelina.....	20
3.2.3.- HCN	21
3.2.4.- Fenazinas.....	21
3.3.- Sistema de quorum sensing.....	22
3.4.- El estatus nutrimental y su relación con la producción de factores de virulencia en <i>Pseudomonas</i>	25
3.5.- Otras <i>Pseudomonas</i> patógenas.....	26
3.6.- <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	27
3.7.-Sistema de quorum sensing en <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	27
4.- Antecedentes	27
5.-Justificación.....	28
6.-Hipótesis	29
7.- Objetivos	29
7.1.- Objetivo general:.....	29
7.2.- Objetivos particulares:.....	29

8.-Materiales y métodos	30
8.1.-Crecimiento y desarrollo de las plantas	30
8.2.-Cepa bacteriana	30
8.3.-Determinación histoquímica de la actividad GUS.....	31
8.4.-Determinación de los factores de virulencia.....	31
8.4.1.-Pioverdina	31
8.4.2.-Ramnolípidos	32
8.4.3.-Fenazinas	32
8.5.- RT-qPCR	32
8.6.-Suplementación química con una fenazina exógena	33
8.7.-Análisis estadístico.....	33
9.-Resultados	34
9.1- La sacarosa modifica el comportamiento patogénico de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ante <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
9.2.- La percepción de sacarosa por <i>Pseudomonas chlororaphis</i> modifica su comportamiento patogénico.	39
9.3.- La sacarosa inhibe la producción de factores de virulencia de <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	41
9.4.- La piocianina reestablece la patogenicidad de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> en condiciones elevadas de sacarosa	42
9.5.- <i>Pseudomonas chlororaphis</i> induce respuestas de defensa y de desarrollo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
10.- Discusión	47
11.-Bibliografía.....	51

Tabla de figuras

Figura 1. Mecanismo de captación de nutrientes mediante la liberación de exudados en la rizosfera.	12
Figura 2. Interacciones de las plantas con diversos factores bióticos.	13
Figura 3. Los cuatro sistemas de detección de quórum en <i>P. aeruginosa</i>.	24
Figura 4. <i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción con <i>Pseudomonas chlororaphis</i> en respuesta a diferentes concentraciones de sacarosa.	36
Figura 5. Análisis de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción con <i>Pseudomonas chlororaphis</i>.	36
Figura 6. Evaluación del efecto de la bacteria sobre el desarrollo de la planta a mayor tiempo de interacción.	38
Figura 7. Desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> con diferente concentración de sacarosa y cuando <i>Pseudomonas chlororaphis</i> no puede percibir la sacarosa.	40
Figura 8. Efecto de la sacarosa sobre la producción de factores de virulencia y la expresión de genes relacionadas a su biosíntesis en <i>P. chlororaphis</i>.	42
Figura 9. Efecto de la plicianina y la sacarosa en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción con <i>P. chlororaphis</i>.	44
Figura 10. Activación de las vías de señalización del ácido salicílico, ácido jasmónico y auxínicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Pseudomonas chlororaphis</i>.	46

Resumen

A la zona del suelo más próxima a la raíz se le denomina Rizosfera, es el sitio donde existe un mayor intercambio energético entre diferentes organismos incluyendo a las plantas, las bacterias, los hongos, los nematodos, los virus, los protozoos y algunos artrópodos. Los organismos más estudiados de esta zona son las bacterias, más específicamente las rizobacterias. Dentro de estas rizobacterias tenemos al género *Pseudomonas*, bacterias gram-negativas que además de producir factores de virulencia, tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios benéficos para las plantas. Es por ello que estos microorganismos pueden comportarse como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o como patógenos. La mayoría de las especies de este género están descritas como rizobacterias promotoras del crecimiento por su capacidad de suprimir el crecimiento de fitopatógenos, sintetizar fitohormonas o inducir respuestas de defensa local o sistémica en la planta. En el caso de *Pseudomonas chlororaphis*, se ha reportado en diversos estudios como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se aisló una cepa de esta especie proveniente de un bosque de pino/encino, la cual mostró ser patógena para *Arabidopsis thaliana*. Para profundizar en los mecanismos en este cambio de condición patogénica, en el presente trabajo analizamos la interacción entre *Pseudomonas chlororaphis* 3T4-12 y *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de sacarosa pues resultados preliminares que esta podía modificar la condición patogénica. De manera interesante, se observó que la condición patogénica de *Pseudomonas chlororaphis* 3T4-12 cambia a una condición promotora del crecimiento vegetal dependiendo de la concentración de sacarosa presente en el medio de interacción.

Palabras Clave: *Pseudomonas chlororaphis*, patógeno vegetal, promoción del crecimiento vegetal.

Abstract

The soil zone closest to the root is called rhizosphere and is the site where there is a major energetic exchange between different organisms including plants, bacteria, fungi, nematodes, viruses, protozoa and some arthropods. The most studied organisms in this zone are bacteria, more specifically rhizobacteria. Among these rhizobacteria we have the genus *Pseudomonas*, gram-negative bacteria that besides producing virulence factors, have the ability to synthesize beneficial secondary metabolites for plants. That is why these microorganisms can behave as plant growth-promoting rhizobacteria or as pathogens. Most species of this genus are described as growth-promoting rhizobacteria because of their ability to suppress the growth of phytopathogens, synthesize phytohormones or induce local or systemic defense responses in the plant. In the case of *Pseudomonas chlororaphis*, it has been reported in several studies as a plant growth-promoting rhizobacterium. However, in our work group, a strain of this species was isolated from a pine/oak forest, which was shown to be pathogenic for *Arabidopsis thaliana*. To deepen in the mechanisms of this change of pathogenic condition, in the present work we analyzed the interaction between *Pseudomonas chlororaphis* 3T4-12 and *Arabidopsis thaliana* in different sucrose concentrations, as preliminary results showed that sucrose could modify the pathogenic condition. Interestingly, it was observed that the pathogenic condition of *Pseudomonas chlororaphis* 3T4-12 changes to a plant growth-promoting condition depending on the sucrose concentration present in the interaction medium.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis*, plant pathogen, plant growth promotion.

1.-Introducción

A medida que la población mundial aumenta, también crece la demanda de recursos vegetales. Esto conlleva a diversos problemas ecológicos, como la sobreexplotación de los suelos, el uso excesivo de plaguicidas y fertilizantes, las sequías y la introducción de especies invasoras que afectan el desarrollo de la flora y fauna local. Para reducir o resolver estos problemas, es prioritario buscar opciones sustentables y ecológicas. En este sentido, una de las estrategias con mayor perspectiva es el uso de agentes bioinoculantes, que consiste en microorganismos utilizados para mejorar el desarrollo y rendimiento de los cultivos. Entre estos agentes, se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, como las bacterias del género *Pseudomonas* (López-Hernandez *et al.*, 2022).

Las *Pseudomonas* son bacilos gram-negativos que se encuentran en todas las regiones del mundo y han sido ampliamente estudiadas como especies bioinoculantes para mejorar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, algunas especies pueden ser patógenas tanto para las plantas como para los seres humanos, causando enfermedades intrahospitalarias.

Hasta la fecha, hay poca información que defina las razones por las cuales especies del mismo género pueden ser beneficiosas o patógenas, así como los factores ambientales que influyen en este comportamiento, especialmente si todas las *Pseudomonas* comparten información genética para inducir mecanismos de virulencia.

En este trabajo de tesis, se investigó la influencia de la sacarosa durante la interacción *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* con *Pseudomonas chlororaphis*, una bacteria que se ha descrito como promotora del desarrollo vegetal y, recientemente patógena para las plantas.

2.- Interacción planta-microorganismo

2.1.- Rizosfera

Las interacciones biológicas, fisiológicas y químicas más complejas suceden en la rizosfera (Bais *et al.*, 2006). Hiltner (1904) utiliza el término rizosfera por primera vez al referirse al volumen de suelo en el que las raíces de legumbres interactuaban con las bacterias del suelo. En años posteriores se ha ajustado el término como aquella zona del suelo que se ve afectada por la raíz y además es compartida con microorganismos (Darrah, 1993). El tamaño de la rizosfera puede variar significativamente, pudiendo ser de varios milímetros de la superficie de la raíz cuando hay nutrientes móviles como el nitrógeno a apenas 1 o 2 milímetros de la superficie de la raíz en la presencia de nutrientes inmóviles como el fosfato (Bertin *et al.*, 2003). Las raíces pueden afectar físicamente la naturaleza del suelo al aumentar su densidad, porosidad y dureza (Dexter, 1987). Así mismo, las plantas liberan compuestos biológicamente activos llamados exudados que, cuando se acumulan forman rizodepositos, los cuales representan del 5–21% de las fuentes de carbono disponible en el suelo. Se ha establecido que 10% del carbono fijado fotosintéticamente es secretado por las raíces, convirtiendo a la rizosfera en una zona ideal para el crecimiento de microorganismos (Gleba *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2006, Baetz & Martinoia, 2014; Dakora & Phillips, 2002).

Los exudados incluyen compuestos de masa molecular variable, por ejemplo, moléculas simples como aminoácidos, mono o disacáridos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, así como compuestos mayor peso molecular como polisacáridos, proteínas, enzimas, terpenos y ácidos grasos (Bais *et al.*, 2006). La cantidad y tipo de exudados secretados por la planta dependerá del tipo de suelo, de las necesidades de la planta y de los factores bióticos y abióticos. (Doornbos *et al.*, 2011). La producción y liberación de los compuestos a la rizosfera es incierta y varía dependiendo de la edad de la planta, la composición orgánica e inorgánica de los suelos y de la especie de la planta en cuestión.

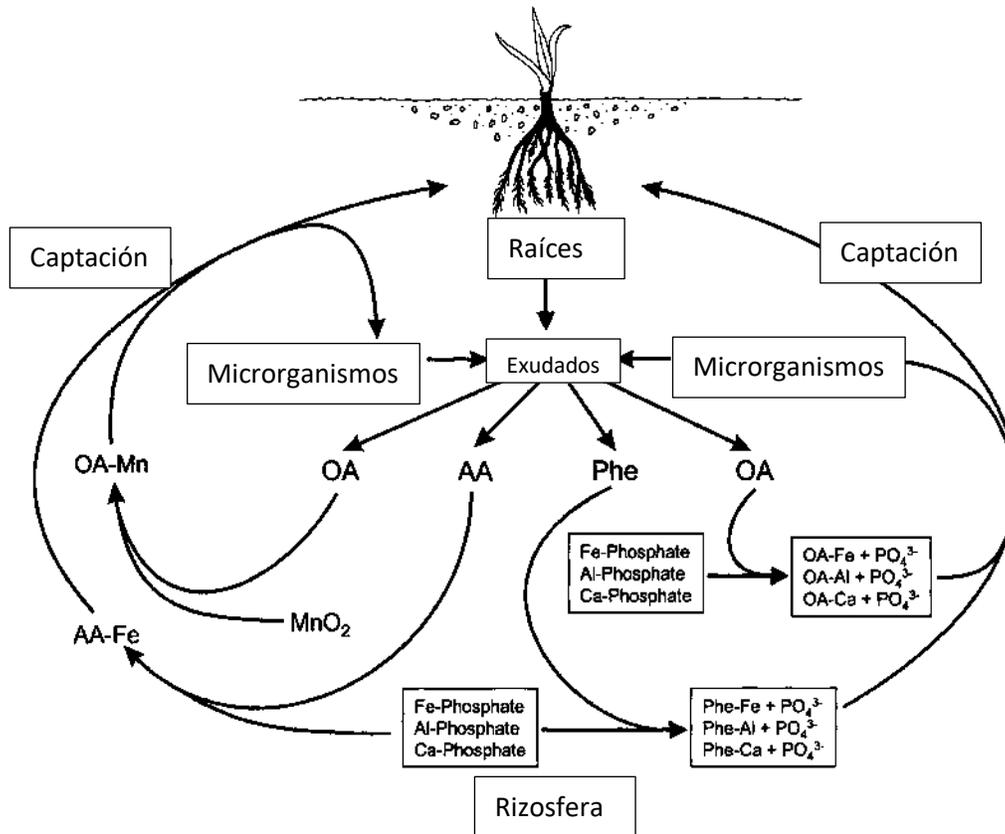


Figura 1. Mecanismo de captación de nutrientes mediante la liberación de exudados en la rizosfera. (Dakora & Phillips, 2002). Mecanismo mediante el cual las plantas captan los nutrientes como ácidos orgánicos (OA), aminoácidos (AA) y compuestos fenólicos (Phe), liberados por los microorganismos, a su vez la planta libera exudados a la rizosfera que son aprovechados por los microorganismos

2.2.- Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Los rizodepositos al ser ricos en carbono se convierten en la principal fuente de alimento de diversos microorganismos (Fig. 2), como lo pueden ser microorganismos patógenos (nematodos, oomicetos, bacterias y hongos), que tienen una relación parasítica, microorganismos neutros en donde ninguna de las partes se ve afectada; o bien microorganismos benéficos para la planta (Endo-, ectomicorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal) que tienen una relación mutualista con la planta (Singh *et al.*, 2004, Raaijmakers *et al.*, 2007).

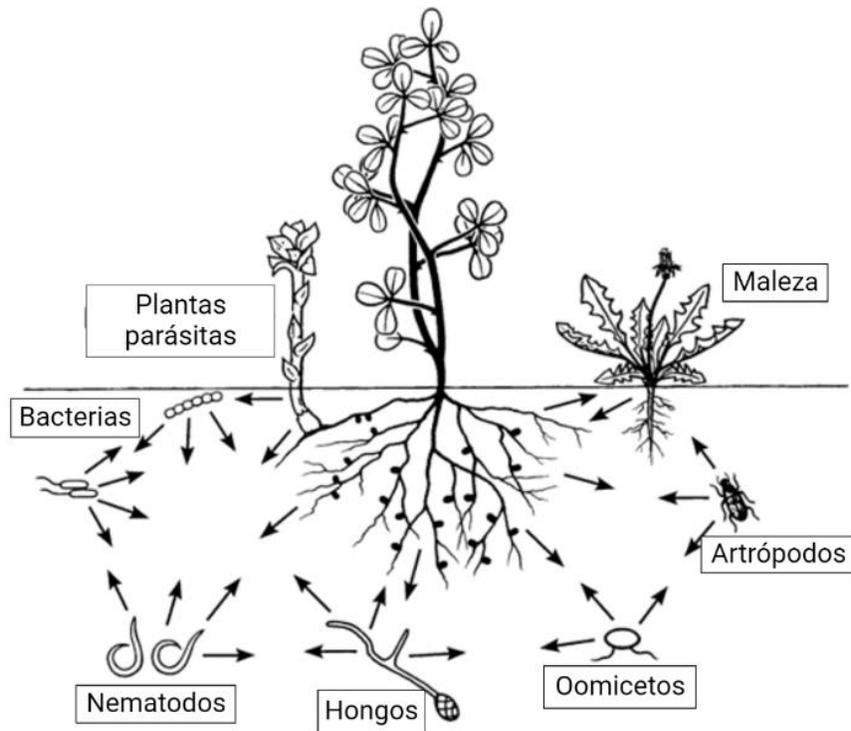


Figura 2. Interacciones de las plantas con diversos factores bióticos. (Hirsch *et al.*, 2003)
Representación de las interacciones que se dan de forma natural en la rizosfera entre las plantas y otros microorganismos.

Dentro del grupo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal se encuentra un grupo más específico de bacterias denominadas PGPR por sus siglas en inglés (plant growth promoting rhizobacteria), las PGPR son un grupo de bacterias de vida libre que se encuentran en la rizosfera (Vallejo *et al.*, 2017, Hassan, 2019). Diversos géneros de bacterias son considerados PGPR, como *Bacillus*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Dorjey *et al.*, 2017; Vallejo-Ochoa *et al.*, 2017; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; Gurikar *et al.*, 2016; García-Cárdenas *et al.*, 2022). Los PGPR pueden mejorar el crecimiento y el correcto desarrollo de las plantas por diferentes mecanismos estrechamente ligados, incluyendo la fitoestimulación, la biofertilización, el antagonismo de patógenos o por inducción de respuestas de defensa.

2.3- Fitoestimulación

La fitoestimulación se logra cuando las PGPR producen una serie de reguladores del crecimiento vegetal como lo son auxinas y citocininas, las cuales a su vez promueven el crecimiento de las plantas y modifican la arquitectura de la raíz (Bal *et al.*, 2013). Las auxinas son un tipo de fitohormonas que se producen por la misma planta o pueden ser captadas del entorno. Diferentes estímulos ambientales como la disponibilidad de nutrientes o agua activan la producción de auxinas endógenas que promueven el crecimiento de la raíz, inducen la producción y el crecimiento de raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002, Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Las citoquininas son otro tipo de fitohormonas derivados de las purinas que promueven y mantienen la división celular de las plantas en cultivos y también intervienen en varios procesos de diferenciación, como la formación de brotes, el crecimiento de raíces primarias y la formación de callos (Howell *et al.*, 2003). Las plantas utilizan continuamente las citocininas para mantener las reservas de células madre totipotentes en sus meristemas de brotes y raíces (Ortiz- Castro *et al.*, 2009).

2.4.- Biofertilización

La inducción del desarrollo vegetal por biofertilización se debe a la capacidad de las PGPR de alterar la biodisponibilidad de nutrientes. En el suelo existen una gran diversidad de macro y micronutrientes que son necesarios para un correcto desarrollo de las plantas. Sin embargo, muchos de estos no pueden ser asimilados por diversas razones. (Baetz *et al.*, 2014).

El nitrógeno, además de ser el nutriente más limitante, también es fundamental para el desarrollo de las plantas, debido a que su deficiencia es una de las principales causas de pérdidas en los cultivos. El nitrógeno inorgánico está constituido por las formas solubles como nitrito (NO_2), nitrato (NO_3) y amonio (NH_4^+) (Rutherford *et al.*, 2007). La principal entrada de nitrógeno a los ecosistemas es el N_2 que se encuentra en gran proporción en la atmósfera, ocupando un 79%. Sin embargo, la mayoría de las plantas superiores son incapaces de romper el triple enlace de esta molécula (Celaya-Michel & Castellanos, 2011). Algunas PGPR mediante la acción de enzimas

nitrogenasas son capaces de transformar el nitrógeno N_2 atmosférico en NH_4^+ , aportando del 12-70% del contenido total de nitrógeno en las plantas (Kuan *et al.*, 2016), mientras que las bacterias rizobias (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) tienen como característica principal la fijación de N_2 en leguminosas (Vessey, 2003).

El fósforo es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es un nutriente, que, si bien se encuentra en grandes concentraciones, la mayor cantidad de éste se encuentra en forma no asimilable para las plantas, debido a que forma minerales de calcio o aluminio (Rodríguez & Fraga, 1999; Goldstein *et al.*, 1999). El fósforo puede estar presente en el suelo en formas orgánicas, como producto de la descomposición de materia vegetal, detritus o excreta animal, o bien, en forma inorgánica, al formar precipitados poco solubles como son los fosfatos de calcio y de aluminio en suelos alcalinos y ácidos, respectivamente (Ruiz-Herrera *et al.*, 2015). Las bacterias solubilizadoras de fosfato transforman los minerales de fósforo en fosfato, la forma químicamente asimilable y componente crítico de diversas biomoléculas como el trifosfato de adenosina, los fosfolípidos, los ácidos nucleicos, así como en reacciones de fosforilación de proteínas importante para la transducción de señales en las células (Sashidhar & Podile, 2010).

El hierro es otro nutriente esencial para las plantas, es insoluble en suelos neutros y alcalinos, por lo que no está disponible para las plantas. El hierro se considera un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, debido a que controla procesos vitales como la respiración, la fijación del nitrógeno, la fotosíntesis, la síntesis y reparación de nucleótidos, la homeostasis de los metales, la regulación hormonal y la producción de clorofila, debido a su naturaleza redox-activa en circunstancias biológicas (Kroh *et al.*, 2020; Molnár, *et al.*, 2023). El hierro en la rizosfera se encuentra principalmente en su forma de Fe^{3+} , el cual en condiciones de alcalinidad se precipita en forma de óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos que son muy poco solubles. Por otro lado, en menores cantidades, el hierro se encuentra en estado de oxidación Fe^{2+} en forma de silicatos ferromagnesianos, lo cuales son solubles y

pueden ser asimilados por las plantas (Robin *et al.*, 2008). Las PGPR tienen la capacidad de producir sideróforos que toman el abundante y poco soluble Fe^{3+} del suelo, lo reducen a Fe^{2+} que es soluble y puede ser asimilado por las plantas (Valencia-Cantero *et al.*, 2007).

2.5.- Respuesta de defensa

La respuesta sistémica inducida es un estado de mayor capacidad defensiva de una planta bajo un estímulo adecuado (Van Loon, 1998). Cuando la planta detecta que hay un posible agente patógeno activa sus defensas. Las PGPR al ser bacterias no patógenas no desarrollan un daño en la planta, únicamente mantiene las defensas de la planta activas, lo que desencadena una respuesta más eficiente al encontrarse con un patógeno real y aminorar el daño (Annapurna *et al.*, 2013).

2.6- Antagonismo

Las PGPR que tienen mecanismos antagónicos contra fitopatógenos reducen la incidencia y la severidad de decesos en plantas (Beattie, 2006). Sus mecanismos antagónicos se basan en la síntesis de enzimas hidrolíticas, como quitinasas, proteasas y lipasas, que pueden lisar células fúngicas patógenas (Neeraja *et al.*, 2010; Maksimov *et al.*, 2011), por la competencia de nutrientes y colonización adecuada de nichos en la superficie de la raíz (Stephens *et al.*, 1993), la producción de sideróforos y antibióticos que afectan directa o indirectamente a los fitopatógenos, y mediante la producción de sideróforos que son moléculas capaces de quelar el hierro del medio circundante y de esta manera dejar a otros microorganismos fuera del nicho (Beneduzi, 2012). Además, se ha descrito que las PGPR son capaces de producir compuestos que atacan directamente contra fitopatógenos que son principalmente: fenazinas, pioluteorina, phloroglucinol, lipopéptidos, pirrolnitrina y ácido cianhídrico (HCN) (Haas & Défago, 2005).

3.- *Pseudomonas*

Este es un género de bacterias gramnegativas y están distribuidas por todo el mundo. Principalmente, el grupo descrito como *Pseudomonas* fluorescentes, representado las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas aeruginosa*, producen un gran espectro de moléculas antibióticas, presentan motilidad con un flagelo polar y la capacidad de producir un pigmento amarillo soluble en agua (Sutra *et al.*, 1997; Dorjey *et al.*, 2017). Si bien de manera general se consideran a las bacterias del género *Pseudomonas* como PGPR, existen excepciones como algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* o *Pseudomonas syringae*, que se han estudiado ampliamente por sus efectos fitopatógenos. Por otro lado, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas chlororaphis* son estudiadas por sus capacidades de mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Su contribución como promotora de crecimiento de vegetal se ha establecido por los diferentes mecanismos que activa, incluyendo la reducción de la incidencia de enfermedades de las plantas (Haas & Défago, 2005).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de producir factores de virulencia que son aquellos mecanismos que trabajan individualmente o en conjunto y le permiten a una bacteria producir invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellas (De La Calle *et al.*, 2012). Como factores de virulencia se consideran los siguientes: Factores de virulencia estructurales y factores de virulencia excretados por la bacteria.

3.1.- Factores de virulencia estructurales celulares

3.1.1- Lipopolisacáridos

Son moléculas incrustadas en la membrana, conformadas por una porción glicolípídica, denominada lípido A, un oligosacárido central y un polisacárido de cadena O, el cual está por fuera de la membrana e interactúa con el medio ambiente

(Bystrova *et al.*, 2004). En el grupo de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento vegetal, los lipopolisacáridos desempeñan un papel importante en la inducción de la resistencia sistémica en las plantas (Zdorovenko *et al.*, 2015). Pero la amplitud de su estudio se restringe a las especies patógenas antes mencionadas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas syringae*, donde su función principal se ha descrito como responsable de la adhesión y colonización a la célula huésped (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

3.1.2.- Flagelo

En *Pseudomonas chlororaphis* como el resto de las bacterias gramnegativas, su flagelo está conformado por una membrana, un gancho y el filamento de flagelina (Chevance *et al.*, 2008). El gancho es una estructura flexible que conecta a la membrana con la estructura rígida de flagelina, esto permite al flagelo rotar y propulsar a la bacteria dando como resultado la motilidad tipo “Swimming”. Su principal función es la respuesta a señales quimiotácticas y junto a los pilis colonizar zonas con un gradiente químico mayor (Bouteiller *et al.*, 2021; Sampedro, 2014).

3.1.3.- Pilis

El pili es una estructura en forma de pelo asociada a la adhesión bacteriana y relacionada con la colonización y la infección bacterianas. Los pilis se componen principalmente de proteínas pilinas oligoméricas, que se disponen helicoidalmente para formar un cilindro. La arquitectura de los pilis varía desde fibras delgadas y retorcidas en forma de hilo hasta varillas gruesas y rígidas con pequeños orificios axiales (Xuedong and Yuqing 2015; Dhakal *et al.*, 2015).

3.1.4.- Alginato

El alginato es un tipo de exopolisacárido formado por los monómeros ácidos L-glucurónico y D-manurónico unido por un enlace β -1,4 (Evans & Linker 1973). El alginato además de ser un factor de virulencia crítico para *Pseudomonas*. Es un

polímero viscoso que tiene actividad antifagocítica, debido a que rodea a la bacteria, bloqueando los receptores de las células fagocíticas y obstruyendo la opsonización (Rehman & Rehm 2013). El alginato tiene función adhesiva, reduce la efectividad de los antibióticos y si bien no es indispensable para la formación de la biopelícula, su ausencia modifica la estructura de ésta (Wozniak *et al.*, 2003).

3.1.5.- Exopolisacáridos de tipo psl

La función principal de este polisacárido es la formación de la biopelícula en conjunto con el alginato. Los exopolisacáridos de tipo psl se fabrican a partir de un conjunto de precursores de nucleótidos que incluyen GDP-D-manosa, UDP-D-glucosa y dTDP-L-ramnosa (Byrd *et al.*, 2009). Si bien el estudio de los exopolisacáridos como factores de virulencia se limita a las especies patógenas, principalmente a *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao *et al.*, 2013), investigaciones recientes describen el grupo de genes necesarios para la biosíntesis de exopolisacáridos de tipo psl en *Pseudomonas chlororaphis* (Heredia-Ponce *et al.*, 2020).

3.1.6.- Formación de biopelícula.

Las biopelículas constituyen el entorno normal de las colonias bacterianas que además de agua y células microbianas que constituyen el 97% de la biopelícula, la matriz de la biopelícula es un complejo de polímeros secretados, nutrientes y metabolitos, productos de la lisis celular e incluso partículas y detritus del entorno inmediato (Christensen, 1989; Sutherland, 2001). Los polisacáridos agregativos psl y pel, celulosa y alginato determinan la estructura y condiciones inmediatas de la biopelícula en las bacterias del género *Pseudomonas*. Esto puede afectar a la porosidad, la densidad, el contenido de agua, la hidrofobicidad y la estabilidad mecánica (Flemming & Wingender, 2002; Ethan *et al.*, 2012). El estudio de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* es usado como paradigma para el resto de las especies de *Pseudomonas*. Una vez que la bacteria se ha adherido irremediabilmente a una superficie (inerte, tejido o célula) comienza el proceso de

maduración de la biopelícula (Dunne, 2002). Cuando la biopelícula ha madurado, se ven afectadas diferentes características de las bacterias como las tasas de crecimiento, el patrón de genes expresados y el aumento de la resistencia a agentes desinfectantes y antibióticos (Rollet *et al.*, 2008).

3.2.- Factores de virulencia excretados por la bacteria

3.2.1.- Ramnolípidos

Estos compuestos fueron descubiertos por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* y están conformados por una o dos moléculas de ramnosa ligados a uno o dos β -hidroxi ácidos grasos (Lang & Wullbrandt, 1999). Los ramnolípidos modifican la producción y la estructura de la biopelícula, además de permitir y facilitar la movilidad de tipo “swarming” (Davey *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007).

En una investigación realizada hace dos décadas, Gunther (2005), describe por primera vez la producción de mono-ramnolípidos en *Pseudomonas chlororaphis*. Posteriormente, se encontró un gen heterólogo de *Pseudomonas aeruginosa* en algunas cepas de *Pseudomonas chlororaphis* (*rhIC*) por lo que se descubrió que también es capaz de producir, aunque en bajas cantidades di-ramnolípidos (Solaiman *et al.*, 2015).

3.2.2.- Pioverdina y pioquelina

La pioverdina es el sideróforo principal de las bacterias del género *Pseudomonas*, y tienen una alta afinidad por el hierro (Meyer *et al.*, 1996). La pioverdina de *Pseudomonas* es un sideróforo conformado por una cadena peptídica y un cromóforo. Los sideróforos son moléculas especializadas en la captación de hierro, un nutriente esencial para el crecimiento bacteriano (Schalk, 2008).

La pioquelina es un sideróforo fenólico que contiene dos anillos heterocíclicos (Ankenbauer, *et al.*, 1986). El mecanismo de captación es similar que, para la pioverdina. El mecanismo por el cual los sideróforos se consideran un factor de

virulencia es porque aportan estabilidad a la estructura de la biopelícula contribuyendo a la protección y virulencia; por otro lado, toman el hierro del medio circundante dejando a las células del huésped desprovistas de este nutriente (Kyle *et al.*, 2014; Díaz-Pérez *et al.*, 2022).

3.2.3.- HCN

El ácido cianhídrico (HCN) es descrito como un factor de virulencia que actúa como un inhibidor directo de la cadena respiratoria, al interferir con la citocromo c oxidasa y otras reacciones enzimáticas metálicas, lo que conduce a una inhibición letal de las cadenas de transferencia de electrones que producen energía (Goldfarb and Margraf., 1967; Blier *et al.*, 2012). El cianuro es una sustancia altamente tóxica que puede causar daños en los tejidos neuronales de mamíferos, y se acumula en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en quemaduras y pacientes con fibrosis quística (Ryall *et al.*, 2008; Chowdhury *et al.*, 2016).

Diversos estudios demuestran que *Pseudomonas chlororaphis* es capaz de producir el ácido cianhídrico y que además es uno de los responsables del comportamiento patógeno de *Pseudomonas chlororaphis* sobre *Caenorhabditis elegans* (Nandi, 2015; Jain & Pandey, 2016).

3.2.4.- Fenazinas

Las fenazinas comprenden un extenso grupo de moléculas heterocíclicas nitrogenadas. Se han descrito cerca de cien fenazinas de origen natural, producidas casi exclusivamente por eubacterias. Los principales efectos patógenos o competitivos se atribuyen a la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (EROs) (Mavrodi *et al.*, 2006; Pierson & Pierson, 2010).

Como se mencionó anteriormente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas chlororaphis* son los principales productores de fenazinas (Gross, & Loper, 2009). La fenazina más representativa es la piocianina (PYO), y fue descubierta en *Pseudomonas aeruginosa*, se ha descrito como un

factor de virulencia, pues tiene un potencial redox, durante la respiración, al reducir el oxígeno en el ion superóxido (Marrez & Haitham, 2020).

Las bacterias de la especie *Pseudomonas chlororaphis* son capaces de producir fenazinas como el ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), el ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico (2OH-PCA), la 2-hidroxifenazina (2-OHPHZ) (Pierson & Thomashow, 1992) y la fenazina-1-carboxamida (PCN) (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998).

3.3.- Sistema de quorum sensing

La gran mayoría de los factores de virulencia mencionados anteriormente están regulados por el sistema jerárquico de quorum sensing (QS). El sistema de QS fue descrito por primera vez en *Vibrio fischeri*, una bacteria capaz de producir bioluminiscencia cuando la densidad bacteriana es elevada (Nealson & Hastings, 1979; Gonzalez & Keshavan, 2006). La bioluminiscencia es regulada por el sistema LuxI-LuxR, el cual pertenece a la red de señalización de QS. LuxI sintetiza la señal que es una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos, 3-oxo-hexanoil-HSL. A medida que las AHL se acumulan, llevan a la unión y activación de su regulador específico LuxR (Fuqua, C *et al.*, 2001 Losick, R., & Kaiser, D. 1997). El LuxR activado, actúa como factor de transcripción que se une al ADN, reclutar a la ARN polimerasa y así aumentan la expresión de genes relacionados con la bioluminiscencia (Gonzalez & Keshavan, 2006).

P. aeruginosa tiene cuatro sistemas de QS de tipo LuxI-LuxR (Las, Rhl, Pqs e Iqs). LasR y RhIR son los circuitos reguladores más dominantes. En el sistema Las, LasI es la sintasa autoinductora que media en la síntesis de N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (OdDHL) (Kahlon, 2016; Kariminik *et al.*, 2017). LasI se une al activador transcripcional LasR, creando un complejo que regula específicamente la transcripción de genes de virulencia involucrados en daño de la célula huésped. (Lee y Zhang, 2015; Kahlon, 2016).

Por otro lado, el sistema Rhl sintetiza el autoinductor N-butilil-L-homoserina lactona (C4-HSL, BHL), que forma un complejo con la proteína activadora RhIR (Kariminik

et al., 2017; Kostylev *et al.*, 2019). Este circuito regula la producción de ramnolípidos, la producción de lectinas, PYO, HCN, pioverdina y pioquelina (Kahlon, 2016; Kariminik *et al.*, 2017; Thi *et al.*, 2020).

En el sistema Pqs, el autoinductor es la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) es sintetizado junto a sus precursores por enzimas codificadas por el grupo de genes pqsABCDE y son reconocidos por la proteína reguladora PqsR (Ahator y Zhang, 2014; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Al unirse PqsR con el promotor de pqsABCDE, da como resultado la expresión de la proteína PqsE y a la vez retroalimenta para inducir la expresión del gen rhIRI (McKnight *et al.*, 2000).

En el sistema Iqs el autoinductor es el 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS) sintetizado por el grupo de genes ambBCDE (Kahlon, 2016). Este sistema, al igual que los otros, está bajo el control del sistema Las. Se ha reportado que IQS bajo diversas condiciones asume parcialmente las funciones del sistema Las y, por lo tanto, controla el sistema Rhl y PQS (Lee *et al.*, 2013).

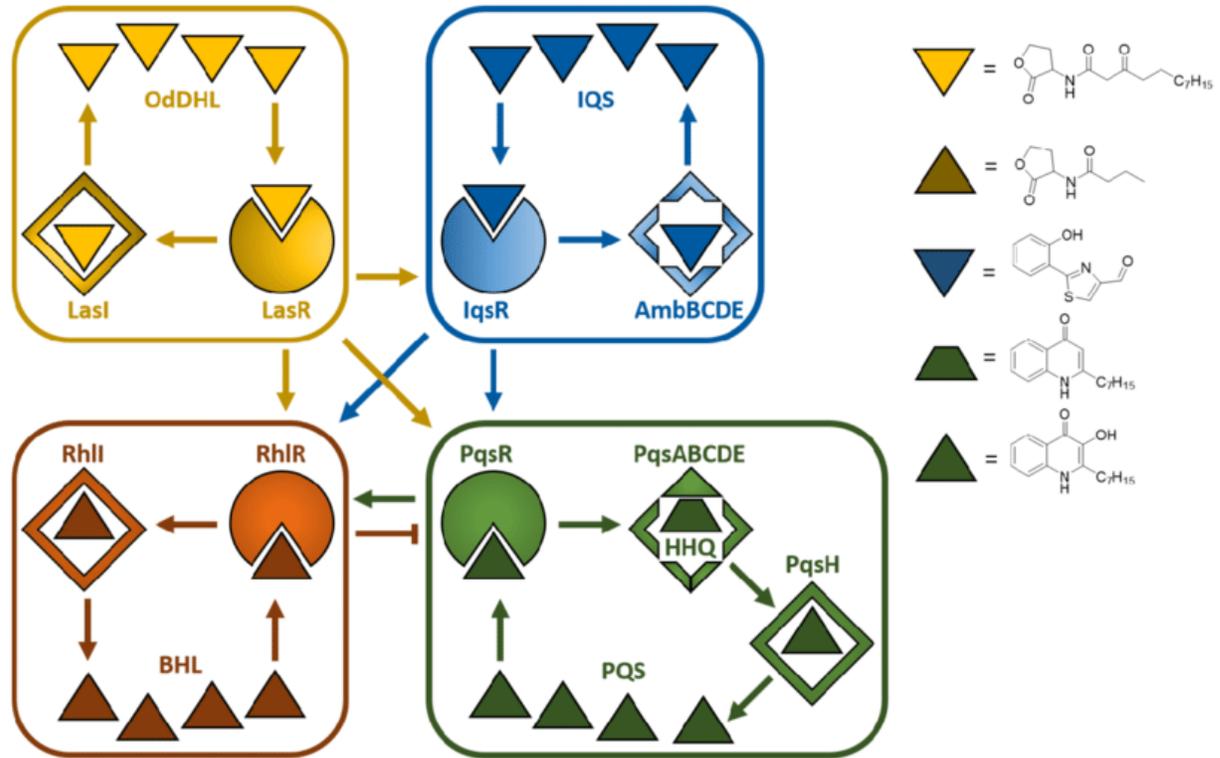


Figura 3. Los cuatro sistemas de detección de quórum en *P. aeruginosa*. (Schütz & Emling, 2018). Diagrama de los cuatro sistemas de quorum sensing descritos en *Pseudomonas aeruginosa*, las, iqs, rhl y pqs y sus moléculas inductoras, OdDHL, N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona; IQS, señal integradora de detección de quórum; BHL, N-butiril-L-homoserina lactona; PQS, señal de quinolona de *Pseudomonas*.

Ortiz-castro *et al.*, (2011) estudiaron los efectos fitopatogénicos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre *Arabidopsis thaliana*. En este reporte se describe que *Pseudomonas aeruginosa* provocaba una reducción importante en el crecimiento de la raíz primaria y la producción de biomasa en el follaje, además de que la planta mostraba signos importantes de enfermedad. Interesantemente, mutaciones en los genes inductores de QS; LasI y RhlI, mostraban un deterioro mucho menor en la planta, incluso aumentando de manera importante la producción de biomasa en el follaje y mejorando la salud de la planta en comparación de la cepa silvestre. Esto indica que los efectos patogénicos eran una consecuencia de la activación de los sistemas de QS y la producción de factores de virulencia regulados por estos. Posteriormente, se demostró que la fenazina PYO es un factor de virulencia importante para *Pseudomonas aeruginosa* y la ausencia de esta disminuía de igual forma la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Ortiz-castro *et al.*, 2014).

Más tarde, González *et al.*, (2017) analizaron distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales presentan mutaciones en genes relacionados con la producción de los sideróforos pioquelina y pioverdina en *Arabidopsis thaliana*. Se descubrió que la reducción en estos sideróforos disminuye los efectos fitopatógenos y, por el contrario, se estimuló la producción de raíces laterales.

Recientemente Díaz-Pérez *et al.*, (2022) en su estudio sobre la influencia de los sideróforos sobre la formación de biopelícula, analizó distintas cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, incluyendo mutaciones en los sistemas de QS LasI y RhII y de los genes relacionados en la producción de biopelícula. Ellos encontraron que el porcentaje de mortalidad sobre el nematodo *C. elegans* se ve importantemente disminuido en estas mutantes, demostrando así que la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* sobre *C. elegans* era dependiente de la producción de estos factores de virulencia.

3.4.- El estatus nutricional y su relación con la producción de factores de virulencia en *Pseudomonas*

Las mutaciones en los genes inductores del QS no son el único factor que puede disminuir la producción de los factores de virulencia encargados de la patogenicidad en las bacterias del género *Pseudomonas*. También se ha descrito que el estatus nutricional cambia la producción de factores de virulencia; Van rijn *et al.*, (2004) mostró que la concentración de nutrientes y micronutrientes como el hierro, magnesio, potasio, sodio y fosfatos en el medio de crecimiento en *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, modificaban la producción de la fenazina-1-carboxamida.

Chen *et al.*, (2020) probaron los efectos de la glucosa sobre diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. En este estudio se encontró que con alta concentración de glucosa se reduce la producción de PYO, elastasa, la formación de biopelícula y la motilidad de las bacterias. Esto indica que la cantidad de fuente de carbono en el medio influye directamente sobre la virulencia de *Pseudomonas*.

3.5.- Otras *Pseudomonas* patógenas

Pseudomonas aeruginosa y *Pseudomonas syringae* son las especies más reconocidas por su capacidad patogénica, mientras que especies como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas chlororaphis* son conocidas por su capacidad de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que estas afirmaciones pueden ser no del todo correctas. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se consideraba como un fitopatógeno estricto, sin embargo, Ortiz-Castro *et al.*, (2011) demuestra que la patogenicidad de esta es dependiente del metabolismo y no siempre tiene ese comportamiento patogénico.

En el caso de *Pseudomonas putida*, considerada anteriormente como una especie no patogénica, en 1987 Anaissie *et al.*, descubrieron que puede tener efectos patogénicos en humanos, causando septicemia pura o polimicrobiana y además existiendo casos de neumonía donde se sospecha como el agente etiológico a *Pseudomonas putida*.

Años atrás *Pseudomonas fluorescens* era descrita como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal estricta, pero se sospechaba de efectos patogénicos en animales de sangre fría y causar infecciones letales en hígados de aves (Anaissie *et al.*, 1987; Picot, 2001). Sin embargo, actualmente se conoce que puede causar infecciones en boca, estómago y pulmones en humanos. Si bien su virulencia no es tan alta, se conocen al menos un caso de infección hepática letal en humanos y dos casos graves de bacteriemia producida por *Pseudomonas fluorescens*. Sus mecanismos de patogenicidad aún no han sido esclarecidos por ello se desconocen más casos, sin embargo, se sospecha que es causante de muchos problemas más de salud en humanos (Scales, 2014; Biaggini, *et al.*, 2015).

Por otro lado, para *Pseudomonas chlororaphis* aún no se ha reportado ningún caso de infección en humanos. Sin embargo, una investigación reciente demuestra que *Pseudomonas chlororaphis* puede tener un efecto fitopatógeno en *Arabidopsis thaliana* (López-Hernandez *et al.*, 2022).

3.6.- *Pseudomonas chlororaphis*

Si bien *Pseudomonas chlororaphis* es una de las bacterias más estudiadas por su capacidad para potenciar el crecimiento de las plantas mediante la producción de auxinas como el ácido indol acético (AIA) y las N-acil-homoserina lactonas, además de competir por el hierro con otras bacterias potencialmente patógenas por la producción de sideróforos, así como agente de control biológico por su producción de compuestos antibióticos (Ortiz-Castro *et al.*, 2009, Gross *et al.*, 2009; Dimkpa *et al.*, 2011), también puede producir moléculas con potencial fitotóxico así como diferentes factores de virulencia (Zhang *et al.*, 2020; Bouteiller *et al.*, 2021).

3.7.-Sistema de quorum sensing en *Pseudomonas chlororaphis*

El estudio de los sistemas de QS en otras *Pseudomonas* es limitado, sin embargo, en *Pseudomonas chlororaphis* se han descrito dos sistemas tipo Lux llamados PhzI/PhzR y CsaI/CsaR (Pierson *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1997; Zhang & Pierson, 2001; Morohoshi *et al.*, 2013).

El sistema PhzI/PhzR se ha observado y descrito como su función principal para la regulación de la producción de fenazinas, mediante la activación del grupo de genes relacionados con la biosíntesis de estas (Wood *et al.*, 1997). El sistema de CsaI/CsaR es un sistema muy similar a al sistema RhII/RhIR de *Pseudomonas aeruginosa* y se relaciona a las propiedades de la célula bacteriana. Si bien los aspectos específicos en los que interviene aún son desconocidos, se ha observado que está relacionado con la colonización y supervivencia (Zhang & Pierson, 2001).

4.- Antecedentes

Pseudomonas chlororaphis es descrita como una bacteria no patógena, sin embargo, un estudio reciente muestra que puede tener un efecto fitopatógeno sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* (López-Hernández, *et al.*, 2022), esto presenta

una contrariedad pues *Pseudomonas chlororaphis* no se había reportado como un patógeno.

Efectos similares habían sido observados en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 considerada como un fitopatógeno estricto, posteriormente se observó que mutaciones en los genes inductores del QS en *Pseudomonas aeruginosa* revertía su comportamiento patogénico en *Arabidopsis thaliana* por uno promotor del crecimiento vegetal (Ortiz-Castro et al., 2011). Otro estudio reportó que *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de altas cantidades de glucosa sufría pérdida en la producción de elastasa y PYO dos de los factores de virulencia más importantes para *Pseudomonas aeruginosa* (Chen et al., 2020), en la misma *Pseudomonas chlororaphis* se reportó que la producción de PCN se veía modificada en distintas concentraciones de micro y macronutrientes en el medio de crecimiento (Van rij, et al., 2004). Esto nos indica que el efecto patogénico observado en *Pseudomonas chlororaphis* puede ser consecuencia de un cambio en el metabolismo de esta. A pesar de que *Pseudomonas chlororaphis* no se había reportado como una bacteria patógena, esta comparte un gran número de genes relacionados a la biosíntesis de factores de virulencia con *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo los encargados de la producción de ramnolípidos, fenazinas, HCN, exopolisacáridos, sideróforos, también cuenta con factores estructurales que le facilita la infección como los pilis, flagelo y la formación de la biopelícula que le dan el potencial para comportarse como un patógeno.(Zhang et al., 2020; Bouteiller et al., 2021; Heredia-Ponce et al., 2020; Solaiman et al., 2015; Liu et al., 2021; Nandi, 2015; Gross, & Loper, 2009).

5.-Justificación

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido descritas en su “mayoría” como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. En particular, *Pseudomonas chlororaphis* se ha descrito como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Sin embargo, un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo reportó un

comportamiento patogénico contra *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, en un estudio preliminar observamos que la condición patogénica/inductora depende de la cantidad de fuentes de carbono (azúcares) presentes en el medio de interacción. Por lo tanto, es de nuestro interés profundizar en los mecanismos que controlan el cambio del estatus patogénico a promotor del desarrollo vegetal en la interacción de *Pseudomonas chlororaphis* - *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de sacarosa.

6.-Hipótesis

La concentración de sacarosa en el medio de interacción determina la condición patogénica o promotora de crecimiento vegetal de *Pseudomonas chlororaphis* sobre *Arabidopsis thaliana*.

7.- Objetivos

7.1.- Objetivo general:

Evaluar el efecto de *Pseudomonas chlororaphis* en la interacción con *Arabidopsis thaliana* bajo distintas concentraciones de sacarosa en el medio.

7.2.- Objetivos particulares:

- 1) Evaluar el comportamiento de *Pseudomonas chlororaphis* sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* con diferentes concentraciones de sacarosa.
- 2) Evaluar la producción de factores de virulencia por *Pseudomonas chlororaphis* en diferentes concentraciones de sacarosa.
- 3) Analizar los efectos de la sacarosa sobre la expresión de genes relacionados con la producción de factores de virulencia por *Pseudomonas chlororaphis*.

8.-Materiales y métodos

8.1.-Crecimiento y desarrollo de las plantas

Para los experimentos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre Col-0 y las líneas transgénicas: *DR5::GUS*, *PR-1::GUS*, *LOX2::GUS* (Ulmasov, *et al.*, 1997). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se desinfectaron superficialmente con etanol al 96% (v/v) durante 5 minutos, seguido de cloro al 20% (v/v) durante 7 minutos y cinco enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas se almacenaron a 4 °C durante 48 h con la finalidad de sincronizar la germinación. Tiempo transcurrido, las semillas se colocaron sobre la superficie de un medio de agar 0.2X Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) en placas Petri, colocadas en una cámara de crecimiento a 21 °C, con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. Siete días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a un medio fresco de agar MS 0.2X suplementado con 0.6%, 1.2% 1.8% y 2.4% de sacarosa, en presencia o ausencia de una estría realizada con un asa bacteriológica nicromo calibrada a 1 µL de *Pseudomonas chlororaphis*, la cual fue crecida a partir de un precultivo incubado 24 horas antes a temperatura ambiente en medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani (LB). En la presencia de la bacteria, la raíz primaria se colocó sobre el estriado y se analizó la biomasa y la arquitectura de la raíz 7 días después de la transferencia en ambas condiciones. Las mediciones de la longitud de la raíz primaria se realizaron con una regla, mientras que el número de raíces laterales se contó con un estereomicroscopio Leica L2. El peso fresco se determinó usando una balanza analítica.

8.2.-Cepa bacteriana

La cepa de *Pseudomonas chlororaphis* utilizada en este estudio fue proporcionada por el laboratorio de “Microbiología Ambiental” del INECOL, las bacterias fueron aisladas de un Bosque de Pino/Encino cercano a la comunidad de Ajuno, Michoacán. La cepa fue llamada *Pseudomonas chlororaphis* 3T4-12 y caracterizada mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARN

ribosomal 16s, presentando un 95% de homología con la cepa *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* NBRC 3521.

8.3.-Determinación histoquímica de la actividad GUS

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* que expresaban el promotor sintético DR5::GUS, PR-1::GUS, LOX2::GUS que responden a las rutas hormonales de auxinas, del ácido salicílico y del ácido jasmónico respectivamente, para estudiar la respuesta en las interacciones directas raíz-bacteria. Las plántulas transgénicas se sumergieron en una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (X-Gluc) en buffer de fosfato sódico 100 mM, pH 7, suplementado con 2 mM $K_4 Fe(CN)_6$ y 2 mM $K_3 Fe(CN)_6$ a 37 °C y se incubaron durante la noche. El aclaramiento de los tejidos se realizó colocando las plántulas en 2 ml de solución con metanol al 20% (v/v) y HCl 0.24 N, incubando a 60 °C durante 45 min; después de retirar cuidadosamente la solución utilizando una punta de micropipeta de 1 ml, se añadió NaOH al 7% para cubrir las plántulas y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se desechó la solución y las plántulas se lavaron con etanol al 40%, 20% y 10% (v/v) durante 30 min cada una y, finalmente, se almacenaron con glicerol al 50% (v/v) a 4 °C (Malamy & Benfey, 1997). Se tomaron imágenes representativas utilizando el estereomicroscopio Leica L2.

8.4.-Determinación de los factores de virulencia

A partir de un cultivo en líquido de *Pseudomonas chlororaphis*, se añadieron 30 μ L a medio LB fresco, donde se igualaron las concentraciones de sacarosa utilizados en los experimentos anteriores, se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 13500 rpm en una centrifuga Thermo scientific ST 16R con un rotor Thermo scientific FiberLite F15-6x100y , para obtener el sobrenadante libre de células.

8.4.1.-Pioverdina

Se añadieron sobrenadantes libres de células (100 μ L) de *Pseudomonas*

chlororaphis con 900 µL de una solución de piridina/ácido acético (piridina 50 mM, ácido acético 50 mM, pH 5.0) y se mezclaron. La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 380 nm, y la cuantificación se realizó utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) de la piridina 16.500 M⁻¹ cm⁻¹ (Hoegy *et al.*, 2014).

8.4.2.-Ramnolípidos

Se utilizaron sobrenadantes libres de células obtenidos de cultivos de *Pseudomonas chlororaphis* cultivadas a 37 °C durante 48 h se utilizaron para cuantificar ramnolípidos utilizando el método orinal-ramnosa basado en una curva estándar de ramnosa que mide la absorbancia a 421 nm en un espectrofotómetro (Wang Q *et al.*, 2007).

8.4.3.-Fenazinas

La concentración de fenazinas se estimó utilizando un método colorimétrico que mide los compuestos oxidados por piocianina. Un mililitro del sobrenadante libre de células se mezcló con 1 mL de cloroformo, y la fracción orgánica se recogió y se mezcló con 1 mL de HCl 0.2 N. A la fracción orgánica se le midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (González *et al.*, 2017).

8.5.- RT-qPCR

El ARN total de los cultivos de cepas de *Pseudomonas chlororaphis* se obtuvo tras 7 días de crecimiento en interacción con *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó para obtener ADNc mediante transcriptasa inversa Superscript II utilizando hexámeros aleatorios inversos (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µL para 1 µg de material de ARN, según las instrucciones del fabricante. La reacción resultante se diluyó a 40 µL, y se añadieron 2 µL a una mezcla de reacción qPCR SYBRGreen que contiene 5 µL de mezcla maestra de PCR, 0.5 µL de oligos directo y reverso para los genes a evaluar: *rpoS* (5'-3': CTATGTCAATCGCGGACTGT 3'-5' AGGTAGACGTTGAGCTCCTT), *phzH* (5'-3' CGAGGTGTACAACCACGATG 3'-5'

GATGGACTTGATCTCCGAGC), *rhIA* (5'-3' GAGGTCAATCACCTGGTCTC 3'-5' TGATGGTTGCTGGCTTTCAG), *psIA* (5'-3' ATATCTTCAGCAACCGCCTG 3'-5' GTGGTTGCGTACCAGGTATT) y agua estéril desionizada hasta un volumen final de 10 µL. La reacción qPCR se realizó en un termociclador ABI StepOne (Applied Biosystems) con el programa de ciclos térmicos 95 °C durante 2 min, 40 ciclos de 95 °C durante 5 s y 60 °C durante 30 s. El producto se examinó rutinariamente utilizando una curva de disociación como sugiere Applied Biosystems, y la cantidad de transcripción se comparó con el método de Ct relativo con el gen *rpoS* como control interno de referencia. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para analizar los datos experimentales de los genes *phzH*, *psIA*, *rhIA*.

8.6.-Suplementación química con una fenazina exógena

Para complementar la menor producción de fenazina en la concentración más alta de sacarosa, se añadieron 4 µg/ml de piocianina a placas de medio de agar 0.2 X MS con tratamientos contrastantes de sacarosa 0.6 % y 2.4 %.

8.7.-Análisis estadístico

Los datos globales de todos los experimentos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPadSoftware Inc.). Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) con pruebas post hoc de Tukey para determinar las diferencias estadísticas de los tratamientos.

9.-Resultados

9.1- La sacarosa modifica el comportamiento patogénico de *Pseudomonas chlororaphis* ante *Arabidopsis thaliana*

Para evaluar el efecto de *Pseudomonas chlororaphis* sobre *Arabidopsis thaliana*, se germinaron semillas de *Arabidopsis thaliana* en medio Murashige-shoog (MS) 0.2X, 7 días posteriores a la siembra se transfirieron a placas frescas de agar MS 0.2X suplementadas con 0.6% 1.2%, 1.8% y 2.4% de sacarosa estriadas previamente con *Pseudomonas chlororaphis* y en la ausencia de esta, para finalmente ser incubadas durante siete días adicionales (Fig. 4 a-b). Nuestros resultados muestran que las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* en comparación con las no inoculadas bajo condiciones de 0.6% de sacarosa tienen síntomas de enfermedad, representado por los síntomas de clorosis o amarillamiento del follaje y en correlación peso fresco de la planta se reduce significativamente. Las plantas no inoculadas crecidas bajo las diferentes condiciones de 1.2%, 1.8% y 2.4% de sacarosa tienen una inducción en el crecimiento de la raíz primaria y en la formación de raíces laterales en comparación con las crecidas en 0.6% de sacarosa (Fig. 4 c y d). De manera sobresaliente las plantas en interacción con la bacteria en 1.8% y 2.4% de sacarosa, no mostraron síntomas de enfermedad, por el contrario, se observan follajes sanos con un peso fresco igual al de las plantas no inoculadas (Fig. 4 e).

Análisis detallados en el sistema radicular muestran que la inhibición del crecimiento está estrechamente relacionada con una mayor colonización de la raíz primaria. Bajo concentraciones de 0.6% y 1.2% de sacarosa existe una mayor formación de biopelícula y que se extiende por toda la raíz, por su parte en las concentraciones de 1.8% y 2.4% de sacarosa la biopelícula disminuye y está contenida en el margen de la punta de la raíz (Fig. 5 a y b). Adicionalmente en las concentraciones de 1.8% y 2.4% de sacarosa se observan cambios significativos en la formación de raíces laterales (Fig. 5 c y d)

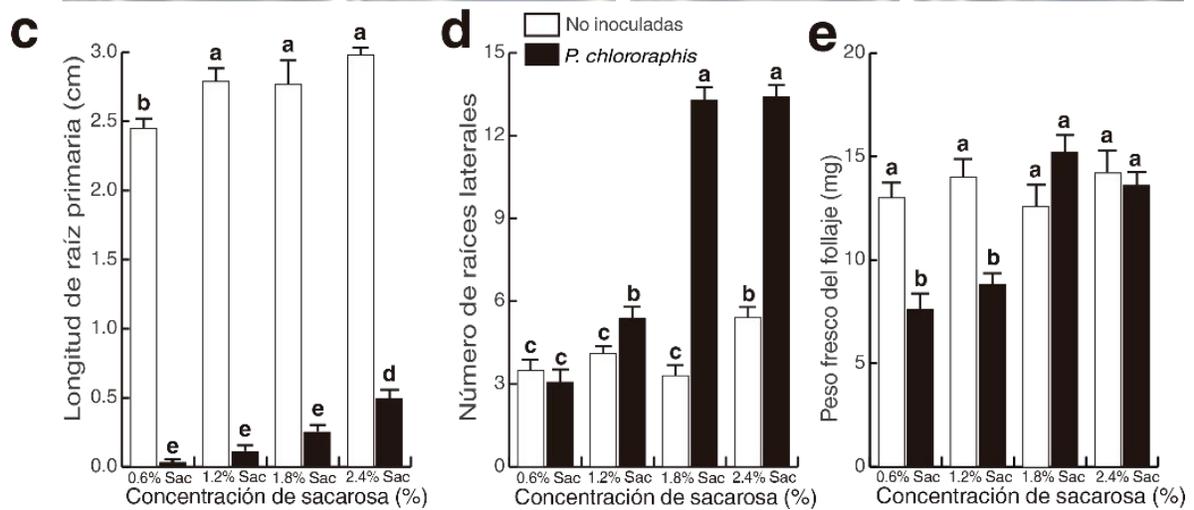
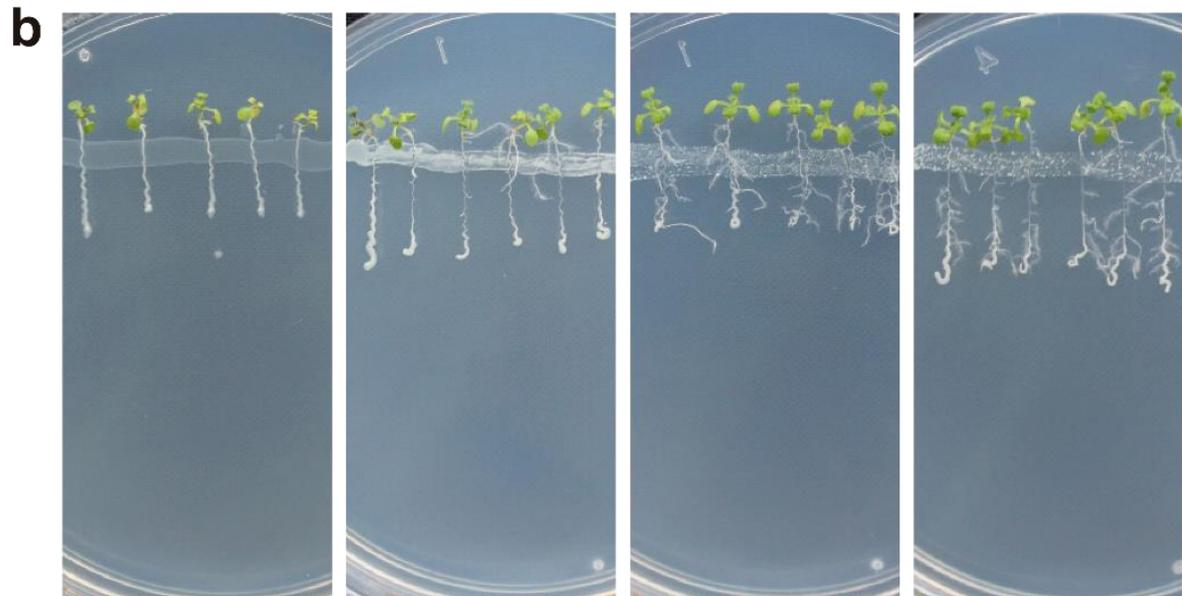
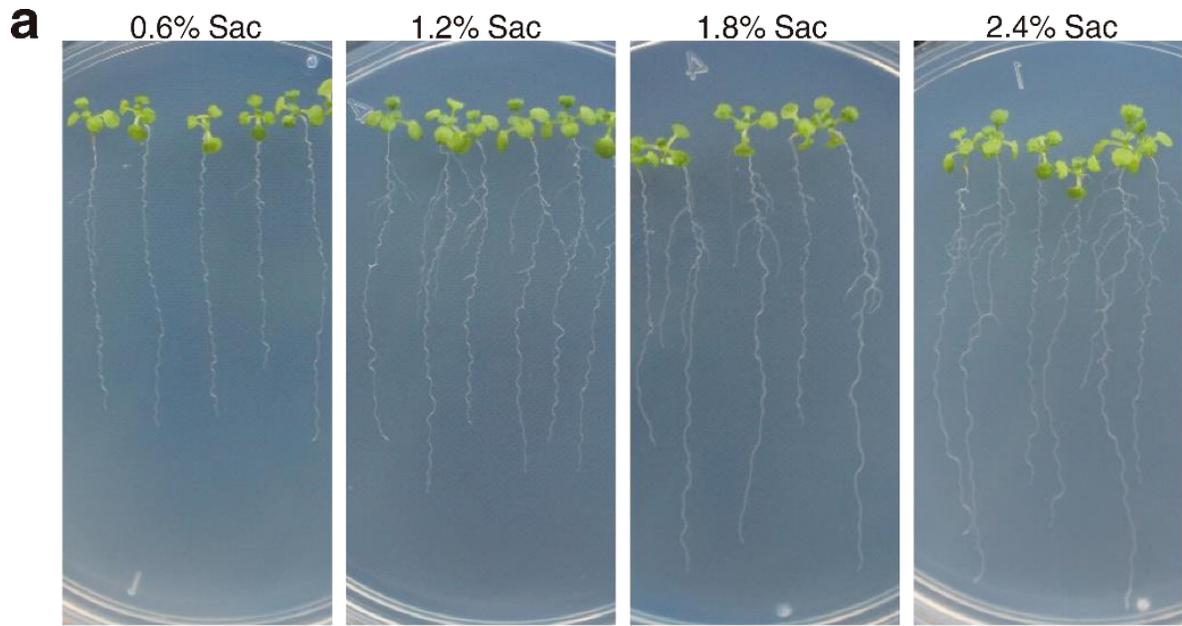


Figura 4. *Arabidopsis thaliana* en interacción con *Pseudomonas chlororaphis* en respuesta a diferentes concentraciones de sacarosa. Imágenes del desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* en cajas Petri sin inocular (a) e inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* (b). Gráficas de la longitud de la raíz primaria (c), el número de raíces laterales (d) y peso fresco del follaje (e). Las barras representan la media \pm EE de 18 plántulas en 3 experimentos diferentes de los tratamientos indicados, letras diferentes indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido de un análisis post hoc de Tukey ($P < 0,05$).

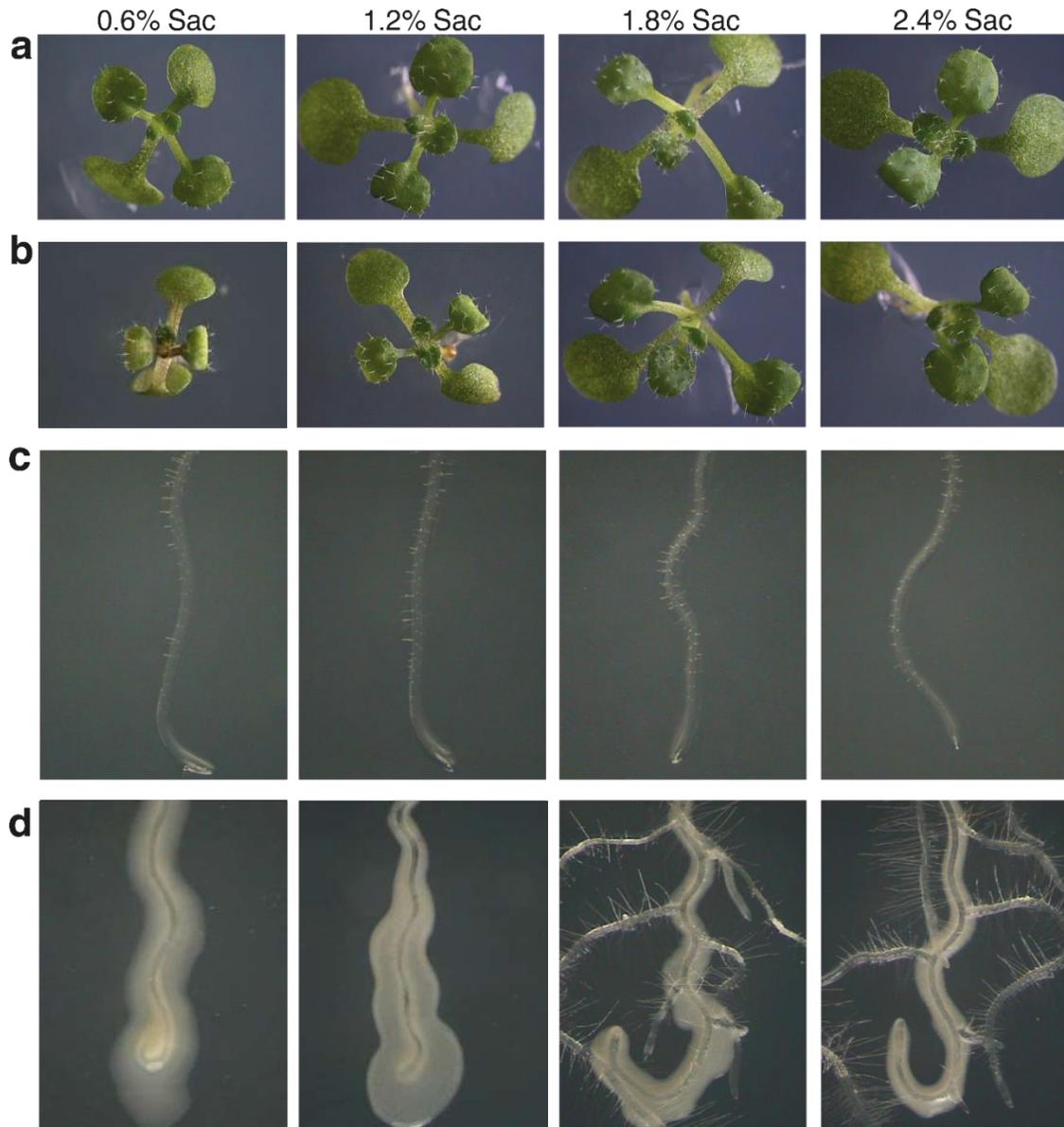


Figura 5. Análisis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en interacción con *Pseudomonas chlororaphis*. Imágenes amplificadas del follaje de *Arabidopsis thaliana* de plántulas no inoculadas (a) e inoculadas (b), imágenes amplificadas de raíz de *Arabidopsis thaliana* en plántulas no inoculadas (c) y las inoculadas (d).

De forma interesante, a los 21 días de interacción comparando el desarrollo de las plantas no inoculadas con las inoculadas bajo condiciones de 0.6% de sacarosa el desarrollo tanto del follaje como del sistema radicular está severamente afectado y las plantas están completamente colonizadas por la bacteria. En contraste, las plantas inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* bajo condiciones de 2.4% de sacarosa muestran follajes iguales a las plantas no inoculadas y resalta un desarrollo exacerbado del sistema radicular por una mayor formación de raíces laterales (Fig. 6).

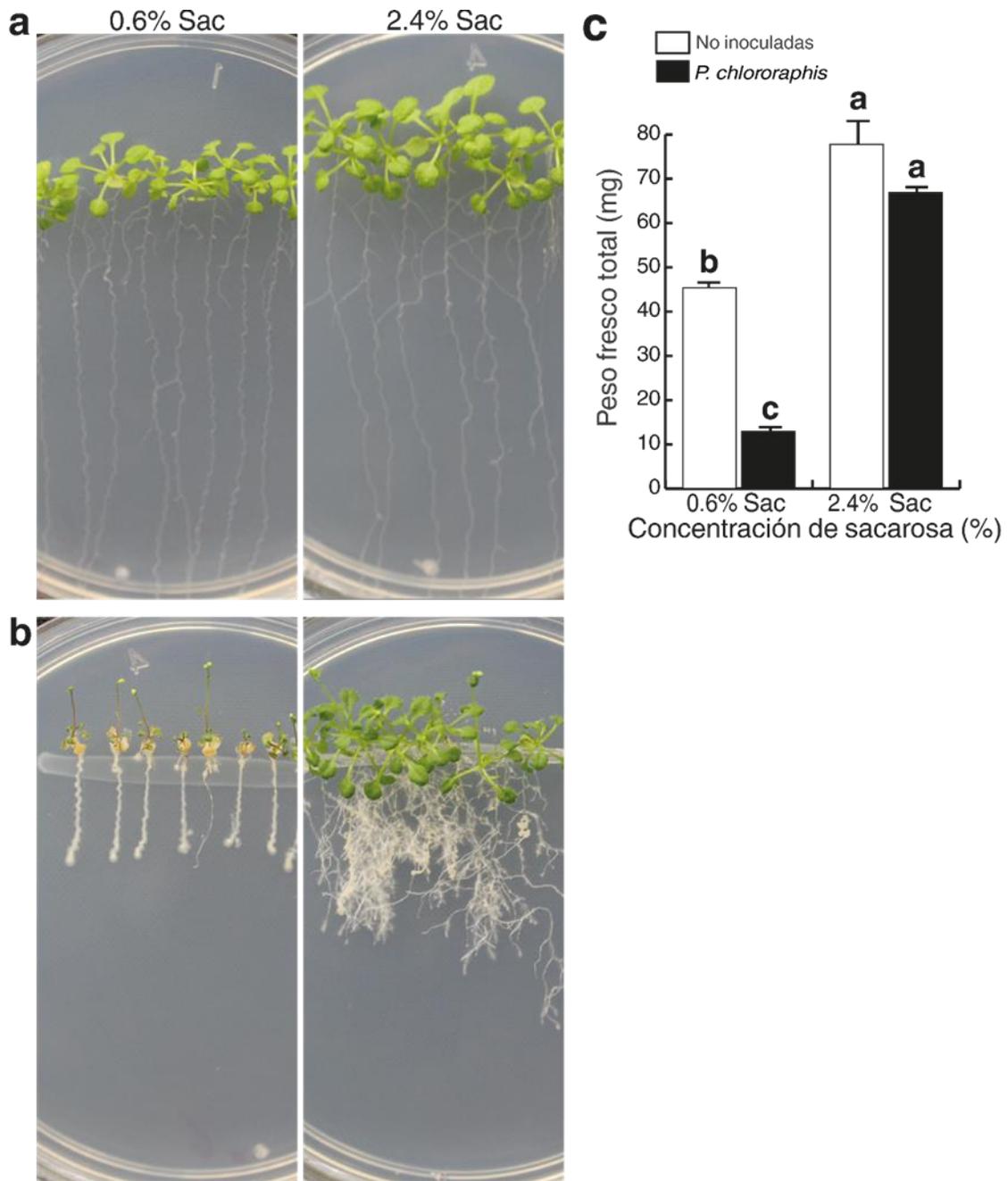


Figura 6. Evaluación del efecto de la bacteria sobre el desarrollo de la planta a mayor tiempo de interacción. Efecto de condiciones contrastantes de sacarosa en plántulas no inoculadas (a) e inoculadas (b) con *Pseudomonas chlororaphis* 21 días después de la interacción Gráfica del peso fresco total (c). Las barras representan la media \pm EE de 18 plántulas en 3 experimentos diferentes de los tratamientos indicados, letras diferentes indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA unidireccional, seguido de un análisis post hoc Tukey ($P < 0,05$).

9.2.- La percepción de sacarosa por *Pseudomonas chlororaphis* modifica su comportamiento patogénico.

Como el desarrollo de las plantas se ve favorecido al incrementar la cantidad de sacarosa en el medio cuando no está en interacción con la bacteria (Fig. 6 a), es posible que los efectos asintomáticos en 2.4% de sacarosa durante la interacción con *Pseudomonas chlororaphis* se deban al vigor de las plantas más que a un cambio en el comportamiento de la bacteria. Para elucidar estas dos posibilidades, los experimentos de interacción se modificaron siendo ahora los follajes de la planta los que perciben con las concentraciones contrastantes de sacarosa, mientras que la interacción de la bacteria con la raíz de la planta se lleva a cabo bajo 0.6% de sacarosa. Como resultados se puede observar que en comparación con los follajes en 0.6%, la percepción de la de sacarosa por el follaje induce el crecimiento y la ramificación de la raíz primaria cuando las plantas no están inoculadas (Fig. 7 a). Sin embargo, cuando las plantas están inoculadas, el desarrollo disminuye tanto en las plantas cuyo follaje está bajo condiciones de 0.6% de sacarosa como en las que están bajo condiciones de 2.4% de sacarosa (Fig. 7). Estos datos demuestran que el comportamiento patogénico o agonista de *Pseudomonas chlororaphis* hacia la planta depende de la cantidad de sacarosa que la bacteria percibe en el medio.

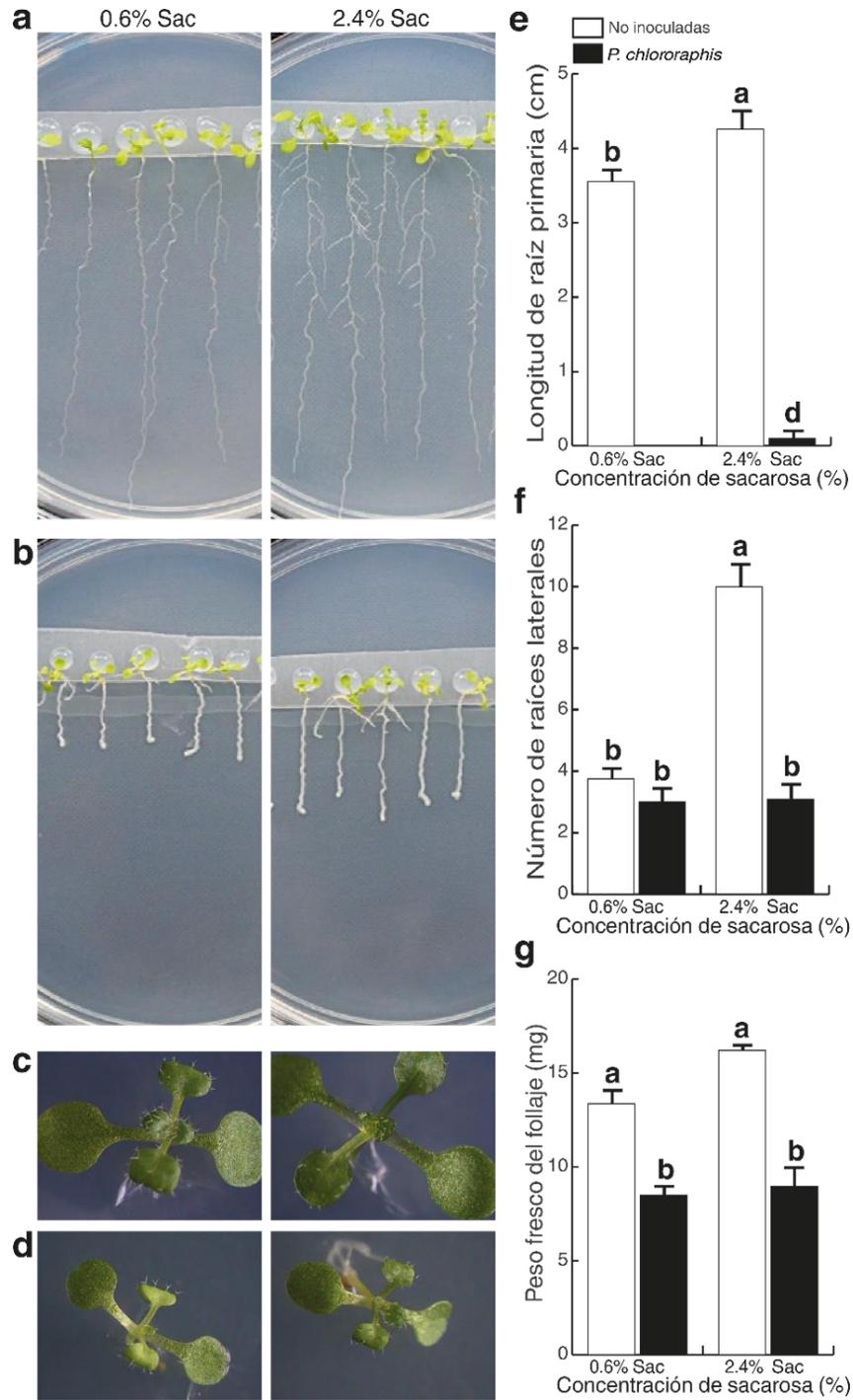


Figura 7. Desarrollo de *Arabidopsis thaliana* con diferente concentración de sacarosa y cuando *Pseudomonas chlororaphis* no puede percibir la sacarosa. Fotografías de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sin inocular (a y c) e inoculadas (b y d), suplementadas con las concentraciones indicadas de sacaros en el follaje. Gráfica de la longitud de la raíz primaria (e), el número de raíces laterales (f) y el peso fresco del follaje (g). Las barras representan la media \pm EE de 18 plántulas en 3 experimentos diferentes de los tratamientos indicados, letras diferentes indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA unidireccional, seguido de un análisis post hoc Tukey ($P < 0,05$).

9.3.- La sacarosa inhibe la producción de factores de virulencia de *Pseudomonas chlororaphis*

Los resultados anteriores muestran que la percepción de la cantidad de sacarosa pudiera estar modulando la producción de factores de virulencia por parte de la bacteria. Por lo tanto, se midieron los factores de virulencia de los cultivos bacterianos, creciendo en los tratamientos contrastantes de sacarosa de menor concentración (0.6 %) y de mayor concentración (2.4 %). Se evaluó la cantidad de pioverdina, de ramnolípidos y de las fenazinas en los sobrenadantes de los cultivos de 48 horas. Se determinó que la producción de fenazina disminuye significativamente en la mayor concentración de sacarosa, mientras que no hay diferencias en la producción de pioverdina y ramnolípidos (Fig. 8 a-c).

Adicionalmente, mediante RT-qPCR se analizó la expresión de los genes *rhlA*, *phzH*, *pslA* de *Pseudomonas chlororaphis* en co-inoculación por 7 días con *Arabidopsis thaliana*. El gen *phzH*, participa en la biosíntesis de fenazina-1-carboxamida y en nuestro estudio se encontró que la expresión de este gen esta elevada en condiciones de 0.6 % de sacarosa en relación con el gen de control *rpoS* y en comparación con su expresión en 2.4 % de sacarosa (Fig. 8d). Se observó un comportamiento similar en la expresión de *pslA* (Fig. 8e), un gen que codifica una glicosil transferasa implicada en los exopolisacáridos necesarios para la formación de biopelículas (Byrd *et al.*, 2009). Por su parte *rhlA*, un gen involucrado en la biosíntesis de ramnolípidos no mostró diferencias significativas en su expresión en comparación con el gen control (Fig. 8f). Estos datos son consistentes con la sobreproducción de fenazinas en bajas concentraciones de sacarosa y consistentes con el pobre desarrollo de la biopelícula en la colonización de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* en altas concentraciones de sacarosa. Estos resultados sugieren que, a una menor concentración de sacarosa, *Pseudomonas chlororaphis* sobreproduce fenazinas y exopolisacáridos y esto puede conducir a un aumento en la patogenicidad observada de *Pseudomonas chlororaphis* sobre *Arabidopsis thaliana*.

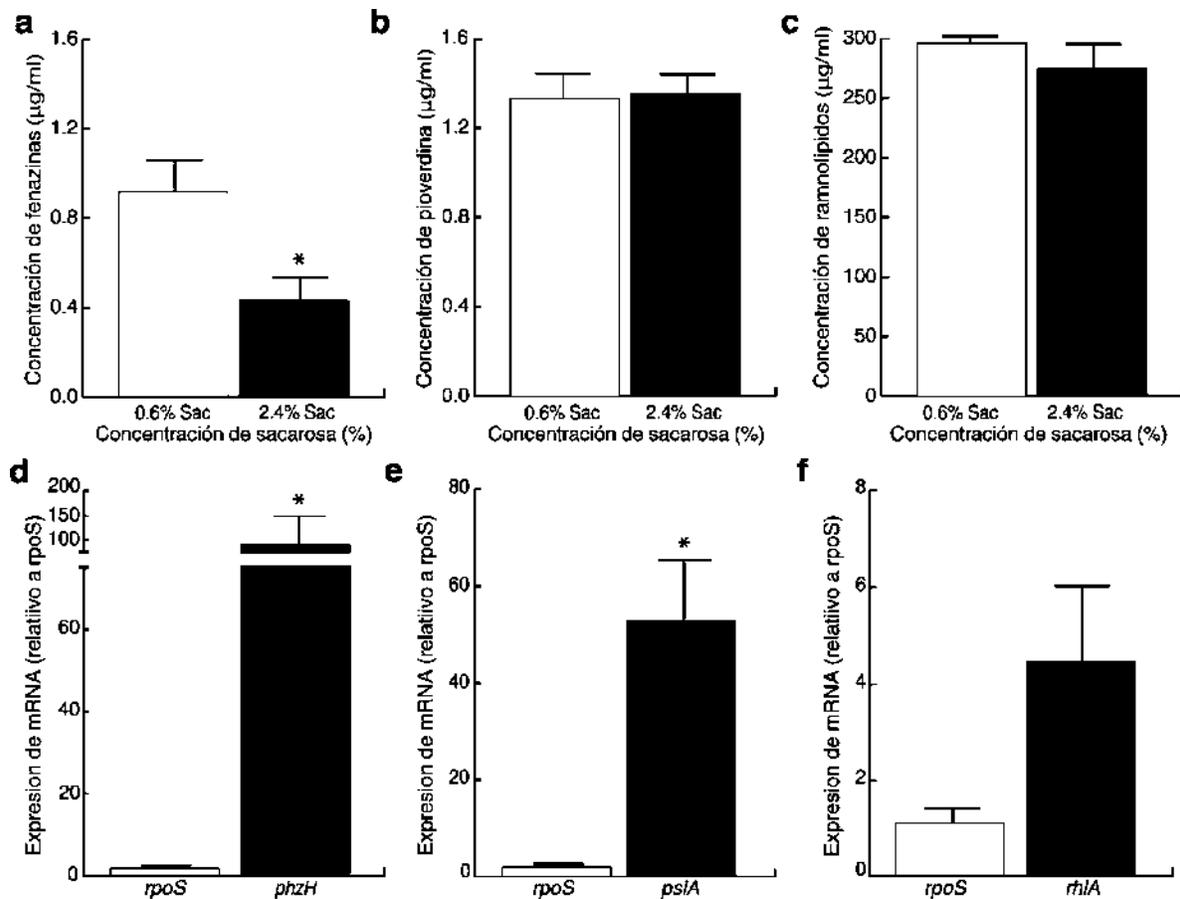


Figura 8. Efecto de la sacarosa sobre la producción de factores de virulencia y la expresión de genes relacionados a su biosíntesis en *P. chlororaphis*. Se grafica la concentración de fenazinas (a), pioverdina (b) y ramnolipidos (c). Además, se grafica la expresión relativa a rpoS de los genes phzH (d), psiA (e) y rhlA (f). Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos diferentes de los tratamientos indicados, * indican diferencias estadísticas determinadas mediante T test ($P < 0,05$).

9.4.- La piocianina reestablece la patogenicidad de *Pseudomonas chlororaphis* en condiciones elevadas de sacarosa

Los resultados anteriores muestran que la biosíntesis de fenazina se ve afectada y puede ser un factor importante en la patogenicidad de *Pseudomonas chlororaphis*. Para comprobar esto, se adicionó una fenazina exógena en el medio agar MS 0.2X con concentraciones contrastantes de 0.6% y 2.4% de sacarosa. Cuando se adiciona la fenazina exógena (piocianina 4 µg/mL) en ausencia de la bacteria, se muestra un acortamiento de la raíz primaria y un incremento en el número de raíces

laterales, pero no se observan diferencias significativas en la producción de biomasa a la concentración de 0.6% de sacarosa. A 2.4% de sacarosa, la piocianina reduce los parámetros analizados, sin embargo, las plantas no muestran signos de enfermedad en ninguna concentración de sacarosa (Fig. 9 a, c, e y f). En los ensayos de interacción, la adición de piocianina en 0.6% de sacarosa no induce efectos aditivos o diferenciales comparado con las plantas interaccionando con *Pseudomonas chlororaphis* bajo condiciones 0.6% de sacarosa, pero sin piocianina. De manera importante las plantas inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* bajo 2.4% de sacarosa más la adición de piocianina muestran inhibición del desarrollo, así como signos de enfermedad ocasionados por la bacteria en la planta como aquellos que se observan bajo condiciones 0.6% de sacarosa. Estos resultados demuestran que la producción de fenazinas modulada por la concentración de sacarosa es un factor importante para la patogenicidad de *Pseudomonas chlororaphis*.

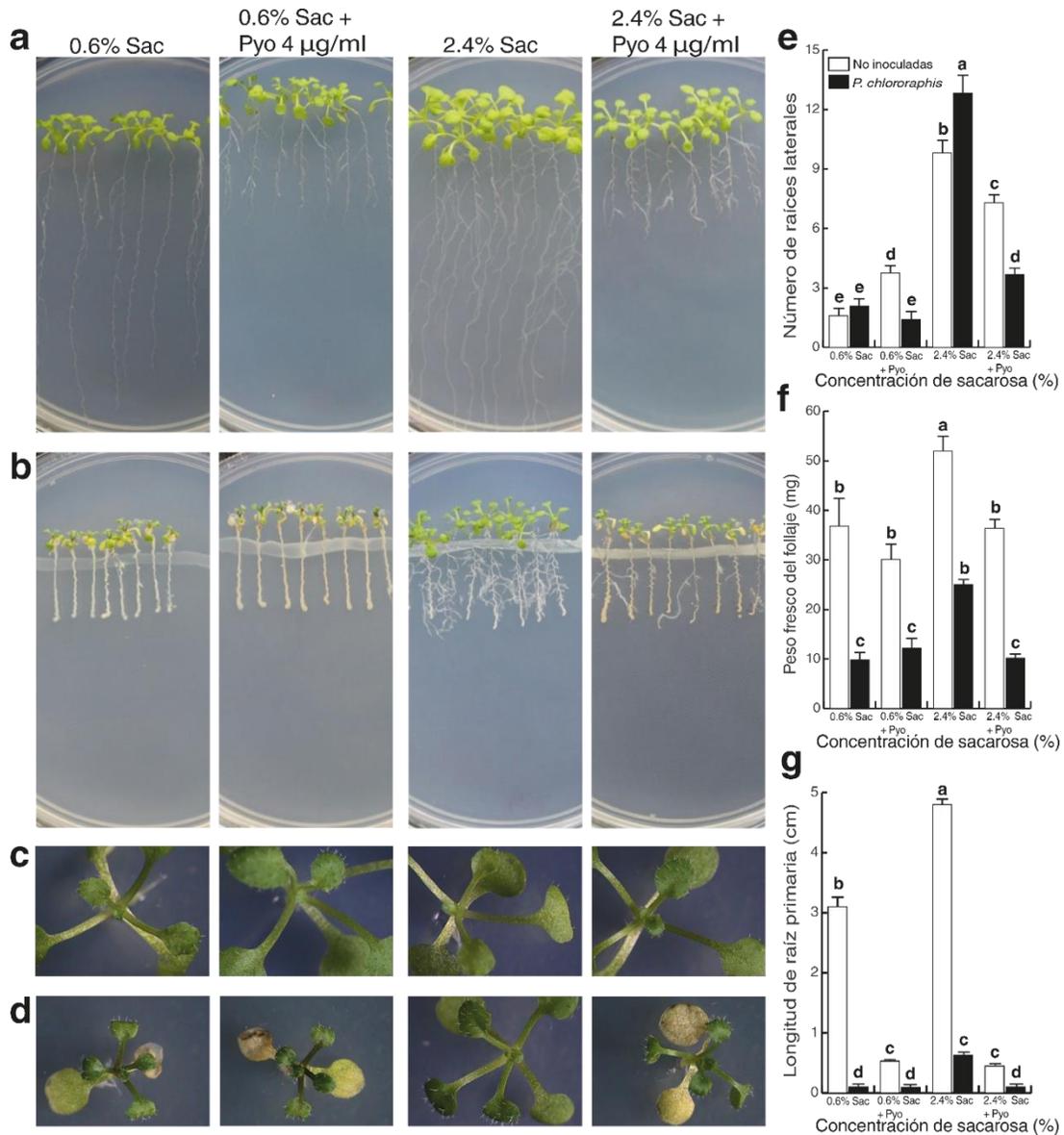


Figura 9. Efecto de la pocianina y la sacarosa en plántulas de *Arabidopsis thaliana* en interacción con *P. chlororaphis*. Se adiciona pocianina (Pyo) al medio MS en los tratamientos de 0.6 % y 2.4 % de sacarosa en las plantas no inoculadas (a) e inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* (b), se realizó un acercamiento de 10 X para observar el follaje de las plantas no inoculadas (c) e inoculadas (d). A demás se determinó el número de raíces laterales (e) y el peso fresco del follaje (f). Las barras representan la media \pm EE de 18 plántulas en 3 experimentos diferentes sembrados de los tratamientos indicados, letras diferentes indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido de un análisis post hoc de Tukey ($P < 0,05$).

9.5.- *Pseudomonas chlororaphis* induce respuestas de defensa y de desarrollo en *Arabidopsis thaliana*.

Las características benéficas de los PGPRs incluyen activar vías de defensa, así como de desarrollo. Para evaluar estas posibles respuestas inducidas por *Pseudomonas chlororaphis* en *Arabidopsis*, se evaluó la expresión de los marcadores genéticos *PR1::GUS*, *LOX2::GUS* y *DR5::GUS*, los cuales monitorean la actividad de las vías del ácido salicílico, del ácido jasmónico y de las auxinas respectivamente. Los resultados muestran que comparando con las plantas no inoculadas (Fig. 10 a, c y e), *Pseudomonas chlororaphis* induce la expresión de los tres marcadores genéticos a la concentración de 0.6% de sacarosa, mientras que a 2.4 % la expresión de *LOX2::GUS* y de *DR5::GUS* se potencia, no así la expresión de *PR1::GUS* (Fig. 10 b, d y f). Estos datos concuerdan con los reportados donde *Pseudomonas chlororaphis* induce respuestas deseadas en la planta para contender y desarrollarse mejor en condiciones adversas, dichas respuestas mejoran en las plantas interaccionado bajo condiciones de alta sacarosa.

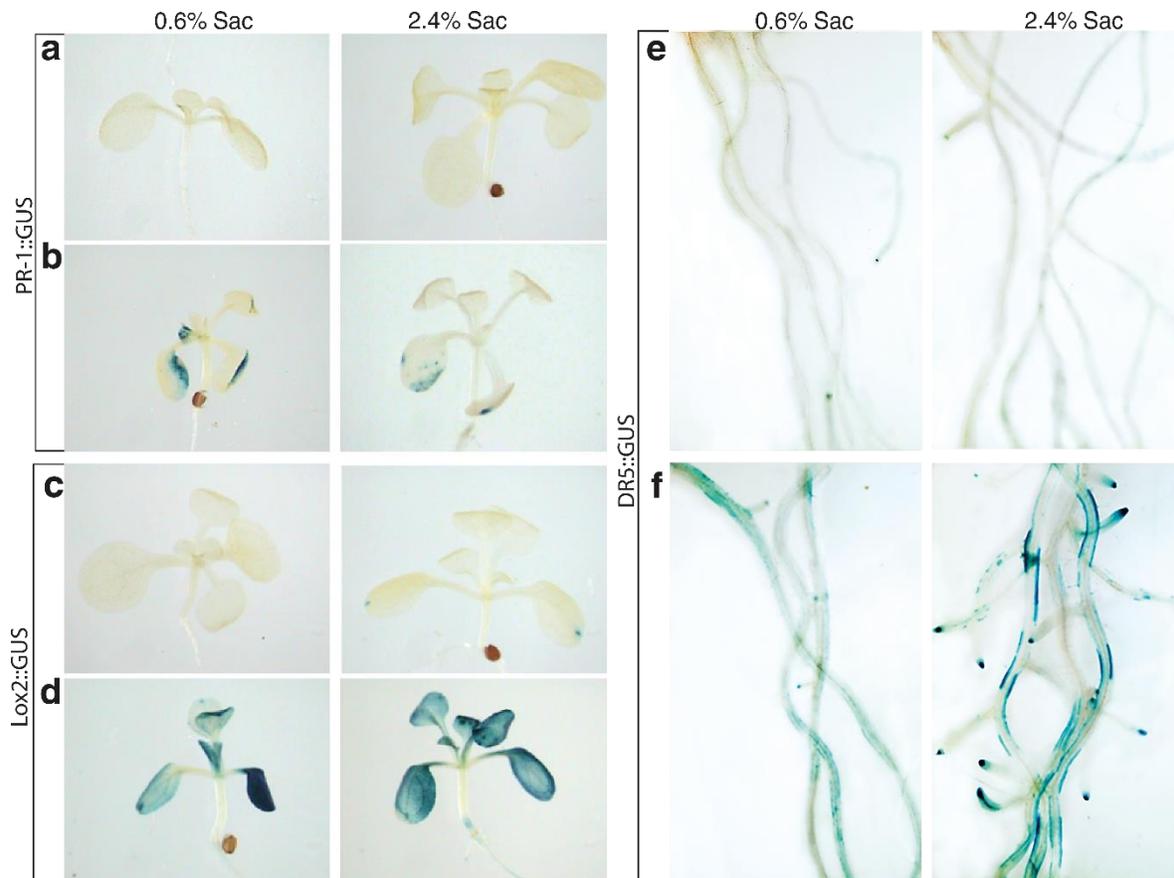


Figura 10. Activación de las vías de señalización del ácido salicílico, ácido jasmónico y auxínicas de *Arabidopsis thaliana* por *Pseudomonas chlororaphis*. El efecto de *Pseudomonas chlororaphis* sobre las vías de activación de respuesta auxínica, ácido salicílico y ácido jasmónico fue analizado mediante las líneas transgénicas de plantas no inoculadas(a, c, e) e inoculadas (b, d, f) de *DR5::GUS*, *PR1::GUS* y *LOX2::GUS* respectivamente.

10.- Discusión

Ante la demanda de recursos vegetales debido al incremento de la población mundial, el sector agrícola enfrenta diversos retos para obtener un rendimiento eficiente de las plantas en un entorno de constantes cambios bióticos y abióticos. En particular, los productores recurren a prácticas como la aplicación de fertilizantes y pesticidas químicos para mejorar el desarrollo de los vegetales y combatir plagas. Sin embargo, el uso excesivo de estos productos genera diversos problemas, incluyendo el agotamiento de los suelos, la eutrofización de los mantos acuíferos y la resistencia de plagas y patógenos. Una de las alternativas sostenibles para mejorar el desarrollo de las plantas, incluso en suelos salinos, ácidos o alcalinos, y pobres en nutrientes, así como para hacer frente a las condiciones de sequía y proteger a las plantas contra los patógenos, es el uso de PGPRs como una alternativa sostenible (Jiménez-Velázquez et al., 2020; Abd El-Azeem et al., 2012; López-Hernández et al., 2022; Cohen et al., 2015; Tanveer et al., 2023; Vardharajula et al., 2011; Niu et al., 2011).

Existen diferentes géneros bacterianos que tienen especies representativas que actúan como PGPRs, como *Bacillus*, *Achromobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*, entre otros (García-Cárdenas et al., 2022; Jiménez-Velázquez et al., 2020; Vallejo-Ochoa et al., 2017; López-Hernández et al., 2022; Wu et al., 2022).

El género *Pseudomonas* está representado por más de 60 especies de bacilos gram-negativos ubicuos, por lo que no es sorprendente que además de las especies PGPR encontradas en el género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brassicae*, *Pseudomonas lurida* y *Pseudomonas putida* (Gross & Loper 2009; Wu et al., 2022; López-Hernández et al., 2022; Tanveer et al., 2023), también puedan encontrarse cepas patógenas para las plantas, como la más estudiada *Pseudomonas syringae*, así como el patógeno oportunista humano *Pseudomonas aeruginosa* (Xin et al., 2018; Jun et al., 2016). La capacidad de *Pseudomonas* para colonizar diferentes nichos ecológicos y actuar como PGPR o fitopatógeno está asociada a la versatilidad de su metabolismo secundario (Gross & Loper 2009; Jun et al., 2016).

Pseudomonas chlororaphis ha sido descrita en numerosas ocasiones como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, principalmente debido a la producción de antibióticos que pueden fungir como antagonistas de hongos fitopatógenos, la biosíntesis del ácido 3-indol acético (AIA), una fitohormona con la capacidad de estimular el crecimiento vegetal, y la solubilización de nutrientes como fosfato y hierro. Si bien su uso actualmente ha demostrado no tener efectos negativos sobre las plantas de interés comercial, una investigación reciente de nuestro grupo de trabajo mostró un efecto fitopatógeno de *Pseudomonas chlororaphis* en *Arabidopsis thaliana* (López-Hernández et al., 2022).

Teniendo en cuenta que las plantas deben interactuar con una gran diversidad de organismos en la rizosfera, se ha demostrado que la raíz puede afectar al suelo de distintas maneras, ya sea de forma mecánica al aportar estabilidad al suelo o químicamente al liberar sustancias orgánicas al suelo llamadas exudados (Singh et al., 2004, Raaijmakers et al., 2007). Los exudados son sustancias que contienen grandes cantidades de nutrientes como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Estas fuentes ricas en carbono se acumulan entre las raíces y el suelo, formando rizodepositos que se utilizan frecuentemente como monedas de cambio para reclutar especies de microorganismos que ayudan a enfrentar condiciones adversas, como la baja disponibilidad de nutrientes, así como a combatir especies patógenas (Singh et al., 2004, Raaijmakers et al., 2007; Kyle et al., 2014). Se ha demostrado que las plantas secretan una gran cantidad de sacarosa, y se ha sugerido que este es un mecanismo de defensa indirecto a través de la inducción de la colonización de bacterias beneficiosas como *Bacillus* y especies de *Pseudomonas* (Huang et al., 2019; López-Hernández et al., 2022; Tian et al., 2021).

Con estas consideraciones, decidimos evaluar, mediante un sistema de interacción *in vitro* entre *Arabidopsis thaliana* y *Pseudomonas chlororaphis*, la influencia de la sacarosa en dicha interacción. Nuestros resultados muestran que el efecto fitopatógeno de *Pseudomonas chlororaphis* sobre la planta podría cambiar a uno promotor del crecimiento vegetal dependiendo de la concentración de sacarosa presente en el medio. El comportamiento promotor no patogénico depende

exclusivamente de la percepción de la sacarosa por *Pseudomonas chlororaphis*, lo cual conduce a una disminución en la producción de fenazinas. Esto está asociado a la reducción de la expresión del gen *phzH*, el cual es responsable de la síntesis de fenazina-1-carboxamida.

La fenazina PYO, al igual que otras producidas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que actúan como factores de virulencia en células de mamíferos (Munro et al., 1989), así como antibióticos contra hongos fitopatógenos como *Fusarium spp.* y *Botrytis spp.* (O'Malley et al., 2004; Humlicek et al., 2005; Sinha et al., 2015), también inhibe el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Ortiz-Castro et al., 2013).

La restauración de la patogenicidad al suplementar PYO al medio de interacción con 2.4% de sacarosa demuestra que la disminución de la producción de fenazinas es un factor importante en el comportamiento patogénico de *Pseudomonas chlororaphis* en *Arabidopsis thaliana*. Resultados similares se han reportado previamente en la cepa patogénica humana *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, en la cual condiciones elevadas de glucosa inhiben la formación de biofilm y la motilidad, así como reducen la producción de los factores de virulencia pirocianina y elastasa, y la expresión de los genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* y *rhlR* (Chen et al., 2020).

Además, la disminución de la expresión de *pslA*, que codifica una glicosiltransferasa implicada en la producción de exopolisacáridos, sugiere que la sacarosa percibida por *Pseudomonas chlororaphis* modifica la formación de biopelículas y se correlaciona con las diferencias en la colonización de las raíces de *Arabidopsis thaliana* bajo interacción en un medio con 2.4% de sacarosa.

Estudios en *Pseudomonas aeruginosa* han revelado la importancia de los sistemas de quorum sensing (QS) en la patogénesis, particularmente en la modificación de la producción de elicitores de QS, como las homoserina lactonas y los ciclodipeptidos, que disminuyen los efectos patogénicos en las plantas. Además, la producción de otros compuestos que son percibidos por las plantas y que inducen la activación de vías hormonales, aportan beneficios al inducir el desarrollo de las plantas y

respuestas de defensa (Ortiz-Castro et al., 2011; Chen et al., 2020; González et al., 2017; López-Hernández et al., 2022).

Como se evidencia en nuestros resultados, la pérdida de patogenicidad debido a la disponibilidad de sacarosa, asociada a la reducción de la producción de moléculas de virulencia como las fenazinas y a la formación de biopelícula, favorece la inducción de otras respuestas en la planta, como las vías de defensa y auxínicas, que preparan a la planta contra el ataque de otros patógenos y que promueven el desarrollo del sistema radicular. Esto impacta considerablemente en el desarrollo total de la planta, posiblemente debido a una mejor explotación de los recursos presentes en el medio de cultivo. Por lo tanto, bajo esta modificación de las condiciones de interacción, *Pseudomonas chlororaphis* puede considerarse como un PGPR.

Al igual que *Pseudomonas chlororaphis*, otras especies clasificadas como PGPR pueden tener efectos patogénicos en las plantas. Sin embargo, como demuestran nuestros resultados, la capacidad agónica o antagónica sobre el desarrollo de la planta puede depender de la disponibilidad de recursos durante la interacción. Esta consideración tiene potencial para diseñar o mejorar los métodos de aplicación de PGPR en el sector agrícola.

11.-Bibliografía

- Abd El-Azeem, SA, Elwan, MW, Sung JK, Ok YS (2012) Alleviation of salt stress in eggplant (*Solanum melongena* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(9), 1303-1315.
- Ahator SD, Zhang L. Small Is Mighty-Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu Rev Microbiol*. 2019 Sep 8;73:559-578.
- Anaissie, E., Fainstein, V., Miller, P., Kassamali, H., Pitlik, S., Bodey, G. P., & Rolston, K. (1987). *Pseudomonas putida*. *The American Journal of Medicine*, 82(6), 1191–1194. [https://doi:10.1016/0002-9343\(87\)90223-3](https://doi:10.1016/0002-9343(87)90223-3)
- Ankenbauer R., Hanne L. F. y Cox C. D. 1986. Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdinin production. *J Bacteriol*. 167(1): 7-11
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. (2013). PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management. In: Maheshwari, D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer, Berlin, Heidelberg..
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90–98
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). THE ROLE OF ROOT EXUDATES IN RHIZOSPHERE INTERACTIONS WITH PLANTS AND OTHER ORGANISMS. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233–266
- Bal, H. B., Das, S., Dangar, T. K., & Adhya, T. K. (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12), 972–984.

- Beattie GA (2006) Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-Associated Bacteria. Springer, Dordrecht, pp 1-56
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 suppl 1), 1044–1051.
- Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256(1), 67–83.
- Biagini, K., Barbey, C., Borrel, V., Feuilloley, M., Déchelotte, P., & Connil, N. (2015). The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Archives of Microbiology*, 197(8), 983–990.
- Blier, A., Vieillard, J., Gerault, E., Dagorn, A., Varacavoudin, T., Derf, F. L., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., & Lesouhaitier, O. (2012). Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide production by a polarographic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 90(1), 20–24.
- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-Ghiorghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3337.
- Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622–638.
- Bystrova, O. V., Lindner, B., Moll, H., Kocharova, N. A., Knirel, Y. A., Zahringer, U., & Pier, G. B. (2004). Full Structure of the Lipopolysaccharide of

- Pseudomonas aeruginosa* Immunity 5. *Biochemistry (Moscow)*, 69(2), 170–175.
- Celaya-Michel, H., & Castellanos, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343–356.
- Chen, T., Xu, Y., Xu, W., Liao, W., Xu, C., Zhang, X., ... Zhou, T. (2020). Hypertonic glucose inhibits growth and attenuates virulence factors of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 20(1).
- Chevance, F. F. V., & Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 455–465.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., van der Bij, A. J., van der Drift, K. M. G. M., Schripsema, J., Kroon, B., ... Lugtenberg, B. J. J. (1998). *Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing Pseudomonas chlororaphis PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1069-1077.
- Choi Y, Park H.Y, Park S.J, Park S.J, Kim S.K, Ha C, Im S.J, Lee J.H, (2011). Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells*. 32(1):57-65.
- Chowdhury, N., Bagchi, A. (2017). Structural Insight into the Gene Expression Profiling of the *hcn* Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol* 182, 1144–1157.
- Christensen, B. E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J Biotechnol* 10, 181–202.
- Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli FJ, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia C, Piccoli P (2015) *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* 153:79–90.

- Cornelis P. y Dingemans J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 75.
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). *Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities, 201–213.*
- Darrah, P. R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155–156(1), 1–20.
- Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2003 Feb;185(3):1027-36.
- De La Calle Rodríguez N, Santa V.C, Cardona C.N, (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*, 26(1): 43-55.
- Dexter, A. R. (1987). Compression of soil around roots. *Plant and Soil*, 97(3), 401–406.
- Dhakal, B. K., Bower, J. M., Mulvey, M. R., & Yang, X. (2015). Pili, Fimbriae☆. In Elsevier eBooks.
- Díaz-Pérez, S. P., Solis, C. S., López-Bucio, J. S., Alarcón, J. J., Villegas, J. E., De La Cruz, H. R., & Campos-García, J. (2022gon). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*.
- Dimkpa, C. O., Mclean, J. E., Britt, D. W., & Anderson, A. J. (2011). *CuO and ZnO nanoparticles differently affect the secretion of fluorescent siderophores in*

the beneficial root colonizer, Pseudomonas chlororaphis O6. *Nanotoxicology*, 6(6), 635–642.

Dimkpa, C. O., Zeng, J., McLean, J. E., Britt, D. W., Zhan, J., & Anderson, A. J. (2011). *Production of Indole-3-Acetic Acid via the Indole-3-Acetamide Pathway in the Plant-Beneficial Bacterium Pseudomonas chlororaphis O6 Is Inhibited by ZnO Nanoparticles but Enhanced by CuO Nanoparticles. Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1404–1410.

Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2011). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227–243.

Dorjey, S., Dolkar, D., & Sharma, R. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6(7), 1335-1344.

Dunne, W. M. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.

Ethan E. Mann, Daniel J. Wozniak, *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 4, July 2012, Pages 893–916.

Evans, L. R. & Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 116(2): 915–924.

Finkel, O.M., Salas-González, I., Castrillo, G. *et al.*,. (2020). A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. *Nature* 587, 103–108.

Flemming, H., & Wingender, J. (2002). Extracellular Polymeric Substances (EPS): Structural, Ecological and Technical Aspects. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.

- Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A. A., & Moreno, E. (1995). Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Research in Microbiology*, 146(7), 569–578.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual review of genetics*, 35(1), 439-468.
- García-Cárdenas, E., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L.F. *et al.*, (2022) *Bacillus* sp. LC390B from the Maize Rhizosphere Improves Plant Biomass, Root Elongation, and Branching and Requires the Phytochromes PHYA and PHYB for Phytostimulation. *J Plant Growth Regul* (2022).
- Gleba, D., Borisjuk, N. V., Borisjuk, L. G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., ... Raskin, I. (1999). Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 5973–5977.
- Goldfarb, W., & Margraf, H. W. (1967). Cyanide Production by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Annals of Surgery*, 165(1), 104–110.
- Goldstein, A.H., Braverman, K. and Osorio, N. (1999) Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol Ecol* 30, 295–300.
- González J.E., Keshavan N.D. (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev.*;70(4):859-75.
- González, O. M., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microbial Ecology*, 73(3), 616–629.

- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). *Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp.* *Natural Product Reports*, 26(11), 1408.
- Gunther, N. W., Nuñez, A., Fett, W. F., & Solaiman, D. K. Y. (2005). Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288–2293.
- Gurikar, C., Naik, M.K., Sreenivasa, M.Y. (2016). *Azotobacter*: PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319.
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2019). The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture*, 9(7), 142.
- Heredia-Ponce, Z., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Purtschert-Montenegro, G., Eberl, L., Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2020). Role of extracellular matrix components in the formation of biofilms and their contribution to the biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *Environmental Microbiology*, 23(4), 2086–2101.
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T. (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*; 14(10):2339-51.
- Hirsch, A. M., Bauer, W. D., Bird, D. M., Cullimore, J., Tyler, B., & Yoder, J. I. (2003). MOLECULAR SIGNALS AND RECEPTORS: CONTROLLING RHIZOSPHERE INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND OTHER ORGANISMS. *Ecology*, 84(4), 858–868.

- Hoegy F, Mislin GL, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements. *Methods Mol Biol* (Clifton, NJ) 1149:293–301.
- Howell SH, Lall S, Che P (2003) Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci*; 8(9), 453-9.
- Huang AC, Jiang T, Liu YX, Bai YC, Reed J, Qu B, Goossens A, Nützmann HW, Bai Y, Osbourn A (2019) A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis thaliana* root microbiota. *Science* 364:6440.
- Humlicek, A., Britigan, B. E., & Denning, G. M. (2005). *Pyocyanin and Its Precursor Phenazine-1-Carboxylic Acid Increase IL-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Airway Epithelial Cells by Oxidant-Dependent Mechanisms. The Journal of Immunology, 175(6), 4017–4023.*
- Jain, R., & Pandey, A. (2016b). A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. *Microbiological Research, 190, 63–71.*
- Jilani, G., Mahmood, S., Chaudhry, A. N., Hassan, I., & Akram, M. (2008). *Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil—a review. Annals of Microbiology, 58(3), 351–357.*
- Jiménez-Vázquez, K. R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L. F., Ramos-Acosta, B. P., López-Bucio, J. (2020). The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *The Plant Journal, 103(5), 1639–1654.*
- Jun SR, Wassenaar TM, Nookaew I, Hauser L, Wanchai V, Land M, Timm CM, Lu TS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier DA, Ussery DW (2016) Diversity of *Pseudomonas* genomes, including *Populus*-Associated isolates, as

revealed by comparative genome analysis. *Appl Environ Microbiol* 82:375-383.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S, (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*, 22(6):3128.

Kahlon R.S, (2016). *Pseudomonas: molecular and applied biology*. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer, pp1–518.

Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B, (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett*. 190:1-6.

Kostylev M, Kim D.Y, Smalley NE, Salukhe I, Peter Greenberg E, Dandekar AA. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc. Natl Acad Sci*, 116(14), 7027–7032.

Kroh, G. E., & Pilon, M. (2020). Regulation of Iron Homeostasis and Use in Chloroplasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3395.

Kuan, K. B., Othman, R., Abdul Rahim, K., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PLOS ONE*, 11(3), e0152478.

Kyle W. Becker, Eric P. Skaar, (2014) Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 38, Issue 6, November 2014, Pages 1235–1249.

Lang, S., and D. Wullbrandt. 1999. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:22-32.

- Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang L.H, (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat chem biol*, 9(5), 339–343.
- Lee J, y Zhang L, (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6(1):26-41.
- Liu, P. V. (1957). Survey of hemolysin production among species of pseudomonads. *Journal of bacteriology*, 74(6), 718-727.
- Liu, Y., Dai, C., Zhou, Y., Qiao, J., Tang, B. Q., Yu, W., Zhang, R., Liu, Y., & Lu, S. (2021). Pyoverdines Are Essential for the Antibacterial Activity of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 under Low-Iron Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(7).
- López-Hernández, J. F., García-Cárdenas, E., López-Bucio, J. S., Jiménez-Vázquez, K. R., De La Cruz, H. R., Ferrera-Rodríguez, O., Santos-Rodríguez, D. L., Ortiz-Castro, R., & López-Bucio, J. (2022b). Screening of Phosphate Solubilization Identifies Six *Pseudomonas* Species with Contrasting Phytostimulation Properties in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Microbial Ecology*.
- Losick, R., & Kaiser, D. (1997). Why and How Bacteria Communicate. *Scientific American*, 276(2), 68–73.
- MacGregor, D. R., Deak, K. I., Ingram, P. A., & Malamy, J. E. (2008). *Root System Architecture in Arabidopsis thaliana Grown in Culture Is Regulated by Sucrose Uptake in the Aerial Tissues. THE PLANT CELL ONLINE*, 20(10), 2643–2660.
- Maksimov IV, Abizgil'dina RR and Pusenkova LI (2011) Plantgrowth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review). *Appl Biochem Microbiol* 47:333-345

- Marrez D.A., Haitham S. M., (2020). Biological activity and applications of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Open Access Journal of Biomedical Science, 1(4).
- Mattick, J. S. (2002). *Type IV Pili and Twitching Motility*. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314.
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2006). Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 417–445.
- McKnight S.L, Iglewski B.H, Pesci E.C, (2000) The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182:2702–2708.
- Meyer J. M., Neely A., Stintzi A., Georges C. y Holder, I. A. 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 64(2): 518-523.
- Molnár, Z., Solomon, W., Mutum, L., & Janda, T. (2023). Understanding the Mechanisms of Fe Deficiency in the Rhizosphere to Promote Plant Resilience. *Plants*, 12(10), 1945.
- Morohoshi, T., Wang, W.-Z., Suto, T., Saito, Y., Ito, S., Someya, N., & Ikeda, T. (2013). Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(5), 580–584.
- Munro, N. C., Barker, A., Rutman, A., Taylor, G., Watson, D., McDonald-Gibson, W. J., ... Cole, P. J. (1989). Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity. *Journal of Applied Physiology*, 67(1), 316–323.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Nandi, M., Selin, C., Brassinga, A. K. C., Belmonte, M. F., Fernando, W. G. D., Loewen, P. C., & de Kievit, T. R. (2015). Pyrrolnitrin and Hydrogen Cyanide Production by *Pseudomonas chlororaphis* Strain PA23 Exhibits Nematicidal and Repellent Activity against *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, 10(4), e0123184.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496.
- Neeraja C, Anil K, Purushotham P, Suma K, Sarma P, Moerschbacher BM and Podile AR (2010) Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit Rev Biotechnol* 30:231-241
- Niu DD, Liu HX, Jiang CH, Wang YP, Wang QY, Jin HL, et al (2011) The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 533–542.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1), L94–L103.
- Ortiz-Castro, R. Martinez-Trujillo M. Lopez-Bucio J. (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*, 31(10), 1497–1509.

- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701-712.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., Del Río, R. E., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7253–7258.
- Ortiz-Castro, R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a Virulence Factor Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Alters Root Development Through Reactive Oxygen Species and Ethylene Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(4), 364–378.
- Paz-Zarza VM, Mangwani M.S, Martínez M.A, Álvarez H.D, Solano-Gálvez S.G, Vázquez-López R, (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol*, 36 (2): 180-189.
- Picot, L., Abdelmoula, S. M., Merieau, A., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., & Feuilloley, M. G. J. (2001). *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes and Infection*, 3(12), 985–995.
- Pierson, L. S., & Thomashow, L. S. (1992). Cloning and Heterologous Expression of the Phenazine Biosynthetic Locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 5(4), 330.
- Pierson, L. S., Keppenne, V. D., & Wood, D. W. (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3966–3974.

- Pierson, L.S., Pierson, E.A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1659–167.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C. *et al.*, (2007) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361.
- Read, R. C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., ... et, al. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology*, 72(6), 2271–2277.
- Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. A. (2013). Dual Roles of *Pseudomonas aeruginosa* AlgE in Secretion of the Virulence Factor Alginate and Formation of the Secretion Complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 2002–2011.
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J. M., Briat, J. F., & Lemanceau, P. (2008). Chapter 4 Iron Dynamics in the Rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 183–225.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *BiotechnolAdv* 17, 319–339.
- Rollet, C., Gal, L., & Guzzo, J. (2008). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 290(2), 135–142.
- Ruiz-Herrera LF, Shane MW, López-Bucio J (2015). Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4:431-443.

- Rutherford, P. M., McGill, W. B., Arocena, J. M., Figueiredo, C. T., Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (2007). Soil sampling and methods of analysis. *Soil sampling and methods of analysis*, 267-278.
- Ryall, B., Davies, J. C., Wilson, R., Shoemark, A., & Williams, H. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *The European Respiratory Journal*, 32(3), 740–747.
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T., & Hill, J. E. (2014). *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiology Reviews*, (39), 17-46
- Sashidhar, B. and Podile, A.R. (2010) Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J Appl Microbiol* 109, 1–12.
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). *Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927–948.
- Schalk, I. J. (2008). *Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5-6), 1159-1169
- Schütz, C., & Empting, M. (2018). Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14, 2627–2645.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., & Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*, 12(8), 386–393.
- Sinha, S., Shen, X., Gallazzi, F., Li, Q., Zmijewski, J. W., Lancaster, J. L., & Gates, K. S. (2015). Generation of Reactive Oxygen Species Mediated by 1-

- Hydroxyphenazine, a Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemical Research in Toxicology*, 28(2), 175–181.
- Snyder WE, Tonkyn DW, Kluepfel DA. (1998). Insect-mediated dispersal of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis*. *Phytopathology* 88: 1248–1254.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Gunther, N.W. *et al.*, (2015). Dirhamnolipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 4333–4342 (2015).
- Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K *et al.*, (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytol* 201(3):850–861
- Stephens PM, Crowley JJ and O'Connell C (1993) Selection of pseudomonad strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugarbeet seeds in soil. *Soil Biol Biochem* 25:1283-1288.
- Sutherland, I. (2001). *The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment*. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227.
- Sutra, L., Siverio, F., Lopez, M. A., Hunault, G., Bollet, C., & Gardan, L. (1997). Taxonomy of *Pseudomonas* Strains Isolated from Tomato Pith Necrosis: Emended Description of *Pseudomonas corrugata* and Proposal of Three Unnamed Fluorescent *Pseudomonas* Genomespecies. *International journal of systematic bacteriology*, 47(4), 1020-1033.
- Tanveer S, Akhtar N, Ilyas N, Sayyed RZ, Fitriatin BN, Perveen K, Bukhari NA (2023) Interactive effects of *Pseudomonas Putida* and salicylic acid for mitigating drought tolerance in canona (*Brassica Napus L.*) *Heliyon* 9:e14193 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14193>

- Thi M.T.T, Wibowo D, Rehm B.H.A, (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*, 21(22):8671
- Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F., & Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2622–2630.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963–1971.
- Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., & López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil*, 291(1-2), 263–273.
- Vallejo-Ochoa, J., López-Marmolejo, M., Hernández-Esquivel, A.A. *et al.*, (2017). Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2. *Protoplasma* 255, 685–694.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 453–483.
- Van Rij, E. T., Wesselink, M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Influence of Environmental Conditions on the Production of Phenazine-1-Carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(5), 557–566.

- Vardharajula S, Ali SZ, Grover M, Reddy G, Bandi V (2011) Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J. Plant Interact* 6:1–14.
- Vessey, J. K. (2003). *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- Wall, D., & Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology*, 32(1), 01–10.
- Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard WA 3rd, Tang Y (2007) Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng* 98:842–853.
- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M., Williams, P., & Pierson, L. S. (1997). N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7663–7670.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., Parsek, M. R. (2003). *Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 Pseudomonas aeruginosa biofilms. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7907–7912.
- Wu Y, Xiao S, Qi J, Gong Y, Li K (2022) *Pseudomonas fluorescens* BsEB-1: an endophytic bacterium isolated from the root of *Bletilla striata* that can promote its growth. *Plant Signaling and Behavior* 1:e2100626.
- Xin XF, Kvitko BH, He S (2018) *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328.
- Xuedong Z. & Yuqing L. (2015) Basic Biology of Oral Microbes. *Atlas of Oral Microbiology*, 1–14.

- Zdorovenko, E. L., Varbanets, L. D., Shashkov, A. S., Kiprianova, E. A., & Knirel, Y. A. (2015). *Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens UCM B-306. Carbohydrate Research, 410, 47–50.*
- Zhang, L., Chen, W., Jiang, Q., Fei, Z., & Xiao, M. (2020). Genome analysis of plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* JD37 and insights from comparasion of genomics with three *Pseudomonas* strains. *Microbiological Research, 237, 126483.*
- Zhang, Z., & Pierson, L. S. (2001). A Second Quorum-Sensing System Regulates Cell Surface Properties but Not Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology, 67(9), 4305–4315.*
- Zhao K, Tseng BS, Beckerman B, Jin F, Gibiansky ML, Harrison JJ, Luijten E, Parsek MR, Wong GCL. (2013) Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature. 16;497(7449):388-391.*