



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

Maestría en ciencias en biología experimental



Efecto de los niveles de hierro en la virulencia de *Pseudomonas chlororaphis* durante la interacción con *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones diferenciales de sacarosa.

Que presenta:

Hugo Alejandro Tinoco Tafolla

Director de tesis

D.C. Jesús Salvador López Bucio

Codirector de tesis

D.C. Homero Reyes de la Cruz

Morelia, Michoacán, diciembre 2025

Dedicatoria

A mi madre Alma Julia de la Soledad Tafolla Delgado por seguirme apoyando día con día y permitir que me siga desarrollando profesionalmente, por cuidarme y quererme siempre.

A mi padre Alejandro Tinoco Rodríguez por enseñarme el valor de las cosas, enseñarme a hacer las cosas que nadie más te enseña a hacer, a ser humilde y seguir apoyándome en esta parte de mi formación.

A mi abuela Lucila por siempre abrirme sus puertas, cuidarme y procurarme.

A Belén Bustos Gutiérrez por acompañarme, apoyarme, inspirarme y motivarme, tu apoyo siempre me motiva a hacer un poco más y tu energía a disfrutar detalles que s veces no puedo apreciar por mí mismo.

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, confiar en mí y orientarme para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jesús Salvador López Bucio por los conocimientos transmitidos a lo largo del desarrollo de este proyecto, además de seguirme brindando la confianza y asesoría para realizar este proyecto.

A mi comité sinodal por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y brindarme excelentes críticas y comentarios sobre el mismo con el fin de mejorar.

A mis amigos del laboratorio de biotecnología molecular de plantas, especialmente a Lolita, Daniela, Pepe, Saúl e Iván que vuelven el laboratorio un lugar donde se disfrute trabajar, brindarme parte de su experiencia y conocimientos y agradecer que sé que puedo contar con ellos, haciendo especial mención a Pepe que me permitió trabajar con uno de sus aislados y me enseñó a trabajarlos y con ello pude desarrollar este trabajo.

Resumen

Pseudomonas chlororaphis es una rizobacteria tradicionalmente clasificada como promotora del crecimiento vegetal debido a su capacidad para producir fitohormonas, sideróforos y metabolitos antimicrobianos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, bajo ciertas condiciones nutrimentales, esta especie puede afectar el desarrollo de *Arabidopsis* en su interacción *in vitro*.

En este trabajo se evaluó el efecto de la disponibilidad de hierro y sacarosa, sobre la interacción entre *P. chlororaphis* y *Arabidopsis thaliana*. Los resultados demostraron que, en medio suplementado con 0.6% de sacarosa, *P. chlororaphis* actúa como un patógeno, inhibiendo el desarrollo del follaje y suprimiendo la formación de raíces laterales. Este efecto se mantuvo independientemente de la disponibilidad de hierro, aunque el exceso de este micronutriente exacerbó la reducción de la ramificación radical. En contraste, en una mayor concentración de sacarosa (2.4%), la bacteria promovió la formación de raíces laterales y un crecimiento foliar comparable al de plantas no inoculadas; sin embargo, esta promoción desapareció cuando se disminuyó la disponibilidad de hierro en el medio, así como cuando fue suplementado con altas concentraciones de hierro, condición en la cual se indujo un comportamiento virulento en la bacteria. Se determinó también que las respuestas hormonales de la planta se inhiben de manera diferencial durante las interacciones en concordancia con la producción de diferentes factores de virulencia dependiendo de las concentraciones de hierro y sacarosa.

En conjunto, nuestros resultados indican que la virulencia de *P. chlororaphis* no es un rasgo fijo, sino un fenotipo dinámico regulado por la disponibilidad de nutrientes, que puede oscilar entre un promotor del crecimiento a uno patogénico, dependiendo de las concentraciones de hierro y de sacarosa. Estos hallazgos resaltan la necesidad de evaluar cuidadosamente las condiciones ambientales en las que se aplican bioinoculantes bacterianos, así como de considerar su plasticidad metabólica para garantizar su uso seguro en sistemas agrícolas.

Palabras clave: Pseudomonas, Azúcares, Fenazinas, Desarrollo de *Arabidopsis*, Defensas

Abstract

Pseudomonas chlororaphis is a rhizobacterium traditionally classified as a plant growth-promoting species due to its ability to produce phytohormones, siderophores, and antimicrobial metabolites. However, recent studies have shown that under certain nutrient conditions, this species can exhibit virulence-like behavior, negatively affecting *Arabidopsis* development in vitro.

In this study, we evaluated the effect of iron, in combination with contrasting sucrose levels, on the interaction between *P. chlororaphis* and *Arabidopsis thaliana*. Our experiments demonstrated that under 0.6% sucrose, *P. chlororaphis* behaves as a pathogen, inhibiting shoot development and suppressing lateral root formation. This effect persisted regardless of iron availability, although excess iron further exacerbated the reduction in lateral branching. In contrast, at 2.4% sucrose the bacterium promoted lateral root formation and supported shoot growth comparable to that of non-inoculated plants; however, this growth promotion disappeared when iron availability in the medium was reduced, as well as when high iron concentrations were supplied, conditions under which the bacterium displayed a virulent phenotype. We also determined that plant hormone responses are differentially inhibited during these interactions, consistent with the production of distinct bacterial virulence factors depending on iron and sucrose conditions.

Altogether, our results demonstrate that the virulence of *P. chlororaphis* is not a fixed trait but rather a dynamic phenotype regulated by nutrient availability. In this context, the behavior of *P. chlororaphis* can shift between a growth-promoting and a pathogenic state depending on iron and sucrose concentrations. This finding highlights the need to carefully evaluate the environmental conditions under which bacterial bioinoculants are applied, as well as to consider their metabolic plasticity to ensure their safe use in agricultural systems.

Índice:

1.- Introducción	1
2.-Marco teórico	2
2.1.- Interacción planta-microorganismo	2
2.2- Mecanismos de las PGPRs.....	4
2.2.1 Fitoestimulación hormonal.....	4
2.2.2.- Respuesta de defensa.....	5
2.2.3- Antagonismo.....	6
2.1.4.- Biofertilización.....	7
2.2.- <i>Pseudomonas</i> como PGPRs.....	9
2.2.1.- <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	10
2.2.2.- Sistema de quorum sensing en <i>P. chlororaphis</i>	12
2.2.3.- Virulencia de <i>P. chlororaphis</i>	13
2.3.- Nutrientes y virulencia	18
2.4.-Factores de virulencia asociados a la homeostasis del hierro	20
3. Antecedentes	21
4.- Justificación	23
5.- Hipótesis	24
6.- Objetivos	24
6.1.- Objetivos particulares.....	24
7.- Materiales y métodos	24
7.1.- Crecimiento y desarrollo de las plantas	24
7.2.- Cepa bacteriana.....	25
7.3.- Determinación histoquímica de la actividad de GUS.....	25
7.4.- Determinación histoquímica de especies reactivas de oxígeno	26
7.5.- Determinación histoquímica de hierro en tejidos vegetales por tinción perls/DAB	27
7.6.- Determinación de los factores de virulencia	27
7.6.1- Pioverdina	27
7.6.2.- Ramnolípidos.....	27
7.6.3.- Fenazinas	27
7.7.-Análisis estadístico	28
8.- Resultados	28
8.1.- El exceso de hierro modifica la respuesta de <i>A. thaliana</i> a la inoculación con <i>P. chlororaphis</i> en condiciones diferenciales de sacarosa	28

8.2.- La deficiencia de hierro modula diferencialmente la respuesta de <i>A. thaliana</i> a <i>P. chlororaphis</i> en condiciones contrastantes de sacarosa.....	32
8.3.- Los niveles diferenciales de sacarosa y hierro modifican la respuesta auxínica de <i>A. thaliana</i> durante la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	36
8.4.- Los niveles diferenciales de sacarosa y hierro modifican la respuesta de citocininas en <i>A. thaliana</i> durante la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	38
8.5.- Los niveles diferenciales de sacarosa y de hierro alteran la respuesta de defensa mediada por los ácidos salicílico y jasmónico en las plantas de <i>A. thaliana</i> en interacción con <i>P. chlororaphis</i>	40
8.6. Los niveles diferenciales de sacarosa y de hierro alteran la respuesta de especies reactivas de oxígeno en <i>A. thaliana</i> en interacción con <i>P. chlororaphis</i>	42
8.6.1. Acumulación de anión superóxido (NBT)	42
8.6.2. Acumulación de peróxido de hidrógeno (DAB)	44
8.7.- La interacción con <i>P. chlororaphis</i> en las condiciones limitantes de hierro acentúa los síntomas de deficiencia de hierro en las plantas.	46
8.8.- Efecto de los niveles de hierro sobre el desarrollo y comportamiento de <i>P. chlororaphis</i>	49
8.8.1.- Efecto del hierro sobre el crecimiento bacteriano.....	49
8.8.2.- Efecto del hierro sobre la motilidad tipo swarming.....	50
8.8.3.- Producción de factores de virulencia en las distintas condiciones de hierro y sacarosa.	51
8.8.4.- Producción de fenazinas en las distintas condiciones de hierro y sacarosa. .	53
8.8.5.- Distribución de fenazinas en raíces de <i>A. thaliana</i> durante la interacción con <i>P. chlororaphis</i> bajo condiciones diferenciales de hierro y sacarosa	54
8.8.6.- Producción y acumulación de pioverdina en las distintas condiciones de hierro y sacarosa.	56
9.- Discusión	58
10.-Conclusión.....	68
11.-Referencias:	69
12. Anexo	86

Índice de figuras:

Figura 1 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPR.....	8
Figura 2. Diversidad funcional dentro del género <i>Pseudomonas</i> y sus efectos contrastantes en las plantas.	10
Figura 3. Modulación nutricional y por metales pesados de la red de quorum sensing.	13
Figura 4. Desarrollo de <i>A. thaliana</i> en interacción con <i>P. chlororaphis</i> en distintas concentraciones de hierro (FeSO_4) y en condiciones diferenciales de sacarosa (Sac)..	30
Figura 5. Desarrollo del tejido aéreo de <i>A. thaliana</i> con <i>P. chlororaphis</i> en las distintas concentraciones de hierro y sacarosa.....	31
Figura 6. Desarrollo de <i>A. thaliana</i> en interacción con <i>P. chlororaphis</i> en distintas concentraciones de ferrozina y condiciones diferenciales de sacarosa:.....	33
Figura 7. Desarrollo del tejido aéreo de <i>A. thaliana</i> con <i>P. chlororaphis</i> en distintas concentraciones de ferrozina y sacarosa.....	34
Figura 8. Evaluación del efecto de la bacteria sobre el desarrollo de la planta a mayor tiempo de interacción.....	35
Figura 9. Respuesta auxínica en <i>A. thaliana</i> durante la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	37
Figura 10. Respuesta de citocininas en <i>A. thaliana</i> en la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	39
Figura 11. Respuesta de ácido salicílico en <i>A. thaliana</i> en la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	41
Figura 12. Respuesta de ácido jasmónico en <i>A. thaliana</i> en la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	41
Figura 13. Acumulación de anión superóxido en follaje de <i>A. thaliana</i> en la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	44
Figura 14. Acumulación de peróxido de hidrógeno en el follaje de <i>A. thaliana</i> en la interacción con <i>P. chlororaphis</i>	45
Figura 15. La interacción con <i>P. chlororaphis</i> acentúa los síntomas de deficiencia de hierro y disminuye la cantidad de hierro en los tejidos radiculares.....	48
Figura 16. Crecimiento y motilidad de tipo swarming en diferentes concentraciones de hierro y condiciones diferenciales de sacarosa.	49
Figura 17. Motilidad de tipo swarming en diferentes concentraciones de hierro.....	51
Figura 18. Producción de factores de virulencia asociados a la toma de hierro en las diferentes concentraciones de hierro y sacarosa.	52
Figura 19. Formación de cristales de fenazina-1-carboxamida en medio Kings' B en diferentes concentraciones de hierro sacarosa.	54
Figura 20. Fluorescencia de fenazinas producidas por <i>P. chlororaphis</i> en la interacción con <i>A. thaliana</i>	55
Figura 21. Fluorescencia de la pioverdina producida por <i>P. chlororaphis</i> en la interacción con <i>A. thaliana</i>	57

1.- Introducción

A medida que la población mundial aumenta, tambien lo hace la demanda de recursos vegetales, incluyendo los comestibles, lo que genera problemas importantes sobre los sistemas de producción y resulta en diversos problemas ecológicos, como la sobreexplotación de los suelos, el uso excesivo de plaguicidas y de fertilizantes, así como de recursos hídricos y la introducción de especies invasoras que afectan negativamente la biodiversidad. Para reducir o resolver estos problemas, se ha vuelto una prioridad la búsqueda de alternativas sustentables que favorezcan la productividad de los cultivos sin comprometer la salud ambiental. Entre las estrategias con mejor perspectiva, se destaca el uso de bioinoculantes, microorganismos que mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Dentro de estos microorganismos uno de los géneros que más destacan es el género *Pseudomonas*.

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas como bioinoculantes por su capacidad de mediante diversos mecanismos promover el crecimiento vegetal (Santhi & Deivasigamani, 2017). Por otro lado, este género bacteriano tambien cuenta con especies patogénicas para plantas y animales. En nuestro grupo de trabajo se reportó como una especie históricamente conocido como beneficia mostraba un fenotipo patogénico con *Arabidopsis thaliana* y como este fenotipo podía ser revertido al cambiar la sacarosa del medio de interacción (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024).

En este trabajo se busca determinar la influencia del hierro en la interacción *in vitro* entre *Arabidopsis thaliana* y *Pseudomonas chlororaphis* en diferentes concentraciones de sacarosa, una bacteria históricamente descrita como promotora del desarrollo vegetal y que incluso algunas cepas se han comercializado como bioinoculante en diversos países. Sin embargo, reportes recientes de nuestro grupo de trabajo han documentado comportamientos virulentos de *P. chlororaphis* en condiciones específicas, lo que plantea la necesidad de reevaluar su estatus como un PGPR estricto. En este estudio se propone alejar el enfoque típico de la dicotomía entre patógeno y benéfico,

buscando describir un comportamiento bacteriano dinámico, regulado por factores ambientales como el hierro y la sacarosa, que pueden modular el fenotipo de la bacteria entre comportamientos de promoción vegetal o la virulencia.

2.-Marco teórico

2.1.- Interacción planta-microorganismo

Las plantas son organismos sésiles y están ancladas a un sustrato por el largo de sus vidas, esto las vuelve especialmente susceptibles a numerosos estímulos tanto bióticos como abióticos y su supervivencia dependerá de su capacidad para adaptarse a ellos. Tradicionalmente, se han estudiado las respuestas a factores más comunes como el agua, la luz, los nutrientes o las plagas, sin embargo, cada vez se empieza a reconocer más la importancia que tiene para la supervivencia y el correcto desarrollo de las plantas la interacción con distintos microorganismos, ya sean mutualistas, comensales o patógenos. La mayoría de las interacciones biológicas más complejas se llevan a cabo en la rizosfera y estas tienen un alto impacto en el desarrollo vegetal (Bais *et al.*, 2006).

Hiltner en 1904 introduce por primera vez el término rizosfera para referirse al volumen de suelo en el que las raíces de las leguminosas interactuaban con las bacterias. Sin embargo, ese término hoy en día se ha ajustado a la zona del suelo que experimenta modificaciones químicas, físicas y biológicas derivadas de la actividad de las raíces y que puede funcionar como nicho de microorganismos (Darrah, 1993). El tamaño de la rizosfera puede variar desde un par de 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 afectan directamente el suelo al aumentar su densidad, porosidad y dureza y liberando una gran variedad de compuestos biológicamente activos denominados exudados, que pueden ser desde moléculas de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, hasta macromoléculas como polisacáridos, proteínas, lípidos, terpenos y enzimas

(Dexter, 1987; Bais *et al.*, 2006). La liberación de estos compuestos a la rizosfera es incierta y pueden variar según la edad, la especie de la planta y sus necesidades, así como la composición del suelo.

Los exudados se acumulan formando rizodepositos, los cuales representan del 5–21% de las fuentes de carbono disponible en el suelo y se estima que aproximadamente el 20% del carbono fijado es exudado por las raíces contribuyendo de manera importante a la formación de estos, la acumulación de los exudados forman los rizodepositos ricos en carbono que lo vuelven un nicho ideal para el crecimiento de diversos microorganismos benéficos (Endo y ectomicorras, bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal), así como para patógenos incluyendo nematodos, oomicetos, bacterias y hongos (Gleba *et al.*, 1999; Dakora & Phillips, 2002; Singh *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009 Baetz & Martinoia, 2014; Dakora & Phillips, 2002). Los azúcares son tan importantes en la rizosfera que la cantidad y el tipo de estos, pueden modificar la composición de las bacterias de la rizosfera. El reclutamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal le confiere, una mejora en el desarrollo de las plantas (Lopes *et al.*, 2022).

Entre los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se encuentra el grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR por sus siglas en inglés (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*). En este grupo se encuentran especies de los géneros *Bacillus*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* que pueden influenciar positivamente mediante diferentes mecanismos el desarrollo vegetal (Dorjey *et al.*, 2017; Vallejo-Ochoa *et al.*, 2017; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; Gurikar *et al.*, 2016; García-Cárdenas *et al.*, 2023).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal aumentan el rendimiento de los cultivos mediante diversos mecanismos, como la fijación de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas y la movilización o solubilización de nutrientes. Por otro lado, los mecanismos indirectos incluyen el antagonismo

frente a patógenos, la producción de enzimas líticas, la inducción de resistencia sistémica adquirida y la generación de sideróforos.

2.2- Mecanismos de las PGPRs

2.2.1 Fitoestimulación hormonal

Como se mencionó las PGPRs cuentan con diversos mecanismos de promoción del crecimiento y uno de los más importantes es la fitoestimulación que es la producción de fitohormonas o estimulación de las rutas hormonales. Entre las hormonas más relevantes se encuentran las auxinas y las citocininas, que estudios han demostrado como las PGPR pueden alterar el equilibrio de auxinas/citocininas en la rizosfera, favoreciendo el crecimiento vegetal incluso en condiciones poco favorables (Tsukanova *et al.*, 2017; Howell *et al.*, 2003; Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2022).

Las auxinas son un tipo de fitohormona esencial para el desarrollo del sistema radicular principalmente el ácido indol-3-acético (AIA) y estas pueden ser sintetizados por las plantas y por los microorganismos de la rizosfera. Su producción se activa frente a estímulos ambientales como deficiencia de nutrientes o estrés hídrico, induciendo la formación de raíces laterales y pelos radicales, incrementando el área de absorción de nutrientes y la capacidad de exploración del suelo (Himanen *et al.*, 2002; Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Las PGPR producen principalmente AIA y es parte crucial de los efectos promotores del crecimiento vegetal, promoviendo la organogénesis. Las PGPR productoras de AIA han mostrado efectos positivos en las plantas como la mejora en la arquitectura radicular, síntesis de enzimas antioxidantes y la osmoprotección; confiriéndole a las plantas la capacidad de adaptarse y sobrevivir a diferentes ambientes poco favorables (Pantoja-Guerra *et al.*, 2023).

Las citocininas son otro tipo de fitohormona derivadas de las purinas, sus principales funciones reportadas son que promueven la división celular y la diferenciación de tejidos, incluyendo la formación de brotes y raíces primarias (Ortiz-Castro *et al.*, 2009); se ha reportado que algunos géneros de PGPR cuentan con la capacidad de sintetizar y degradar citocininas, por ejemplo,

algunas especies de *Bacillus* pueden promover el desarrollo del sistema radicular por la vía de las citocininas y aumentar el contenido de clorofila (Akhtyamova *et al.*, 2023).

Las PGPRs pueden alterar otras fitohormonas como giberelinas, brasinoesteroides y el etileno que contribuyen en las interacciones con rizobacterias favoreciendo la elongación celular, la expansión foliar y la emergencia de raíces laterales bajo condiciones limitantes (Bottini *et al.*, 2004). En cuanto a brasinoesteroides, se ha visto que PGPR pueden potenciar componentes de su vía y su interacción con auxinas/citocininas, mejorando el crecimiento y la tolerancia al estrés (Vriet *et al.*, 2012), muchas PGPR poseen ACC desaminasa, que puede reducir el nivel de etileno en las raíces y así evita la inhibición del crecimiento, especialmente bajo salinidad, sequía o presencia de metales (Glick, 2014). Finalmente, las PGPR también interactúan fuertemente con las fitohormonas de defensa, el ácido salicílico y el jasmónico (Beneduzi *et al.*, 2012)

2.2.2.- Respuesta de defensa

Las plantas poseen mecanismos de defensa que se activan a distintas escalas, tanto localmente como en tejidos distantes, cuando perciben la presencia de microorganismos potencialmente dañinos. Entre las estrategias más estudiadas se encuentran la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR), principalmente asociada por la señalización del ácido salicílico (AS), y la Respuesta Sistémica Inducida (ISR), mediada sobre todo por las rutas del ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET) (Beneduzi *et al.*, 2012).

La SAR suele activarse tras percibir la infección por patógenos biotróficos y se caracteriza por la acumulación sistémica de ácido salicílico y la inducción de genes PR (Pathogenesis-Related), entre los que destacan PR1, PR2 y PR5, implicados en la resistencia de amplio espectro. Esta defensa también involucra la generación controlada de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y la deposición de callosa, mecanismos que contribuyen al reforzamiento de las paredes celulares y a la contención de la infección, evitando que el

microorganismo se propague con facilidad (Fu & Dong, 2013; Spoel & Dong, 2012).

Por otro lado, la ISR se ha establecido que es activada por microorganismos necrotróficos y mediante daño mecánico, sin embargo, también se ha visto que algunos microorganismos pueden activarla sin daño aparente. Esta respuesta se basa en la señalización del AJ y ET. A diferencia de la SAR, no implica necesariamente la acumulación directa de ácido salicílico, sino una preparación fisiológica del sistema defensivo que permite a la planta generar respuestas más rápidas y eficientes cuando se enfrenta posteriormente a un microorganismo patogénico (Van Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2000).

Se ha observado que algunas PGPR pueden activar ISR y SAR mediante la liberación de moléculas que funcionan como elicidores microbianos, entre las que se incluyen lipopéptidos cíclicos (como surfactina, fengicina e iturina), sideróforos bacterianos, polisacáridos extracelulares y compuestos orgánicos volátiles conocidos como VOCs (Bais et al., 2006; Romero et al., 2019; Conrath, 2005). Estas moléculas no siempre desencadenan una respuesta idéntica en todos los cultivos, ya que su efecto depende también del estado hormonal y nutrimental de la planta hospedera.

A diferencia de la inmunidad basal o PTI (*Pattern-Triggered Immunity*), la ISR y la SAR no tratan de eliminar directamente al patógeno, sino que preparan fisiológicamente a la planta para responder de forma más rápida, sostenida y con menor gasto energético ante un ataque por patógenos. (Mauch-Mani et al., 2017; Conrath et al., 2015).

2.2.3- Antagonismo

El antagonismo se refiere a la inhibición del crecimiento de patógenos por parte de las PGPR, reduciendo así la incidencia de infecciones. Existen los denominados mecanismos directos que es la secreción directa de moléculas que pueden causar daño directo al patógeno como la producción de enzimas hidrolíticas, como quitinasas, proteasas y lipasas, todas capaces de debilitar o degradar estructuras de la pared celular, sobre todo en hongos (Neeraja et al.,

2010; Maksimov et al., 2011), además, varias especies PGPR producen metabolitos antimicrobiano, como las fenazinas, la pioluteorina, 2,4-diacetilphloroglucinol, pirrolnitrina y ácido cianhídrico, compuestos que pueden disminuir directamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Haas & Défago, 2005; Haas, 2005).

De manera indirecta, las bacterias PGPR, compiten por el nicho de colonización especialmente las raíces y rizosfera por lo que mencionamos anteriormente de ser ricos en fuente de carbono y nutrientes críticos. Uno de los ejemplos más representativos es la producción de sideróforos bacterianos, moléculas de alta afinidad por el hierro, por ello son moléculas muy necesarias para la competencia microbiana, ya que poseen la capacidad de secuestrar Fe^{3+} del entorno volviéndolo menos accesible para otros microorganismos que dependen del hierro y no cuenten con este mecanismo o al menos no de tanta afinidad.

2.1.4.- Biofertilización

Con biofertilización nos referimos a la capacidad que tienen las PGPR para mejorar la disponibilidad de nutrientes que en condiciones normales no podrían ser asimilables por las plantas. Los microorganismos de la rizosfera son fundamentales para el ciclado de elementos como nitrógeno, fósforo y hierro, transformándolos desde formas no disponibles hacia formas asimilables por la planta (Baetz & Martinoia 2014).

El caso del nitrógeno es uno de los más estudiados, debido al impacto tan importante que tiene sobre el desarrollo de las plantas y se han descrito los mecanismos por los que algunas PGPR pueden fijarlo de la atmósfera a través de enzimas nitrogenasas capaces de fijar nitrógeno (N_2) y convertirlo en amonio (NH_4^+), forma directamente utilizable por la planta. Este proceso de fijación por bacterias aporta entre el 12 y el 70% del nitrógeno total de los tejido vegetales, especialmente en asociaciones con *Azotobacter* o *Rhizobium* (Kuan et al., 2016; Vessey, 2003).

El fósforo es un nutriente abundante en el suelo, sin embargo, mayoritariamente se encuentra formando precipitados insolubles como fosfatos de calcio o

aluminio, lo que limita en gran medida su disponibilidad. Las bacterias solubilizadoras de fosfato producen ácidos orgánicos y fosfatases que transforman estas formas insolubles en fosfato (PO_4^{3-}), químicamente asimilable por las plantas (Rodríguez & Fraga, 1999; Sashidhar & Podile, 2010).

El hierro es un micronutriente esencial y ampliamente estudiado en el desarrollo de las plantas, sin embargo, a pesar de que este suele ser muy abundante en la rizosfera, la mayor parte de las veces se encuentra como en su forma férrica (Fe^{3+}) formando complejos insolubles en suelos alcalinos o neutros y se vuelve inaccesible para las plantas provocando la problemas importantes en su crecimiento pues participa en procesos clave como la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de clorofila. Las PGPR al producir sideróforos son capaces de quelar Fe^{3+} , reducirlo a Fe^{2+} y transportarlo, facilitando su asimilación (Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Kroh *et al.*, 2020).

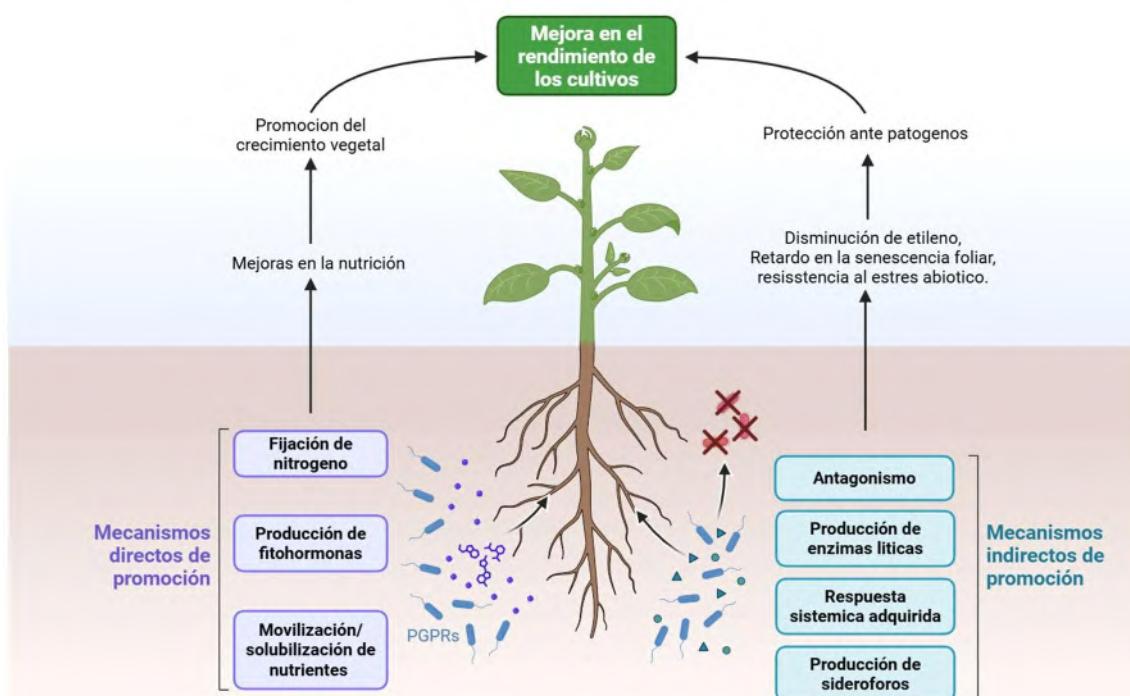


Figura 1 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPR. El diagrama muestra los principales mecanismos de promoción por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal contribuyen a mejorar el rendimiento de los cultivos. Los mecanismos directos incluyen la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas (como auxinas y citocininas) y la movilización o solubilización de nutrientes esenciales. Dentro de los mecanismos indirectos tenemos el antagonismo contra

patógenos, la secreción de enzimas líticas, la inducción de resistencia sistémica adquirida y la síntesis de sideróforos. En conjunto, estas actividades favorecen el crecimiento vegetal, mejoran la nutrición, reducen el impacto del estrés biótico y abiótico contribuyendo con una mejora en el rendimiento de los cultivos. Diagrama modificado de Ehinmitan *et al.*, 2024.

2.2.- *Pseudomonas* como PGPRs

El género *Pseudomonas* ha sido estudiado ampliamente tanto por sus características patogénicas como por la promoción del crecimiento vegetal, de hecho, es uno de los géneros más reportados como PGPR. Los bacilos gramnegativos, aerobios y móviles del género *Pseudomonas* tienen una elevada versatilidad metabólica y son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono y energía, incluyendo hidrocarburos, compuestos aromáticos complejos y contaminantes ambientales por lo que también son muy estudiadas como agentes de biorremediación (Palleroni, 2010; Santhi & Deivasigamani, 2017). Adicionalmente, tienen capacidad de sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios como: fenazinas, sideróforos, lipopéptidos y enzimas extracelulares lo que les confiere una capacidad de formar interacciones complejas con muchos organismos y por lo que están ampliamente distribuidos en prácticamente todos los ecosistemas, incluyendo suelo, agua, rizosfera, organismos vegetales y animales (Green *et al.*, 1974).

Dentro de este género, encontramos un grupo más específico denominado *Pseudomonas* fluorescentes que como su nombre sugiere tiene la capacidad de producir un compuesto fluorescente denominado pioverdina y que es su sideróforo principal en este grupo encontramos a *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas aeruginosa*, (Sutra *et al.*, 1997; Dorjey *et al.*, 2017). Las especies, *P. aeruginosa* y *P. syringae* se han descrito tradicionalmente como patógenas oportunistas de humanos o plantas, respectivamente (Lyczak *et al.*, 2000; Xin *et al.*, 2018). En contraste, las especies *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. chlororaphis* se han establecido como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, capaces de mejorar la germinación, el desarrollo radicular y la resistencia a enfermedades (Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020).

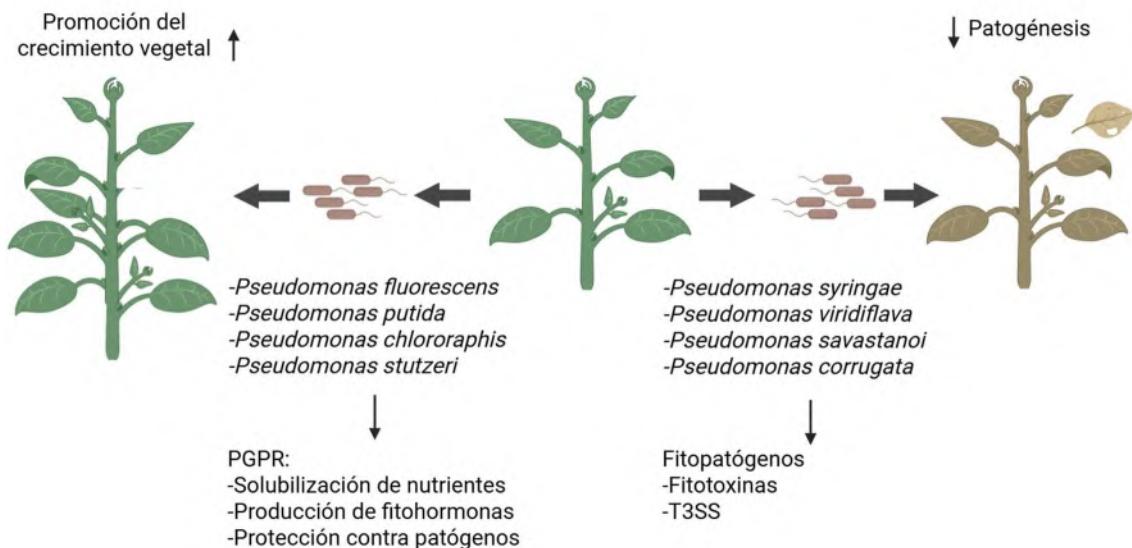


Figura 2. Diversidad dentro del género *Pseudomonas* y sus efectos contrastantes en las plantas. El esquema ilustra la diversidad de especies de *Pseudomonas* con efectos benéficos y patogénicos sobre las plantas. A la izquierda se muestran especies rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* y *P. stutzeri*, las cuales favorecen el desarrollo de la planta mediante la solubilización de nutrientes, la producción de fitohormonas y la protección frente a patógenos. Mientras que, a la derecha se representan especies fitopatógenas clásicas, como *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. savastanoi* y *P. corrugata*, caracterizadas por la producción de fitotoxinas, la secreción de efectores a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) y la manipulación hormonal del hospedero. Diagrama realizado por el autor.

2.2.1.- *Pseudomonas chlororaphis*

Pseudomonas chlororaphis es una especie que está comúnmente asociada a la rizosfera de numerosas plantas. Diversas cepas han mostrado una capacidad sobresaliente tanto para promover el crecimiento vegetal como para ejercer actividad de biocontrol, lo que la convierte en microorganismos de alto interés biotecnológico (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001; Arrebola *et al.*, 2019; Anand *et al.*, 2020).

En términos de fitoestimulación, *P. chlororaphis* puede modular el desarrollo vegetal mediante la producción de AIA y citocininas, así como por la liberación de una gran variedad de compuestos difusible. Además, desempeña funciones de solubilización de nutrientes y de inducción de resistencia en las plantas hospederas. Se ha reportado en diferentes trabajos que *P. chlororaphis* tiene la

capacidad de sintetizar diferentes metabolitos como pioverdina, fenazinas, pirrolnitrina, HCN y VOCs que pueden favorecer la absorción de nutrientes, la mejora de la arquitectura radicular, además de la activación de respuestas de defensa en la planta (Biessy *et al.*, 2019; Teiba *et al.*, 2023). Muchos de estos compuestos han despertó mucho interés en el sector agrícola, tanto es así que múltiples cepas de *P. chlororaphis* ya han sido utilizadas bioinoculantes, formulados con la intención de mejorar el rendimiento de cultivos sin provocar efectos adversos, como ejemplo tenemos un estudio en trigo con la cepa YB-10 mostró efecto promotor tanto por la producción de auxinas y sideróforos como la inhibición del patógeno *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, junto con un aumento en la biomasa de las plántulas (Zhou *et al.*, 2022).

Si bien *P. chlororaphis* ha sido estudiada como PGPR, un estudio reciente ha demostrado que el comportamiento de *P. chlororaphis* no es exclusivamente benéfico. López-Hernández (2023) reportó evidencia de patogenicidad de dos cepas *P. chlororaphis* en *A. thaliana*. Posteriormente, otros resultados recientes mostraron que la virulencia observada en *P. chlororaphis* podía ser influenciada por la disponibilidad de azúcares, en donde las concentraciones bajas de sacarosa en el medio de interacción presentaban el efecto patogénico donde se observaron follajes enfermos y una inhibición total del desarrollo del sistema radicular. Sin embargo, al aumentar las concentraciones de sacarosa hasta 2.4% el efecto cambia por uno menos virulento, se determinó que esta pérdida de virulencia era causada por una disminución importante en la producción de fenazinas en la bacteria y estimular la respuesta auxínica. (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024).

Estos hallazgos confirman que algunas cepas de *P. chlororaphis* pueden comportarse como patógenas en interacción con *A. thaliana*, y que esta ocurría mediante la producción de factores de virulencia como las fenazinas, si bien estas fueron las que se pudieron determinar en el trabajo, no se descarta que otros factores de virulencia estuvieran participando en la virulencia, factores que, al igual que en *P. aeruginosa* son regulados por el sistema de quorum sensing (QS).

2.2.2.- Sistema de quorum sensing en *P. chlororaphis*

El quorum sensing es un sistema que permite medir la densidad poblacional de las bacterias a través de la síntesis de un autoinductor en el caso de *Pseudomonas* las N-acil homoserina lactonas. En el caso de *P. chlororaphis*, al igual que en otras *Pseudomonas*, incluyendo especies patógenas, se han descrito diferentes sistemas de QS organizados de manera complementaria un sistema principal, el sistema PhzI/PhzR (Peng *et al.*, 2018). PhzI sintetiza AHLs de cadena corta, como N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL), una molécula señal, que, al acumularse, se unen a su receptor PhzR. Este complejo activa la transcripción del operón *phz*, responsable de la biosíntesis de fenazinas (Wood *et al.*, 1997; Pierson & Pierson, 2010). Otro sistema, el CsaI/CsaR actúa como regulador secundario, sintetizando AHLs de cadena corta como butanoil-HSL (C4-HSL), y su detección regula la formación de biopelículas, la motilidad bacteriana y la colonización de la rizosfera (Zhang & Pierson, 2001).

La evidencia nos muestra que PhzI/PhzR es el sistema principal de QS y que es funcionalmente similar al sistema LasI/LasR de *P. aeruginosa*, mientras que CsaI/CsaR exhibe homología funcional con el sistema RhII/RhIR y está más asociado con la supervivencia y la colonización (Zhang & Pierson, 2001). Esta similitud no solo es estructural, sino también funcional: en *P. aeruginosa*, el sistema Las controla la producción de elastasas y exotoxinas, mientras que en *P. chlororaphis*, el sistema Phz controla la producción de fenazinas, sideróforos y enzimas hidrolíticas (Peng *et al.*, 2018). Por otro lado, el sistema Rhl en *P. aeruginosa* regula la producción de rhamnolípidos y biopelículas, lo que determina su capacidad de colonización y competencia en el hospedero o ambiente, en el caso de *P. chlororaphis* el sistema Csa es un sistema homólogo al Rhl sin embargo este no ha sido estudiado a profundidad, sin embargo, se podría inferir que tiene funciones similares sobre los factores que comparten estas dos bacterias. En ambos casos, el sistema principal (Phz o Las) pueden regular la expresión del sistema secundario (Csa o Rhl), estableciendo una jerarquía de señalización que controla la producción de metabolitos secundarios. Un matiz importante es que, si bien en *P. chlororaphis* no se consideran sistemas

fuertemente jerárquicos como en *P. aeruginosa* y que inclusive algunos autores los consideran directamente no jerárquicos, el sistema Phz puede regular negativamente al sistema Csa y a demás utilizar los propios autoinductores del sistema secundario a su favor y así regular la expresión factores de virulencia y estrategias de supervivencia (Morohoshi *et al.*, 2013; Lee & Zhang, 2015; Venturi, 2005).

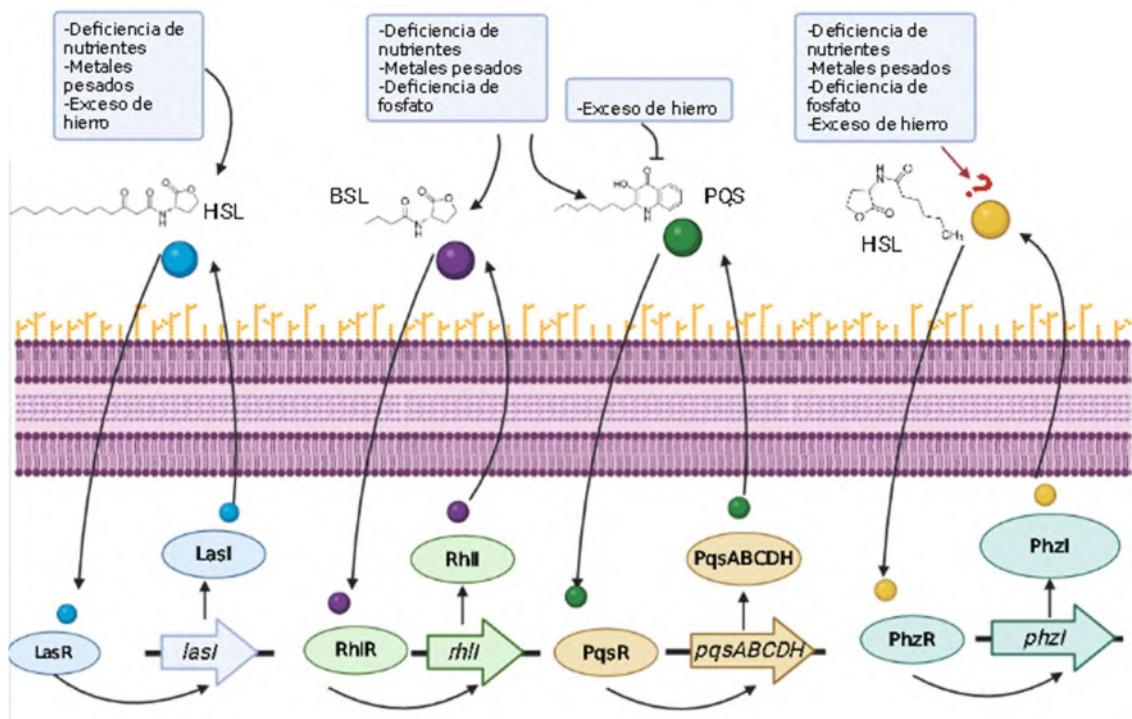


Figura 3. Modulación del quorum sensing por condiciones ambientales. En *P. aeruginosa* se pueden ver modulados los sistemas de quorum sensing LasI/LasR, RhII/RhIR y PQS/PqsR condiciones de estrés ambiental como la deficiencia de nutrientes, la presencia de metales pesados, la limitación de fosfato y la disponibilidad de hierro, y finalmente modulando la producción de factores de virulencia. En los sistemas de *P. chlororaphis* como PhzI/PhzR que regulan principalmente la biosíntesis de fenazinas, por más que tengan similitudes a los de *P. aeruginosa* aún no se ha descrito una regulación directa por nutrientes o hierro. Diagrama hecho por el autor basado en los trabajos de Moradali *et al.*, (2017) y Matilla *et al.*, (2022).

2.2.3.- Virulencia de *P. chlororaphis*

2.2.3.1.-Factores de virulencia estructurales

Estos corresponden a componentes que ayudan en la colonización, la adhesión, la evasión del sistema inmune vegetal y el establecimiento de biopelículas. Aunque tradicionalmente se han estudiado en bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, se ha demostrado que *P. chlororaphis* posee homologías genéticas

y funcionales en estos sistemas, lo que permite la síntesis de una amplia variedad de factores de virulencia (Shen *et al.*, 2013).

Son moléculas incrustadas en la membrana, conformadas por una porción glicolipídica, 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 *P. chlororaphis*, si bien no se ha estudiado a profundidad se ha asociado que pueden la inducir resistencia sistémica en plantas (Zdorovenko *et al.*, 2015).

El flagelo bacteriano permite la motilidad del tipo *swimming* y es esencial para la colonización inicial de las raíces (Chevance *et al.*, 2008). En *P. chlororaphis*, el flagelo actúa como sensor quimiotáctico que permite el movimiento dirigido hacia gradientes de nutrientes o de exudados radicales (Bouteiller *et al.*, 2021). Además, puede funcionar como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), activando respuestas inmunes en las plantas.

Los pili son estructuras proteicas delgadas utilizadas para la adhesión a superficies bióticas y abióticas, y son determinantes en la colonización de la rizosfera y en el establecimiento de biopelículas (Ajijah *et al.*, 2023). En *P. chlororaphis* se han descrito pilis tipo IV y se sugiere que le permiten colonización en la rizosfera (Shen *et al.*, 2013). El alginato es un exopolisacárido viscoso que forma parte de la matriz extracelular de la biopelícula. En *P. aeruginosa*, actúa como factor antifagocítico y protector frente al estrés ambiental (Rehman & Rehm, 2013). En *P. chlororaphis*, su producción se ha relacionado con la colonización de raíces y la estabilidad de la biopelícula, lo que favorece tanto interacciones mutualistas como oportunistas (Heredia-Ponce *et al.*, 2020).

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). Aunque ampliamente estudiados en *P. aeruginosa*, se ha identificado el operón *psl* en *P. chlororaphis*,

sugiriendo un mecanismo conservado de colonización (Heredia-Ponce *et al.*, 2020).

La biopelícula representa una forma multicelular organizada que confiere resistencia a condiciones adversas y facilita la cooperación bacteriana (Sutherland, 2001). En *Pseudomonas*, su formación está regulada por el quorum sensing y modulada por la disponibilidad de hierro y otros nutrientes. La presencia de biopelícula en *P. chlororaphis* refuerza su capacidad para persistir en la rizosfera y para alterar la respuesta inmune vegetal.

2.2.3.2.- Factores de virulencia excretados

Las bacterias del género *Pseudomonas* producen una variedad de metabolitos secundarios que han sido tradicionalmente clasificados como compuestos antimicrobianos implicados en el biocontrol. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que muchos de estos metabolitos también cumplen funciones típicas de factores de virulencia en bacterias patógenas, incluyendo la alteración redox del ambiente del hospedero, la inducción de estrés oxidativo y la facilitación de la adquisición de hierro. Entre los principales compuestos destacan el ácido cianhídrico (HCN), las fenazinas y los ramnolípidos. Estos compuestos son secretados activamente al medio y participan en la competencia microbiana, la adquisición de nutrientes o el impacto directo sobre el hospedero.

El ácido cianhídrico es un metabolito volátil producido por diversas bacterias del género *Pseudomonas* y ha sido ampliamente reconocido como un factor de virulencia debido a su capacidad para interferir con la respiración celular. El HCN inhibe la citocromo c oxidasa y otras metaloproteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones, lo que conduce a una interrupción del metabolismo energético en células eucariotas (Goldfarb & Margraf, 1967; Blier *et al.*, 2012). En *P. aeruginosa*, la biosíntesis de HCN está regulada por el sistema de quorum sensing RhI/RhlR y se activa principalmente bajo condiciones de microaerofilia o estrés oxidativo, donde actúa como un mecanismo de competencia interespecífica y como toxina durante la infección de tejidos en mamíferos (Ryall *et al.*, 2008). Este compuesto se acumula en infecciones pulmonares crónicas,

como en pacientes con fibrosis quística, donde contribuye al daño tisular y a la persistencia de la biopelícula (Chowdhury *et al.*, 2016).

En el caso de *P. chlororaphis*, diversos estudios han demostrado su capacidad para producir HCN, no solo como compuesto contra hongos y nematodos, sino también como posible factor de virulencia en interacciones planta-bacteria. Nandi (2015) y Jain & Pandey (2016) reportaron que la producción de HCN por *P. chlororaphis* contribuye a la muerte de *Caenorhabditis elegans*, demostrando que este metabolito puede afectar organismos eucariotas. La presencia del operón hcnABC en el genoma de *P. chlororaphis* confirma la conservación genética de esta ruta biosintética con *P. aeruginosa*, lo que sugiere un papel potencial en interacciones tanto mutualistas como patogénicas dependiendo del ambiente.

Las fenazinas son metabolitos secundarios nitrogenados pertenecientes a un extenso grupo de compuestos heterocíclicos con más de cien estructuras naturales descritas, producidas principalmente por bacterias del género *Pseudomonas* (Arrebola *et al.*, 2019). Constituyen el segundo grupo de metabolitos secundarios más abundante en este género y cumplen múltiples funciones ecológicas, incluyendo la inhibición de hongos fitopatógenos, la adquisición de hierro y la competencia microbiana. En ausencia o limitación de sideróforos, las bacterias pueden recurrir a las fenazinas como mediadores redox para la captación de hierro. Bajo condiciones aeróbicas, compuestos como la piocianina (PYO) y el ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) actúan como transportadores de electrones, reduciendo el ion férrico (Fe^{3+}) a su forma ferrosa (Fe^{2+}), más soluble y biodisponible para la célula bacteriana (Wang *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2023). Esta capacidad confiere una ventaja competitiva, especialmente en entornos de baja disponibilidad de hierro, como la rizosfera. Adicionalmente, las fenazinas están asociadas a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que puede generar daño en células vegetales y animales (Mavrodi *et al.*, 2006).

En *P. aeruginosa*, la piocianina ha sido descrita como un factor de virulencia clave debido a su capacidad de alterar el equilibrio redox celular e inducir estrés oxidativo en el hospedero (Marrez & Haitham, 2020). *P. chlororaphis* produce una gran variedad de fenazinas principalmente fenazina-1-carboxílico (PCA), ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico (2OH-PCA), fenazina-1-carboxamida (PCN) y 2-hidroxifenazina (2-OHPHZ) (Pierson & Thomashow, 1992; Chin-A-Woeng *et al.*, 1998). Aunque estos compuestos han sido ampliamente estudiados por su actividad antifúngica, estudios recientes (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024; Ortiz-Castro *et al.*, 2014) sugieren que, bajo ciertas condiciones pueden tener efectos adversos en plantas.

Los ramnolípidos son biosurfactantes anfipáticos formados por uno o dos residuos de ramnosa enlazados a β -hidroxi ácidos grasos. Fueron descritos inicialmente en *P. aeruginosa* (Lang & Wullbrandt, 1999), donde desempeñan un papel clave en la virulencia, la motilidad superficial (swarming) y la formación de biopelículas (Davey *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2007). Además de sus funciones estructurales, los ramnolípidos participan activamente en la homeostasis del hierro. Se ha observado que su producción se incrementa bajo condiciones de limitación de hierro, facilitando la adquisición de este micronutriente al modificar la tensión superficial y promover la liberación de hierro unido a compuestos orgánicos (Glick *et al.*, 2010). En *P. aeruginosa*, la producción de ramnolípidos está regulada por el sistema RhII/RhIR de quorum sensing, el cual responde a señales jerárquicas activadas por el sistema maestro LasI/LasR. En *P. chlororaphis*, Gunther (2005) reportó por primera vez la producción de mono-ramnolípidos. Posteriormente, Solaiman *et al.* (2015) identificaron la presencia del gen rhIC, homólogo al de *P. aeruginosa*, permitiendo la síntesis de di-ramnolípidos. Aunque se producen en menores cantidades, su presencia confirma que *P. chlororaphis* posee la maquinaria genética asociada a este factor de virulencia importante.

Pseudomonas produce sideróforos, moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad por el hierro que quelan este metal del ambiente y lo transportan hacia el interior celular (Cornelis & Matthijs, 2002). La pioverdina es considerada un

factor de virulencia en *P. aeruginosa*, debido a su capacidad para secuestrar hierro en el hospedero animal y vegetal, privando a las células de este elemento indispensable (Lamont *et al.*, 2002). Además del papel en la virulencia, los sideróforos contribuyen a la promoción del crecimiento vegetal al aumentar la disponibilidad de hierro en la rizosfera y al suprimir microorganismos competidores que no poseen la misma capacidad de captación. Esto demuestra que los sideróforos no son inherentemente patogénicos, sino que forman parte de un mecanismo ecológico de competencia cuyo resultado dependerá de las condiciones ambientales y del hospedero.

2.3.- Nutrientes y virulencia

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que forma parte estructural de los aminoácidos, ácidos nucleicos, cofactores y pigmentos secundarios. En *P. aeruginosa*, la asimilación de nitrógeno está finamente regulada por un conjunto de sistemas de transporte y señalización que le permiten adaptarse a entornos donde este nutriente es limitado, como el interior de los tejidos vegetales o animales (Wenner *et al.*, 2013). Los principales mecanismos incluyen la captación de amonio mediante AmtB, la reducción de nitrato y nitrito a amonio a través de las enzimas Nar/Nir/Nas, y la regulación global del metabolismo del nitrógeno mediante el sistema NtrB/NtrC (Leigh & Dodsworth, 2007). Además, *P. aeruginosa* emplea un sistema fosfotransferasa especializado denominado PTS^{Ntr}, que coordina la utilización de fuentes nitrogenadas con la expresión de genes de virulencia y quorum sensing (Lacal *et al.*, 2023). Este sistema puede modular la transcripción de *lasI*, *rhII* y *phzM*, afectando la producción de ramnolípidos, fenazinas y cianuro de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, también se induce el ARN regulador NrsZ, que activa la motilidad y la formación de biopelículas mediante el control postranscripcional de genes de superficie (Kambara *et al.*, 2018). En conjunto, la homeostasis del nitrógeno en *Pseudomonas* no solo garantiza la supervivencia y la eficiencia metabólica, sino que también funciona como una señal de estrés

ambiental que desencadena la activación de vías de virulencia, comunicación intercelular y colonización de huéspedes.

El fosfato inorgánico (Pi) es otro nutriente esencial para las bacterias *Pseudomonas*, ya que participa en la estructura del ADN, ARN, fosfolípidos y moléculas energéticas como el ATP. A pesar de su abundancia geológica, el Pi suele encontrarse en formas poco disponibles, especialmente en suelos neutros o alcalinos donde precipita como sales insolubles. Para superar esta limitación, *Pseudomonas* ha desarrollado un complejo sistema de control que incluye los genes *phoB*, *phoR* y el transportador de alta afinidad PstSCAB, los cuales se activan bajo condiciones de escasez de fosfato (Santos-Beneit, 2015; Hsieh & Wanner, 2010). En *P. aeruginosa*, la activación de PhoB-PhoR no solo incrementa la expresión de fosfatases y enzimas solubilizadoras, sino que también induce una reprogramación metabólica asociada con la virulencia: se incrementa la producción de piocianina, elastinas, proteasas y moléculas de quorum sensing, mientras que se estimula la formación de biopelícula. La restricción de fosfato se ha descrito como una señal ambiental que potencia el estado patogénico de *P. aeruginosa*, ya que la activación de PhoB puede modular directamente reguladores de virulencia como *lasR* y *rhlR* (Lamarche et al., 2008; Bains et al., 2012; Chekabab et al., 2014)). Además, bajo condiciones de Pi limitante, se promueve la competencia de sideróforos y el comportamiento antagonista frente a otras bacterias, lo que refuerza su capacidad de colonizar nichos pobres en nutrientes. Por tanto, el fosfato actúa simultáneamente como nutriente esencial y como señal reguladora que coordina las estrategias de supervivencia, biocontrol y virulencia en *Pseudomonas*.

Asimismo, cómo se mencionó anteriormente, los sideróforos son moléculas altamente especializadas en la captación de hierro pues este es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos debido a su participación en procesos redox fundamentales. En bacterias, el hierro es necesario para la respiración, el metabolismo energético, la síntesis de ADN y ARN, la fijación de nitrógeno, la producción de ATP y la defensa contra especies reactivas de oxígeno (Messenger & Barclay, 1983; Butt & Thomas, 2017). La

deficiencia de hierro puede provocar inhibición del crecimiento celular, alteraciones en la morfología bacteriana, disminución de la síntesis de ácidos nucleicos y reducción de la viabilidad celular. Aunque el hierro es abundante en la corteza terrestre, su forma predominante en ambientes aeróbicos y a pH neutro-alcalino es el ion férrico (Fe^{3+}), el cual es prácticamente insoluble. Esta situación ha generado una fuerte presión selectiva para que las bacterias desarrollen mecanismos especializados para adquirir hierro del entorno. Como resultado, el hierro no solo es un nutriente esencial, sino también un determinante central del comportamiento bacteriano, actuando como señal molecular que coordina la expresión de genes asociados tanto a la supervivencia como a la virulencia (Santos *et al.*, 2020; Lemos & Balado, 2020).

2.4.-Factores de virulencia asociados a la homeostasis del hierro

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular producidos por bacterias bajo condiciones de limitación de hierro. Estos quelantes presentan alta afinidad por el Fe^{3+} , formando complejos estables que son reconocidos por receptores específicos en la membrana externa, transportados al periplasma e internalizados al citoplasma, donde el hierro es reducido a Fe^{2+} para su utilización metabólica (Schalk, 2008; Khasheii *et al.*, 2021). Aunque los sideróforos son el mecanismo principal de captación de hierro, diversas bacterias han desarrollado estrategias alternativas o complementarias para adquirir este elemento en ambientes competitivos, especialmente cuando el hierro está secuestrado por el hospedero. Estas estrategias incluyen:

Las fenazinas pueden actuar como mediadores redox, reduciendo Fe^{3+} a Fe^{2+} y facilitando su solubilidad y su transporte (Sousa *et al.*, 2023). Además, como ya se mencionó anteriormente, generan EROs que pueden dañar células vegetales, actuando como factores de virulencia.

Los rammolípidos facilitan la movilización del hierro al alterar la tensión superficial y liberar hierro unido a compuestos orgánicos, además de promover la movilidad de tipo swarming que permite la exploración para la obtención del recurso, la producción de rammolípidos está regulada por este metal lo cual nos habla de

una regulación fina entre el nutriente y el metabolito (Glick *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020).

En *P. aeruginosa*, se ha demostrado que la disponibilidad de hierro controla directamente la expresión de múltiples factores de virulencia. Por ejemplo, bajo condiciones de limitación de hierro, se activa el regulador global Fur (*Ferric uptake regulator*), lo que induce la expresión de sideróforos como la pioverdina y la pioquelina, además de potenciar la producción de fenazinas y rammolípidos (Visca *et al.*, 2022; Imperi *et al.*, 2019).

3. Antecedentes

Históricamente, *P. chlororaphis* ha sido descrita como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), debido a su capacidad para sintetizar fitohormonas, sideróforos y metabolitos antimicrobianos con actividad de biocontrol, sin embargo, estudios recientes han demostrado efectos patogénicos sobre *Arabidopsis thaliana*; López-Hernández *et al.* (2023) muestran por primera vez que ciertas cepas de *P. chlororaphis* llegan a generar síntomas de patogenicidad en plántulas de *A. thaliana*, adicionalmente diversos estudios han observado que la disponibilidad de nutrientes pueden afectar de manera importante la producción de factores de virulencia. Nuestro grupo mostró un efecto patogénico de *P. chlororaphis* sobre *A. thaliana* dependiente de los niveles de sacarosa en el medio de interacción, altas concentraciones de sacarosa en el medio de interacción disminuyeron la virulencia de la bacteria al disminuir la síntesis de fenazinas e inducir promoción del crecimiento por activación la señalización auxínica y la ramificación del sistema radicular, promoviendo el crecimiento de *A. thaliana* (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024).

Diversos estudios realizados en *Pseudomonas chlororaphis* han revelado que su genoma comparte homologías con genes presentes en especies del mismo género que tienen un perfil ecológico más amplio o diverso, como *P. aeruginosa*, reconocida por su notable versatilidad en la interacción con múltiples organismos hospedadores. Entre los genes homólogos identificados se encuentran, por ejemplo, algunos relacionados con la biosíntesis de metabolitos como fenazinas,

ramnolípidos y ácido cianhídrico (HCN); otros incluyen componentes estructurales vinculados a la movilidad y colonización como flagelos y pili, así como genes involucrados en la formación de biopelículas y en la producción de exopolisacáridos tipo psl (Venturi, 2005; Gross & Loper, 2009).

Aunque en bacterias rizosféricas estas rutas genéticas suelen asociarse a mecanismos de antagonismo frente a fitopatógenos, la similitud observada abre el cuestionamiento si, estos mismos sistemas podrían también dar a *P. chlororaphis* la capacidad de modificar el comportamiento por uno más virulento cuando el ambiente lo permita.

En *Pseudomonas aeruginosa*, la disponibilidad de hierro no solo influye en el metabolismo, sino que también puede funcionar como un regulador múltiple con impacto en sistemas de comunicación intercelular, como el quorum sensing. Cuando el hierro es limitado, algunos mecanismos de virulencia se activan de forma acelerada, incluyendo la producción de sideróforos, la redirección del metabolismo hacia la competencia nutrimental y la activación de vías clásicas de quorum sensing (Lamont et al., 2002; Lamont, 2005; Oglesby et al., 2008).

Cuando el hierro está presente en exceso, podrían ocurrir efectos fisiológicos para la bacteria como la producción de metabolitos relacionados a la homeostasis del hierro. Partiendo de lo que se sabe en otras especies, es razonable que en *P. chlororaphis* las condiciones de exceso de hierro combinadas con niveles contrastantes de carbono como la sacarosa podrían modificar la regulación de sus sistemas propios de quorum sensing (por ejemplo, PhzI/PhzR y CsaI/CsaR), con un impacto directo en la producción de metabolitos asociados a la virulencia, como fenazinas y ramnolípidos (Venturi, 2005; Zhang et al., 2020).

Lo llamativo es que, aunque existen investigaciones sobre estos mecanismos de regulación por nutrientes, no existe, hasta donde sabemos, ningún estudio que analice el efecto combinado hierro carbono en sistemas in vitro durante una interacción directa con plantas, ni mucho menos que explore cómo reacciona el sistema cuando ambos organismos reciben cambios nutrimetales al mismo

tiempo. Esta ausencia de información no es un hueco menor es un vacío de investigación y abre una oportunidad científica clara para aportar información nueva.

Además, algo que tampoco se ha examinado es si las respuestas del sistema cambian cuando la modificación de los nutrientes se hace de forma simultánea tanto en la planta como en la bacteria, lo que sugiere que el contexto interaccional podría no ser siempre la suma directa de las respuestas individuales. Podría ser distinto, incluso. De ahí que este estudio no solo busque describir un efecto nutrimental aislado, sino comprender cómo responde el sistema completo cuando el ambiente se modifica drásticamente.

4.- Justificación

P. chlororaphis ha sido descrita como una bacteria promotora del crecimiento vegetal. Sin embargo, estudios recientes de nuestro grupo de trabajo demuestran un comportamiento como patógeno sobre *A. thaliana*; sin embargo, esta podía revertirse al modificar las concentraciones de sacarosa en el medio de interacción. Diversos estudios han demostrado que, además de la sacarosa, la disponibilidad de otros nutrientes influencia la producción de factores de virulencia en bacterias del género *Pseudomonas*; uno de ellos es el hierro. En *P. aeruginosa*, el hierro afecta tanto los sistemas de quorum sensing como la producción de diversos metabolitos que alteran el comportamiento bacteriano, incluyendo la interacción con otros organismos. Sin embargo, no existe información sobre la influencia del hierro durante la interacción entre *P. chlororaphis* y *A. thaliana*, por lo que es de nuestro interés profundizar en el efecto de diferentes concentraciones de hierro en condiciones diferenciales de sacarosa durante dicha interacción. El conocimiento generado podría utilizarse para gestionar las condiciones ambientales durante la aplicación de bioinoculantes bacterianos en plantas de interés agronómico.

5.- Hipótesis

La disponibilidad de hierro y sacarosa modula la virulencia de *P. chlororaphis* y su impacto sobre el crecimiento de *A. thaliana*.

6.- Objetivos

Caracterizar el efecto de diferentes concentraciones de hierro y sacarosa en la virulencia de *P. chlororaphis* durante su interacción con *A. thaliana*.

6.1.- Objetivos particulares

- 1) Caracterizar las respuestas del desarrollo de *A. thaliana* en su interacción con *P. chlororaphis* en diferentes concentraciones de hierro y sacarosa.
- 2) Evaluar la respuesta de auxinas y citocininas en *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*, en diferentes concentraciones de hierro y sacarosa.
- 3) Evaluar la respuesta de ácido salicílico y jasmónico, además de la generación de especies reactivas de oxígeno en *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis* en diferentes concentraciones de hierro y sacarosa.
- 4) Analizar la producción de factores de virulencia en *P. chlororaphis* bajo diferentes concentraciones de hierro y sacarosa.

7.- Materiales y métodos

7.1.- Crecimiento y desarrollo de las plantas

Para los experimentos se utilizaron semillas de *A. thaliana* de tipo silvestre Col-0 y las líneas transgénicas: PR-1::GUS, LOX2::GUS (Ulmasov *et al.*, 1997). Las semillas de *A. 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 fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad.

A los siete días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a placas con medio fresco MS 0.2X con diferente disponibilidad de hierro (suplementado con 25 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM de sulfato ferroso), así como en carencia de hierro inducida por la suplementación del quelante ferrozina en concentración de 50 µM, 100 µM y 200 µM, tanto en presencia o ausencia de una estría de *P. chlororaphis*, realizada con un asa bacteriológica calibrada a 1 µL con un 10 µL de un cultivo homogéneo de *P. chlororaphis*, la cual se obtuvo 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

7.2.- Cepa bacteriana

La cepa de *P. chlororaphis* que se utilizará en este estudio fue proporcionada por el laboratorio de biología del desarrollo vegetal del instituto de investigaciones químico-biológicas de la Universidad Michoacana de san Nicolas de Hidalgo. Las bacterias fueron aisladas de un bosque de Pino/Encino cercano a la comunidad de Ajuno, Michoacán. La cepa fue llamada *P. 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 *P. chlororaphis* subsp. aureofaciens NBRC 3521, estas fueron aisladas y caracterizadas en el trabajo de Lopéz-Hernandez *et al.*, 2023.

7.3.- Determinación histoquímica de la actividad de GUS

Se utilizaron las líneas transgénicas de *A. thaliana* DR5::GUS, ARR5::GUS, PR1::GUS y LOX2::GUS que responden a las rutas hormonales de auxinas, citocininas, 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 K4 Fe(CN)6 y 2 mM K3 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 mantuvieron 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).

7.4.- Determinación histoquímica de especies reactivas de oxígeno

La detección de O₂^{•-} se realizó basado en el trabajo de Ramel *et al.* (2009). Las plántulas de 7 días de interacción con la bacteria se sumergieron en una solución de tinción de 1 mg/ml de Nitro blue tetrazolium (NBT) (N6495-Invitrogen) en tampón de fosfato de potasio (10 mM), con NaN₃ (10 mM), las plántulas teñidas se hirvieron en una solución de ácido acético: glicerol: etanol (1:1:3, v/v/v) durante 15 min a 80° C. Finalmente las muestras se almacenaron en etanol al 95 % (v/v) hasta el escaneo. El O₂^{•-} se visualizó como un color azul producido por la reducción de NBT a formazán. El color azul que es proporcional a la cantidad de ERO totales.

Para la detección de H₂O₂, se utilizó el agente diaminobencidina (DAB) (D8001-5G, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml. Este se disolvió en H₂O y se ajustó a pH 3,8 con HCl. La solución DAB se preparó el día del análisis para evitar la autooxidación. Las plántulas de 7 días de interacción con la bacteria se sumergieron en la solución durante 2-3 horas. A continuación, las plántulas teñidas se hirvieron en una solución de ácido acético: glicerol: etanol (1:1:3, v/v/v) durante 10 min y luego se almacenaron en etanol al 95 % (v/v) hasta el escaneo. El peróxido de hidrógeno se visualizó como un color marrón debido a la polimerización DAB, que es directamente proporcional a la cantidad de H₂O₂ (Ramel *et al.*, 2009).

7.5.- Determinación histoquímica de hierro en tejidos vegetales por tinción perls/DAB

La acumulación de hierro férrico (Fe^{3+}) en los tejidos de *A. thaliana* se evaluó mediante la tinción Perls/DAB. Las plántulas se incubaron por 30 min en una solución Perls compuesta por ferrocianuro potásico al 4% y ácido clorhídrico al 4% (1:1). Las muestras se incubaron durante 15 min en una solución de diaminobencidina (DAB, 0.025% en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5) suplementada con H_2O_2 al 0.03%, lo que permitió amplificar la reacción y generar un precipitado marrón insoluble indicativo de depósitos de hierro férrico (Vargas & Roschzttardtz, 2023). Finalmente, las raíces se lavaron con agua destilada y se montaron en portaobjetos para su documentación mediante microscopía de luz.

7.6.- Determinación de los factores de virulencia

A partir de las placas de interacción se cortó con bisturí la zona de interacción y se separaron los sobrenadantes con una microfibra de nylon mediante centrifugación a 13000 rpm en una centrifuga Thermo scientific ST 16R con un rotor Thermo scientific FiberLite F15-6x100y, para obtener el sobrenadante libre de células.

7.6.1- Pioverdina

Se cuantificó la pioverdina directamente sobre las placas de MS en interacción, las fotografías se obtuvieron mediante Chemidoc MP con fuente de emisión epi-blue un tiempo de exposición de 0.1 segundos y un filtro de 530 nm; una vez obtenidas las imágenes se realizó la cuantificación por fluorescencia en el software imageJ.

7.6.2.- Ramnolípidos

Se utilizaron los sobrenadantes libres de células de *P. chlororaphis* para cuantificar ramnolípidos utilizando el método orcinol-ramnosa, basado en una curva estándar de ramnosa que mide la absorbancia a 421 nm en un espectrofotómetro (Wang *et al.*, 2007).

7.6.3.- Fenazinas

Se utilizaron los sobrenadantes libres de células obtenidos de *P. chlororaphis*; se añadió 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se

dejó en reposo hasta la separación completa de fases. La fase inferior (orgánica), correspondiente al cloroformo, fue recuperada y evaporada. El residuo seco se resuspendió en un mililitro de metanol absoluto para su análisis espectrofotométrico. La cuantificación de PCA se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis, midiendo la absorbancia a 368 nm en celdas de cuarzo, utilizando como referencia el coeficiente de extinción molar en metanol reportado por Jayatilake *et al.* (1996), con un valor de $\epsilon = 3,020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

7.7.-Análisis estadístico

Los datos globales de todos los experimentos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPadSoftware Inc.). Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas post hoc de Tukey para determinar las diferencias estadísticas de los tratamientos.

8.- Resultados

8.1.- El exceso de hierro modifica la respuesta de *A. thaliana* a la inoculación con *P. chlororaphis* en condiciones diferenciales de sacarosa
De manera reciente nuestro grupo de trabajo demostró la importancia de la sacarosa durante la interacción de *Arabidopsis* con *P. chlororaphis* (Tinoco-

Tafolla *et al.*, 2024), en este sentido el desarrollo de *Arabidopsis* que se compromete durante la interacción con *P. chlororaphis* bajo condiciones de 0.6 % de sacarosa en comparación con las plantas no inoculadas (Fig. 4A, G, M; Fig. 5A, G y M), disminuye cuando se incrementa la concentración de sacarosa de 0.6% a 2.4%, particularmente el follaje de la planta se desarrolla de manera similar al de las plantas no inoculadas y se induce la formación de raíces laterales (Fig. 4D, J, N; Fig. 5D, J, N).

Para evaluar la influencia del hierro sobre la virulencia de *P. chlororaphis*, se analizaron ambas condiciones de sacarosa en el medio MS 0.2 X suplementado con 25 μ M de sulfato ferroso (FeSO_4) como control, así como con 100 y 200 μ M de FeSO_4 como exceso de hierro. Las respuestas fenotípicas muestran que bajo condiciones de 0.6% de sacarosa la suplementación de hierro induce la ramificación de la raíz de las plantas no inoculadas (Fig. 4A-C, M), mientras que en la interacción con *P. chlororaphis*, el exceso de hierro disminuye la formación de raíces laterales (Fig. 4G-I, M).

Bajo condiciones de 2.4% de sacarosa, la adición de hierro promueve el crecimiento de la raíz primaria en plantas no inoculadas (Fig. 4D-F). De manera interesante, la suplementación de 100 y 200 μ M de FeSO_4 restauró y estatus inhibitorio de *P. chlororaphis* sobre *Arabidopsis* al disminuir la formación de raíces laterales (Fig. 4J-L, N).

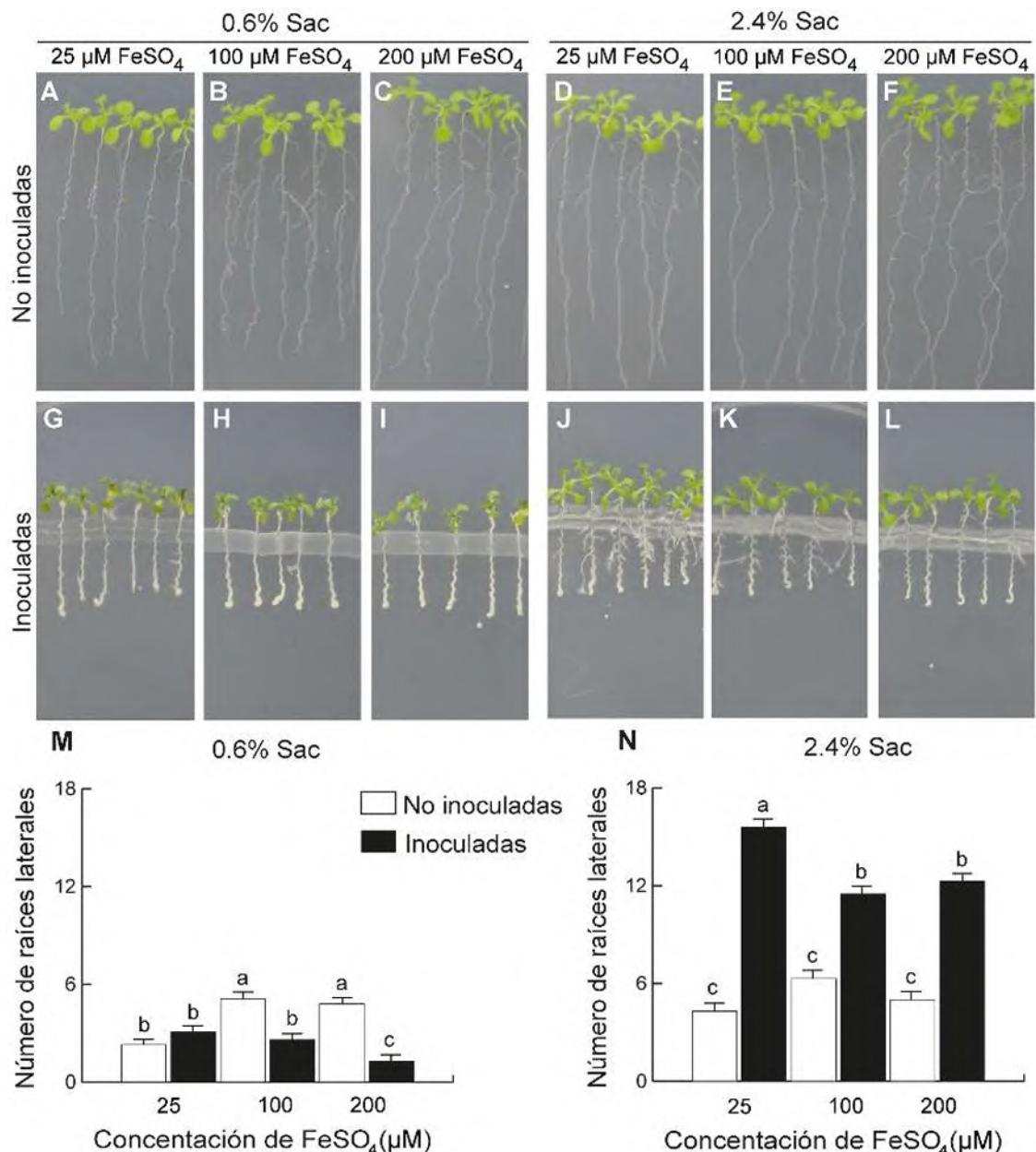


Figura 4. Desarrollo de *A. thaliana* en interacción con *P. chlororaphis* en distintas concentraciones de hierro (FeSO₄) y sacarosa (Sac). Se muestran imágenes representativas del desarrollo de *A. thaliana* en distintas concentraciones de hierro y sacarosa (A-F), además de su interacción con *P. chlororaphis* en las mismas condiciones (G-L). Las gráficas muestran los promedios ± EE de la producción de raíces laterales en condiciones diferenciales de sacarosa y de hierro (M, N). n = 18 plántulas en 3 experimentos diferentes. Las letras indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA de una vía, seguido de un análisis post hoc de Tukey ($P \leq 0,05$).

La inhibición del desarrollo del follaje de *Arabidopsis* en interacción con *P. chlororaphis* en comparación con las plantas no inoculadas, no cambia al incrementar el contenido de hierro en las condiciones de 0.6 % de sacarosa (Fig.

5A-C, G-I, M). Pero de manera similar a como ocurre en el desarrollo del sistema radicular, el exceso de hierro inhibe el desarrollo del follaje de las plantas de *Arabidopsis* en interacción con *P. chlororaphis* en condiciones de 2.4% de sacarosa (Fig. 5D-F, J-L, N). Estos resultados demuestran la flexibilidad represora-inductora de *P. chlororaphis* sobre el desarrollo de la planta al percibir los niveles de nutrientes en el medio de interacción, posiblemente por la inducción de mecanismos de competencia por los nutrientes.

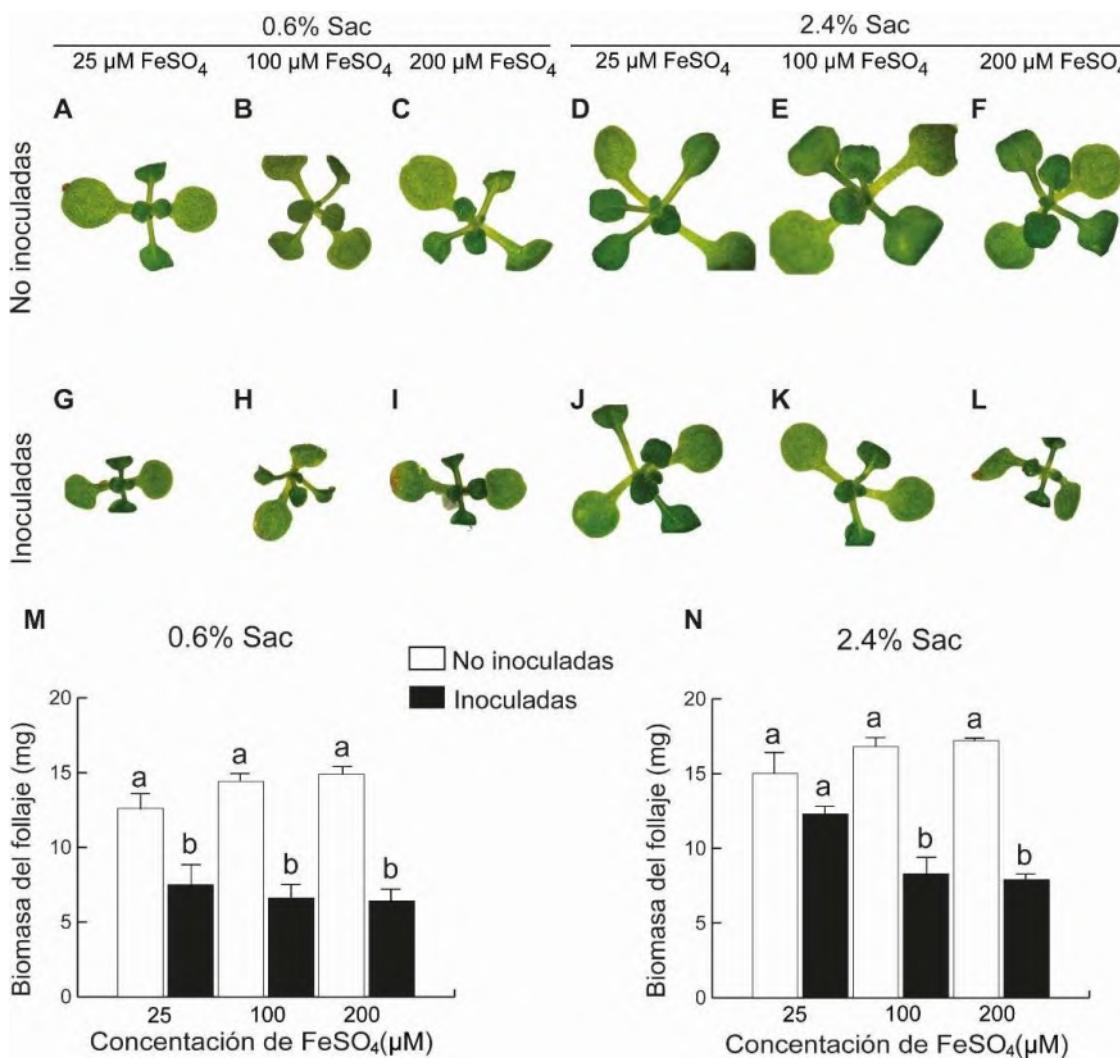


Figura 5. Desarrollo del tejido aéreo de *A. thaliana* con *P. chlororaphis* en las distintas concentraciones de hierro y sacarosa: Se muestran imágenes representativas del follaje de *A. thaliana* en las distintas concentraciones de hierro y sacarosa (A-F), además del desarrollo durante la interacción en las mismas condiciones de hierro y sacarosa (G-I), finalmente se muestran las gráficas del peso fresco del follaje en la concentración de 0.6% de sacarosa (M) y en 2.4% de sacarosa (N).

8.2.- La deficiencia de hierro modula diferencialmente la respuesta de *A. thaliana* a *P. chlororaphis* en condiciones contrastantes de sacarosa

Para determinar si la limitación de hierro afecta la virulencia de *P. chlororaphis*, se evaluó el desarrollo de *A. thaliana* en medio MS 0.2X suplementado con 0, 100 y 200 µM de ferrozina, un agente quelante de hierro. Los ensayos se realizaron en condiciones de 0.6% (efecto virulento de la bacteria) y 2.4% de sacarosa (efecto promotor del crecimiento), tanto en plantas inoculadas como no inoculadas.

En las plantas no inoculadas bajo condiciones de 0.6% de sacarosa, la suplementación de ferrozina no generó diferencias significativas en el desarrollo del sistema radicular (Fig. 6A–C, M). Sin embargo, se observó un ligero efecto visual de clorosis en concentraciones elevadas del quelante, consistente con la reducción del hierro biodisponible. En plantas inoculadas, no se observaron diferencias en comparación con la condición control (Fig. 6G–I, M); esto indica que la bacteria no modificó su comportamiento virulento en condiciones de baja sacarosa ante la disminución de hierro. Por su parte, en condiciones de 2.4% de sacarosa la promoción de raíces laterales inducida por *P. chlororaphis* disminuyó consistentemente cuando se adicionó ferrozina al medio (Fig. 6J–L, N).

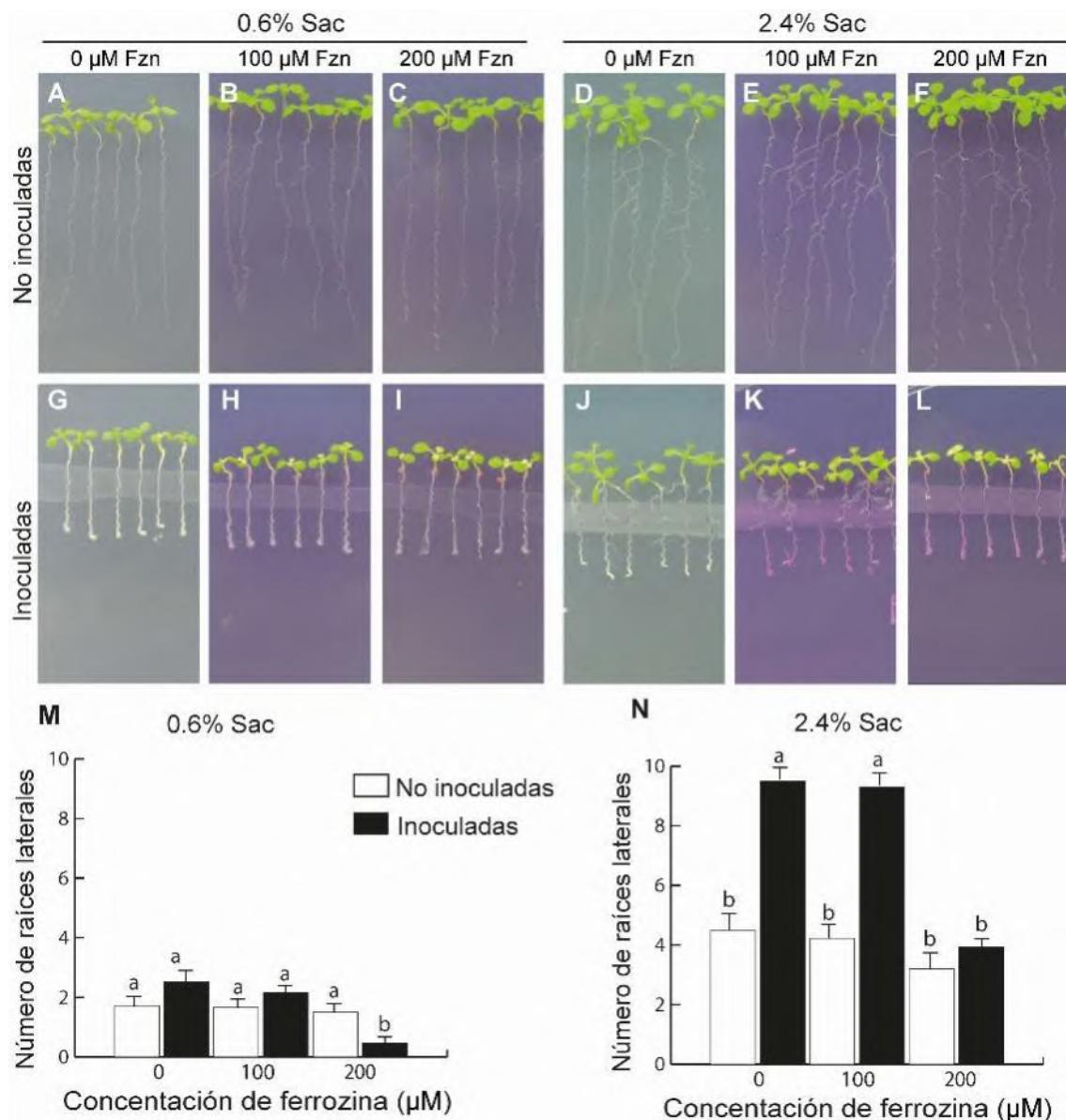


Figura 6. Desarrollo de *A. thaliana* en interacción con *P. chlororaphis* en distintas concentraciones de ferrozina y condiciones diferenciales de sacarosa: Se muestran imágenes representativas del desarrollo de *A. thaliana* en distintas concentraciones de ferrozina y sacarosa (A-F); además de su interacción con *P. chlororaphis* en las mismas condiciones (G-L); finalmente se muestran gráficas sobre la producción de raíces laterales en ambas condiciones (M, N). Las barras representan la media ± 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 ($P \leq 0,05$).

Análisis detallados del follaje de plantas en las diferentes condiciones de crecimiento e interacción muestran que la ferrozina induce clorosis en las plantas creciendo en 0.6% de sacarosa en condiciones axénicas (Fig. 7A-C), este efecto

de clorosis se exacerbaba en las plantas inoculadas con *P. chlororaphis*, sin modificar la producción de biomasa (Fig. 7G-I, M). En las condiciones de 2.4% de sacarosa, las plantas no inoculadas mostraron síntomas leves de clorosis a concentraciones elevadas de ferrozina (Fig. 7D-F). Finalmente, las plantas inoculadas con *P. chlororaphis* en ausencia de ferrozina en condiciones de 2.4 % de sacarosa, muestran follajes sanos comparables con las plantas no inoculadas(Fig. 7J, N). Sin embargo, ante condiciones limitantes de hierro por la adición de ferrozina, la bacteria inhibe el desarrollo foliar tanto como en las concentraciones de 0.6% de sacarosa (Fig. 7K, L, N).

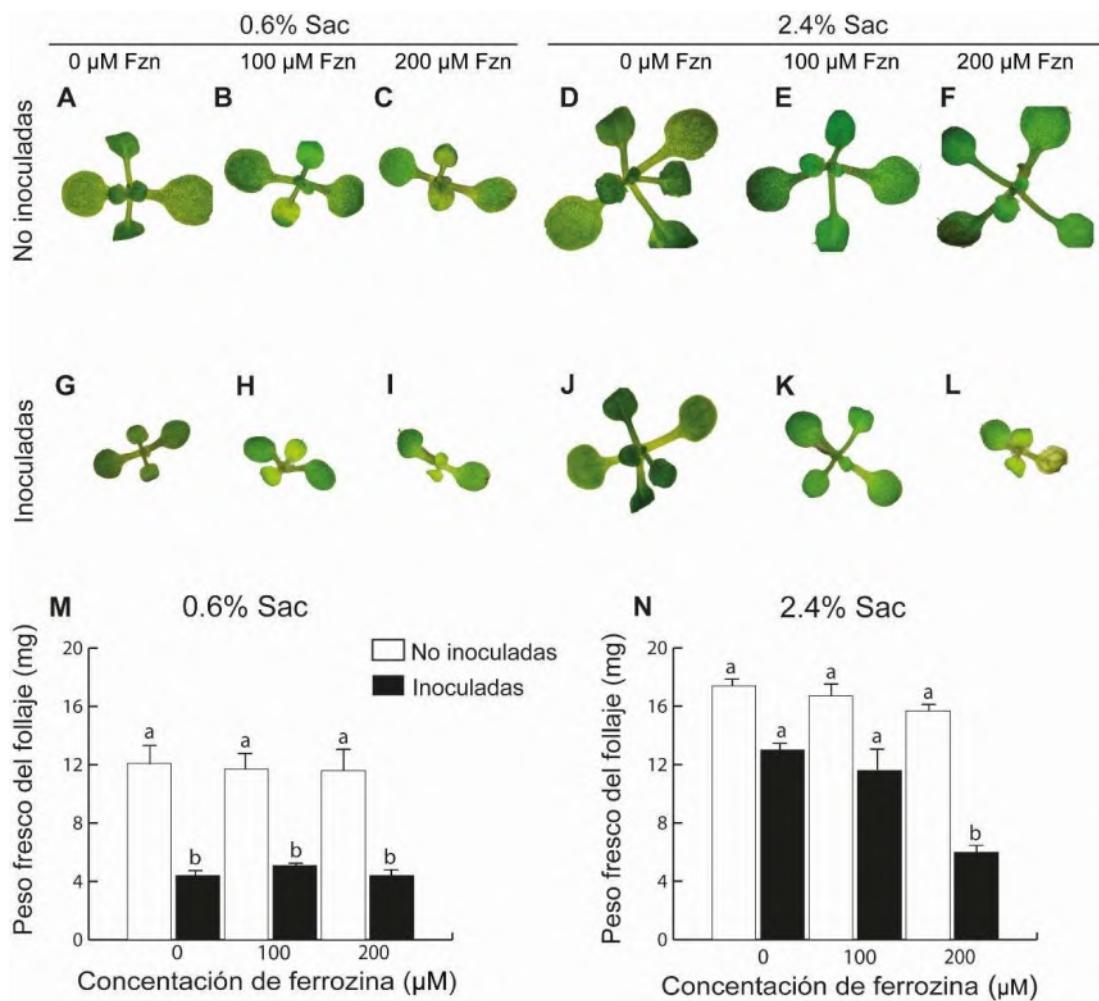


Figura 7. Desarrollo del tejido aéreo de *A. thaliana* con *P. chlororaphis* en distintas concentraciones de ferrozina y sacarosa. Se muestran imágenes representativas del follaje de *A. thaliana* en las distintas concentraciones de ferrozina y sacarosa (A-F). Además del desarrollo durante la interacción en las mismas condiciones de hierro y sacarosa (G-L); finalmente se muestran gráficas del peso fresco del follaje en la concentración de 0.6% de sacarosa (M) y en 2.4% de sacarosa (N), Las barras

representan la media ± 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 de Tukey ($P < 0,05$).

Adicionalmente, se analizó la interacción de *Arabidopsis* con *P. chlororaphis* bajo condiciones diferenciales de sacarosa y hierro en tiempos prolongados, donde se confirma la fuerte influencia del hierro en la virulencia de la bacteria sobre la planta. En condiciones de 0.6 % de sacarosa, la bacteria inhibe el desarrollo total de la planta en las diferentes condiciones de hierro (Fig. 8A-C). Mientras que en condiciones de 2.4% de sacarosa, donde la bacteria induce el desarrollo del sistema radicular y del follaje (Fig. 8D), el comportamiento bacteriano es revertido cuando se modifican los niveles de hierro, particularmente incrementándolo (Fig. 8D-E, G-H). En la condición de deficiencia de hierro, si bien el crecimiento se inhibió, los síntomas de daño fueron menos pronunciados y predominó la clorosis, sugiriendo una alteración fisiológica distinta a la observada bajo exceso de hierro (Fig. 8F).

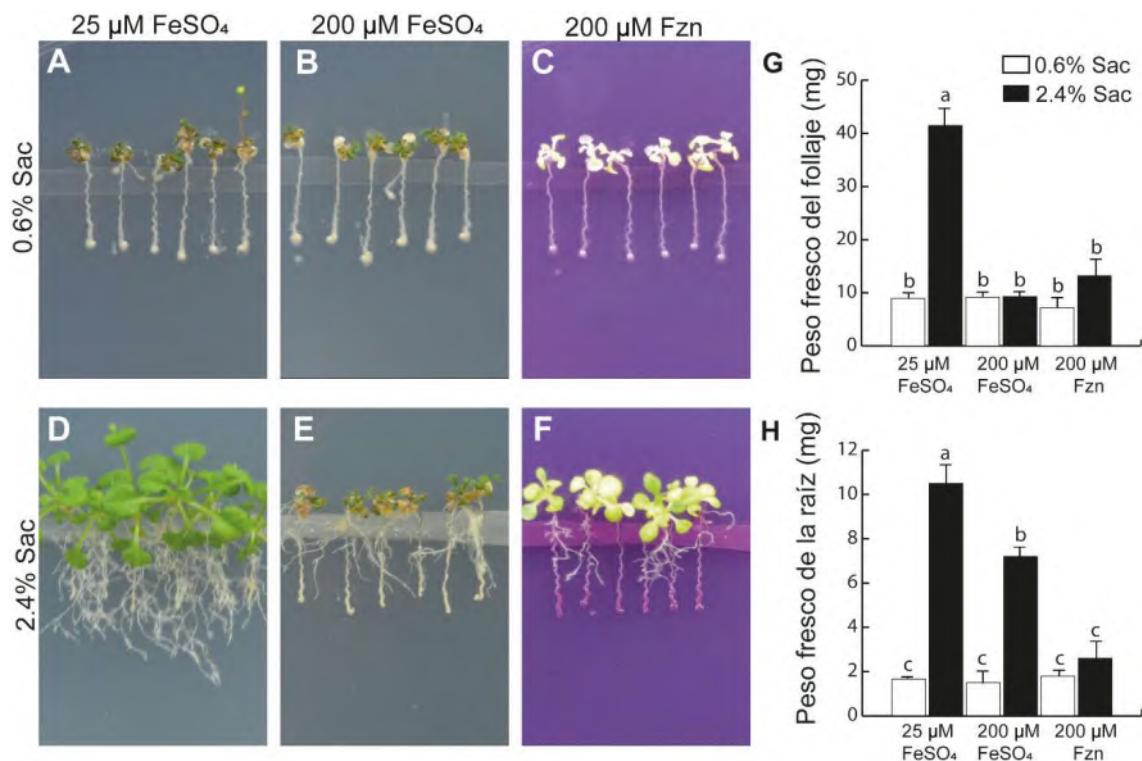


Figura 8. Evaluación del efecto de la bacteria sobre el desarrollo de la planta a mayor tiempo de interacción. Efecto de condiciones contrastantes de hierro y ferrozina en plántulas de *A. thaliana* 21 días después de la inoculación en las condiciones de 0.6% de sacarosa (A-C) y 2.4% sacarosa (D-F) inoculadas con *P. chlororaphis*.

Adicionalmente, se muestra una gráfica del peso fresco del follaje (G) y de la raíz (H). Las barras representan la media ± 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 de Tukey ($P < 0,05$).

8.3.– Los niveles diferenciales de sacarosa y hierro modifican la respuesta auxínica de *A. thaliana* durante la interacción con *P. chlororaphis*

Nuestros resultados previos demostraron que la promoción del crecimiento inducida por *P. chlororaphis* se correlaciona con un aumento en la señal auxínica, evidenciado por una coloración azul del tejido, producto del incremento en la expresión del gen reportero DR5::GUS y un incremento en la actividad de la β -glucoronidasa (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024). Dicho incremento en la señalización auxínica se produjo en condiciones de baja virulencia, en las que la bacteria actuaba como promotora del crecimiento. Para determinar cómo los niveles de sacarosa y hierro modulan esta respuesta hormonal, analizamos la actividad del gen reportero DR5::GUS en plantas no inoculadas e inoculadas cultivadas en 0.6% y 2.4% de sacarosa, además de las diferentes concentraciones de hierro.

En plantas no inoculadas cultivadas con 0.6% de sacarosa (Fig. 9A–C, G–I), la actividad auxínica fue baja y se restringió principalmente al ápice radicular, consistente con el patrón típico de señalización en condiciones normales de desarrollo. De manera similar, en 2.4% de sacarosa no se observó mayor activación de DR5::GUS (Fig. 9D–F, J–L). La ausencia de señal en la región media de la raíz se considera fisiológicamente esperada, dado que estas zonas no presentan acumulación basal de auxinas en condiciones estándar de crecimiento. En plantas inoculadas cultivadas con 0.6% de sacarosa (Fig. 9M–O, S–U), el patrón DR5::GUS fue indetectable en la raíz y follaje (FIG. 9N–O, T–U), lo cual coincide con la fuerte inhibición del desarrollo radicular descrita previamente.

En contraste, en plantas inoculadas cultivadas con 2.4% de sacarosa (Fig. 9P–R, V–X), se observó un comportamiento diferencial. Bajo la condición control

(Fig. 9P, V), la señal de *DR5::GUS* se detectó en la zona de elongación y en primordios de raíces laterales, coincidiendo con el efecto promotor del crecimiento característico de condiciones de menor virulencia. También el exceso de hierro indujo una señal auxínica a lo largo de la raíz a pesar de su fenotipo patogénico (Fig. 9Q, W). Esta inducción nos explica por qué, en análisis a tiempos más largos se observa ramificación, a pesar de que los follajes están completamente inhibidos. Por el contrario, en las condiciones de deficiencia de hierro, la señal auxínica disminuye drásticamente, correlacionándose con la pérdida casi total de la arquitectura radicular descrita en los análisis morfológicos (Fig. 9R, X).

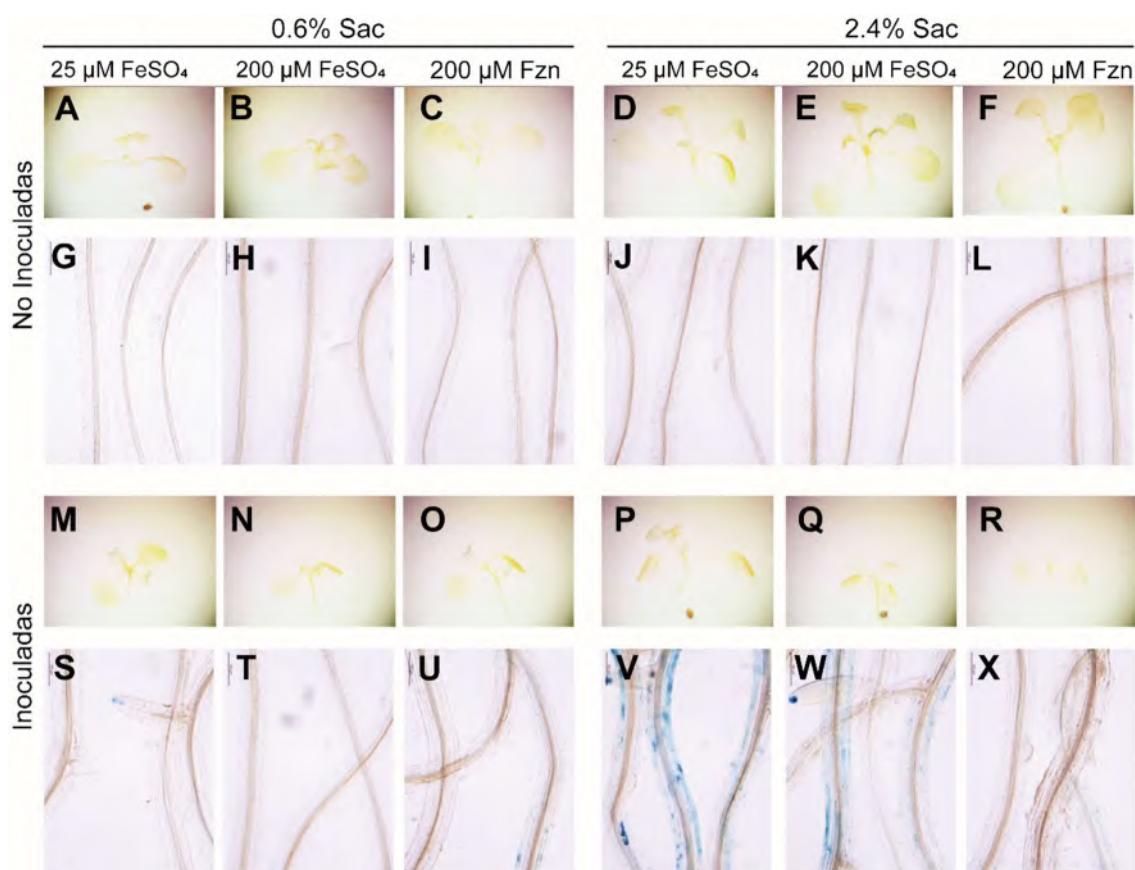


Figura 9. Respuesta auxínica en *A. thaliana* durante la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la respuesta auxínica a través del marcador *DR5::GUS* en plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C, G-I, M-O, S-U) e inoculadas (D-F, J-K, P-R, V-X),

8.4.– Los niveles diferenciales de sacarosa y hierro modifican la respuesta de citocininas en *A. thaliana* durante la interacción con *P. chlororaphis*

Con el fin de determinar si los efectos en el desarrollo de *Arabidopsis* por *P. chlororaphis* se relacionaban también con la regulación de la vía de las citocininas, se empleó la línea reportera *ARR5::GUS*.

Las plantas no inoculadas, creciendo en 0.6% de sacarosa tienen una expresión de *ARR5::GUS* restringida al meristemo apical radicular, patrón consistente con condiciones normales de desarrollo (Fig. 10A–C, G–I), mientras que el exceso de hierro incrementó ligeramente la señal (Fig. 10B, H). En contraste, en las condiciones de deficiencia de hierro se reduce la expresión del marcador (Fig. 12C, I), indicando una supresión de la actividad de las citocininas asociada al estrés por limitación de hierro.

Las plantas no inoculadas creciendo en 2.4% de sacarosa se observó un incremento general en la señal *ARR5::GUS*, particularmente bajo exceso de hierro (Fig. 10E, K), lo que sugiere un ambiente fisiológico favorable para el crecimiento, el cual se reduce cuando hay limitación de hierro en concordancia con la disminución de la expresión de *ARR5::GUS* (Fig. 10F, L), esto, es consistente con la clorosis y el menor vigor observados en estas plantas.

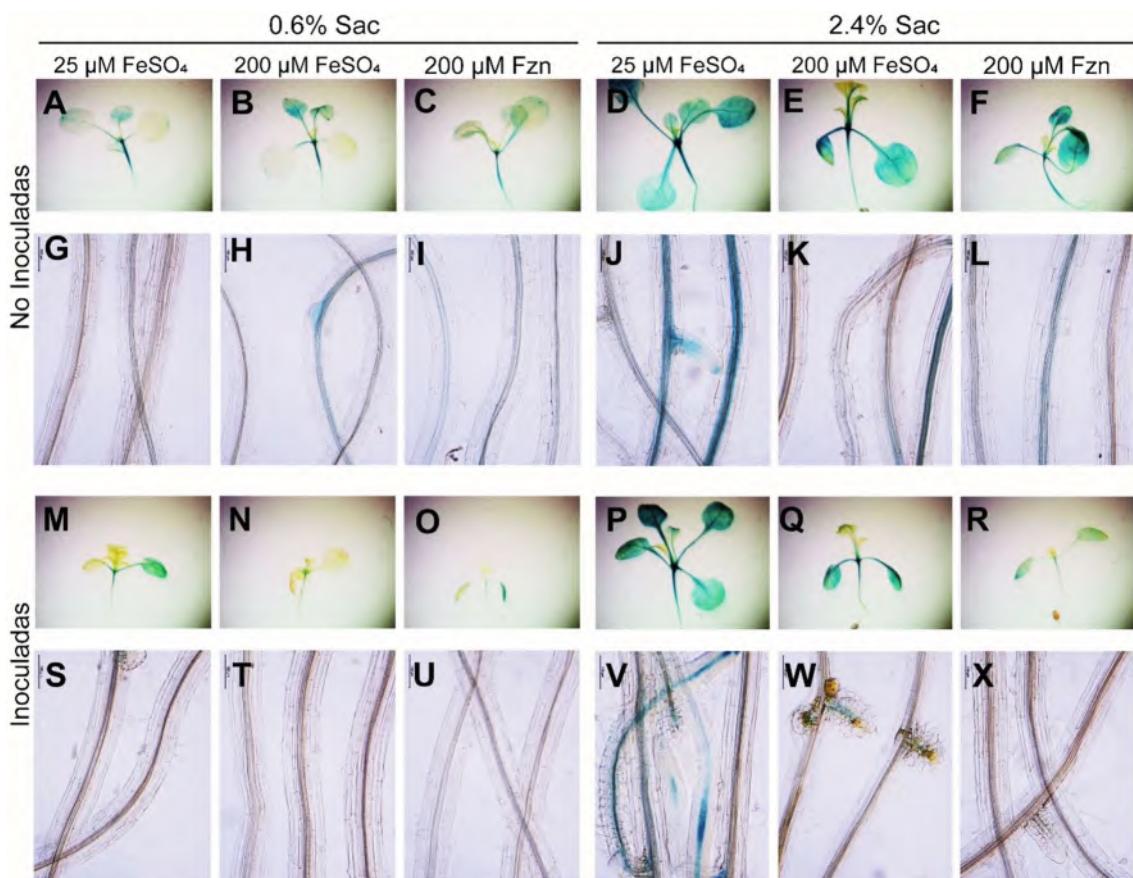


Figura 10. Respuesta de citocininas en *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la respuesta a citocininas a través del marcador *ARR5::GUS* en plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina, en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C, G-I) e inoculadas (M-O, S-U) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (D-F, J-K) e inoculadas (P-R, V-X),

Las plantas inoculadas creciendo en condiciones de 0.6% de sacarosa, la señal de *ARR5::GUS* disminuyó de manera notable en todos los tratamientos, incluyendo el control (Fig. 10M–O, S–U). Esta supresión generalizada sugiere que *P. chlororaphis* reduce la actividad de las citocininas como parte de su efecto inhibitorio en condiciones donde la bacteria presenta alta virulencia. La disminución fue aún más marcada bajo exceso de hierro (Fig. 12N–O, T–U), coincidiendo con el fenotipo de fuerte inhibición radicular descrito previamente.

En las plantas inoculadas cultivadas con 2.4% de sacarosa, en el tratamiento control se observó una activación alta del reportero comparado con su control (Fig. 10P, V), coherente con el efecto promotor del crecimiento, característico de *P. chlororaphis* bajo estos niveles de sacarosa. Sin embargo, el

exceso de hierro redujo la señal *ARR5::GUS* en los tejidos foliares y radiculares (Fig. 10Q, W), concordando con el retorno del estado virulento de la bacteria y la disminución del desarrollo foliar. De manera similar, la deficiencia de hierro (Fig. 10R, X) produjo una reducción drástica de la señalización por citocininas, consistente con un cambio de *P. chlororaphis* hacia un comportamiento más competitivo con *A. thaliana* y es consistente con mayor impacto negativo sobre la arquitectura de la planta y crecimiento del follaje; la marcada disminución de la señalización por citocininas observada durante la interacción con *P. chlororaphis* bajo condiciones de alta virulencia coincide con patrones reportados de microorganismos patógenos, los cuales suprimen vías hormonales clave para comprometer la integridad meristemática y favorecer su establecimiento (Li *et al.*, 2021).

8.5.- Los niveles diferenciales de sacarosa y de hierro alteran la respuesta de defensa mediada por los ácidos salicílico y jasmónico en las plantas de *A. thaliana* en interacción con *P. chlororaphis*

Para evaluar si los cambios en la en el desarrollo de *Arabidopsis* interaccionando con *P. chlororaphis* observados están asociados con la activación de rutas hormonales de defensa en la planta, se utilizaron líneas *PR1::GUS* y *LOX2::GUS* reporteras de las vías del ácido salicílico y del ácido jasmónico, respectivamente.

En las plantas no inoculadas no se detectó la expresión de ninguno de los reporteros, lo que demuestra que, ni el hierro, ni la sacarosa inducen de manera directa estas vías de defensa (Fig. 11A–F, Fig. 12 A-F). Sin embargo, en las plantas inoculadas y cultivadas con 0.6% de sacarosa, la vía del SA mostró una inducción fuerte bajo la condición control, la cual tendió a aumentar ligeramente bajo exceso de hierro mientras que la deficiencia de hierro redujo de manera marcada la señal (Fig. 11G–I). En las condiciones de 2.4% de sacarosa, la expresión de PR1 se detecta tanto en el control como en el exceso de hierro, mientras que la condición con deficiencia de hierro la señal es muy baja (Fig. 11J-L). Este patrón sugiere que, aun en condiciones donde *P. chlororaphis* actúa como promotor del crecimiento, la vía del SA permanece activa, descartando la posibilidad de una inhibición por la activación de esta vía.

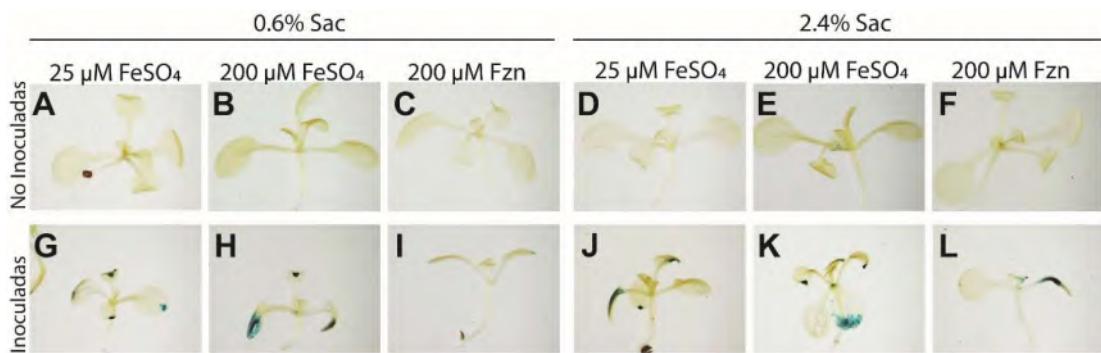


Figura 11. Respuesta de ácido salicílico en *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la respuesta a ácido salicílico a través del marcador PR1::GUS en plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C) e inoculadas (G-I) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (D-F) e inoculadas (J-L).

En cuanto a la vía del JA, en plantas inoculadas cultivadas con 0.6% de sacarosa, la expresión de LOX2 fue evidente en la condición control y se intensificó bajo exceso de hierro, mientras que la deficiencia de hierro disminuyó significativamente la señal (Fig. 12G–I). En 2.4% de sacarosa (Fig. 12J–L) se indujo la expresión de LOX2, aunque la ferrozina redujo ligeramente la expresión (Fig. 12L).

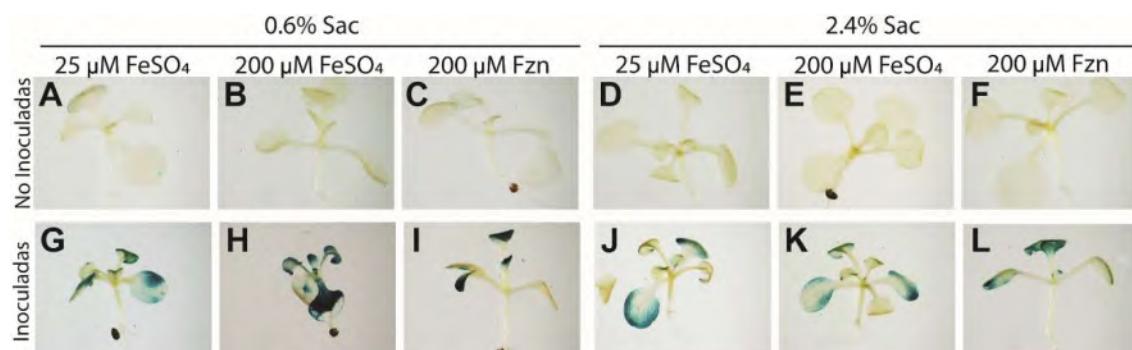


Figura 12. Respuesta de ácido jasmónico en *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la respuesta a ácido jasmónico a través del marcador LOX2::GUS en plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C) e inoculadas (G-I) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (D-F) e inoculadas (J-L).

8.6. Los niveles diferenciales de sacarosa y de hierro alteran la respuesta de especies reactivas de oxígeno en *A. thaliana* en interacción con *P. chlororaphis*

Las especies reactivas de oxígeno están asociadas directamente con la defensa de las plantas produciendo un fenómeno denominado “explosión oxidativa”. Como su nombre lo sugiere, es una respuesta corta e intensa, se produce un aumento súbito de éstas que rápidamente y en cuestión de horas se debe detoxificar pues la acumulación de éstas es altamente dañina para las plantas.

A fin de determinar si las variaciones en la virulencia observadas en *P. chlororaphis* estaban asociadas a un estrés oxidativo inducido en la planta, se evaluó la acumulación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno mediante tinciones histoquímicas con NBT y DAB, respectivamente, bajo condiciones contrastantes de hierro y sacarosa.

8.6.1. Acumulación de anión superóxido (NBT)

En plantas no inoculadas cultivadas con 0.6% de sacarosa la señal del NBT fue mínima y homogénea, indicando que sin la presencia de la bacteria la planta mantiene un nivel basal de anión superóxido independientemente de las condiciones de hierro (Fig. 13A–C, G–I). En 2.4% de sacarosa las plantas no inoculadas mostraron una acumulación mayor de superóxido, probablemente asociada a un incremento normal de la respiración celular y fotosíntesis al ser estimulado el crecimiento con sacarosa (Fig. 13D–F, J–L). Pese a este incremento, la distribución y el fenotipo de los follajes nos confirma que la planta sigue manteniendo un estatus redox saludable, lo que se confirma con el posterior análisis del peróxido de hidrógeno.

En plantas inoculadas, cultivadas con 0.6% de sacarosa (Fig. 13M–O, S–U), se observó un aumento de superóxido en el follaje, particularmente bajo exceso de hierro (Fig. 13N, T). La deficiencia de hierro (Fig. 13O, U) también mostró señal, aunque con menor intensidad, equiparable con su control no inoculado, lo cual coincidiría con la reducción observada previamente en la activación de las vías de defensa dependientes de SA y JA, sugiriendo que bajo deficiencia de hierro la bacteria podría estar en un estado fisiológico menos activo, reduciendo la

producción de metabolitos redox-activos o efectores que normalmente inducen una respuesta más intensa en la planta, caso contrario a lo que sucede con el exceso de hierro, posiblemente como consecuencia de un metabolismo bacteriano más activo cuando el hierro es abundante, pudiendo observar señales intensas en toda la planta.

En plantas cultivadas con 2.4% de sacarosa (Fig. 13P–R, V–X), el tratamiento control inoculado mostró niveles moderados de superóxido, similares a los observados en plantas no inoculadas, nuevamente podría ser una consecuencia del metabolismo incrementado por la sacarosa bajo exceso de hierro (Fig. 13Q, W), la acumulación fue notablemente mayor que su control, presentando un exceso en las hojas nuevas y el hipocótilo, mientras que en la deficiencia se redujo significativamente la señal y correlaciona con la disminución el fenotipo de daño en el follaje. Estos resultados indican que la acumulación de superóxido sigue un patrón que coincide con las condiciones donde la bacteria podría adoptar un funcionamiento más virulento, donde se muestra un fenotipo de marchitez y daño en los follajes, el anión superóxido es inestable y las plantas se detoxifican rápidamente principalmente a través de la enzima superóxido dismutasa se degrada formando peróxido de hidrogeno que cuando se acumula es altamente citotóxico y un mecanismo ya descrito de daño por patógenos (Fones & Preston, 2011; Ishiga *et al.*, 2008).

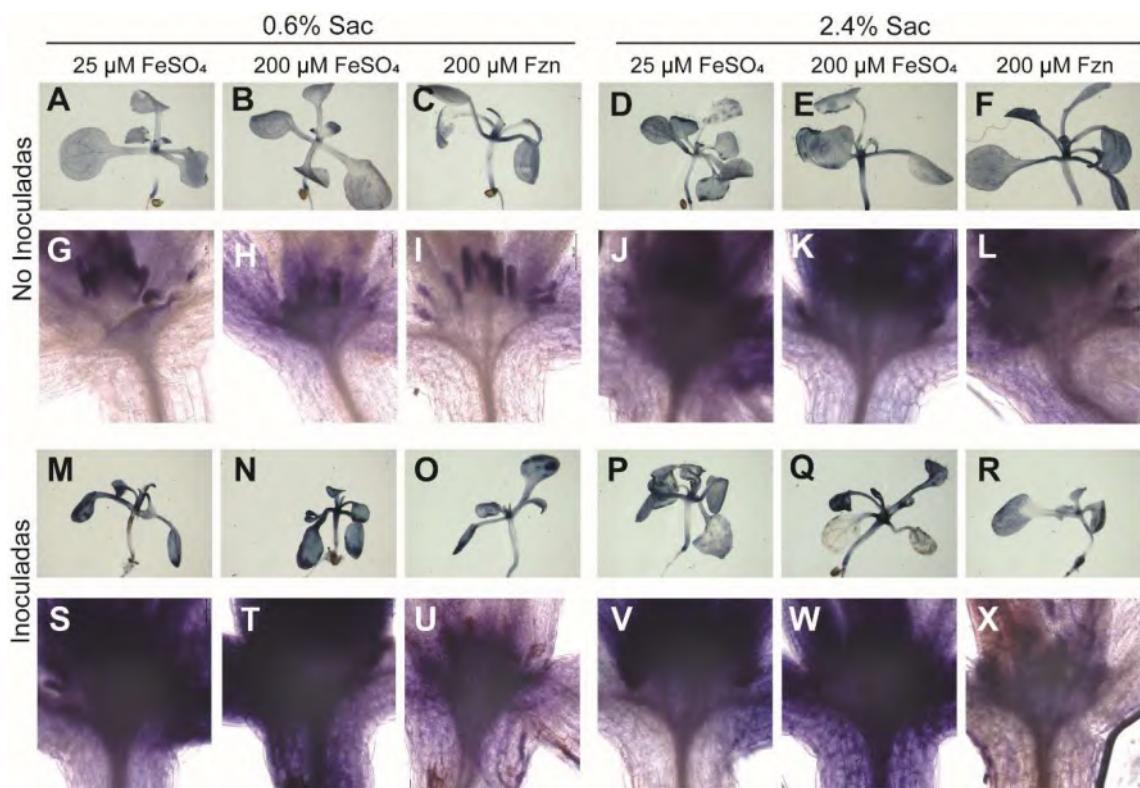


Figura 13. Acumulación de anión superóxido en follaje de *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la acumulación del anión superóxido en los follajes de plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C, G-I) e inoculadas (M-O, S-U) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (D-F, J-K) e inoculadas (P-R, V-X).

8.6.2. Acumulación de peróxido de hidrógeno (DAB)

Una pérdida en la homeostasis de hierro puede ser letal, las plántulas inoculadas en las condiciones de mayor virulencia mostraban un aumento importante en la acumulación del anión superóxido; sin embargo, las condiciones de promoción decrecimiento ya sea con 2.4% sacarosa no inoculadas y las inoculadas también mostraron un aumento a los 7 días de interacción, esta respuesta sostenida sin homeostasis debería ser dañina, para ello se analizara la acumulación de peróxido de hidrógeno y se confirmará como se encuentra el estatus redox de las plantas en este tiempo de interacción.

Las plantas no inoculadas, cultivadas con 0.6% de sacarosa la acumulación de H_2O_2 fue baja tanto en la condición control como bajo deficiencia de hierro, y se

mantuvo igualmente baja bajo exceso de hierro, indicando que la planta no experimenta un desbalance redox significativo en ausencia del microorganismo (Fig. 14A–C, G–I). En 2.4% de sacarosa la señal volvió a ser homogénea y de baja intensidad, lo que confirma que la planta mantiene su homeostasis oxidativa bajo estas condiciones y que el aumento del anión superóxido no produce una acumulación del peróxido de hidrógeno (Fig. 14D–F, J–L).

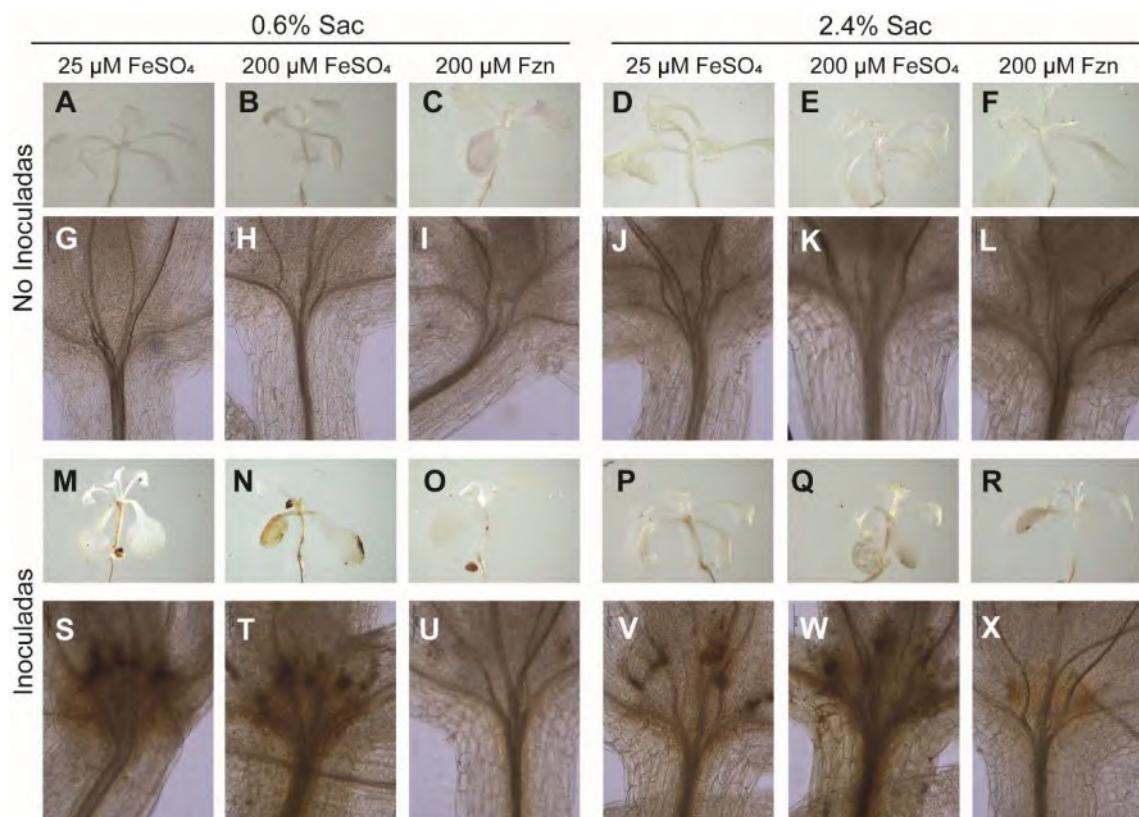


Figura 14. Acumulación de peróxido de hidrógeno en el follaje de *A. thaliana* en la interacción con *P. chlororaphis*. Se muestran imágenes representativas de la acumulación de peróxido de hidrógeno en los follajes de plántulas en las distintas concentraciones de hierro y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A-C, G-I) e inoculadas (M-O, S-U) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (D-F, J-K) e inoculadas (P-R, V-X).

En plantas inoculadas, cultivadas con 0.6% de sacarosa, la señal de H_2O_2 aumentó de manera notable en las condiciones control y en exceso de hierro (Fig. 14N, T) y en menor medida en deficiencia de hierro (Fig. 14O, U); algo muy similar a lo que habíamos observado con el anión superóxido. Este patrón

coincide con la hipótesis de que la interacción con la bacteria podría activar procesos que favorecen la generación de EROs, especialmente cuando el hierro es abundante. En plantas inoculadas, cultivadas con 2.4% de sacarosa la acumulación de H_2O_2 fue baja en el tratamiento control, tan solo ligeramente superior a su control no inoculado, lo cual nos demuestra nuevamente de que en estas condiciones la planta puede mantener su estatus redox en equilibrio (Fig. 14P–R, V–X). Por otro lado, se observó un aumento considerable en la condición de exceso de hierro (Fig. 14Q, W). En deficiencia de hierro (Fig. 14R, X), la señal fue similar a la observada en 0.6% de sacarosa.

8.7.- La interacción con *P. chlororaphis* en las condiciones limitantes de hierro acentúa los síntomas de deficiencia de hierro en las plantas.

La tinción histoquímica Perls/DAB permitió evaluar la distribución del hierro en raíces de *A. thaliana* bajo diferentes concentraciones de sacarosa y disponibilidad del metal, tanto en plantas inoculadas con *P. chlororaphis* como en controles no inoculados. Los paneles superiores muestran el follaje completo como referencia visual de la clorosis foliar, mientras que las micrografías radiculares corresponden a la tinción de hierro en distintas regiones de la raíz, incluyendo el hipocótilo y la zona apical.

Las plantas no inoculadas, cultivadas con 0.6% de sacarosa, la tinción se observó leve y homogénea, reflejando una captación basal de hierro sin acumulación marcada (Fig.15 A–B, E–J). Al incrementar la concentración de sacarosa a 2.4% la tinción aumentó notablemente en la base del hipocótilo y, en menor medida, en la punta de la raíz, lo que sugiere que la mayor disponibilidad de carbono favorece la absorción y el transporte de hierro hacia los tejidos vasculares (Fig. 15C–D, G–L). Este patrón coincide con el fenotipo más saludable observado en estas condiciones, donde las plantas muestran un crecimiento vigoroso y ausencia de clorosis.

En contraste, las plantas inoculadas con *P. chlororaphis* mostraron una reducción marcada de la tinción en prácticamente todas las condiciones evaluadas (Fig. 15M–P, Q–X). La disminución fue especialmente evidente en 2.4% de sacarosa, donde la bacteria atenuó la acumulación de hierro

previamente promovida por la alta disponibilidad de carbono. Esta pérdida de señal coincide con el fenotipo de clorosis y con la inhibición del crecimiento foliar y radicular de las plántulas inoculadas, lo que sugiere que, en presencia de la bacteria, la planta enfrenta una disponibilidad limitada de hierro, probablemente debido a un proceso de competencia.

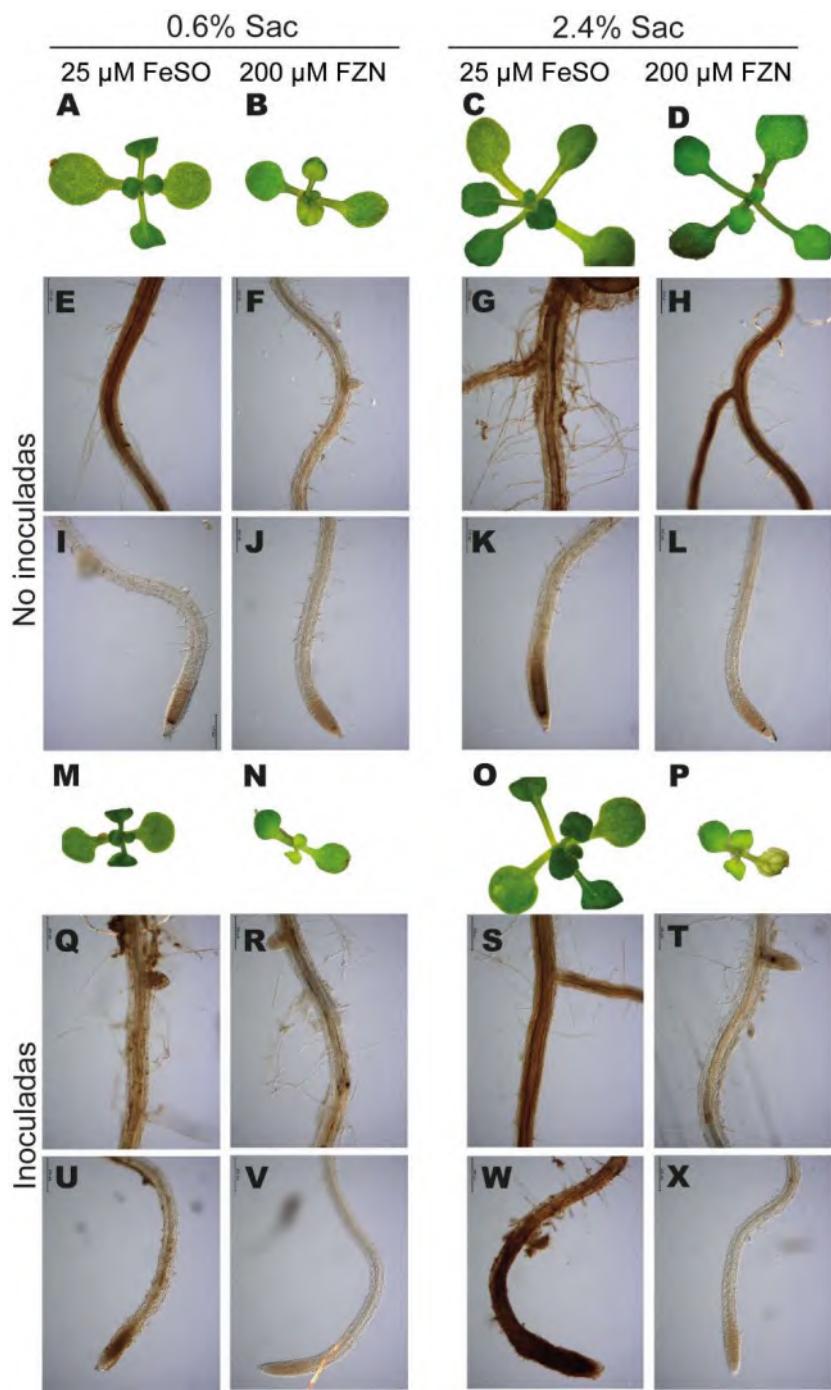


Figura 15. La interacción con *P. chlororaphis* acentúa los síntomas de deficiencia de hierro y disminuye la cantidad de hierro en los tejidos radiculares. Se muestran imágenes representativas del desarrollo del follaje de plántulas en las distintas concentraciones control y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (A, B) e inoculadas (M, N) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (C, D) e inoculadas (O, P), adicionalmente se muestra una tinción Perls/DAB con un precipitado marrón que corresponde al hierro en los tejidos internos de la raíz de plántulas en las distintas concentraciones control y ferrozina en las condiciones de 0.6% de sacarosa no inoculadas (E-J) e inoculadas (Q-V) y 2.4% de sacarosa no inoculadas (G-L) e inoculadas (S-X).

8.8.- Efecto de los niveles de hierro sobre el desarrollo y comportamiento de *P. chlororaphis*

Con el fin de evaluar si los cambios fisiológicos observados en la interacción con *A. thaliana* pueden estar asociados a modificaciones en el comportamiento de *P. chlororaphis* inducidas por la disponibilidad de hierro, se realizaron ensayos de crecimiento bacteriano, motilidad superficial y producción de metabolitos bajo condiciones contrastantes de sacarosa y hierro.

8.8.1.- Efecto del hierro sobre el crecimiento bacteriano

Se realizó una curva de crecimiento en medio MS 0.2X líquido suplementado con 0.6% o 2.4% de sacarosa, iniciando con una D.O. de 0.1 y monitoreando cada 30 minutos durante 24 horas (Fig. 16A). En estas condiciones, la concentración de 2.4% de sacarosa promovió un incremento progresivo en la densidad óptica a partir de las 18 horas, mientras que el tratamiento con 0.6% de sacarosa no mostró crecimiento detectable, permaneciendo en valores cercanos al punto inicial. Este comportamiento sugiere que, en las condiciones evaluadas, *P. chlororaphis* requiere una disponibilidad adecuada de carbono para mantener su crecimiento, lo cual coincide con los resultados observados en la interacción planta-bacteria, es interesante pues se descarta que los efectos puedan deberse a estrés osmótico o por mayor crecimiento bacteriano.

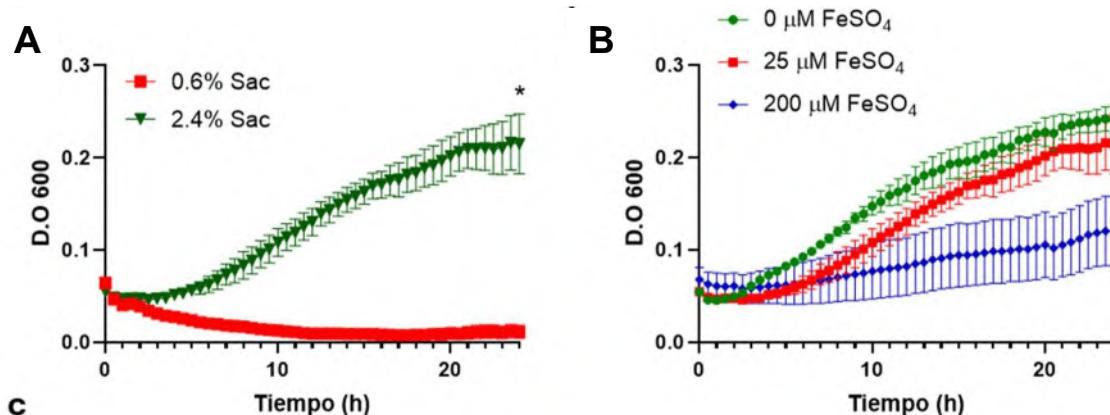


Figura 16. Crecimiento y motilidad de tipo swarming en diferentes concentraciones de hierro y condiciones diferenciales de sacarosa. Efecto de los niveles de hierro sobre el crecimiento de *P. chlororaphis* (A, B) en medios MS líquido al 0.2X se monitoreó cada 30 minutos por 24 horas. Las barras representan la media ± EE

de 3 mediciones en cada 30 minutos de los tratamientos indicados; la diferencia estadística se determinó mediante t test.

Adicionalmente se evaluó el efecto del hierro utilizando 0, 25 y 200 μM de FeSO_4 (Fig. 16B). Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, la concentración de 200 μM mostró una tendencia a alcanzar menores valores de densidad óptica en comparación con el control sin hierro. Estos resultados indican que los cambios en el comportamiento bacteriano observados durante la interacción con la planta no se deben a modificaciones importantes en la tasa de crecimiento, sino posiblemente a ajustes metabólicos inducidos por la disponibilidad de hierro y no necesariamente ligados a proliferación celular.

8.8.2.- Efecto del hierro sobre la motilidad tipo swarming

La motilidad superficial se evaluó mediante ensayos de swarming en medio King's B modificado con 0.5% de agar y suplementado con 25 μM o 200 μM de FeSO_4 , así como con 200 μM de ferrozina (Fig. 17). En el tratamiento con 25 μM de hierro (Fig. 17A), la bacteria formó colonias simétricas sin evidencia de expansión radial. La adición de 200 μM de FeSO_4 (Fig. 17B), alteró ligeramente la simetría del borde de la colonia, lo cual indica un incremento en la motilidad de tipo swarming. En contraste, bajo la deficiencia de hierro inducida por ferrozina (Fig. 17C), se observó una expansión marcada del crecimiento superficial, indicando un aumento importante en la motilidad swarming. Esta respuesta puede representar una adaptación de la bacteria para explorar el entorno en busca de recursos limitados, o bien reflejar condiciones poco adecuadas que estimulan comportamientos asociados a competencia y desplazamiento, características relevantes en la rizosfera, lo más importante es que la bacteria es altamente sensible a la ferrozina lo cual nos indica que si se inicia una respuesta a deficiencia de hierro.

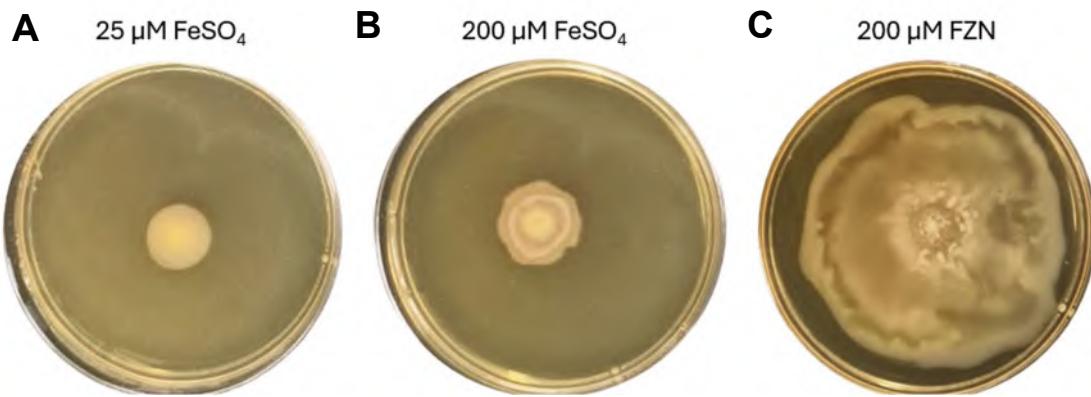


Figura 17. Motilidad de tipo swarming en diferentes concentraciones de hierro. Efecto de los niveles de hierro sobre la motilidad de tipo swarming en medio King's B en las condiciones control (A), exceso (B) y deficiencia de hierro (C). Se muestran imágenes representativas de cada tratamiento n=5.

8.8.3.- Producción de factores de virulencia en las distintas condiciones de hierro y sacarosa.

La producción de metabolitos comúnmente asociados a comportamientos competitivos o potencialmente virulentos fue cuantificada directamente en las placas donde se llevó a cabo la interacción planta–bacteria, bajo condiciones contrastantes de hierro y sacarosa (Fig. 18). La concentración de ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) alcanzó su valor más alto en el tratamiento con 200 μ M de FeSO_4 y 0.6% de sacarosa, siendo significativamente mayor respecto al control. En contraste, la deficiencia de hierro inducida con 200 μ M de ferrozina, redujo notablemente la producción de PCA en ambas concentraciones de sacarosa. Al nivel de las condiciones de 2.4% de sacarosa y hierro control, se observó, como se había reportado anteriormente, una menor producción de fenazinas, las cuales son metabolitos redox-activos. En este contexto, los tratamientos con mayor producción de PCA correlacionan con la mayor acumulación de EROS observada previamente (Fig. 18A), lo cual es consistente con el papel de las fenazinas como moduladores del estado redox del entorno.

La producción de rammolípidos mostró un patrón similar en ambos niveles de sacarosa: los valores más altos se registraron bajo exceso de hierro, aunque las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas (Fig.

18B). Interesantemente, los cambios más contrastantes los encontramos entre las condiciones de 0.6 y 2.4% de sacarosa y hierro control, siendo en 2.4 % la concentración más alta, lo que nos sugiere que en este contexto los rammolipidos no están teniendo un rol importante en la virulencia de *P. chlororaphis*.

Finalmente, la producción de pioverdina se midió como se mencionó anteriormente mediante la detección de fluorescencia en ChemiDoc, donde se graficaron Unidades Arbitrarias/píxel, y esta fue altamente dependiente de la disponibilidad de hierro. En 0.6% de sacarosa, el exceso de FeSO₄ incrementó de forma significativa la fluorescencia respecto al control, mientras que la deficiencia de hierro suprimió completamente su síntesis. En 2.4% de sacarosa, la señal de pioverdina disminuyó respecto al control bajo exceso de hierro, y nuevamente fue reprimida en condiciones de ferrozina (Fig. 18C).

En conjunto, estos resultados muestran que la disponibilidad de hierro regula de manera diferencial los metabolitos bacterianos evaluados: PCA y pioverdina se inducen fuertemente bajo condiciones de hierro abundante y se reprimen en su ausencia, mientras que los rammolípidos presentan una regulación más estable y menos sensible a las fluctuaciones del micronutriente. Estos patrones concuerdan con la idea de que *P. chlororaphis* ajusta su metabolismo en función de las condiciones nutrimentales.

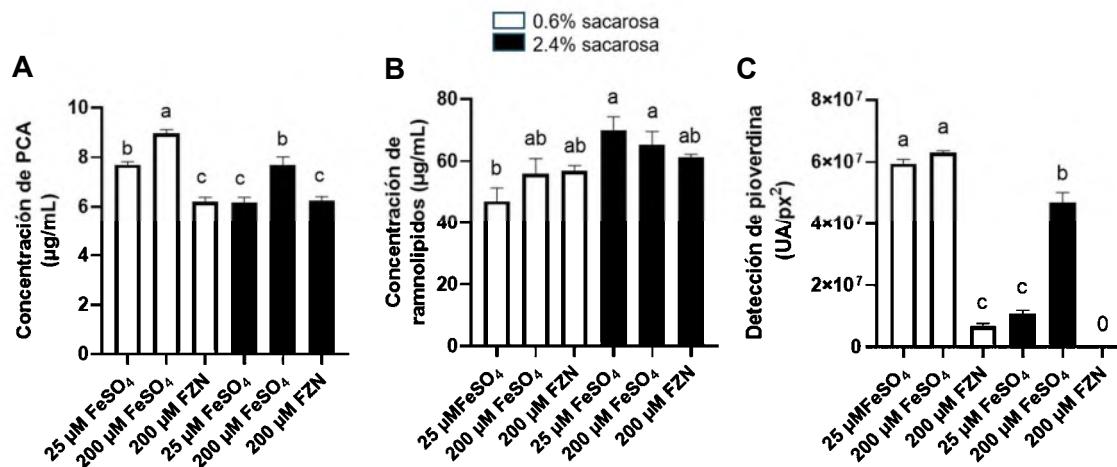


Figura 18. Producción de factores de virulencia asociados la toma de hierro en las diferentes concentraciones de hierro y sacarosa. Se cuantificó la producción de los factores de virulencia PCA (A), rammolipidos (B) y pioverdina (C), directamente de la

placa de interacción en las diferentes concentraciones de hierro y sacarosa. Las barras representan la media ± EE de 3 muestras de 3 experimentos diferentes de los tratamientos indicados; letras diferentes indican diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA unidireccional, seguido de un análisis post hoc de Tukey ($P < 0,05$).

8.8.4.- Producción de fenazinas en las distintas condiciones de hierro y sacarosa.

La producción de pigmentos cristalinos correspondientes a fenazinas, específicamente fenazina-1-carboxamida, fue evaluada en medio sólido King's B, un medio especializado en la producción de estos pigmentos suplementado con diferentes concentraciones de hierro (Fig. 19). En el tratamiento control, *P. chlororaphis* formó cristales verdes distribuidos de forma homogénea en la superficie del medio (Fig. 19A). La suplementación con 200 μM de FeSO_4 incrementó significativamente el número y densidad de los cristales, evidenciando una mayor producción de fenazinas en comparación con el control (Fig. 19B). Por el contrario, bajo la deficiencia de hierro inducida con 200 μM de ferrozina no se detectó la formación de cristales (Fig. 19C). El análisis cuantitativo confirmó estos patrones, mostrando un incremento significativo de la producción de fenazinas bajo exceso de hierro y una represión total en ausencia de hierro disponible (Fig. 19D). Estos resultados concuerdan con la cuantificación de PCA realizada previamente por espectrofotometría, reforzando la idea de que la síntesis de fenazinas depende fuertemente de la disponibilidad de hierro y puede ser un proceso estrechamente regulado por el estatus nutrimental del entorno.

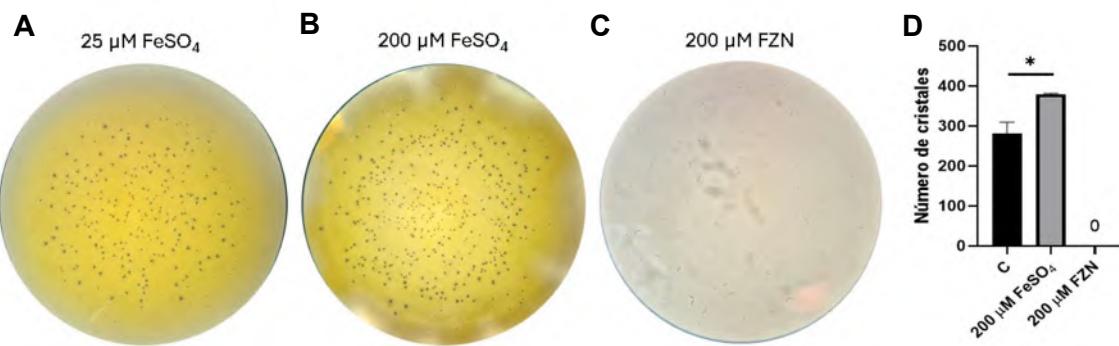


Figura 19. Formación de cristales de fenazina-1-carboxamida en medio King's en diferentes concentraciones de hierro sacarosa. Se analizó la formación de cristales verdes precipitados en el fondo del medio de cultivo correspondientes a fenazina-1-carboxamida en las diferentes condiciones de hierro (A-C), adicionalmente se muestra la cuantificación de estos (D). Las barras representan la media ± EE de 3 réplicas experimentales de los tratamientos indicados. La diferencia estadística se determinó mediante el t test.

8.8.5.- Distribución de fenazinas en raíces de *A. thaliana* durante la interacción con *P. chlororaphis* bajo condiciones diferenciales de hierro y sacarosa

La acumulación de fenazinas producidas por *P. chlororaphis* se pudo detectar en raíces de *A. thaliana* mediante microscopía confocal aprovechando la fluorescencia emitida por estas moléculas cuando son excitadas con luz ultravioleta. En las plantas no inoculadas no se detecta señal fluorescente (Fig. 20A), mientras que como control positivo se aplicó de exógena ácido fenazina-1-carboxílico (PCA, 10 µg/mL), es se permea a la raíz de *Arabidopsis* y puede ser detectado por microscopia confocal (Fig. 20B).

En plantas inoculadas cultivadas con 0.6% de sacarosa, la condición control mostró una fluorescencia intensa distribuida a lo largo de la raíz (Fig. 20C, F). La suplementación con 200 µM de FeSO₄ incrementó notablemente la señal, particularmente en pelos radicales y zonas superiores (Fig. 20D, G), mientras que la deficiencia de hierro (200 µM ferrozina) redujo la fluorescencia casi por completo (Fig. 20E, H). Un patrón similar se observó en 2.4% de sacarosa, aunque con menor intensidad general de fluorescencia, solo restaurándose parcialmente en el exceso de hierro que concuerda con la restauración de la virulencia (Fig. 20I-N), indicando que la producción de fenazinas depende tanto

del hierro como del estado metabólico de la bacteria, asociado a la disponibilidad de carbono.

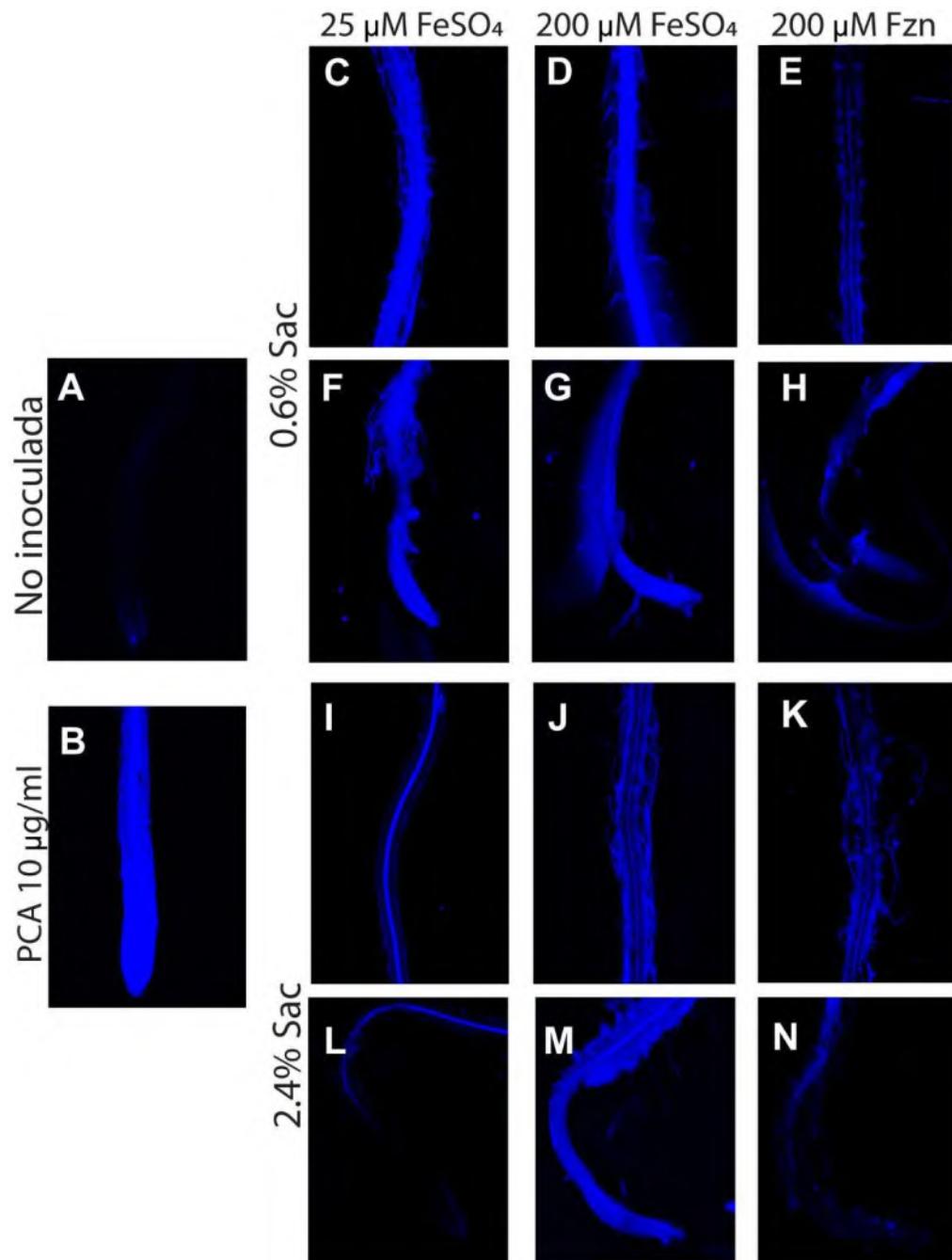


Figura 20. Fluorescencia de fenazinas producidas por *P. chlororaphis* en la interacción con *A. thaliana*. Se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de las fenazinas producidas por *P. chlororaphis* en la interacción con *A. thaliana*. Las imágenes se tomaron con microscopía confocal en las condiciones de hierro y ferrozina, en las condiciones de 0.6% (C-H) y 2.4% de sacarosa (I-N). Adicionalmente, se muestra el control no inoculado (A) y el control positivo con PCA a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B).

8.8.6.- Producción y acumulación de pioverdina en las distintas condiciones de hierro y sacarosa.

La producción de pioverdina se pudo detectar durante la interacción planta–bacteria mediante análisis de fluorescencia directa en placa (proyección XY) y reconstrucción tridimensional de la señal asociada a las raíces (proyección XZ). En la condición hierro control, *P. chlororaphis* mostró una colonización homogénea a lo largo de la raíz, con una fluorescencia elevada concentrada en la zona de elongación (Fig. 21B, J). En condiciones de exceso de hierro, la señal fluorescente aumentó notablemente y la colonización se volvió más densa y focalizada en regiones específicas, lo que indica una mayor actividad de sideroforos y un establecimiento más marcado de la colonia en zonas superiores de la raíz (Fig. 21C, K). En contraste, la deficiencia de hierro inducida con ferrozina (200 µM), resultó en la pérdida total de fluorescencia y en la ausencia de colonización detectable (Fig. 21D, L).

La disponibilidad de sacarosa modificó estos patrones. En 2.4% de sacarosa, la colonización fue más superficial y distribuida a lo largo del eje radicular, además fue menos intensa (Fig. 21F, N), mientras que, bajo exceso de hierro, la señal se intensificó y se concentró principalmente en la punta de la raíz restaurando parcialmente lo observado en las condiciones más virulentas de 0.6% (Fig. 21, O). Finalmente, en presencia de ferrozina no se detectó actividad de pioverdina (Fig. 21H, P). Estos resultados indican que la combinación de hierro y fuente de carbono no solo regula la síntesis de pioverdina, sino también el modo y la distribución de la colonización bacteriana sobre la superficie radicular, revelando una dinámica de colonización modulada de manera compleja por la disponibilidad de hierro.

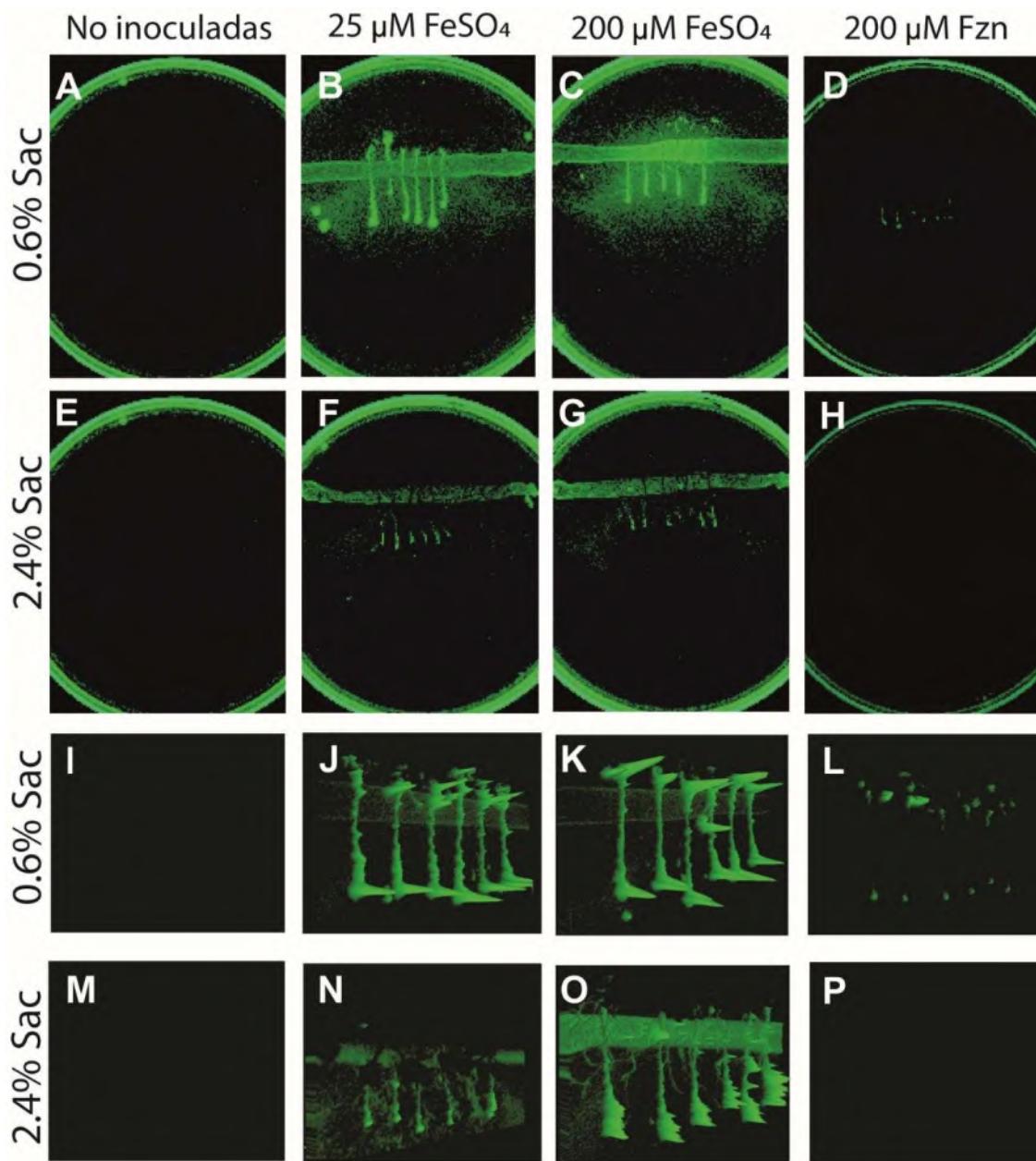


Figura 21. Fluorescencia de la pioverdina producida por *P. chlororaphis* en la interacción con *A. thaliana*. Se muestran imágenes representativas de fluorescencia de la pioverdina producida por *P. chlororaphis* en la interacción con *A. thaliana* en placa Petri en las condiciones contrastantes de hierro y ferrozina. Se muestran placas no inoculadas donde no hay fluorescencia visible (A, E, I y M) en las condiciones de 0.6% de sac (B-D) y 2.4% (F-H). En los paneles inferiores se muestran construcciones tridimensionales de la fluorescencia emitida por *P. chlororaphis* en las distintas condiciones de hierro y ferrozina, en las condiciones de 0.6% (J-L) y 2.4% de sacarosa (N-P).

En conjunto, los patrones observados en la producción de fenazinas y pioverdina, así como en su acumulación diferencial en la raíz, muestran que *P.*

chlororaphis tienen cambios importantes en la producción de factores de virulencia en función de la disponibilidad de hierro y de la sacarosa. Las condiciones que promovieron una mayor síntesis de fenazinas, particularmente el exceso de hierro en combinación con baja sacarosa, coincidieron con una señal intensa en raíz y con los niveles más altos de especies reactivas de oxígeno detectados previamente en la planta, así como con los fenotipos de marchitez y daño foliar. Por el contrario, la deficiencia de hierro disminuyó la producción de fenazinas y pioverdina, y no indujo acumulación significativa de EROs ni activación de las vías de defensa, aunque sí acentuó la clorosis asociada a la deficiencia de hierro lo que podría sugerir que los efectos negativos son consecuencia de otro mecanismo como puede ser la competencia por el hierro. Estos resultados indican que el hierro no solo afecta la síntesis de sideróforos y fenazinas, sino que también puede influir en el modo de colonización y el impacto de la bacteria sobre la planta, sugiriendo que la interacción *A. thaliana*–*P. chlororaphis* es altamente sensible al estado nutrimental del entorno y la bacteria puede adoptar comportamientos distintos según las condiciones de hierro y carbono disponibles.

9.- Discusión

Conforme la población mundial aumenta tambien lo hace la demanda de recursos vegetales, convirtiendo esto en un desafío para el sector agrícola que se ve en la necesidad de incrementar el rendimiento de los cultivos. En las últimas décadas, se ha intentado resolver esta problemática mediante del uso de fertilizantes y pesticidas, sin embargo, el uso excesivo de estos a la larga puede acarrear efectos perjudiciales como, la pérdida de la fertilidad de los suelos, la contaminación de los cuerpos hídricos y daños sobre la salud humana, es por ello que se ha vuelto una necesidad el desarrollar alternativas que permitan aumentar el rendimiento de los cultivos sin afectar negativamente el medio ambiente (Jiménez-Velázquez et al., 2020; Abd El-Azeem et al., 2012). En respuesta a esto, se han implementado diversas estrategias y tecnologías que puedan solventar esta situación, el uso de PGPRs se planta como una de las

estrategias más prometedora dado que son capaces de estimular el desarrollo de las plantas con la producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes, a través de la inducción de respuestas de defensa o la supresión directa e indirecta de patógenos de patógenos (López-Hernández et al., 2023; Tanveer et al., 2023; Niu et al., 2011).

Uno de los géneros de PGPR más estudiados es el género *Pseudomonas* que son bacilos gram negativos, ubicas y que destacan por poseer una gran versatilidad metabólica, si bien este género de bacterias se le han descrito numerosas especies como PGPR, también se han descrito especies patógenas, lo que nos habla de una notable variedad ecológica (Gross & Loper, 2009; Xin et al., 2018; Jun et al., 2016). Este género se ha estudiado ampliamente como PGPR principalmente por su capacidad para sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios, con potencial interés para el sector agrícola, entre los que se incluyen antibióticos, sideróforos, fenazinas y biosurfactantes. Estos compuestos no son solo subproductos del metabolismo bacteriano, tambien cumplen roles como moléculas reguladoras clave para la adaptación al entorno, la competencia microbiana y la interacción con el hospedero (Wu et al., 2022; López-Hernández et al., 2022; Vallejo-Ochoa et al., 2017).

En particular, *P. chlororaphis* ha sido descrita como una bacteria no patogénica e incluso PGPR debido a su capacidad para producir ácido indol-3-acético (AIA), solubilizar fosfatos y sintetizar compuestos con actividad antifúngica utilizados como agentes de biocontrol (Ortiz-Castro et al., 2011; López-Hernández et al., 2022). Sin embargo, trabajos recientes desarrollados por nuestro grupo, ha demostrado que el comportamiento de *P. chlororaphis* no es exclusivamente benéfico, pues en condiciones de interacción *in vitro* mostraban un comportamiento patogénico sobre *A. thaliana* bajo condiciones específicas. Nuestros hallazgos permitieron observar que la bacteria podía revertirse este efecto patogénico por uno promotor del crecimiento vegetal al modificar disponibilidad de sacarosa en el medio de interacción. Se realizaron análisis sobre los cambios en la producción de factores de virulencia y se observó que *P. chlororaphis* reduce significativamente la producción de fenazinas en

concentraciones altas de sacarosa. Esta reducción en la síntesis de fenazinas se corrobora con la medición de la expresión de un gen de síntesis de estas, y se confirmó su papel como factor de virulencia al suplementar con una fenazina exógena y recuperar el comportamiento patogénico, mientras que no solo se disminuía la producción de fenazinas, si no que había una estimulación en la señal auxínica e inducción de la respuesta de defensa (Tinoco-Tafolla *et al.*, 2024). No obstante, aunque el papel de la sacarosa ha sido parcialmente descrito en la virulencia de *P. chlororaphis*, aún no se ha profundizado en el efecto de otros nutrientes, entre los cuales el hierro destaca como un micronutriente clave y que cuya disponibilidad podría ser importante en la expresión de los factores de virulencia bacteriana, debido a que muchos de ellos están relacionados con la homeostasis de este metal.

El hierro es un micronutriente esencial, debido a su participación en procesos fundamentales como la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de enzimas redox. Si bien es un metal muy abundante de la rizosfera suele estar poco disponible pues se encuentra principalmente como hierro ferrico la forma no asimilable por las plantas y formando complejos insolubles, lo que genera una intensa competencia entre organismos por su captación. Debido a esta limitación, las bacterias del género *Pseudomonas* han desarrollado diversos mecanismos para la adquisición de hierro, en la rizosfera su mecanismo principal es la síntesis sideróforos como la pioverdina, una molécula fluorescente que no solo facilita la captación del metal, sino que también en condiciones específicas puede regular la expresión de genes asociados a la homeostasis del hierro y a la virulencia (Cornelis, 2010; Schalk, 2008).

En *P. aeruginosa*, el exceso de hierro se ha sido descrito que es capaz de activar vías que son dependientes del quorum sensing, favoreciendo la producción de fenazinas y de otros metabolitos con actividad antimicrobiana. Esto nos sugiere que el hierro para la bacteria no solo actúa como un nutriente, sino que también puede ser percibido como una señal ambiental sobre si las condiciones son propicias para la competencia ecológica o para la colonización del hospedador (Imperi *et al.*, 2019; Visca *et al.*, 2022). Así, la respuesta bacteriana al hierro

podría ser importante en la virulencia, dependiendo la disponibilidad la bacteria podría parar de estrategias mutualistas a competitivas según el estado de este nutriente. Aunque actualmente existan estudios que han reportado los efectos del hierro en la producción de factores de virulencia, aún queda poco estudiado estos cambios regulados por el hierro en una interacción directa planta–bacteria, donde ambos organismos se enfrenten simultáneamente el estado del micronutriente.

En el caso específico de *P. chlororaphis*, si consideramos las similitudes que presenta en la producción de algunos factores de virulencia y en los sistemas de quorum sensing con *P. aeruginosa*, se puede pensar que el hierro podría funcionar como señal que también afecte estos sistemas o vías dependientes a estos, los cuales en general de factores de virulencia estos coordinan la síntesis de fenazinas, sideróforos y rammolípidos; la formación de biopelícula, la motilidad y la secreción de toxinas en función de la densidad poblacional y pueden verse afectados por (Jun *et al.*, 2016; Visca *et al.*, 2022). Este planteamiento cobra mayor importancia si se contempla que la interacción entre las bacterias del género *Pseudomonas* y las raíces tiene lugar en ambientes en los que el hierro se encuentra en distintos estados de oxidación y en el que la planta tambien cuenta con sus propios mecanismos para la adquisición de este metal. En este contexto, la bacteria puede llegar a interpretar la abundancia de hierro como una señal para la síntesis de factores de virulencia asociadas al hierro, mientras que su deficiencia puede ser interpretada como una condición que favorece un comportamiento mutualista al priorizar su supervivencia o bien de competencia por este recurso con la planta. Y de esta forma la disponibilidad de hierro puede actuar como un modulador en virulencia, justificando la importancia de evaluar cómo este metal influye en la interacción *P. chlororaphis*–*A. thaliana*.

En este estudio se lleva a cabo la evaluación de la interacción directa entre *A. thaliana* - *P. chlororaphis* en distintas concentraciones de hierro y condiciones diferenciales de sacarosa que se establecieron como mayor virulencia (0.6) y menor virulencia (2.4%), los resultados presentados muestran que la disponibilidad de este micronutriente modifica significativamente el resultado de

la interacción, evidenciando que el hierro al igual que la sacarosa es un factor clave propiciando un comportamiento virulento. En la condición de baja sacarosa (0.6%) donde ya se había reportado un efecto de patogenicidad, los aumentos en las concentraciones en la concentración de hierro produjeron una inhibición del desarrollo radicular muy severa, disminuyendo el número de raíces laterales y su longitud, acompañadas de la aparición de síntomas visibles de estrés y daño en los follajes, algo muy similar ocurrió en las concentraciones más altas de sacarosa (2.4%) donde se había reportado el comportamiento menos virulento al añadir el hierro se revierte este comportamiento y comienza una inhibición importante en el desarrollo del follaje y del sistema radicular. Este efecto no puede ser atribuido a un efecto propio del hierro, puesto que el control no inoculado no mostraba efectos negativos en esas condiciones, confirmando que el efecto observado es consecuencia de un cambio sólo inducido por la bacteria y no por el efecto nocivo del metal.

Este comportamiento dependiente del hierro se confirmó al evaluar los efectos de la deficiencia inducida con ferrozina. En esta condición, tanto en 0.6% como en 2.4% de sacarosa, se observó una inhibición importante del desarrollo global de la planta; sin embargo, disminuyó la capacidad de la bacteria para inducir síntomas severos de marchitez y colapso de los follajes. En su lugar, las plantas presentaron una clorosis homogénea, atribuible a una posible competencia por el hierro entre la planta y la bacteria. Este hallazgo sugiere que, bajo deficiencia de hierro, *P. chlororaphis* podría adoptar un estado con menor virulencia o una virulencia asociada a un mecanismo distinto esto basado en la diferencia del fenotipo en las interacciones, probablemente asociado a priorizar la supervivencia y la adquisición del metal antes que la infección activa de un hospedero y como consecuencia de la competencia producir este efecto de deficiencia de hierro exacerbada. Los ensayos interacción en tiempos prolongados mostraron que únicamente las plantas inoculadas en alta sacarosa y hierro control mantuvieron un desarrollo sostenido del sistema radicular y foliar; en contraste, aquellas expuestas a exceso de hierro experimentaron un deterioro progresivo principalmente visible en los follajes con síntomas evidentes de daño

y estrés, confirmando que este metal no solo modula la virulencia inicial, sino que influye directamente en la trayectoria de la interacción a largo plazo.

La evaluación de las respuestas hormonales en *A. thaliana* evidencia que el comportamiento de la bacteria, regulado por las condiciones de hierro y sacarosa también altera el estatus hormonal de la planta. En condiciones de alta sacarosa y de hierro control, se observó la activación importante de los marcadores *DR5::GUS* y *ARR5::GUS*, asociados a las vías de auxinas y de citocininas, respectivamente, en el caso de la señal auxínica se observó lo que se había reportado anteriormente, una señal elevada a lo largo de la raíz y en el caso de la señal de las citocininas no se observaron cambios en comparación con su control promovido por la sacarosa. Este patrón de expresión indica que *P. chlororaphis* actúa como promotora del crecimiento vegetal cuando la disponibilidad de hierro no favorece la producción de factores de virulencia y cuando la concentración de sacarosa es alta. Estos resultados evidencian que la planta no responde simplemente a la presencia de la bacteria, sino a su estado fisiológico y metabólico, el cual es determinado por las señales del hierro y sacarosa.

En paralelo, los marcadores de defensa mostraron un comportamiento opuesto. La expresión de *PR1::GUS* se incrementó en condiciones de hierro control y exceso y disminuyó bajo deficiencia, lo que indica que la planta independientemente del comportamiento virulento percibe a *P. chlororaphis* como un agente potencialmente patogénico en presencia de hierro disponible. De forma complementaria, la expresión de *LOX2::GUS* también se activó en condiciones de hierro en abundancia, lo que sugiere que la bacteria puede inducir simultáneamente respuestas asociadas a patógenos biotróficos y necrotróficos, lo cual recuerda la estrategia descrita para *P. syringae*, que activa ambas vías de defensa aprovechándose de la activación de las vías del ácido jasmónico para producir una respuesta inmune deficiente en la planta (Gao *et al.*, 2021). Es posible que algunas bacterias del género conserven esta capacidad, lo que explicaría por qué *P. chlororaphis* muestra este patrón dual de activación de SA y JA.

La acumulación de EROs, específicamente anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es interesante pues la acumulación de estos dos simultáneamente solo ocurre cuando *P. chlororaphis* presenta un fenotipo virulento. Bajo condiciones de alta concentración de hierro, se observó un incremento significativo de EROs en el follaje, acompañado de síntomas visibles de daño como necrosis localizada y colapso tisular. Este resultado coincide con la sobreproducción de fenazinas, compuestos redox-activos que pueden inducir estrés oxidativo por alteración de la cadena de transporte de electrones y provocar acumulación de H_2O_2 (Guttenberger *et al.*, 2017; Briard *et al.*, 2015). En contraste, bajo deficiencia de hierro, la acumulación de EROs fue mínima, lo que se correlacionó con la ausencia de daño tisular y activación de las vías de defensa, además que correlaciona con una baja en la producción de fenazinas. Este patrón diferencial sugiere que la producción de EROs no es consecuencia del estrés ambiental, sino el resultado directo de la interacción. La acumulación elevada de EROs bajo exceso de hierro evidencia que *P. chlororaphis* modifica su virulencia en presencia de este metal y se ve puede corroborar mediante la producción de metabolitos redox-activos, similar a lo observado en *P. aeruginosa* durante infecciones en tejidos animales. Es sumamente interesante destacar que si bien las EROs son componentes de las vías de señalización de defensa su acumulación debe ser intensa pero breve de entre 12 y 24 horas pues estos compuestos son citotóxicos y una pérdida de la homeostasis redox provocaría daños importantes en la salud de la planta, nuestros resultados se muestran después de 7 días de interacción lo que nos indica que la acumulación observada no se trata de una respuesta normal de defensa y que debe estar asociada al estrés de los metabolitos producidos por la bacteria.

La tinción histoquímica de Perls/DAB complementó estos resultados al evidenciar que la disponibilidad de hierro y la presencia de *P. chlororaphis* modifican drásticamente los patrones de acumulación del metal en los tejidos radiculares de *A. thaliana*. En condiciones sin inoculación, el aumento de la concentración de sacarosa favoreció la absorción de hierro, observándose una tinción más intensa en la base del hipocótilo y en la punta de la raíz, lo que

sugiere que la disponibilidad de carbono estimula la adquisición del metal. Sin embargo, al inocular con *P. chlororaphis*, la acumulación del metal fue prácticamente abolida, indicando que la bacteria es capaz de restringir la toma de hierro por la planta, probablemente mediante competencia directa o secuestro del metal a través de sideróforos. Al no observarse una actividad clara de pioverdina como sideróforo principal bajo ciertas condiciones, puede pensarse en la participación de sideróforos secundarios no fluorescentes, cuya expresión se ha reportado elevada en presencia de quelantes similares a la ferrozina. Esta restricción concuerda con los síntomas de clorosis y la reducción del crecimiento observados en plantas inoculadas, lo que refuerza la idea de que *P. chlororaphis* puede alterar la homeostasis del hierro de la planta y utilizarlo como recurso clave durante la interacción.

La cuantificación de los factores de virulencia generados por *P. chlororaphis* bajo las diferentes condiciones que se estudiaron permitieron proponer la explicación del cambio fenotípico que se observó en la planta y era similar al que se había reportado anteriormente. La producción del ácido fenazina-1-carboxílico se comprobó que significativamente aumentó por exceso de hierro en condiciones de baja sacarosa, en la concentración de 2.4% de sacarosa con exceso de hierro también se indujo fuertemente comparado con el control, este resultado coincidió con la mayor inhibición del crecimiento radicular y del crecimiento foliar, además que estos resultados también concordaron con la productividad de los pigmentos verdes precipitados en medio King's B, los cuales habían sido caracterizados previamente e identificados como fenazina-1-carboxamida o clororafina y que corresponde a una fenazina sintetizada a partir de la PCA, también se pudo observar que no sólo la producción de este pigmento se encontraba modificado por el hierro en el medio, sin no que también el característico pigmento amarillo de esta especie, esto es similar al crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* que presentaban mutaciones en sistemas de QS, donde no se mostró producción de ningún tipo de pigmento y una disminución importante en los factores de virulencia.

La conexión entre la concentración de fenazinas y la disminución del crecimiento de las raíces laterales se asemeja a lo observado en otras especies de este género, en las que estos compuestos que se asocian a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la ruptura de membranas y la interferencia en la señalización por hormonas de las plantas (Ortiz-Castro et al., 2011), donde incluso los propios autores dejan entrever la posibilidad de que otras fenazinas pueden dar lugar a EROs mediante un mecanismo conservado en eucariontes.

La producción de pioverdina mostró una fuerte dependencia de la disponibilidad de hierro, incrementándose notablemente en una situación de exceso. A pesar de que habitualmente se afirma que los sideróforos son reprimidos en presencia de hierro, esta situación puede deberse al uso de hierro ferroso como medio de interacción en lugar de hierro férrico, y porque está considerado un contacto biológico directo con la planta en el que, a su vez, la pioverdina puede estar actuando como molécula señalizadora además que su producción se ha visto elevada en entornos tóxicos por metales. Este resultado es consistente con reportes que indican que los sideróforos pueden desencadenar la expresión de genes de virulencia bajo condiciones ambientales específicas, desempeñando un papel dual como moléculas de adquisición de nutrientes y moduladoras del comportamiento patogénico (Cornelis, 2010; Schalk, 2008).

La cuantificación de ramnolípidos también mostró, aunque en menor medida, un patrón inducido por el exceso de hierro. Sin embargo, las condiciones de menor virulencia presentaron los niveles más elevados de estos compuestos, por lo que pueden descartarse como factores clave en el daño observado, aunque sí parecen ser levemente modulados por el hierro, lo cual concuerda con el incremento de la motilidad superficial tipo swarming bajo estas condiciones.

La presencia de ramnolípidos provoca una reducción de la tensión superficial del medio, facilitando el desplazamiento colectivo de la bacteria y favoreciendo su colonización en el hospedero (Caiazza et al., 2005), pero si bien aumentan los ramnolípidos, es probable que algún otro factor pueda influir en este desplazamiento tan importante en condiciones limitantes de hierro pues el efecto

es mucho mayor que en exceso de hierro donde tambien se encuentran elevados. Este desplazamiento tan exacerbado en la motilidad tipo swarming se ha vinculado a un paso a un estado de exploración o de colonización más que de daño, incluso en estas condiciones, se ha visto una disminución general en la expresión de factores de virulencia (Tremblay & Déziel, 2010). Lo cual correlaciona con lo observado bajo deficiencia de hierro, que, si bien aumenta la motilidad de la bacteria, no se detectó producción significativa de fenazinas ni de sideróforos, sugiriendo que la bacteria adopta una estrategia de búsqueda de hierro sin activar factores de virulencia, lo que explicaría la disminución o cambio del tipo de daño en las plantas en esas condiciones. En adición y dado que no hay cambios importantes en el crecimiento bacteriano entre las diferentes concentraciones de hierro, podemos descartar que el efecto patogénico sea simplemente un efecto derivado del aumento en la acumulación de biomasa bacteriana.

Además, nuestros resultados mostraron variaciones en la colonización y acumulación de los factores de virulencia. Se utilizó una estrategia para la de detección *in situ* de los factores de virulencia fluorescentes como las fenazinas y pioverdina y gracias a esto fue posible observar en tres dimensiones la acumulación de la pioverdina. Pudimos observar que no solo se incrementó la señal de fluorescencia de manera diferencial ante la presencia del hierro, si no que se podían observar señales de mayor intensidad en las regiones de la punta de la raíz y el hipocótilo, y esto se exacerbó en las condiciones más virulentas (0.6% de sacarosa con hierro control y en exceso). En condiciones de deficiencia, las señales desaparecieron casi por completo, lo cual es un resultado interesante pues típicamente los sideroforos son inducidos por la deficiencia de hierro nuestra propuesta es que, al no poder obtener el hierro quelado por la ferrozina, la bacteria opta por su sideróforo secundario no fluorescente, que es una estrategia que se ha reportado anteriormente en *P. aeruginosa* en donde condiciones específicas de limitación de hierro principalmente por algunos tipos de quelantes, se inhibe la síntesis de pioverdina y se activa la de pioquelina el

sideróforo secundario que no es detectable en estas condiciones fluorescentes (Ma et al., 2024).

De manera similar, la fluorescencia asociada a PCA mostró patrones que son coherentes con la cuantificación realizada; la acumulación de este compuesto siguió los tratamientos con mayor producción de fenazinas que resultan ser los más virulentos y se vio disminuida en el tratamiento menos virulento y en los de deficiencia de hierro que a su vez tienen una menor acumulación de EROs. Resulta particularmente interesante cómo la PCA parece difundirse libremente por la raíz lo que podría explicar su potencial tóxico al distribuirse en los tejidos generando EROs y daño a la planta.

10.-Conclusión

En conclusión, este estudio muestra a *Pseudomonas chlororaphis* como una bacteria de comportamiento dinámico en la interacción planta-microorganismo y que su comportamiento se ve modulado por la presencia no solo de sacarosa si no que las condiciones de exceso y deficiencia de hierro promueven comportamientos virulentos al modular de forma significativa la producción de factores de virulencia. Este resultado es un hallazgo muy importante ya que tiene consecuencias en el uso de bioinoculantes en agricultura, al evidenciar que el éxito no solo de la especie utilizada, sino que también juega un papel importante las condiciones nutrimientales del medio de interacción. Estos resultados incitan a reconsiderar el planteamiento tradicional que se tiene del concepto de PGPR y a considerar a las bacterias desde una perspectiva dinámica altamente dependiente de la condición del medio, lo que a su vez abre nuevas perspectivas de estudio sobre la influencia del entorno en el comportamiento de los bioinoculantes.

11.-Referencias:

- 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.
- Ajijah, N., Fitriatin, B. N., Setiawati, M. R., Simarmata, T., Joy, B., & Bullen, C. R. (2023). Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability as potential plant growth promoters. *Diversity*, 15(1), 112.
- Akhtyamova, Z., Martynenko, E., Arkhipova, T., Seldimirova, O., Galin, I., Belimov, A., Vysotskaya, L., & Kudoyarova, G. (2023). Influence of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Formation of Apoplastic Barriers and Uptake of Water and Potassium by Wheat Plants. *Microorganisms*, 11(5), 1227.
- Anand, R., Parihar, P., Nagaraja, A., & Srivastava, S. (2020). Functional characterization of *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 as a potential biocontrol and plant growth-promoting agent. *Journal of Applied Microbiology*, 129(6), 1534–1548.
- Arrebola, E., Tienda, S., Vida, C., De Vicente, A., & Cazorla, F.M. (2019). Fitness features involved in the biocontrol interaction of *Pseudomonas chlororaphis* with host plants: the case study of PcPCL1606. *Frontiers in Microbiology*, 10, 719.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: The hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90–98.
- Bains, M., Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6762–6768.
- 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

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 suppl 1).

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 in rhizosphere interactions with plants. *Plant and Soil*, 256(1), 67–83

Biessy, A., Novinscak, A., Blom, J., Léger, G., Thomashow, L.S., Cazorla, F.M., & Filion, M. (2019). Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing *Pseudomonas spp.* *Environmental Microbiology*, 21(1), 437–455.

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.

Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 497–503.

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.

Briard, B., Bomme, P., Lechner, B. E., Mislin, G. L. A., Lair, V., Prévost, M., Latgé, J., Haas, H., & Beauvais, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scientific Reports*, 5(1), 8220.

Butt, A. T., & Thomas, M. S. (2017). *Iron acquisition mechanisms and their role in the virulence of Burkholderia species*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7, 460.

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 52 *Pseudomonas aeruginosa* Immunotype 5. Biochemistry (Moscow), 69(2), 170–175.

Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., & O'Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Of Bacteriology, 187(21), 7351-7361.

Chekabab, S. M., Harel, J., & Dozois, C. M. (2014). Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. Virulence, 5(8), 786–793.

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., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2001). Introduction of the phzH Gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Extends the Range of Biocontrol Ability of Phenazine-1-Carboxylic Acid-Producing *Pseudomonas* spp. Strains. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(8), 1006-1015.

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

- Cornelis, P. & Matthijs, S. (2002). *Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines*. *Environmental Microbiology*, 4(7), 787-798.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in *Pseudomonads*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1637–1645
- 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, 1–20.
- 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.
- Dexter, A. R. (1987). Compression of soil around roots. *Plant and Soil*, 97(3), 401 406.
- 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. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*.
- Dorjey, S., Dolkar, D., & Sharma, R. (2017). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 1335–1344.
- Ehinmitan, E., Losenge, T., Mamati, E., Ngumi, V., Juma, P., & Siamalube, B. (2024). BioSolutions for Green Agriculture: Unveiling the Diverse Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *International Journal Of Microbiology*, 2024(1), 6181491.
- Fones, H., & Preston, G. M. (2011). Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 327(1), 1-8.

- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839–863.
- Gao, Y., Li, Z., Yang, C., Li, G., Zeng, H., Li, Z., Zhang, Y., & Yang, X. (2021). *Pseudomonas syringae* activates ZAT18 to inhibit salicylic acid accumulation by repressing EDS1 transcription for bacterial infection. *New Phytologist*, 233(3), 1274–1288.
- García-Cárdenas, E., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L. F., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2023). *Bacillus sp. LC390B from the maize rhizosphere improves plant biomass, root elongation, and branching and requires the phytochromes PHYA and PHYB for phytostimulation*. Journal of Plant Growth Regulation, 42, 3056–3070.
- 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.
- Glick, B. R. (2014). *Bacteria with ACC deaminase lower plant ethylene, promote growth, protect against stress, and interact with auxin, IAA, and protect against pathogens*. Plants, Genes and Omics, 1, 4.
- Goldfarb, W., & Margraf, H. W. (1967). Cyanide Production by *Pseudomonas aeruginosa*. Annals of Surgery, 165(1), 104–110.
- Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. D., & Vitanza-Jack, V. B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology*, 28(6), 987–991.
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, 26(11), 1408–1446.

- 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 D. Singh & H. Singh (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1 Research Perspectives* 229-244
- Guttenberger, N., Blankenfeldt, W., & Breinbauer, R. (2017). Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(22), 6149-6166.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319.
- 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
- Hiltner, L. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Árbitro. Deut. Tierra. Gesell*, 98 :59-78. (1904)
- 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.
- Howell, S.H., Lall, S., & Che, P. (2003). *Cytokinins and shoot development. Trends in Plant Science*, 8(9), 453-459.
- Hsieh, Y.-J., & Wanner, B. L. (2010). *Global regulation by the seven-component Pi signaling system*. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 198–203

Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. (2019). *Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology, 21(2), 563–576

Ishiga, Y., Uppalapati, S. R., Ishiga, T., Elavarthi, S., Martin, B., & Bender, C. L. (2008). The phytotoxin coronatine induces light-dependent reactive oxygen species in tomato seedlings. *New Phytologist*, 181(1), 147-160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02639.x>

Jain, R., & Pandey, A. (2016). 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.

Jayatilake, G. S., Jayasuriya, H., Lee, E. S., Koonchanok, N. M., Geahlen, R. L., & McLaughlin, J. L. (1996). Isolation and structure of several new phenazine derivatives from a *Streptomyces* species. *Journal of Natural Products*, 59(3), 234–237

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

Kambara, T. K., Ramsey, K. M., & Dove, S. L. (2018). *A nitrogen-limited sRNA, NrsZ, promotes swarming motility and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 9(4), e01889-18.

Khasheii, B., Mahmoodi, P., & Mohammadzadeh, A. (2021). Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry.

- Kroh, L. W., Seyedsayamdst, M. R., & Clardy, J. (2020). Siderophores: Structures, biosynthesis, and roles in iron acquisition. *Annual Review of Biochemistry*, 89, 157–181.
- 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 remobilization of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), e0152478.
- Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darias, J. A., Krell, T., & Ramos, J.-L. (2023). *The nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) controls virulence and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology, 25(2), 214–230.
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). *The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis*. FEMS Microbiology Reviews, 32(3), 461–473.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7072–7077.
- 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., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41.

Leigh, J. A., & Dodsworth, J. A. (2007). *Nitrogen regulation in bacteria and archaea*. Annual Review of Microbiology, 61, 349–377

Lopes, R., Tsui, S., Gonçalves, P. J. R. O., Rosa, C., & Vendruscolo, J. (2022). *Plant growth-promoting rhizobacteria: Mechanisms and applications*. Journal of Applied Microbiology, 133(1), 1–17.

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. (2023). Screening of Phosphate Solubilization Identifies Six *Pseudomonas* Species with Contrasting Phytostimulation Properties in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Microbial Ecology*.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes And Infection*, 2(9), 1051-1060.

Ma, X., Zeng, J., Xiao, W., Li, W., Cheng, J., & Lin, J. (2024). Relationship between Pyochelin and *Pseudomonas* Quinolone Signal in *Pseudomonas aeruginosa*: A Direction for Future Research. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(16), 8611.

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)

Matilla MA, Udaondo Z, Maaß S, Becher D, Krell T. 2022. Virulence Induction in *Pseudomonas aeruginosa* under Inorganic Phosphate Limitation: a Proteomics Perspective. *Microbiol Spectr* 10: e02590-22.

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). *Defense priming: An adaptive part of induced resistance*. Annual Review of Plant Biology, 68, 485-512.

- 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.
- Messenger, A. J., & Barclay, R. (1983). Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochemical Education*, 11(2), 54–63.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers In Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39.
- Morohoshi, T., Yamaguchi, T., Xie, X., Wang, W.-Z., Takeuchi, K., & Someya, N. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes and Environments*, 32(1), 47–53.
- 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.
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P. V. S. R. N., Moerschbacher, B. M., & Podile, A. R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 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.

- Oglesby, A. G., Farrow, J. M., Lee, J., Tomaras, A. P., Greenberg, E., Pesci, E. C., & Vasil, M. L. (2008). The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(23), 15558-15567.
- 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., 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.
- Palleroni, N. J. (2010). *The Pseudomonas Story*. In J. L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas: Volume 1. Genomics, Lifestyle and Molecular Architecture* (pp. 1–11). Springer.
- Pantoja-Guerra, M., Valero-Valero, N. & Ramírez, C.A. Total auxin level in the soil–plant system as a modulating factor for the effectiveness of PGPR inocula: a review. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 10, 6 (2023).
- Peng, H., Ouyang, Y., Bilal, M., Wang, W., Hu, H., & Zhang, X. (2018). Identification, synthesis and regulatory function of the N-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 9.
- Pierson, E. A., & Pierson, L. S. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1659–1670.
- 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.

- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Van Loon, L. C. (2000). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12(5), 907–919.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). *The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*. Plant and Soil, 321, 341-361.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J.-L., & Havaux, M. (2009). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology*, 150(4), 1858–1866
- 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), 2034–2041.
- Rivas, M. Á., Friero, I., Alarcón, M. V., & Salguero, J. (2022). *Auxin-Cytokinin Balance Shapes Maize Root Architecture by Controlling Primary Root Elongation and Lateral Root Development*. Frontiers in Plant Science, 13, 836592.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339.
- Romero, D., Pérez-García, A., de Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2019). To be or not to be a biofilm: Bacterial cyclic lipopeptides trigger plant immunity. *Environmental Microbiology*, 21(9), 3186–3194.
- 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.
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927–4932.

Santhi, N., & Deivasigamani, B. (2017). Crop Rotation as a Better Sanitary Practice in Culture of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, 6(2), 1418-1443.

Santos, R., Batista, B., & Da Silva Neto, J. F. (2020). Ferric uptake regulator Fur coordinates siderophore production, defense against iron toxicity and oxidative stress, and contributes to virulence in *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01620-20.

Santos-Benit, F. (2015). *The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 402.

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.

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), 1159-169.

Sheldon, J. R., Laakso, H. A., & Heinrichs, D. E. (2016). Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiology Spectrum*, 4(2).

Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 14(1), 271. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-271>

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.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Gunther, N.W. et al., (2015). D-Glucuronic acid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 4333–4342.

- Sousa, C. A., Ribeiro, M., Vale, F., & Simões, M. (2024). Phenazines: Natural products for microbial growth control. *hLife*, 2(3), 100–112.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89-100.
- Sutherland, I. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227.
- Sutra, L., Lhospice, L., Bollet, C., & Briançon, S. (1997). Characterization of fluorescent *Pseudomonas* strains producing pyoverdine. *Research in Microbiology*, 148(4), 327–336.
- 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 canola (*Brassica Napus L.*) *Heliyon* 9: e14193
- Teiba, I.I., (2023). Microbial Allies in Agriculture: Harnessing Plant Growth-Promoting Microorganisms as Biocontrol Agents. *Plants*, 10(1), 12.
- Tinoco-Tafolla, H. A., López-Hernández, J., Ortiz-Castro, R., López-Bucio, J., Reyes de la Cruz, H., Campos-García, J., & López-Bucio, J. S. (2024). Sucrose supplements modulate the *Pseudomonas chlororaphis*–*A. thaliana* interaction via decreasing the production of phenazines and enhancing the root auxin response. *Journal of Plant Physiology*, 297, 154259.
- Tremblay, J., & Déziel, E. (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics*, 11(1), 587. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-587>
- 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.
- Tsukanova, K. A., Chebotar, V. K., Meyer, J. J. M., & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, 113, 91–102. Conrath, U., Beckers, G. J. M.,

- Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97-119.
- 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 brasiliense* 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 is induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 453–483.
- Van Rij, E. T., et al. (2004). Influence of carbon sources on phenazine production by *Pseudomonas chlororaphis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 6762–6768.
- Vargas, D. F., & Roschzttardtz, H. (2023). Histochemical detection of iron in plant tissues using the Perls/DAB method. *Bio-protocol*, 13(2), e4627
- Venturi, V. (2005). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 274-291.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586.
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2022). *Pyoverdine siderophores: From biogenesis to biosignificance*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(2), e00015-21.

Vriet, C., Russinova, E., & Reuzeau, C. (2013). From squalene to brassinolide: The steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom. *Molecular Plant*, 6, 1738–1757

Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as a biosurfactant. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(7), 579–588

Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., & Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *Journal of Bacteriology*, 193(14), 3606–3617.

Wenner, N., Maes, A., Cotado-Sampayo, M., & Lapouge, K. (2013). NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 virulence. *Environmental Microbiology*, 16(4), 1053-1068.

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.

Xin, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328.

Zdorovenko, E. L., et al. (2015). Structural diversity of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species. *Carbohydrate Polymers*, 117, 972–980.

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 comparison of genomics with three *Pseudomonas* strains. *Microbiological Research*, 237, 126483.

Zhang, Y., Pan, X., Wang, L., & Chen, L. (2020). Iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the involved iron-targeted anti-biofilm strategies. *Journal Of Drug Targeting*, 29(3), 249-258.

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.

Zhou, X., Li, Y., Wang, J., & Hu, X. (2022). Biological control of take-all and growth promotion in wheat by *Pseudomonas chlororaphis* YB-10. *Frontiers in Microbiology*, 13.

12. Anexo

Journal of Plant Physiology 297 (2024) 154259



Sucrose supplements modulate the *Pseudomonas chlororaphis*-*Arabidopsis thaliana* interaction via decreasing the production of phenazines and enhancing the root auxin response

Hugo Alejandro Tinoco-Tafolla^a, José López-Hernández^a, Randy Ortiz-Castro^b, José López-Bucio^a, Homero Reyes de la Cruz^a, Jesús Campos-García^a, Jesús Salvador López-Bucio^{c,*}

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^b Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster BioMimic®, Instituto de Ecología, Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, A.C. 91073 Veracruz, Mexico

^c Catedrático (IXM) CONAHCYT-Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:
Pseudomonas
Sugars
Phenazines
Arabidopsis development
Defence

ABSTRACT

Management of the plant microbiome may help support food needs for the human population. Bacteria influence plants through enhancing nutrient uptake, metabolism, photosynthesis, biomass production and/or reinforcing immunity. However, information into how these microbes behave under different growth conditions is missing. In this work, we tested how carbon supplements modulate the interaction of *Pseudomonas chlororaphis* with *Arabidopsis thaliana*. *P. chlororaphis* streaks strongly repressed primary root growth, lateral root formation and ultimately, biomass production. Noteworthy, increasing sucrose availability into the media from 0 to 2.4% restored plant growth and promoted lateral root formation in bacterized seedlings. This effect could not be observed by supplementing sucrose to leaves only, indicating that the interaction was strongly modulated by bacterial access to sugar. Total phenazine content decreased in the bacteria grown in high (2.4%) sucrose medium, and conversely, the expression of *phzH* and *pslA* genes were diminished by sugar supply. Pyocyanin antagonized the promoting effects of sucrose in lateral root formation and biomass production in inoculated seedlings, indicating that this virulence factor accounts for growth repression during the plant-bacterial interaction. Defence reporter transgenes *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* were induced in leaves, while the expression of the auxin-inducible, synthetic reporter gene *DR5::GUS* was enhanced in the roots of bacterized seedlings at low and high sucrose treatments, which suggests that growth/defence trade-offs in plants are critically modulated by *P. chlororaphis*. Collectively, our data suggest that bacterial carbon nutrition controls the outcome of the relation with plants.

1. Introduction

Plants sense the environment for growth and fitness. In the rhizosphere, root secretions and microbe-derived molecules are part of a sophisticated chemical recognition system that operates in organisms from different kingdoms that the root itself interprets to grow or defend (Raaijmakers et al., 2009; Ortiz-Castro et al., 2009; Cheng et al., 2019; Ravelo-Ortega et al., 2023). Nutritional carbon resources derived from plant exudates include sugars, organic acids, amino acids and more specialized metabolites such as terpenes, which configure the rhizosphere microbiome (Huang et al., 2019), and many phytochemicals

purified from plants can modulate soil microbiome in the absence of plants (Badri et al., 2013). Rhizobacteria may effectively colonize the root and enhance plant development through the modulation of phytomolecular pathways, promoting the acquisition of nutrients, suppressing potential pathogens and/or influencing plant immunity (Ortiz-Castro et al., 2009; Berendsen et al., 2012; López-Hernández et al., 2023).

Among plant growth promoting traits, changes in root architecture through the production of lateral roots, as well as root waving and skewing movements driven by the bacteria, prime roots for enhanced soil exploration and better usage of sparingly soluble or less accessible

* Corresponding author.

E-mail addresses: jlopezb@conahcyt.mx, salvador.bucio@umich.mx (J.S. López-Bucio).

nutrients such as iron and phosphorus (Raaijmakers et al., 2009; Jiménez-Vázquez et al., 2020; Lewin et al., 2021; López-Hernández et al., 2023). The *Pseudomonas* genus includes both plant probiotic species such as *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* and *P. brassicae*, but also phytopathogens such as *P. aeruginosa* and *P. syringae* (Qessaoui et al., 2018; Sah et al., 2021; Li et al., 2022; López-Hernández et al., 2023). The growth promoting capacity of different *Pseudomonas* isolates barely depends on single traits, since production of auxins, *N*-acyl-*L*-homoserine lactones and cyclodipeptides accounts for biomass production and root branching (Ortiz-Castro et al., 2009; Großkinsky et al., 2016; Uzma et al., 2022).

The synthesis of different compounds with roles in communication with eukaryotic hosts by *Pseudomonas* species is regulated by a quorum-sensing (QS) mechanism. It has been extensively studied in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic human and plant pathogen (Rahme et al., 1997; Ortiz-Castro et al., 2014). *P. aeruginosa* PAO1 produces two *N*-acyl-*L*-homoserine lactones (AHLs), C4-HL, and 3-oxo-C12-HL for cell-to-cell communication, which control virulence factors, resistance to oxidative stress, motility, and biofilm formation (Subramoni et al., 2021; Zhang et al., 2021). In concordance, plants interacting with the PAO1 strain experience growth retardation and manifest disease symptoms that are missing in mutants unable to produce 3-oxo-C12-HL (Ortiz-Castro et al., 2011). This correlates with decreased production of pyocyanin, a phenazine with antibiotic properties that strongly represses root growth (Ortiz Castro et al., 2014).

Provision of carbon to the growth medium of *P. aeruginosa* PAO1 downregulated the QS system and reduced the production of pyocyanin and elastase (Chen et al., 2020). Thus, sugars appear to be critical for *P. aeruginosa* pathogenesis through decreasing the production of virulence factors and therefore, bacteria could change their host relationships upon availability of carbon resources for energetic metabolism. For bacteria that interact with plants, which rely on photosynthates to grow and thrive, this possibility remains largely unexplored.

P. chlororaphis species are frequently found in association with plants, and uneven information has been published regarding their interaction modes, behaving either as beneficial or pathogenic organisms. These species may promote biomass production, confer tolerance to abiotic stress, and resistance to phytopathogens (Cho et al., 2011; Tienda et al., 2020; Raio and Puopolo, 2021; Villar-Moreno et al., 2022). *P. chlororaphis* also produces indole-3-acetic acid, which induces auxin signaling and promotes lateral root formation (López-Hernández et al., 2023), as well as blends of volatile organic compounds (VOCs), siderophores, and antibiotics that effectively antagonize plant pathogens (Raio and Puopolo, 2021). *P. chlororaphis* is a prominent producer of phenazines, a class of nitrogen-containing heterocyclic metabolites with roles as biocontrol agents, but also affects the growth and induces the systemic resistance in plants (Chin-A-Woeng et al., 1998; Gross and Loper, 2009; Biessy and Filion, 2018; Yu et al., 2018). The above information points to a very dynamic behaviour of bacteria, which may largely depend on growth conditions to manifest particular traits for communication with plants.

In this work, through the analysis *in vitro* of the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction, we studied the influence of carbon availability on the bacterial behavior and plant developmental response. Our results show that sucrose supplements shift the deleterious effects on plant growth caused by the bacterium to resume shoot and root growth by down regulating the production of phenazines, and enhancing the root auxin response, which account for the formation of more branched root systems and biomass production.

2. Material and methods

2.1. Biological materials

Seedlings of *Arabidopsis thaliana* wild-type ecotype Col-0 and reporter lines expressing the *uidA* gene under the *DR5* promoter (Ulmashov

et al., 1997), *PATHOGENESIS RELATED 1 (PR-1)* (Shu-Qing et al., 2004), and *LIPOXYGENASE 2 (LOX2::GUS)* (Vellosillo et al., 2007) activated by auxins, salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), respectively, where used to test their regulation in plants whose roots were placed in contact with or without a streak of *Pseudomonas chlororaphis* isolated in a previous study (López-Hernández et al., 2023).

2.2. Plant growth and development

Arabidopsis thaliana seeds were disinfected using 96% ethanol, 20% chlorine bleach solutions and washed three times with sterilized distilled water, then placed at 4 °C for 48 h into a cooler. After vernalization, seeds were germinated and seedlings were grown on 0.2X Murashige and Skoog (MS) agar medium (Murashige and Skoog, 1962), at 21 °C, with a 16 h/8 h light/darkness photoperiod in a growth chamber (Percival AR-95 L). Four day-old seedlings were transferred to fresh 0.2X MS agar medium supplemented with 0, 0.6%, 1.2%, 1.8% or 2.4% sucrose, over a streak of 1 µL of precultured *Pseudomonas chlororaphis* with 0.8 optical density at 600 nm in Luria-Bertani (LB) liquid medium. Developmental parameters were determined 7 days after transfer plants to axenic or streaked media. Primary root length was measured with a ruler taking into account the growth of the root after transfer to the different conditions, and the lateral roots were counted using a Leica L2 stereomicroscope. The fresh biomass was weighted using an analytical scale. Representative images of the Petri plates were taken using a digital camera (Nikon D50) and magnifications captured using the Leica L2 stereomicroscope and a digital camera.

According to Ortiz-Castro et al. (2014) pyocyanin has effects on the development of *Arabidopsis* roots at 5 µg/mL, this concentration is within physiological concentrations known to be produced by *Pseudomonas* (Abo-Zaid et al., 2015). Here pyocyanin (SIGMA) treatments were performed by adding 4 µg/ml of the compound to 0.2X MS agar medium plates with varied sucrose treatments. The developmental parameters affected by pyocyanin in plants were determined 12 days after transfer from pyocyanin free medium.

2.3. Histochemical determination of GUS activity

Arabidopsis seedlings expressing *DR5::GUS*, *PR-1::GUS* and *LOX2::GUS* were immersed in a solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) in sodium phosphate 100 mM buffer, pH 7, supplemented with 2 mM K₄Fe(CN)₆ and 2 mM K₃Fe(CN)₆ at 37 °C and incubated overnight. Stained seedlings were fixed with methanol 20% (v/v) and HCl 0.24 at 60 °C for 45 min and cleared with NaOH 7% at room temperature for 30 min, and dehydrated via immersion of 40, 20, and 10% ethanol solutions (Malamy and Benfey, 1997). Cleared seedlings were placed on glass slides with glycerol 50% and sealed with coverslips and commercial nails varnish prior to capture the different images using a Leica L2 stereomicroscope and a Leica DM500B microscope.

2.4. Determination of virulence factors

Pseudomonas chlororaphis preculture (30 µL) from LB medium was added to fresh LB medium supplying 0.6% or 2.4% sucrose and incubated for 48 h at room temperature, then centrifuged at 13500 rpm in a Thermo Scientific ST 16R centrifuge with a Thermo Scientific FiberLite F15-6x100y rotor to obtain the cell-free supernatant.

2.4.1. Pyoverdine

Cell-free supernatants (100 µL) of the *P. chlororaphis* cultures were added with 900 µL of a pyridine/acetic acid solution (pyridine 50 mM, acetic acid 50 mM, pH 5.0) and mixed. Absorbance was measured spectrophotometrically at 380 nm, and quantification was performed using the molar extinction coefficient (ε) of pyoverdine 16,500 M⁻¹ cm⁻¹ (Hoegy et al., 2014).

2.4.2. Rhamnolipids

Cell-free supernatants obtained from cultures of *P. chlororaphis* were used to quantify rhamnolipids using the orcinol method based on a standard curve of rhamnose measuring absorbance at 421 nm in a spectrophotometer (Wang et al., 2007).

2.4.3. Phenazines

Phenazine concentration was estimated using 1 mL of the cell-free supernatant mixed with 1 mL of chloroform, and the organic fraction was separated by mixing with 1 mL 0.2 N HCl, and collected to determine absorbance at 520 nm in a spectrophotometer (González et al., 2017).

2.5. Gene expression analysis

Total RNA from *P. chlororaphis* cultures interacting during 7 days with *Arabidopsis thaliana* in MS 0.2X medium with 0.6% and 2.4% of sucrose was prepared through the Trizol method (Invitrogen). *Arabidopsis* plants were harvested from 3 plates of each treatment and with the help of a bacteriological loop, bacterial streaks were harvested and resuspended in 100 μ L of distilled water to proceed with RNA extraction. Total RNA was used to obtain cDNA through Superscript II Reverse Transcriptase using reverse random hexamers (Invitrogen) in a reaction volume of 20 μ L for 1 μ g of RNA, according to the manufacturer's instructions. cDNA was added to a qPCR SYBR Green reaction to estimate the expression of *pslA* through 5'-3' ATATCTTCAGCAACGCCCTG 3'-5' GTGGTTGCGTACCAAGGTATT and *rpoS* using 5'-3': CTATGT-CAATCGCGGACTGT 3'-5' AGGTAGACGGTGTGAGCTCCCT primers (Díaz-Pérez et al., 2022) to evaluate *phzH* expression 5'-3' CGAGGTGTACAACCACGATG 3'-5' GATGGACTTGATCTCCGAGC primers were used. The qPCR reaction was performed in an ABI StepOne thermocycler (Applied Biosystems) with the thermal cycling program 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s. The product was routinely examined using a dissociation curve as suggested by Applied Biosystems, and the amount of transcript was compared with the Applied Ct method with *rpoS* gene as an internal reference control (Alqarni et al., 2016). The 2 – ΔCT method was used to analyze the experimental data of the genes *phzH* and *pslA*.

2.6. Statistical analysis

For all experiments, the overall data were statistically analyzed by using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPadSoftware Inc.). One-way, two-way and three-way variance (ANOVA) analyses with Tukey's post hoc and t tests were performed to determine statistical differences. Different letters are used to indicate means that statistically differ ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. *Pseudomonas chlororaphis* represses growth of *Arabidopsis* seedlings and this effect is reversed by sucrose supplements

Pseudomonas chlororaphis 3T4-12 was previously reported to repress plant growth and root branching (López-Hernández et al., 2023). To analyze if carbon supplements may change the plant-bacteria relationship, *Arabidopsis* seedlings were transferred from Petri plates containing Murashige and Skoog 0.2X (MS 0.2X) medium supplemented with 0.6% sucrose used as basal medium, to fresh MS 0.2X media without sucrose (0%) or enriched with 0.6%, 1.2%, 1.8% or 2.4% sucrose, or placed over bacterial streaks made on the surface of the media with the above indicated sucrose concentrations for seven days. The increase in sucrose concentration from 0% to 2.4% promoted the growth of the primary root in axenically-grown seedlings in a dose-dependent manner, being the 1.2%, 1.8% and 2.4% the most effective treatments (Fig. 1a). In medium lacking sucrose (0%) or supplemented with 0.6% sucrose, bacterial

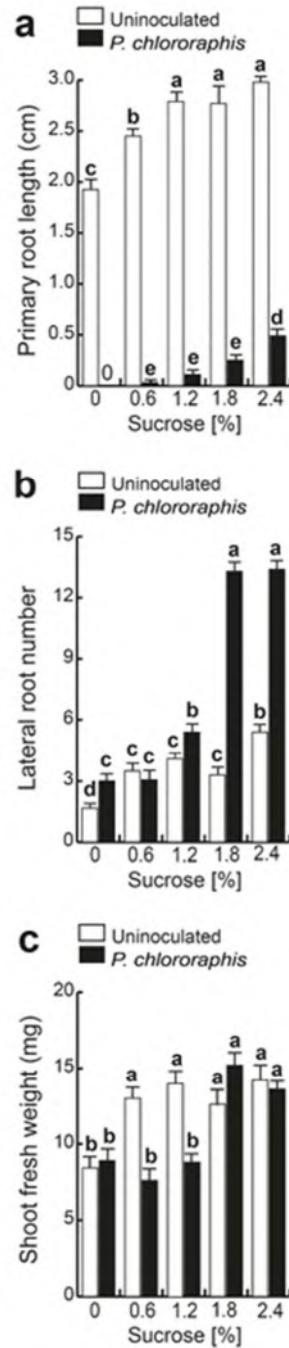


Fig. 1. Developmental parameters of *Arabidopsis thaliana* seedlings in co-inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* under different sucrose concentration. Graphical representations of the primary root length (a), lateral root number (b) and shoot fresh weight (c). Bars represent the mean \pm SE from 18 seedlings from 3 independent Petri plates. Different letters indicate statistical differences determined through two-way ANOVA, followed by a Tukey for paired comparisons tests ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with comparable results.

cocultivation strongly repressed the growth of the primary root, and this effect was partially reverted by sugar (Fig. 1a). The number of lateral roots increased up to 4-fold in axenic seedlings grown in medium with 2.4% sucrose as compared to medium lacking sucrose (Fig. 1b). Noteworthy, bacterial inoculation at 1.8% and 2.8% sucrose led to nearly 10-times more lateral roots than in the 0% sucrose condition (Fig. 1b). Regarding biomass production, in the inoculated seedlings the shoot fresh weight at 0%, 0.6% and 1.2% sucrose was repressed, whereas biomass recovery was evident by increasing its concentration to 1.8% and 2.4% (Fig. 1c). Supplementary Fig. S1 shows the phenotypes of shoots and roots in axenically-grown seedlings and in seedlings that were co-cultivated over the bacterial streak, where it can be appreciated the restoration of leaf growth and the promotion of root branching by the bacterium upon supplying sucrose into the media. Notably, without

sucrose *P. chlororaphis* does not spread over the primary root tip as occurs with the supply of sucrose (Fig. S1). These data show that plant growth repression by *P. chlororaphis* is reversed by increasing the concentration of sucrose in the media and that the sugar supplements promoted both plant and bacterial growth.

The interaction *Arabidopsis* - *P. chlororaphis* was evaluated for 21 days after transfer to 0.6% and 2.4% sucrose. Inoculated seedlings under 0.6% sucrose are stunted with severe disease symptoms compared with those growing in axenic conditions (Fig. S2 a, b, e, f and g). Both uninoculated and inoculated seedlings under 2.4% sucrose maintain increased growth, however, the root system of inoculated seedlings is highly developed spanning a major area and the fresh weight is increased up 2-fold comparing with uninoculated seedlings under 2.4% sucrose (Fig. S2 c, d, e, f and g). These data indicate that the promotion

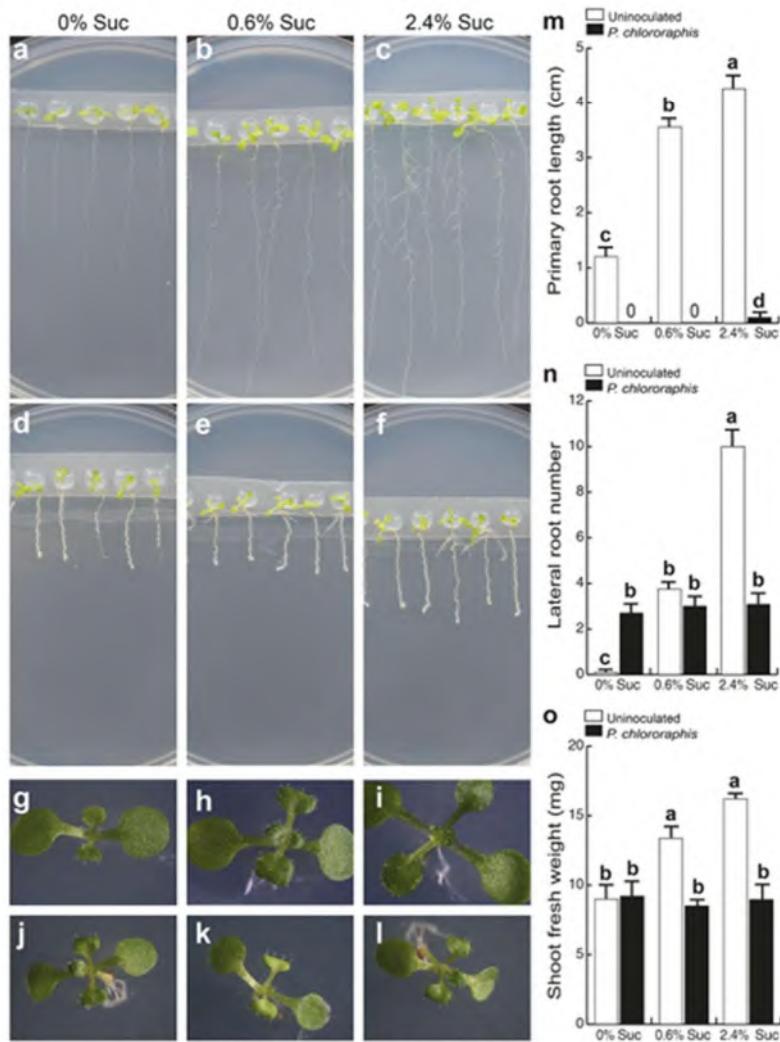


Fig. 2. Effect of sucrose supplementation to the *Arabidopsis thaliana* foliage during plant root interaction with *Pseudomonas chlororaphis*. Representative images of *Arabidopsis thaliana* seedlings transferred from MS 0.2X medium with 0.6% sucrose to fresh medium placing the shoot over a drop of media with 0%, 0.6% or 2.4% sucrose and the roots over axenic or streaked MS 0.2X media with 0.6% sucrose uninoculated or inoculated with *P. chlororaphis* (a-l). Graphical representation of the primary root (m), number of lateral roots (n) and shoot fresh weight (o) measured in the indicated treatments. Bars represent mean \pm SE of 18 seedlings from 3 independent Petri plates, where different letters indicate statistical differences determined by two-way ANOVA followed by Tukey post hoc analysis ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with comparable results.

of the root system development is depending on PGPR activity of *P. chlororaphis* once sucrose diminishes its virulence.

3.2. Local availability of sucrose mediates root branching and plant biomass production in *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction

Plants and bacteria need an adequate supply of sugars to grow, which usually come from photosynthesis and are consumed during metabolism to obtain energy and cell blocks (Lastdrager et al., 2014). To know if the change in the growth of plants in contact with *P. chlororaphis* upon increasing the concentration of sucrose in the medium could be caused by a better growth of the plant, or a change in the behavior of bacteria during the interaction, an experiment was conducted in which plant roots were allowed to interact with the inoculum under 0.6% sucrose and plant shoots were in contact over drops of MS 0.2X medium solidified with agar enriched or not with 0.6% or 2.4% sucrose, and separated from the plate by a sterilized plastic strip that avoids bacterial spread over the shoot. Seven days later, 2.4% sucrose in the drop of medium that supported the growth of the foliage, slightly stimulated root growth in axenic and inoculated plants (Fig. 2a-l), but the increase in primary root growth (Fig. 2m), lateral root formation (Fig. 2n), and fresh weight (Fig. 2o) seen with the supply of 2.4% sucrose to the entire Petri dish, which influences bacterial behavior was not observed. These results show that the recovered growth of the plant in bacteria-root co-cultivation did not depend of the sucrose available to the shoot but by the

nutrition of the bacterium, which in turn decreases its negative effects to plants and induces lateral root formation.

3.3. High sucrose availability modulates the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction through decreasing bacterial phenazine production and the expression of genes related to phenazine biosynthesis

Pseudomonas chlororaphis strains produce antibiotics, such as phenazines, pyrrolnitrine, 2-hexyl, 5-propyl resorcinol and hydrogen cyanide, as well as siderophores such as pyoverdine and achromobactine that may affect plant growth (Raio and Puopolo, 2021). To analyze the mechanism by which sucrose counteracts the plant growth repressing effect of *P. chlororaphis*, the amounts of compounds produced by this bacterium, including siderophores and phenazines, were quantified. Our findings show that phenazine production by *P. chlororaphis* in 2.4% sucrose diminished significantly compared to 0.6% sucrose treatment. However, the production of pyoverdine and rhamnolipids did not change (Fig. 3a-c). Subsequently, we quantified by qRT-PCR the expression of the *phzH* and *pslA* genes involved in the biosynthesis of phenazine-1-carboxamide and exopolysaccharides, respectively. The data showed that expression of the genes *phzH* and *pslA* is highly induced under 0.6% sucrose in *P. chlororaphis* compared with the expression of the *rpoS* gene used as control (Fig. 3d and e), and the expression of both genes is reduced by addition of 2.4% sucrose. These data indicate that sucrose reduces the production of virulence factors.

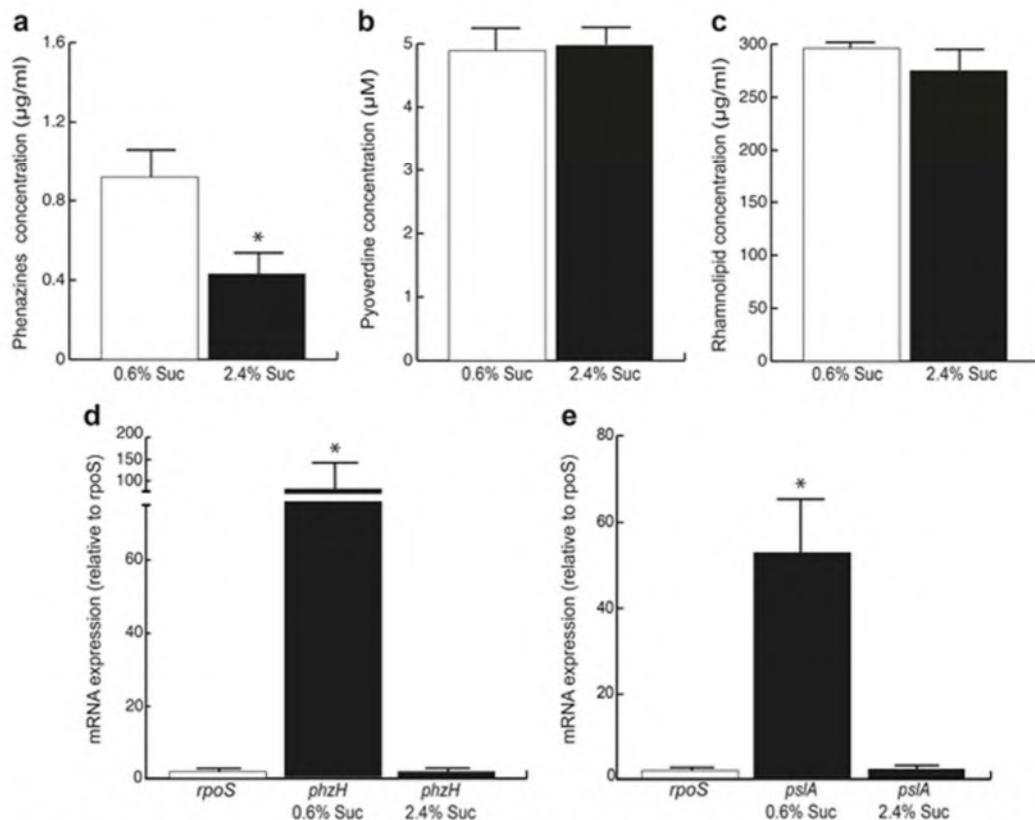


Fig. 3. Influence of sucrose on the production of virulence factors and the expression of the related genes in *Pseudomonas chlororaphis*. Determination of phenazines (a), pyoverdine (b) and rhamnolipids (c) produced by the bacterium under 0.6% or 2.4% sucrose (Suc). The bars represent the mean \pm SD of 3 different experiments of the indicated treatments, the asterisk indicates statistical differences determined by Student-t test ($P < 0.05$). Expression relative to *rpoS* of *phzH* (d) and *pslA* (e) genes in bacteria growing under differential sucrose concentrations. The bars represent the mean \pm SD of 3 different experiments, the asterisk indicates statistical differences determined by Student-T test ($P < 0.01$).

3.4. The virulence factor pyocyanin abrogates plant growth recovery in high sucrose medium in the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction

Pyocyanin is a blue secondary metabolite secreted into the medium by *P. aeruginosa*, which strongly represses root development and biomass production in *Arabidopsis* seedlings (Ortiz-Castro et al., 2014). To assess whether exogenously supplied pyocyanin could influence the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction *in vitro*, this metabolite was supplemented to the MS 0.2X medium containing 0.6% or 2.4% sucrose. Pyocyanin antagonized the effect of 2.4% sucrose in stimulating primary root growth (Fig. 4a) and also the bacterial stimulation of both root branching (Fig. 4b) and shoot biomass production (Fig. 4c). Supplementary Fig. S3 shows the phenotypes of axenically grown seedlings that were co-cultivated over the bacterial streak with or without sucrose and/or pyocyanin. Thus, sucrose and pyocyanin behaved antagonistically in the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* interaction.

3.5. *P. chlororaphis* promotes the expression of plant defence and auxin-inducible, reporter genes at low and high sucrose supplements

The plant interaction with bacteria may influence both defence and hormonally-regulated gene expression. The plant growth repression upon cocultivation with *P. chlororaphis* suggested that possibly, a defence reaction may be occurring, which strengthen plant immunity. To test this possibility, *Arabidopsis* transgenic lines expressing the defence related genes *PR-1::GUS*; *LOX2::GUS*, and the auxin inducible construct *DR5::GUS* were transferred over streaks of *P. chlororaphis* in media supplemented with 0.6% or 2.4% sucrose, kept in interaction during 7 days and then the seedlings were taken from the medium and processed for GUS histochemical analysis. The seedlings expressing GUS were further cleared to eliminate pigments and carbohydrates and to show the GUS expression pattern in blue colour. The expression of the reporter genes did not change in shoot or roots in uninoculated plants under low or high sucrose (Fig. 5a-l), while all were induced in leaves of inoculated plants in both sucrose conditions (Fig. 5m-r). In roots of inoculated plants only *DR5::GUS* construct was clearly induced (Fig. 5s-x), which suggest that growth/defence trade-offs in plants are critically modulated by *P. chlororaphis*.

3.6. *P. chlororaphis* did not promote root branching or foliage development in auxin insensitive *Arabidopsis* mutants

In the previous experiments *Pseudomonas chlororaphis* showed an increase in foliage development and lateral root formation in high sucrose medium compared to the low sucrose treatment, and auxin responsive *DR5::GUS* expression was also increased by sucrose, suggesting that the bacterial effects may be due to auxin. To test this possibility, WT and auxin-related mutants *tir-1*, *aux1-7*, *arf7/19* and *sly-1* were inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* at both 0.6% (Fig. 6a and c; Fig. S4) and 2.4% (Fig. 6b and d; Fig. S4) sucrose concentrations. The *tir-1* and *aux1-7* auxin mutants showed comparable growth repression to WT plants in co-inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* at low sucrose concentration while *arf7/19* and *sly-1* did not produce any lateral root (Fig. 6a; Fig. S4). The WT, *tir1* and *aux1-7* mutants showed an increase in the lateral root number in media with 2.4% sucrose, whereas *arf7/19* and *sly-1* present a poor development lacking lateral roots (Fig. 6b; Fig. S4). Regarding to biomass production, the inoculated WT plants at 0.6% sucrose have repressed shoot growth (Fig. 6c; Fig. S4) which was recovered by increasing sucrose to 2.4% (Fig. 6d; Fig. S4), the auxin mutants have shoot growth repression by *Pseudomonas chlororaphis* at low and high sucrose concentration (Fig. 6c, d and Fig. S4). These data suggest that the promotion of root branching and foliage development by *P. chlororaphis* under high sugar conditions involves auxin signaling.

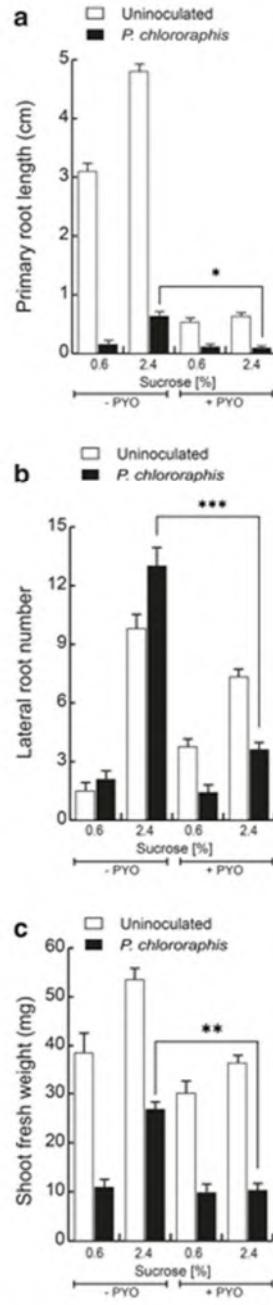


Fig. 4. Developmental parameters of *Arabidopsis thaliana* seedlings in co-inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* under contrasting sucrose concentration and pyocyanin supplementation. The primary root (a) lateral root number (b) and shoot fresh weight of plants growing in axenic media or inoculated with *P. chlororaphis* under 0.6 and 2.4% sucrose (Suc) with or without pyocyanin added to the MS medium (Pyo). The bars represent the mean \pm SE of 18 seedlings in 3 different experiments, letters indicate statistical differences determined by three-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc analysis ($P < 0.05$).

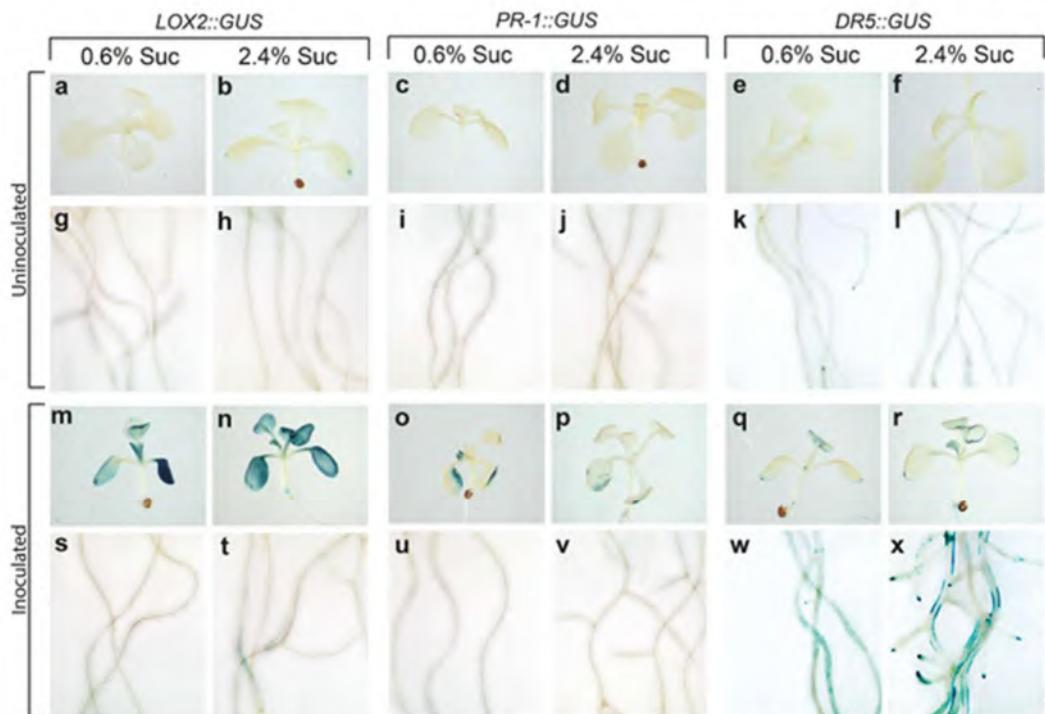


Fig. 5. Activation of jasmonic acid, salicylic acid, and auxin signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas chlororaphis*. Blue staining indicate expression the reporter genes *LOX2::GUS*, *PR-1::GUS* and *DR5::GUS* hormonal pathways from plants growing under axenic conditions (a-l) or inoculated (m-x) with *P. chlororaphis* in MS 0.2X medium with 0.6 and 2.4% sucrose (Suc) concentrations. Representative images of 15 seedlings from 3 technical replicates (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article).

4. Discussion

Plant growth and yield are greatly compromised due to declining soil resources and climate warming. Understanding how the plant microbiome contributes to plant health and productivity is an urgent necessity towards formulation of highly effective biostimulants (Mandal et al., 2023). The application of the so-called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is promising, basically because these microbes interact with roots in many beneficial ways, strengthening growth and/or defence. Growth promotion is related to the capability of bacteria to solubilize nutrients and to produce plant hormones (He et al., 2019; Badri et al., 2013; López-Hernández et al., 2023). It has been largely postulated that the plant defence reaction is very costly in terms of energy consumption, and therefore restricts growth to save energy when challenged with pathogens (Huot et al., 2014). How the growth/defence trade-offs are modulated in plants whose roots have been colonized with rhizobacteria has been scarcely investigated.

The *Pseudomonas* genus includes both plant beneficial and pathogenic species. *P. simiae*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. brassicaceae*, and *P. lurida* have been isolated from different environments and found to configure the architecture of the root system improving in this manner plant growth and biomass production (Zamioudis et al., 2013; Ortiz-Castro et al., 2020; López-Hernández et al., 2023). However, there is no single mechanism to explain their biological attributes, since the *Pseudomonas* strains CM11 and WCS417 influence root growth in a largely contrasting manner, for instance, CM11 inoculation leads to the inhibition of primary root growth, whereas WCS417 manifested the opposite trend and promoted primary root elongation. Interestingly, both bacteria shared common targets for inducing root branching, acting through the PLETHORA 3,5,7 pathway to prime lateral root initiation (Li et al.,

2022). These data suggest that the modes of interaction of *Pseudomonas* species with plants are highly dynamic, a notion reinforced by a recent report showing that not all *Pseudomonas* species isolated by their common property of solubilizing phosphate could neither induce the root auxin response nor the formation of lateral roots (López-Hernández et al., 2023). Auxins indeed could be biologically relevant towards an efficient phosphate solubilizing activity in *Pseudomonas* (Alemneh et al., 2021).

P. chlororaphis strongly repressed the growth of *Arabidopsis* seedlings grown on Petri plates with 0.2X Murashige and Skoog agar medium and when sparingly soluble calcium phosphate was supplied as the sole phosphate source (López-Hernández et al., 2023). In our study, the reason of using *P. chlororaphis* instead of a well-known PGPR was the possibility that the bacterium could change its attributes upon varying the availability of nutrients such as sugars and to explore more in detail how *Pseudomonas* spp., either pathogenic or PGPR behave under changing nutritional scenarios, which may be very relevant for assessing their true biotechnological potential. Furthermore, *in vitro* protocols for plant-bacteria interaction are suitable for testing both plant and bacteria responses during multi varied conditions, the knowledge gained could be extended to soil conditions, and may be useful in crops when applying a bioinoculant, in this case sugar.

The plant growth repression by the bacterium observed in the medium without sucrose (0%) or with limited sucrose (0.6%) might be caused by the production of compounds that promote rhizosphere competence, such as antibiotics and virulence factors that are environmentally regulated. The production of phenazines by *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, and *P. fluorescens* increased between one and three orders of magnitude under phosphate limitation, when compared to nitrate limitation (McRose and Newman, 2021).

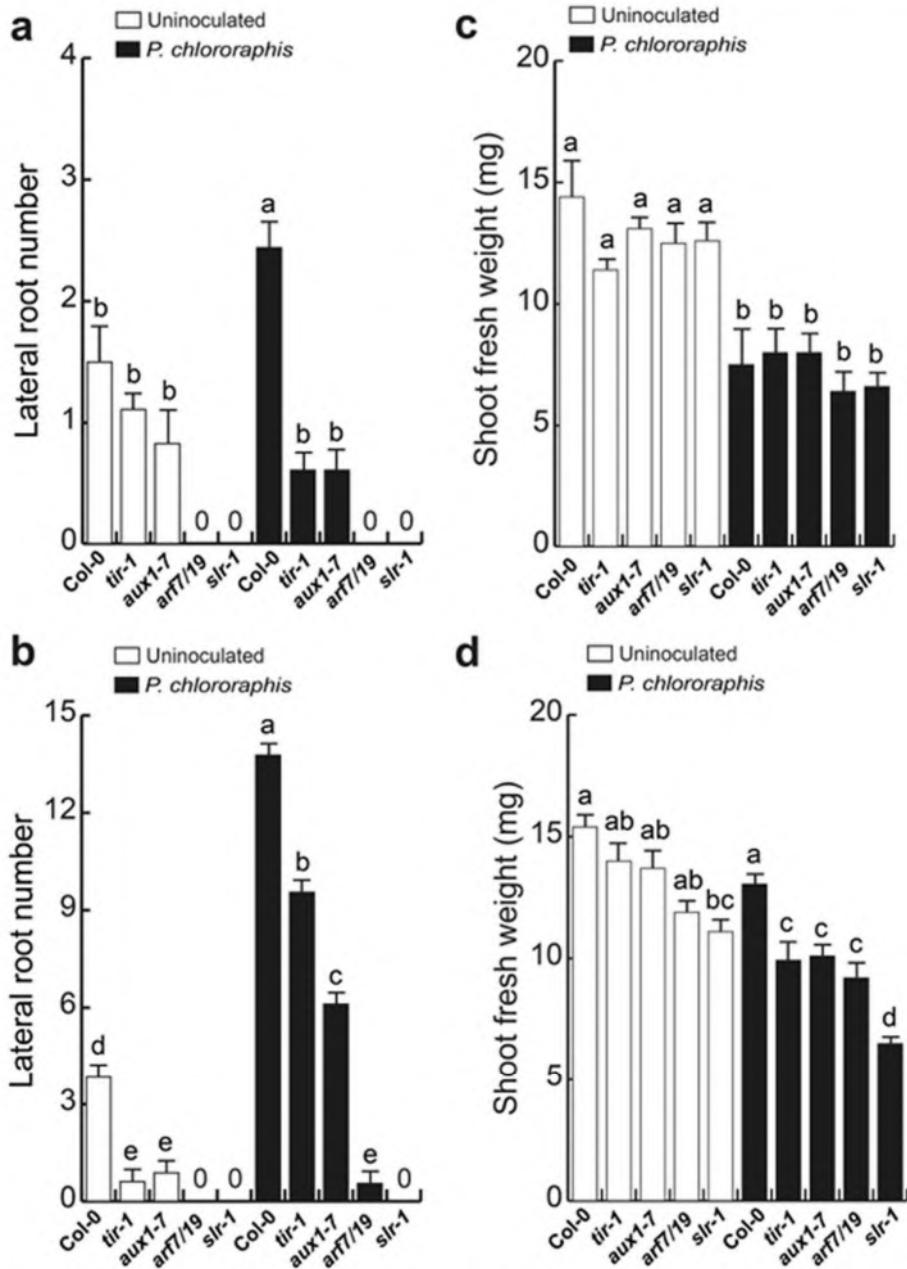


Fig. 6. Lateral root formation and shoot biomass production in *Arabidopsis thaliana* WT and auxin-related mutants in co-inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* under contrasting sucrose concentration. Graphical representations of lateral roots and shoot fresh weight from *Arabidopsis* WT and auxin-related mutants under axenic conditions or inoculated with *P. chlororaphis* in MS0.2X medium with 0.6% (a and c) or 2.4% (b and d) sucrose (Suc). Bars represent mean \pm SE of 18 seedlings from three independent Petri plates. Different letters indicate statistical differences determined by two-way ANOVA followed by Tukey post hoc analysis ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with comparable results.

Noteworthy, sucrose supplements restored partially primary root growth, but fully plant biomass production and strongly promoted lateral root formation in *Arabidopsis* seedlings whose roots were placed over a *P. chlororaphis* streak in agar medium for 7 days and 21 days.

To assess if the change in the growth of plants whose roots are in

contact with *P. chlororaphis* upon increasing the concentration of sucrose in the medium could be caused by a better growth of the plant, or a change in the behavior of bacteria during the interaction, an experimental system was devised in which the medium for bacteria-root interaction was supplemented with 0.6% sucrose, this provided the

minimum concentration (basal) of sugar for both plant and bacterial growth. On the other hand, the shoots were placed over drops of agar-solidified medium supplemented with 2.4% sucrose. The sugar-enriched drops were separated from the Petri plate surface by sterilized plastic parafilm strips. Such design enables plants to take sucrose specifically from the shoot as demonstrated in previous reports (MacGregor et al., 2008; Raya-González et al., 2017). The plastic barrier also avoids the spread of the bacteria into the shoot. According to our data, the root growth restoration could not be observed by supplementing sucrose to leaves only, indicating that the plant response was strongly modulated by bacterial access to sugar resources, and apparently, did not rely on the endogenous sugar pool in the plant foliage.

In our report, pyoverdine, rhamnolipids and QS related genes were measured to understand how sugar availability influences the production of virulence factors, siderophores and biofilm formation potential, which may be relevant for *P. chlororaphis* interactions with plants. The total phenazine content decreased in *P. chlororaphis* grown in high (2.4%) sucrose medium, and the expression of *phzH* and *pslA* genes were also repressed. The *pslA* gene encodes UDP-glucose lipid permease involved in exopolysaccharide biosynthesis and biofilm formation (Overhage et al., 2005), whereas the gene *phzH* encodes a protein with homology to asparagine synthetases that belong to the class II glutamine amidotransferases, involved in the biosynthesis of phenazine-1-carboximide in *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng et al., 2001). Mutation of *phzH* caused loss of biocontrol activity, showing the importance of phenazines for antagonistic bacterial traits. Both *pslA* and *phzH* genes decreased their expression when compared with the housekeeping gene *rpoS* by high glucose supplements, indicating that the bacterial behavior and the underlying communication established with plants depend on the nutritional availability of sugars. Our report agrees well with the data of Chen and coworkers (2020), who indicated that high glucose into the medium inhibits the production of virulence factors including pyocyanin and elastase in pathogenic *P. aeruginosa* strain PAO1, which correlated with repression of regulatory quorum-sensing related genes *lasI*, *lasR*, *rhlI*, and *rhlR*.

The role of sugars as cross-kingdom signalling molecules has just begun to be unveiled. Sucrose and glucose are part of the nutritional compounds present in root exudates that act as positive chemotactic compounds, able to attract fungi and bacteria to the rhizosphere (Feng et al., 2021; Esparza-Reynoso et al., 2021; Loo et al., 2024). A recent work demonstrated that sugars differentially distributed along the root axis modulate microbiota colonization, SWEET2, 4, 11, 12 transporters regulate the abundance of sugars in the primary root and its down regulation results in changes on root microbiota organization. Particularly, the expression of SWEET12, which transports mainly sucrose, is induced by microbes and the double mutant *sweet11-12* differ in the bacterial communities colonizing the root when compared with WT plants (Loo et al., 2024). In the interaction of *Arabidopsis* roots with the plant probiotic and biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*, the presence of root exudates led to the repression of fungal genes involved in complex carbohydrate degradation and favored the acquisition of simple carbon sources such as sucrose (Villalobos-Escobedo et al., 2020). In turn, fungal volatiles increased endogenous sugar levels in shoots, roots and root exudates, which improved root growth and branching and strengthened the symbiosis (Esparza-Reynoso et al., 2021).

Thus, it appears that not only fungi, but also bacteria as shown in the current report, are able to respond to the plant by adjusting its metabolism, which may determine a delicate growth/defense balance.

Pyocyanin acts as a virulence factor and a quorum sensing signalling molecule for *P. aeruginosa* (Jayaseelan et al., 2014). Although it is at present unknown whether *P. chlororaphis* could produce pyocyanin, it already biosynthesizes three phenazines: phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid (2OHPCA) and 2-hydroxy-phenazine (2OHPHZ), and these appear to be required for biocontrol and wheat rhizosphere competence (Yu et al., 2018). We performed experiments to analyze if exogenously supplied pyocyanin

could influence the *P. chlororaphis*-*A. thaliana* relationship under contrasting sucrose supplements. This metabolite not only abrogated the effect of 2.4% sucrose in stimulating primary root growth, but also the bacterial stimulation of both root branching and shoot biomass production, suggesting that pyocyanin antagonizes plant developmental traits being influenced by both the bacterium and the carbon resource.

To analyze how *P. chlororaphis* modulates the growth/defence trade off in the plant, experiments were performed using *Arabidopsis* transgenic plants expressing the defence related genes *PR-1::GUS*; *LOX2::GUS*, and the auxin inducible construct *DR5::GUS*. Interestingly, *P. chlororaphis* promoted the expression of *LOX2::GUS* in leaves under low and high sucrose supplements, which implies the induction of the JA response that critically orchestrates the plant resistance to herbivores and the adaptive response to wounding. The induction of auxin signalling by the bacterium, was particularly strong in roots, and may explain the increases on lateral root formation, and consequently, *Arabidopsis* mutants in genes for auxin perception or signal transduction have impaired lateral root formation even under interaction with *P. chlororaphis* at high sucrose conditions.

Several reports have been published addressing the biological relevance of beneficial *Pseudomonas* for plant immunity, but also modifying root system architecture, particularly, it is common to find out that these bacteria inhibit primary root growth through influencing auxin signalling, and induce root branching implying mutual benefit. For bacteria, a large root surface area ensures adequate provision of rich carbon exudates, whereas for plants a more branched root system promotes soil exploration for water and nutrient acquisition (Zamioudis et al., 2013; Ortiz-Castro et al., 2020; Li et al., 2022; López-Hernández et al., 2023). On the other hand, pathogenic *Pseudomonas*, for instance *Pseudomonas aeruginosa* through inducing plant sickness inhibits overall plant growth, however, it still promotes lateral root formation through the production of virulence factors (Ortiz-Castro et al., 2014; Solis-Ortiz et al., 2022). Although *P. chlororaphis* is considered a beneficial microorganism to plants, its effects on *Arabidopsis* are similar to those induced by the pathogen *P. aeruginosa* PAO1. However, when the virulence of *P. chlororaphis* is suppressed by increasing carbon amounts during plant-bacteria interaction, beneficial traits are manifested, such as an improving root system architecture and the induction of plant defences.

These data provide a promising alternative of using this bacterium to boost not only root branching, but also to reinforce plant immunity, which may help plants to fight against pathogens. It remains to be tested if pyocyanin, rhamnolipids, and quorum sensing signals may directly activate plant promoters during developmental and stress adaptive responses.

5. Conclusions

Our results from the *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas chlororaphis* interaction under differential sucrose supplements reveal the importance of carbon nutrition for an agonist relation from bacteria to plants, where under low carbon availability *P. chlororaphis* represses growth and this is an undesirable trait for its application in agriculture. Root length and shoot weight were still significantly reduced by *P. chlororaphis* even in the presence of sucrose, which challenges its proposed role as a plant growth promoting bacterium. By increasing the amounts of sucrose to the growth media, the expression of genes responsible for bacterial virulence is inhibited and the production of phenazines decreases, then, the bacteria have a mild repressing effect to plants. The induction of the JA and SA signalling in leaves as a response to *P. chlororaphis* may be correlated with the deleterious effects to plants and the underlying defence reaction elicited by this bacterium. Collectively, these results help to understand the growth/defence trade-offs in plant-bacteria interactions that ultimately determine plant fitness and productivity.

CRediT authorship contribution statement

Hugo Alejandro Tinoco-Tafolla: Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **José López-Hernández:** Methodology, Investigation. **Randy Ortiz-Castro:** Resources, Methodology. **José López-Bucio:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization. **Homero Reyes de la Cruz:** Writing – review & editing, Resources. **Jesús Campos-García:** Writing – review & editing, Methodology. **Jesús Salvador López-Bucio:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), México [Grant number FOR-DECYT-PRONACES/377863/2020].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154259>.

References

- Abo-Zaid, G., Wagih, E.E., Matar, S.M., Ashmawy, N.A., Hafez, E.E., 2015. Optimization of pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* JV21 using statistical experimental designs. *Int. J. Chemtech Res.* 8 (9), 137–148.
- Alemneh, A.A., Cawthray, G.R., Zhou, Y., Ryder, M.H., Denton, M.D., 2021. Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. *Arch. Microbiol.* 203, 3825–3837. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02364-w>.
- Alqarni, B., Colley, B., Klebensberger, J., McDougald, D., Rice, S.A., 2016. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiol Methods* 127, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.jmm.2016.06.008>.
- Badri, D., Chapparro, J.M., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M., 2013. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J. Biol. Chem.* 288 (7), 4502–4512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433300>.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>.
- Biessy, A., Filion, M., 2018. Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environ. Microbiol.* 20 (11), 3905–3917. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14395>.
- Chen, T., Xu, Y., Xu, W., Liao, W., Xu, C., Zhang, X., Cao, J., Zhou, T., 2020. Hypertonic glucose inhibits growth and attenuates virulence factors of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 20 (1).
- Cheng, Y.T., Zhang, L., He, S.Y., 2019. Plant-Microbe interactions facing environmental challenge. *Cell Host Microbe* 26 (2), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.009>.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloomberg, G.V., Van Der Bij, A.J., Van Der Drift, K.M.G.M., Schripsema, J., Kroon, B.A.M., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H., De Brujin, F.J., Thomas-Oates, J., Lugtenberg, B., 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-microbe Interactions* 11 (11), 1069–1077. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.11.1069>.
- Chin-A-Woeng, T.F., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J., Bloomberg, G.V., 2001. Introduction of the *pzhII* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. Strains. *Molecular Plant-microbe Interactions* 14 (8), 1006–1015. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2001.14.8.1006>.
- Cho, S.M., Park, J.Y., Han, S., Anderson, A.J., Yang, K., Gardener, B.M., Kim, Y.C., 2011. Identification and transcriptional analysis of priming genes in *Arabidopsis thaliana* induced by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Plant Pathol.* 30 (3), 272–279. <https://doi.org/10.5423/ppj.2011.273.272>.
- Díaz-Pérez, S.P., Solís, C.S., López-Bucio, J.S., Alarcon, J.J., Villegas, J., De La Cruz, H.R., Campos-García, J., 2022. Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm-associated is dependent on the pyoverdine and pyocyanin siderophores by quorum sensing modulation. *Microb. Ecol.* 86 (1), 727–741.
- Esparrago-Reynoso, S., Ruiz-Herrera, L.F., Pelagio-Flores, R., Macías-Rodríguez, L.I., Martínez-Trujillo, M., López-Corina, M., Sánchez-Nieto, S., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J., 2021. *Trichoderma atroviride*-emitted volatiles improve growth of *Arabidopsis* seedlings through modulation of sucrose transport and metabolism. *Plant Cell Environ.* 44 (6), 1961–1976. <https://doi.org/10.1111/pce.14014>.
- Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., Zhang, R., 2021. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root-microbe rhizosphere interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (13), 6655. <https://doi.org/10.3390/ijms22136655>.
- González, O., 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 cyclohexapeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microb. Ecol.* 73 (3), 616–629.
- Gross, H., Loper, J.E., 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26 (11), 1408. <https://doi.org/10.1039/b817075b>.
- Großkinsky, D.K., Tafner, R., Moreno, M.V., Stenglein, S.A., García de Salamone, I.E., Nelson, L.M., Novák, O., Strnad, M., van der Graaff, E., Roitsch, T., 2016. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 6 (1).
- He, Y., Pantigoso, H.A., Wu, Z., Vivanco, J.M., 2019. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biopesticide to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *J. Appl. Microbiol.* 127 (1), 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.14273>.
- Hoegy, F., Mislin, G.L.A., Schalk, L.J., 2014. Pyoverdine and pyochelin measurements. *Pseudomonas Methods and Protocols* 1149, 293–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_24.
- Huang, A.C., Jiang, T., Liu, Y.X., Bai, Y.C., Reed, J., Qu, B., Goossens, A., Nützmann, H.W., Bai, Y., Osbourn, A., 2019. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science* 364, 6440. <https://doi.org/10.1126/science.aau6389>.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., He, S.Y., 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant* 7 (8), 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/suu049>.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., Dharmaraj, S., 2014. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (4), 1159–1168.
- Jiménez-Velázquez, K.R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L.F., Ramos-Acosta, B.P., Cora-Arellano, J.I., Sáenz-Mata, J., López-Bucio, J., 2020. The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *Plant J.* 103, 1639–1654. <https://doi.org/10.1111/tpj.14853>.
- Lastdrager, J., Hamon, J., Smeekens, S., 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 65 (3), 799–807.
- Lewin, S., Francioli, B., Ulrich, A., Kolb, S., 2021. Crop host signatures reflected by co-association patterns of keystone bacteria in the rhizosphere microbiota. *Environmental Microbiome* 16, 18. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00387-w>.
- Li, Q., Li, H., Yang, Z., Cheng, X., Zhao, Y., Qin, L., Bisseling, T., Cao, Q., Willensem, V., 2022. Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. CM11 specifically induces lateral roots. *New Phytol.* 235, 1574–1588. <https://doi.org/10.1111/nph.18199>.
- Lo, P., Durán, P., Pang, T.Y., Westhoff, P., Deng, C., Durán, C., Lercher, M., Garrido-Oter, R., Frommer, W.B., 2024. Sugar transporters spatially organize microbiota colonization along the longitudinal root axis of *Arabidopsis*. *Cell Host Microbe* 32, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.02.014>.
- López-Hernández, J., 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., 2023. Screening of phosphate solubilization identifies six *Pseudomonas* species with contrasting phytostimulation properties in *Arabidopsis* seedlings. *Microb. Ecol.* 86 (1), 431–445.
- MacGregor, D.R., Deak, K.L., Ingram, P.A., Malamy, J.E., 2008. Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 20, 2643–2660.
- Malamy, J., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124 (1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>.
- Mandal, S., Anand, U., López-Bucio, J., Kumar, M., Lal, M.K., Tiwari, R.K., Dey, A., 2023. Biostimulants and environmental stress mitigation in crops: a novel and emerging approach for agricultural sustainability under climate change. *Environ. Res.* 233, 116357. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116357>.
- McRose, D.L., Newman, D.K., 2021. Redox-active antibiotics enhance phosphorus bioavailability. *Science* 371 (6533), 1033–1037. <https://doi.org/10.1126/science.abd1515>.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 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 Signal. Behav.* 4 (8), 701–712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>.

- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Rio, 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>.
- 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*. Mol. Plant Microbe Interact. 27 (4), 364–378. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0219-R>.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J., Lopez-Bucio, J., 2020. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence *Arabidopsis* root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. J. Plant Growth Regul. 39 (1), 254–265.
- Overhage, J., Schemionek, M., Webb, J.S., Rehm, B.H., 2005. Expression of the *pvd* operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms: PvdA performs an essential function in biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 71 (8), 4407–4413.
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J.N., Aalaoui, M.E., Akroid, M.E., Amarraque, A., Van Vaerenbergh, J., Tahzima, R., Mayad, E.H., Chebli, B., 2018. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. Sci. Rep. 9 (1).
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moenne-Loccoz, Y., 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil 321, 341–361.
- Rahme, L.G., Tan, M.W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., Ausubel, F.M., 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (24), 13245–13250. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13245>.
- Rao, A., Puopolo, G., 2021. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. World J. Microbiol. Biotechnol. 37, 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03063-w>.
- Ravelo-Ortega, G., Raya-González, J., López-Bucio, J., 2023. Compounds from rhizosphere microbes that promote plant growth. Curr. Opin. Plant Biol. 73, 102336. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102336>.
- Raya-González, J., López-Bucio, J.S., Prado-Rodríguez, J.C., Ruiz-Herrera, L.F., Guevara-García, Á.A., López-Bucio, J., 2017. The MEDiator genes MED12 and MED13 control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses. Plant Mol. Biol. 95 (1–2), 141–156. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0647-z>.
- Sah, S., Krishnani, S., Singh, R., 2021. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. Current Research in Microbial Sciences 2, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084>.
- Shu-Qing, Z., Xin-Feng, L., Jian-Bo, G., 2004. Expression of the pathogenesis-related gene promoter—GUS reporter fusion in *Arabidopsis*. J. Integr. Plant Biol. 46 (8), 982–987.
- Solis-Ortiz, C.S., Gonzalez-Bernal, J., Kido-Díaz, H.A., Peña-Uribe, C.A., Lopez-Bucio, J., López-Bucio, J., Guevara-García, A.A., García-Pineda, E., Villegas, J., Campos-García, J., Reyes de La Cruz, H., 2022. Bacterial cyclodipeptides elicit *Arabidopsis thaliana* immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains on plant development. J. Plant Physiol. 275, 153738. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153738>.
- Subramoni, S., Muzaki, M.Z.B.M., Booth, S.C.M., Kjelleberg, S., Rice, S.A., 2021. N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulates species interactions in multispecies biofilm communities. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.646991>.
- Tienda, S., Vida, C., Lagendijk, E., de Weert, S., Linares, I., González-Fernández, J., Guirado, E., de Vicente, A., Cazorla, F.M., 2020. Soil application of a formulated biocontrol rhizobacterium, *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, induces soil suppressiveness by impacting specific microbial communities. Front. Microbiol. 11, 1874. <https://doi.org/10.3389/fmcb.2020.01874>.
- Ulmason, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9, 1963–1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>.
- Uzma, M., Iqbal, A., Hasnain, S., 2022. Drought tolerance induction and growth promotion by indole acetic acid producing *Pseudomonas aeruginosa* in *Vigna radiata*. PLoS One 17, e0262932.
- Vellostillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M., Castresana, C., 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. Plant Cell 19 (3), 831–846. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046052>.
- Villalobos-Escobedo, J.M., Esparraga-Reynoso, S., Pelagio-Flores, R., López-Ramírez, F., Ruiz-Herrera, L.F., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, A., 2020. The fungal NADPH oxidase is an essential element for the molecular dialog between *Trichoderma* and *Arabidopsis*. Plant J. 103 (6), 2178–2192. <https://doi.org/10.1111/tpj.14891>.
- Villar-Moreno, R., Tienda, S., Gutiérrez-Barranquero, J.A., Carrón, V.J., de Vicente, A., Cazorla, F.M., Arrebola, E., 2022. Interplay between rhizospheric *Pseudomonas chlororaphis* strains lays the basis for beneficial bacterial consortia. Front. Plant Sci. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1063182>.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., XiaoLin, L., Shuler, P., Goddard, W.A., Tang, Y., 2007. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol. Bioeng. 98 (4), 842–853. <https://doi.org/10.1002/bit.21462>.
- Yu, J.M., Wang, D., Pierson, L.S. 3rd, Pierson, E.A., 2018. Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. Plant Pathol. J. 34 (1), 44–58. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.12.2017.0277>.
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Bilou, I., Pieterse, C.M.J., 2013. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. Plant Physiology 162 (1), 304–318. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212597>.
- Zhang, Q., Li, S., Hachicha, M., Boukraa, M., Souleire, L., Efrit, M.L., Queneau, Y., 2021. Heterocyclic chemistry applied to the design of N-acyl homoserine lactone analogues as bacterial quorum sensing signals mimics. Molecules 26 (17), 5135.

Hugo Alejandro Tinoco Tafolla

Efecto de los niveles de hierro en la virulencia de *Pseudomonas chlororaphis* durante la interacción con *Arabidopsis thaliana* b...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid::3117:536925781

Fecha de entrega
5 dic 2025, 11:53 a.m. GMT-6

Fecha de descarga
5 dic 2025, 11:57 a.m. GMT-6

Nombre del archivo
Efecto de los niveles de hierro en la virulencia de *Pseudomonas chlororaphis* durante la interacci...pdf

Tamaño del archivo
8.0 MB
104 páginas

24.741 palabras 145.185 caracteres

- ✓ iThenticate Página 1 de 122 - Portada Identificador de la entrega trn:oid::3117:536925781
- ✓ iThenticate Página 2 de 122 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega trn:oid::3117:536925781

27% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

- 27% ⓘ Fuentes de Internet
19% 📚 Publicaciones
0% 📄 Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.
Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitan distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial



Coordinación General de Estudios de Posgrado

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Efecto de los niveles de hierro en la virulencia de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> durante la interacción con <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones diferenciales de sacarosa.	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Hugo Alejandro Tinoco Tafolla	1800333g@umich.mx
Director	Jesús Salvador López Bucio	salvador.bucio@umich.mx
Codirector	Homero Reyes de la Cruz	homero.reyes@umich.mx
Coordinador del programa	Mauro Manuel Martínez Pacheco	mae.cs.biologia.experimental@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

**Formato de Declaración de Originalidad
y Uso de Inteligencia Artificial**



Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	Si	Búsqueda de links directos a otros trabajos para su revisión
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Hugo Alejandro Tinoco Tafolla
Lugar y fecha	Morelia Michoacán, 3 de diciembre 2025