



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas  
Maestría en Ciencias en Biología Experimental

**Título:**

**“Estudio del efecto de los compuestos volátiles emitidos por distintas rizobacterias en la homeostasis de auxinas y en la morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis thaliana*”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:**

**BIÓL. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA**

**ASESORA: D.C. LOURDES I. MACÍAS RODRÍGUEZ**

**COMITÉ TUTORAL**

**D.C. JOSUÉ ALTAMIRANO HERNÁNDEZ**

**D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO**

**D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO**

**D.C. PATRICIA RÍOS CHÁVEZ**

**Octubre 2010**

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 La Raíz.....	4
2.1.1 Raíz Primaria.....	5
2.1.2 Raíces Laterales .....	7
2.1.3 Pelos Radiculares.....	7
2.2 División de la Raíz.....	8
2.2.1 Zona de División.....	9
2.2.2 Zona de Alargamiento .....	9
2.2.3 Zona de diferenciación .....	10
2.3 Regulación de los Procesos Morfogénéticos de las Plantas por las Fitohormonas .....	10
2.3.1 El Papel de las Auxinas en el Desarrollo de las Plantas .....	12
2.3.2 El Transporte de Auxinas en las Plantas.....	13
2.2.3 Regulacion de la Homeostasis de Auxinas .....	15
2.2.4 Efecto de las auxinas en las raíces .....	16
2.2.5 La Planta Modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
2.2.5.1 Marcador de Expresión de Genes Regulados por Auxinas DR5::GUS .....	18
2.3 Rizobacterias.....	19

2.3.1 Efecto de las Rizobacterias Promotoras de crecimiento Vegetal (PGPR) en el Desarrollo de las Plantas .....	20
2.3.2 Mecanismos de Acción de las PGPR .....	22
2.4 Los Compuestos Volátiles .....	23
2.4.1 El Papel de los Compuestos Volátiles en la Naturaleza .....	24
2.4.2 Efecto de los Compuestos Volátiles Bacterianos .....	25
2.4.3 Los Compuestos Volátiles Emitidos por Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal Activan Vías de Señalización Hormonal.....	25
3. JUSTIFICACIÓN .....	29
4. HIPÓTESIS .....	31
5. OBJETIVO GENERAL.....	31
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	32
8. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
8.1 Material Biológico y Condiciones de Crecimiento.....	33
8.2 Reactivación de las cepas rizosféricas.....	34
8.3 Experimentos de Inoculación .....	34
8.4 Caracterización Molecular de los Aislados .....	35
8.5 Análisis de los Compuestos Volátiles Bacterianos .....	35
8.6 Análisis de Compuestos Volátiles en la Planta.....	36
8.7 Análisis de los Compuestos Volátiles Durante la Interacción .....	37
8.8 Análisis de la Expresión del Marcador DR::GUS.....	37
8.9 Análisis Estadísticos.....	38
9. RESULTADOS .....	39
9.1 Efecto de los Compuestos Volátiles de las Rizobacterias en la Biomasa de las Plantas de <i>A. thaliana</i> .....	39
9.2 Efecto de los compuestos volátiles de las distintas rizobacterias en la arquitectura de la raíz de Arabidopsis .....	41

9.3 Caracterización Molecular de las Rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a.....	44
9.4 Análisis de la Expresión de la Línea Reportera DR5::GUS en plantas expuestas a los volátiles de diferentes PGPR.....	46
9.5 Determinación de los perfiles de los compuestos volátiles de <i>Arabidopsis</i> , las rizobacterias y la interacción planta-rizobacteria .....	48
9.5.1 Compuestos Volátiles de la Planta .....	49
9.5.2 Análisis de los Compuestos Volátiles de las Rizobacterias.....	50
9.5.3 Compuestos Volátiles Identificados Durante la Interacción Planta-Rizobacteria .....	52
10. DISCUSIÓN .....	56
11. APORTACIONES DEL TRABAJO .....	62
12. PERSPECTIVAS.....	64
13. CONCLUSIÓN .....	65
14. REFERENCIAS.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Partes en que se divide la planta.....	5
Figura 2 División de la raíz primaria.....	9
Figura 3 Cuadro de hormonas vegetales.....	11
Figura 4 Estructura química del ácido-indol-acético.....	12
Figura 5 Transporte polar de auxinas.....	15
Figura 6 Homeostasis de auxinas.....	16
Figura 7 La rizósfera y las PGPR.....	21
Figura 8 Mecanismos de acción de las PGPR .....	23
Figura 9 Efecto de los compuestos volátiles <i>B. subtilis</i> GB03 y <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a en área foliar.....	26
Figura 10 Perfil cromatográfico de <i>B. subtilis</i> GB03 y <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a.....	27
Figura 11 Estrategia experimental.....	32
Figura 12 Caja dividida .....	33
Figura 13 Dispositivo SPME y Cromatógrafo de Gases.....	36
Figura 14 Fibra de SPME expuesta al espacio de cabeza de caja petri.....	37
Figura 15 Imágenes representativas del efecto de los compuestos volátiles...40	
Figura 16 Efecto de los compuestos volátiles en la biomasa total.....	40
Figura 17 Efecto de los compuestos volátiles en la morfogénesis de la raíz....	42
Figura 18 Efecto de los compuestos volátiles en la arquitectura de la raíz.....	43
Figura 19 Análisis del índice de correlación de los parámetros de la raíz con el peso fresco.....	44

Figura 20 Gel de agarosa de los productos de PCR.....	45
Figura 21 Efecto de los compuestos volátiles de las PGPR en la expresión del marcador DR5::GUS.....	47
Figura 22 Perfiles cromatográficos representativos de las rizobacterias, la planta y la interacción .....	49
Figura 23 Aportaciones del trabajo.....	63

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización molecular de las rizobacterias.....	45
Tabla 2 Compuestos volátiles detectados en las rizobacterias agrupados por grupo funcional.....	50
Tabla 3 Abundancias relativas de los compuestos agrupados por familias de Las rizobacterias.....	51
Tabla 4 Compuestos volátiles emitidos por la planta y las rizobacterias.....	52
Tabla 5 Compuestos volátiles detectados en la interacción agrupados por grupo funcional.....	53
Tabla 6 Abundancias relativas de las familias de compuestos de la interacción .....	54
Tabla 5 Compuestos volátiles detectados en la interacción planta-rizobacteria .....	55

## RESUMEN

En la naturaleza existe una extensa comunicación entre plantas y microorganismos que es mediada por la emisión de moléculas. Los compuestos volátiles que son emitidos por microorganismos son ejemplo de este tipo de moléculas y se sugiere que estos compuestos pueden regular el desarrollo de las plantas. Recientemente se ha propuesto que la acetoina y el 2,3-butanediol que son emitidos por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en especial del género *Bacillus* están relacionados con el incremento del área foliar en plantas de *Arabidopsis*. Sin embargo aún se sabe muy poco sobre como es que estos compuestos podrían estar modulando el desarrollo de la planta. En este trabajo se investigó el efecto de los compuestos volátiles de doce rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el desarrollo y en la morfogénesis de la raíz de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Varias rizobacterias mostraron un efecto promotor estimulando la producción de biomasa, de igual forma se observó un efecto diferencial en la modulación de la arquitectura de la raíz. Los aislados L263, L266 y L272a estimularon el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales, mientras que L254, L265a y L265b no alteraron significativamente el crecimiento de la raíz primaria pero si promovieron fuertemente la longitud de las raíces laterales. Debido a la importancia de las auxinas en la regulación de los procesos morfogénéticos de la raíz, se analizó un marcador de genes regulados por auxinas (DR5::GUS), este estudio nos reveló que las rizobacterias promueven un aumento en el transporte de auxinas, además de que se observó un incremento de la expresión de genes regulados por auxinas en la punta de la raíz, por lo que se propone que los volátiles de estas rizobacterias podrían estar modulando el desarrollo de la planta mediante homeostasis de auxinas, probablemente aumentando el transporte de éstas, por lo que nosotros proponemos este mecanismo de señalización como el probable responsable del efecto en el desarrollo de la plántulas de *Arabidopsis*. El análisis molecular por 16S rDNA para la caracterización de las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a nos revelaron su identidad como *Bacillus cereus* L254, L255 y L265a, *Bacillus simplex* L266, *Bacillus nealsonii* L270 y *Bacillus* sp.



L272a. En el análisis de la emisión de compuestos volátiles de las rizobacterias por medio de la técnica de SPME-GC-MS, se identificaron alcoholes, aldehídos y cetonas como las familias de compuestos que fueron comunes entre las cepas así como las más abundantes. Durante el análisis de compuestos de la planta y durante la interacción planta-rizobacteria se identificaron terpenos, que fueron compuestos muy variables en número entre los diferentes tratamientos. Además los perfiles cromatográficos de la interacción mostraron la presencia de cinco compuestos que aparecieron *de novo* los cuales fueron mentol, acetoína, isobornil tiocianoacetato,  $\alpha$ -isoforona y S)-(+)-6-Metil-1-octanol.

En resumen estos datos sugieren que las rizobacterias pueden modular mediante la emisión de distintos compuestos volátiles tanto el crecimiento de la planta como la arquitectura de la raíz de manera diferencial. Este es el primer trabajo donde se estudia el efecto de los compuestos volátiles emitidos por rizobacterias en la morfogénesis de la raíz y donde se analizan los compuestos volátiles que son emitidos durante la interacción planta-rizobacteria.

## 1. INTRODUCCIÓN

El volumen de suelo que rodea a la raíz se le denomina rizósfera y a los microorganismos que habitan este volumen de suelo se les llama rizobacterias (Pérez *et al.*, 2002). En esta región la raíz y sus bacterias asociadas proliferan, interactuando y respondiendo a los cambios en las condiciones ambientales (Campbell y Graves, 1990). Tanto las rizobacterias como las plantas emiten moléculas señal de gran diversidad química con las cuales mantienen una extensa comunicación química durante los distintos estados de desarrollo. Las plantas son capaces de reconocer compuestos microbianos y responder activando mecanismos de defensa y estimulando su crecimiento de acuerdo al microorganismo con el cual entre en contacto. Este diálogo molecular determinará cual será la relación entre ambos organismos, estableciéndose una relación simbiótica o patogénica a través de complejos procesos celulares (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). En el caso de que se establezca una relación simbiótica, las rizobacterias inducen efectos positivos en el crecimiento de la planta, incitando a un aumento en la producción de biomasa e incrementando el rendimiento de los cultivos. A estas rizobacterias se les ha definido como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Ryu *et al.*, 2003).

Las PGPR son habitantes naturales de la rizósfera, las cuales pertenecen a una gran diversidad de géneros entre los que podemos encontrar especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus* principalmente (Ping y Boland, 2004; Ortíz-Castro *et al.*, 2008). Estos microorganismos se han aislado de una amplia variedad de cultivos. Las PGPR han sido usadas principalmente como biofertilizadores, fitoestimuladores o en control biológico (Lugtenberg *et al.*, 2002). El efecto principal de las PGPR es incrementar el crecimiento y la productividad de las plantas. Su contribución puede ser ejercida a través de diferentes mecanismos entre los que se incluyen la modulación de la arquitectura de la raíz o incrementando el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas como auxinas o citocininas principalmente (Ortíz-Castro *et al.*, 2008, López-Bucio *et al.*, 2007). Otro mecanismo, incluye la emisión de compuestos con actividad antimicrobiana como antibióticos o

cianuro, el cual promueve el crecimiento inhibiendo la presencia de microorganismos patógenos para la planta presentes en la rizósfera (Whipps, 2001; Haas *et al.*, 2002; Soleimani *et al.*, 2005). Las PGPR también pueden inducir programas de defensa en las plantas como resistencia sistémica adquirida (SAR) o resistencia sistémica inducida (ISR), mediante los cuales previenen a la planta de futuros ataques de organismos patógenos, reduciendo los efectos de fitotoxicidad en la planta ante poblaciones microbianas patógenas (Compant *et al.*, 2005), también se ha observado que pueden desencadenar respuestas a déficit abiótico o incluso provocar tolerancia sistémica inducida (IST) (Zhang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009).

En los últimos seis años, se han venido estudiando otras señales emitidas por los microorganismos que pueden estar jugando un papel importante en los procesos morfogénicos de las plantas, como son los compuestos volátiles. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Ryu *et al.*, en 2003 donde analizaron el papel de los compuestos volátiles de las rizobacterias *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a en el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis*, encontrando que ciertos compuestos volátiles como la acetoina y el 2,3-butanediol, estaban relacionados con la comunicación planta-rizobacteria, y los cuales fueron considerados como compuestos promotores de crecimiento vegetal. Con estos resultados dio inicio a una nueva época, promoviendo nuevos proyectos de investigación enfocados en determinar si los compuestos volátiles tienen un papel importante en las complejas rutas de señalización hormonal encendidas durante la interacción establecida entre la rizobacteria y la planta (Zhang *et al.*, 2007 y 2008). Hasta la fecha sin embargo hay muy poca información sobre el efecto de los compuestos volátiles en los procesos morfogénicos de las plantas y los mecanismos de acción de estas señales.

En este trabajo se realizó una selección de doce cepas rizosféricas aisladas de rizósfera de limón (*Citrus aurantifolia*) para probar el efecto de los compuestos volátiles en la modulación de la arquitectura de la raíz y en la producción de biomasa de *Arabidopsis thaliana*, encontrándose que solo algunas rizobacterias promueven un aumento en la biomasa total y que el efecto en la morfogénesis de la raíz es diferencial. Este efecto está relacionado con la homeostasis de

auxinas, ya que se observó que los volátiles emitidos por las rizobacterias probablemente alteran el transporte de auxinas y su síntesis.

De acuerdo a los análisis de los compuestos volátiles tanto de las rizobacterias solas como durante la interacción, se sugiere que las plantas perciben la presencia de la rizobacteria y también la bacteria percibe la presencia de la planta, debido a las diferencias en los perfiles cromatográficos cuando se encuentran de manera aislada y en la interacción. Nuestros resultados sugieren que las plantas son capaces de percibir los compuestos volátiles y en función de ello modular sus procesos morfogénéticos. La modificación en la arquitectura de la raíz es un efecto importante ya que algunas de las funciones llevadas a cabo por el sistema radicular es la de tomar agua y nutrientes del suelo. Además la raíz es el órgano con mayor contacto con las poblaciones microbianas. Al aumentar el volumen de la raíz aumentan los nutrientes exudados por la raíz, lo cual refleja en un mayor número de biomasa de microorganismos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LA RAÍZ

La raíz es el órgano de la planta generalmente subterráneo y carente de hojas, que crece en dirección inversa al tallo, y cuyas funciones principales son la de anclar la planta al suelo, la absorción de agua y nutrientes, así como su conducción a otros órganos de la planta y/o su almacenamiento y las interacciones con microorganismos (Grierson *et al.*, 2002, Robbins *et al.*, 1974). La raíz está presente en todas las plantas vasculares exceptuando algunas pteridófitas y plantas acuáticas. En pinófitas y eudicotiledóneas la raíz primaria produce por alargamiento y ramificación, el sistema radical alorrido, caracterizado porque hay una raíz central, principal, que es rodeada por raíces laterales (Fig. 1).

En la mayoría de especies de plantas, la germinación de la semilla comienza con la protusión de la radícula (raíz embrionaria), por lo que la raíz es la primera parte de la planta joven que establece contacto íntimo con el medio ambiente, por lo tanto, parte crítica en el establecimiento de la planta (Greulach y Edison 1970). Para el crecimiento continuado de la raíz primaria de la plántula y de las ramificaciones derivadas de ella, se necesita de los meristemas apicales.

Los orígenes de la raíz primaria y de las raíces laterales son distintos, la raíz primaria surge de una línea celular embrionaria estereotipada, mientras que las raíces laterales surgen post-embrionariamente de un tejido diferenciado denominado periciclo (Celenza *et al.*, 1995).

El sistema radicular además de las funciones fisiológicas ya mencionadas anteriormente, es un órgano mediador en el establecimiento de interacciones con microorganismos, lo que incluye: asociaciones mutualistas con microorganismos benéficos como Rhizobiales, micorrizas., asociaciones de protooperación con rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) e interacciones parásitas con microorganismos patógenos e invertebrados (Bradi *et al.*, 2009)

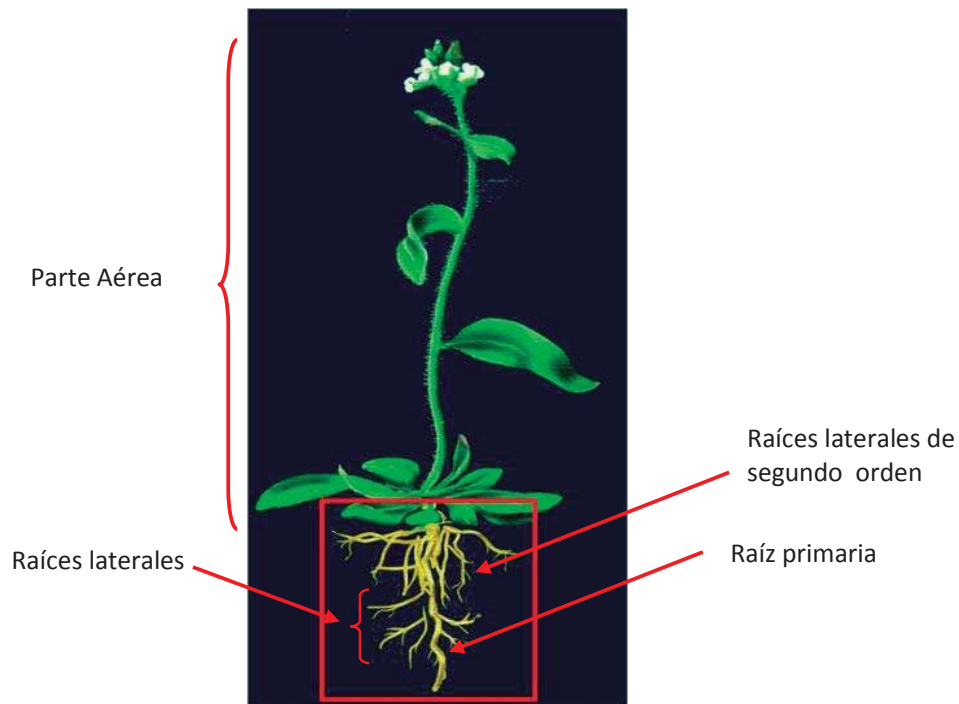


Figura 1. Partes en que se divide la planta. En el recuadro se marca la zona de la raíz, la cual se compone de manera general en plantas dicotiledóneas de una raíz principal o primaria, raíces laterales de primero y segundo orden (Greulach y Edison, 1970).

### 2.1.1 RAÍZ PRIMARIA

Cuando las semillas germinan, la raíz primaria es la primera parte de la planta que aparece. En plantas de *Arabidopsis*, después de varios días la raíz primaria alcanza una longitud de 2 a 3 cm. En este tiempo la división celular en la raíz es limitada principalmente a la punta de la raíz y al meristemo apical radicular. Entre los 8 y 10 días después de la germinación el enfoque coordinado de la división celular ocurre a lo largo de la raíz y la capa del periciclo, una capa concéntrica que rodea a el tejido vascular; que posteriormente da lugar a la formación de los primordios de las raíces laterales (Celenza *et al.*, 1995). Las raíces laterales o secundarias comienzan a desarrollarse a una cierta distancia de la punta de la raíz, que puede ser a unos milímetros, hasta a unos centímetros del meristemo apical de la raíz, en la zona de diferenciación (Fig.2) (Malamy y Benfey 1997).

El meristemo de la raíz está cubierto por una cofia cónica de células parenquimáticas, la cual le da protección mecánica al meristemo cuando avanza abriéndose paso por el suelo y que actúa como sensor de gravedad, a esta cubierta también se le denomina caliptra (Fig. 2A y B). Las células externas de la cofia se desprenden a medida que la raíz crece, pero se van reemplazando por células nuevas formadas en el meristemo de la raíz. La cofia secreta una sustancia gelatinosa rica en polisacáridos de consistencia mucilaginosa que lubrica a la raíz. Este mucilago alberga microorganismos y se va renovando cuando la raíz va creciendo. Muy cerca de la cofia se encuentra una zona llamada centro quiescente, donde rara vez se dan fenómenos de división. Si se daña el meristemo o la cofia, el centro quiescente se vuelve activo y puede regenerar cualquiera de esas partes (Salisbury y Ross, 1992; Greulach y Edison 1970).

Las plantas tienen crecimiento axial bipolar, con un meristemo apical radicular (MAR) que se encuentra en la punta de la raíz (Fig. 2B) y un meristemo apical del brote, que se encuentra en la punta de la parte aérea. El meristemo de la raíz en plantas dicotiledóneas tiene dos esquemas de organización; el cerrado (donde las capas están muy organizadas) y el abierto (con capas desorganizadas). Se cree que estos esquemas se mantienen sin cambio durante todo el crecimiento de la raíz y que las raíces de manera individual tienen un crecimiento indeterminado, lo que sugiere que los meristemas de la raíz permanecerán activos indefinidamente mientras se tengan las condiciones apropiadas de crecimiento (Chapman *et al.*, 2003).

El meristemo apical está compuesto por células de pared delgada, las cuales se parecen mucho y prácticamente no hay espacios intercelulares. Los cortes de esta región generalmente muestran muchas células con los núcleos en diversas fases de la mitosis (Greulach y Edison, 1970).

Nuevas células se producen en los meristemas, en los cuales se distingue distintas zonas de división. La división en el centro quiescente (CQ) (Fig. 2B) es muy infrecuente, y las tasas de división celular aumentan progresivamente en la raíz, dependiendo de la edad y las condiciones de crecimiento (Scheres *et al.*, 2002).

### 2.1.2 RAÍCES LATERALES

Las raíces laterales se originan en el periciclo, y crecen hacia afuera a través de la corteza y la epidermis. La maduración de las raíces laterales involucra la formación de los mismos tejidos que en la raíz primaria, incluyendo un meristemo apical y un sistema vascular que se conecta con la vasculatura de la raíz primaria. La formación de nuevos primordios en la raíz primaria y en las raíces laterales son diferentes, aunque en estados tardíos de la formación de las raíces laterales es muy similar a la formación de la raíz primaria, aunque en las raíces laterales hay mayor variabilidad en el número y la organización celular. En las raíces laterales los meristemas no se activan hasta después que el primordio emerge de la raíz primaria, por lo tanto no parece jugar un papel primordial en la formación y organización de estas. (Scheres *et al.*, 2002)

Dentro de las raíces laterales se pueden producir más raíces laterales (denominadas de segundo orden) (Fig. 1), un complejo sistema radicular esta construido por la reiteración de un mismo proceso de desarrollo (Celenza *et al.*, 1995). La distribución y número de raíces laterales controla en parte la forma global del sistema radicular, y por tanto, las zonas del suelo exploradas.

### 2.1.3 PELOS RADICULARES

Los pelos radiculares son extensiones de las células epidermales de la raíz (Fig. 2A). En *Arabidopsis* el tamaño de los pelos radiculares es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y pueden crecer hasta 1 mm o más de longitud. Cuando el número de pelos radiculares aumenta, incrementa el área de superficie de la raíz, y esto se ve reflejado en el aumento de la adquisición de nutrientes; las plantas con mayor número de pelos radiculares y más largos tienen la ventaja de que aumentan la eficiencia en la adquisición de nutrientes, ya que se ha reportado que estos tienen enzimas y transportadores como la ferro quelato reductasa (FCR), relacionada con la absorción de hierro del suelo. El crecimiento de los pelos radiculares esta controlado y coordinado para



constituir una forma simétrica en la punta y con un mismo diámetro. Este desarrollo está regulado por la concentración de nutrientes, como el fosfato (en bajas concentraciones aumenta el crecimiento de las raíces), manganeso y zinc, también se ha observado que la deficiencia de hierro incrementa la longitud y el número de pelos. Cuando los pelos dejan de crecer el citoplasma se dispersa y la vacuola se alarga, el gradiente de calcio y la actividad de los canales de calcio se pierden (Grierson *et al.*, 2002).

## 2.2 DIVISIÓN DE LA RAÍZ

El meristemo apical produce nuevas células, que formarán los tejidos primarios de la raíz. Estas células pasan por un periodo de crecimiento, principalmente alargamiento, y finalmente maduran a células especializadas. Por lo que, al observarse en su sección media longitudinal del ápice de la raíz, se muestra claramente una región de formación de células nuevas (zona de división), que está cubierta por la cofia, una segunda región de agrandamiento celular (zona de alargamiento o elongación) y una tercera región donde se está llevando a cabo la maduración celular (zona de diferenciación), es en esta región donde se comienzan a formar las raíces laterales (Fig.2) (Greulach y Edison, 1970).

Las células más viejas de la cubierta de la raíz están en la parte distal; es decir la punta de la raíz donde se encuentra la cofia, en la parte proximal, cerca de los meristemas se encuentran las células más jóvenes (Salisbury y Ross, 1992)

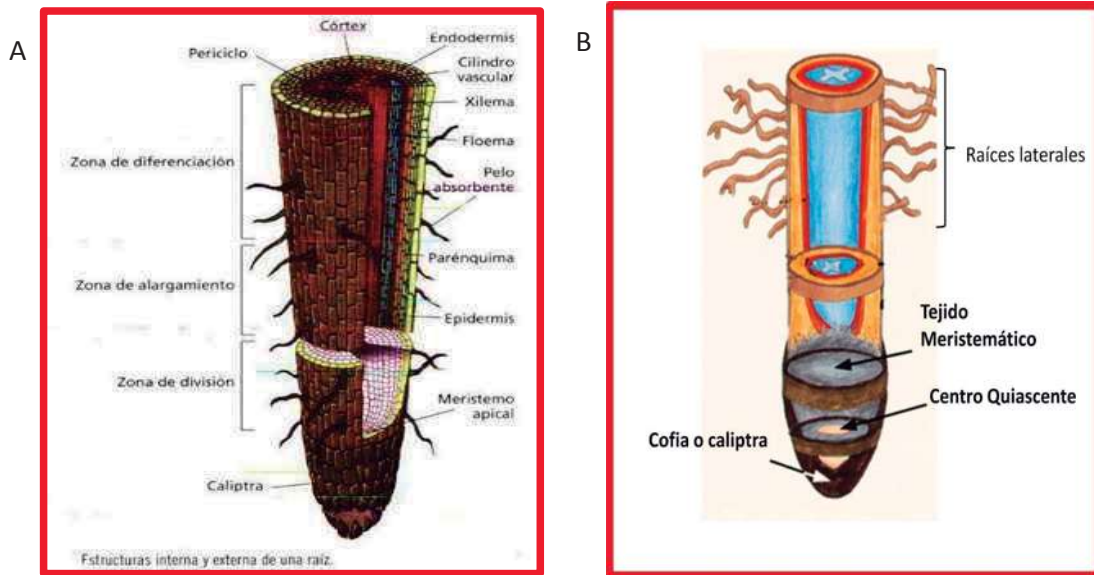


Figura 2. Imágenes que muestran la división de la raíz primaria en las diferentes zonas de crecimiento (A), así como los tejidos que conforman la punta de la raíz (B).

### 2.2.1 ZONA DE DIVISIÓN

La zona de división es la parte de la raíz donde se está llevando a cabo la división celular, en ella se encuentra el meristemo radicular (Fig. 2A). Las células que están en esta zona son generalmente cúbicas, y dan formación a todo el tejido radicular. Tiene aproximadamente 1mm de longitud. Se diferencia de abajo hacia arriba y se está dividiendo activamente. En las plantas la división de las células se lleva a cabo en aproximadamente 16 horas (Greulach y Edison, 1970).

### 2.2.2 ZONA DE ALARGAMIENTO

La zona de alargamiento es una zona de crecimiento de las células de 1 a 2 mm de longitud. En esta región de elongación o alargamiento, hay menos

uniformidad entre las células que la que encontramos en el meristemo. Ya que en esta zona ya empieza a haber una diferenciación (Fig 2A) (Greulach y Edison, 1970).

### 2.2.3 ZONA DE DIFERENCIACIÓN

La diferenciación es la formación de tejidos maduros de la raíz a partir de la proliferación del tejido meristemático y el crecimiento de las células, por lo tanto la zona de diferenciación es donde se llevan a cabo los procesos de formación de tejidos maduros como el parénquima, tejidos vasculares, raíces secundarias, pelos radiculares y meristemos remanentes como el cambium y el felógeno que son los responsables del crecimiento secundario y el engrosamiento de la raíz (Robbins *et al.*, 1974).

La diferenciación celular es uno de los parámetros clave que determinan la forma de los órganos de la planta. Diferentes tipos de diferenciación celular ocurre en la raíz. Para generar nuevas filas de células e ir formando los diferentes órganos, las células iniciales y su progenie se van transformando a través de distintos procesos como los son la expansión, la división y la diferenciación (Scheres *et al.*, 2002).

## 2.3 REGULACIÓN DE LOS PROCESOS MORFOGENÉTICOS DE LAS PLANTAS POR LAS FITOHORMONAS

En as plantas como en todos los organismos multicelulares hay una extensa comunicación entre células y tejidos para coordinar el crecimiento y desarrollo. Tanto las plantas como los animales tienen señales químicas, a las que se les ha denominado hormonas, las cuales regulan la comunicación a corta y larga distancia (Michniewicz *et al.*, 2007). En las plantas se les ha denominado fitohormonas a las sustancias químicas responsables de regular su desarrollo.

Desde que Julius van Sachs discutió por primera vez el concepto de fitohormona en 1887, varios reguladores químicos de crecimiento vegetal han sido identificados en las plantas. Una hormona vegetal es un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y transportado a otra parte, donde produce una respuesta fisiológica, aunque la respuesta no debe llevarse a cabo en el lugar donde se lleva a cabo la síntesis (Salisbury y Ross, 1992). Las fitohormonas son compuestos químicos que tienen efectos específicos en el crecimiento de las plantas, y son activas a bajas concentraciones. Las respuestas del órgano destino no necesariamente son promotoras, porque procesos como crecimiento o diferenciación quedan en ocasiones inhibidos (Salisbury y Ross, 1992). En las plantas se encuentran distintas hormonas entre las que encontramos auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, giberelinas, brasinoesteroides, entre otros, y cuyas funciones han sido ampliamente estudiadas (Fig. 3) (Teale *et al.*, 2006).

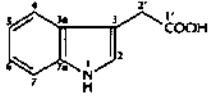
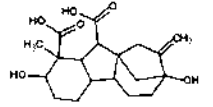
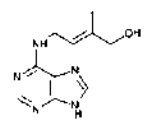
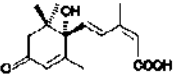
Auxinas	 <p>Ácido-3-indolacético</p>	<p><b>División celular</b>  <b>Crecimiento</b> (elongación celular, extensión de pared celular, diferenciación del xilema y floema)  <b>Tropismos</b>  <b>Dominancia apical</b>  <b>Retardan la abscisión</b>  <b>Rizogénesis</b> (estimulan formación de raíces laterales y adventicias)</p>
Giberelinas		<p><b>Elongación de tallos e hipocotilos</b>  <b>Estimulan la floración</b>  <b>Producen partenocarpia</b>  <b>Germinación</b></p>
Citocininas		<p><b>Crecimiento</b> (proliferación de células meristemáticas junto con auxinas)  <b>Inhiben dominancia apical</b>  <b>Diferenciación y morfogénesis</b>  <b>Inhiben la senescencia</b></p>
Ácido Abscísico		<p><b>Anti-estrés</b>  <b>Contrarresta el efecto de auxinas y giberelinas</b></p>
Etileno	<p><math>\text{CH}_2 = \text{CH}_2</math></p>	<p><b>Abscisión casi universal</b>  <b>Acelera la senescencia</b>  <b>Maduración de frutos climatéricos</b></p>

Figura 3. Cuadro representativo de las hormonas vegetales más importantes y sus efectos en el desarrollo de la planta.

### 2.3.1 EL PAPEL DE LAS AUXINAS EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

En plantas la primera hormona descubierta fue la auxina. Dentro de las auxinas la hormona que se describió primero y que es la más importante fisiológicamente es el ácido-3-indol acético (AIA)(Figura 4), aunque existen otras formas de auxinas naturales como el ácido-3-indol butírico (ABA) y el ácido-4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), así como auxinas sintéticas como el 1-ácido naftalenacético (1-ANA) o el ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D), las cuales se diferencian en sus concentraciones efectivas, su estabilidad metabólica y sus propiedades de transporte. En las plantas, el crecimiento está definido como un proceso irreversible en el incremento del tamaño, las auxinas han sido implicadas en la inducción de una gran variedad de procesos que regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas, tales como la elongación y diferenciación celular, los tropismos, la dominancia apical y la rizogénesis principalmente (Michniewicz *et al.*, 2007, Teale *et al.*, 2006).

Los estudios sobre auxinas también muestran la importancia del transporte de auxinas en la planta, lo que ha indicado que hay una distribución asimétrica que es crucial para el crecimiento (Michniewicz *et al.*, 2007).



Figura 4. Estructura química de la auxina ácido-indol-acético, que es la auxina más abundante en el reino vegetal.

### 2.3.2 EL TRANSPORTE DE AUXINAS EN LAS PLANTAS

Al movimiento de las auxinas entre las células de los diferentes tejidos de la planta se le conoce como transporte de auxinas. A diferencia de los nutrientes de la planta que se transportan por el xilema y el floema, las auxinas se transportan principalmente a través de células del parénquima en contacto con los haces vasculares. El transporte comienza entre las hojas jóvenes donde se está sintetizando y sigue hacia abajo, a lo largo de los haces vasculares. Este tipo de transporte de las auxinas es lento, aunque es más rápido que si se movieran por difusión (Salisbury y Ross, 1992). Las auxinas han sido consideradas moléculas de señalización altamente movibles y debido a su naturaleza promotora de crecimiento, su movimiento debe ser direccional y controlado (Teale *et al.*, 2006).

Aunque todos los tejidos de las plantas parecen ser capaces de sintetizar auxinas, la mayor parte se produce en las hojas y tejidos jóvenes y en los ápices, y recientemente se ha encontrado que también se producen en los meristemas de la raíz primaria y raíces laterales. Desde su lugar de síntesis las auxinas son transportadas a través de toda la planta donde son requeridas para procesos del desarrollo en respuesta a estímulos ambientales. La distribución de las auxinas a lo largo de la planta está conducida a través de dos rutas espacial y fisiológicamente distintas; el transporte no polar, que es rápido y es a través del floema y el transporte polar que es célula-célula y es lento llevado a cabo en varios tejidos (Michniewicz *et al.*, 2007).

El transporte no polar ocurre relativamente rápido, con moléculas moviéndose a una velocidad de 5 a 20 cm/h. Se lleva a cabo a través del floema pasivamente mediante un gradiente de concentración. Las auxinas, junto con otros metabolitos que se transportan por la savia del floema son dirigidos a tejidos y órganos donde son nuevamente redistribuidos para la regulación del crecimiento. Es probable que debido a la alta capacidad y velocidad de transporte basada en el floema, la mayoría de la redistribución a larga distancia de auxinas ocurra en el floema (Michniewicz *et al.*, 2007).

En el caso del transporte polar de auxinas ocurre célula-célula por lo que requiere energía y es relativamente lento transportándose de 5 a 20 mm/h. Es específico para auxinas libres activas y es sensible a síntesis de proteínas inhibitorias. Generalmente se distinguen dos tipos de transporte polar; el de larga distancia, que se lleva a cabo a lo largo de toda la planta y el de corta distancia, que es tejido-específico, aunque ambos siguen el mismo mecanismo. Pero el mayor flujo polar se lleva a cabo desde el tejido apical en las hojas de la planta hasta la base de la planta o la punta de la raíz. Las auxinas son transportadas de los tejidos las partes aéreas a la raíz, una vez en la raíz la auxina continúa hasta llegar a la punta principalmente a través de tejidos vasculares. A este movimiento se le denomina acropétalo. Una vez que la auxina está en la raíz se recircula a las partes aéreas, siendo este el movimiento basipétalo. (Michniewicz *et al.*, 2007).

En el transporte polar (Fig. 5), las células utilizan ATPasas de la membrana plasmática para bombear protones del citosol a las paredes celulares. El pH ácido de las paredes celulares hace que el grupo carboxilo de las auxinas esté menos disociado que en el citosol, donde el pH es de 7 a 7.5. Las auxinas sin carga se desplazan de la pared al citosol, compartiendo transporte con el H<sup>+</sup>. En el interior del citosol, el pH mayor hace que el grupo carboxilo de la auxina se disocie y adquiera carga negativa. A medida que aumenta la concentración de auxina cargada en el citosol, su movimiento hacia afuera es más fácil en términos termodinámicos, sin embargo en el transporte polar de auxinas se requiere que la auxina salga por un extremo basal de la célula, opuesto a donde entro (Salisbury y Ross, 1992).

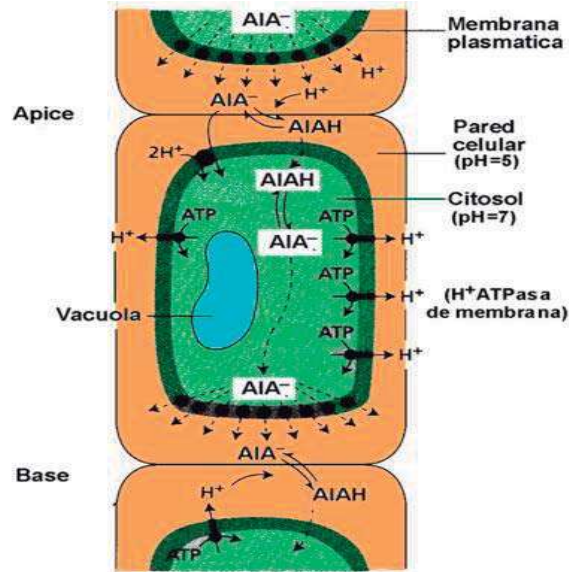


Figura 5. Imagen del transporte polar de auxinas. En la imagen se muestra el movimiento de las auxinas entre las células y como van cambiando su conjugación a medida que van atravesando la pared celular y el citosol.

### 2.2.3 REGULACION DE LA HOMEOSTASIS DE AUXINAS

El desarrollo en las plantas está determinado por la sensibilidad de las células en crecimiento a las auxinas, las concentraciones de la auxinas activas y las concentraciones relativas de otras fitohormonas. Estos parámetros pueden variar ampliamente en los diferentes tejidos y en los diferentes estados de desarrollo (Teale *et al.*, 2006).

Para regular de forma precisa los niveles de auxinas requeridos en los tejidos para cada uno de los efectos fisiológicos en el crecimiento, la planta ha desarrollado cuatro procesos como son biosíntesis, transporte, conjugación o almacenamiento y catabolismo, en los cuales controla sus fluctuaciones y de esta manera sus niveles (Eckardt, 2005). A la regulación de los niveles de auxinas en la planta se le ha denominado homeostasis de auxinas (Fig. 6). Las auxinas pueden estar en los tejidos de forma activa o conjugarse en una amplia variedad de moléculas permaneciendo inactivas, por lo tanto la conjugación y catabolismo puede disminuir los niveles de auxinas activas. La síntesis *de novo*



y la hidrólisis de los conjugados constituyen la forma activa, contribuyendo estos procesos a la regulación del desarrollo en una homeostasis de auxinas. Pero la capacidad de respuesta de la planta a la auxina no está tan determinada por las tasas relativas de síntesis y catabolismo, si no por la capacidad de flujo hacia dentro y hacia fuera de la célula, del mismo modo aunque la síntesis y la conjugación son importantes para establecer el estatus total de las auxinas en la planta, son los gradientes de concentración que se mueven entre las células los que regulan el desarrollo de la planta; de este modo el transporte de auxinas es uno de los procesos más importantes en el crecimiento de la planta (Teale *et al.*, 2006).

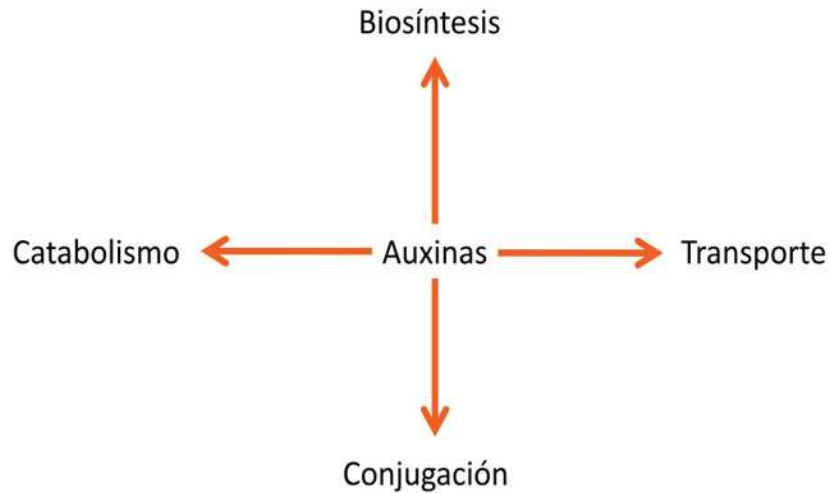


Figura 6. Diagrama que representa el equilibrio de las auxinas en las diferentes formas en las que se encuentra en los tejidos de la planta para su desarrollo y son reguladas por la planta para mantener la homeostasis de auxinas.

#### 2.2.4 EFECTO DE LAS AUXINAS EN LAS RAÍCES

Como lo habíamos mencionado anteriormente la síntesis de auxinas se lleva a cabo principalmente en tejidos de la parte aérea de la planta (principalmente en

tejidos jóvenes), así como en las raíces, principalmente en el meristemo de la raíz primaria.

La formación de la raíz primaria depende fuertemente de la fitohormona auxina, y también se ha visto que juegan un papel muy importante en la iniciación de la formación de raíces laterales, con lo que se ha observado que la aplicación exógena de auxinas se ve reflejada en un aumento en el número de raíces laterales (Scheres *et al.*, 2002).

### 2.2.5 LA PLANTA MODELO *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* es una planta modelo que es utilizada ampliamente como un organismo experimental para estudiar aspectos de las plantas como el desarrollo, metabolismo, genética, adaptación ambiental, interacciones, entre otras, debido a que representa a la mayoría de las plantas porque tiene las características típicas de las eudicotiledoneas en cuanto a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al medio ambiente. Otras características que hacen de esta planta un modelo experimental ampliamente utilizado en la ciencia son que *Arabidopsis* tiene un genoma pequeño con unas 100 Mb (mega bases), puede crecer en ambientes controlados de laboratorio, es pequeña con aproximadamente 30 cm de altura con un ciclo de vida corto de aproximadamente 6 semanas, es una especie prolífica que puede producir hasta 10, 000 semillas por planta y se conoce todo su genoma, además de que es fácilmente transformable (Meyerowitz y Somerville, 1994).

La raíz de *Arabidopsis* es un excelente sistema para el estudio de este órgano, debido a la simplicidad en su estructura y a que anatómicamente tiene una serie de estados de desarrollo sencillos, el arreglo de las células tanto en la raíz primaria como en las raíces secundarias es simple y predecible; como es el caso de las cuatro capas radiales externas, que son la epidermis, el cortex, la endodermis y el periciclo las cuales están conformadas por una sola capa de células. El periciclo forma la capa periférica del estele, la cual también contiene

el floema, el xilema y las células del parénquima. Cada tipo de célula forma una fila vertical de células que puede ser rastreada hasta el meristemo de la raíz. (Malamy y Benfey, 1997).

#### 2.2.5.1 MARCADOR DE EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR AUXINAS

##### DR5::GUS EN *ARABIDOPSIS*

La expresión de genes durante el desarrollo de las plantas está regulado en gran parte por las hormonas. Recientemente se han identificado y caracterizado un grupo de genes de respuesta temprana que son inducidos por auxinas. Uno de estos genes, el GH3, contiene un promotor de respuesta a auxina, el cual tiene tres elementos (AuxREs) que pueden funcionar independientemente uno de otro. Los elementos acoplados confieren una expresión diferencial del gen reportero GUS cuando está presente en la fusión DR5::GUS en presencia o ausencia de auxina, causando una represión de la expresión en la ausencia de auxina y la activación de la expresión en presencia de ésta.

El promotor DR5 es un tándem sintético de repeticiones directas de 11 pb del elemento de respuesta a auxinas D1-4 perteneciente al promotor del gene GH3. Por su parte el gene de la beta glucuronidasa (GUS) fue desarrollado como un gene reportero. La  $\beta$ -glucuronidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de  $\beta$ -glucuronidos como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucorónido (X-GLUC), el 4-metil umbeliferil glucorónido (MUG), el p-nitrofenil glucorónido (PNPG), entre otros, los cuales pueden ser detectados mediante técnicas histoquímicas. La detección de la actividad de GUS depende de la capacidad de degradar el sustrato por la enzima. El sustrato está diseñado para maximizar la sensibilidad de detección de la enzima, por lo que debe de tener ciertas propiedades específicas. El mejor sustrato que actualmente se utiliza para la localización histoquímica de la actividad de la beta-glucuronidasa en los tejidos es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronido (X-Gluc). Este sustrato da un precipitado color azul en el sitio de actividad de la enzima. Este precipitado azul es el producto de la dimerización oxidativa estimulada por el oxígeno atmosférico y se amplía adicionando un catalizador

de la oxidación como la mezcla de ferricianuro/ferrocianuro de potasio (Jefferson, 1987). GUS es utilizado extensamente para monitorear la expresión química de genes de plantas.

Por lo tanto el marcador de expresión de genes regulados por auxinas DR5::GUS es una fusión entre un elemento de un promotor de respuesta a auxinas sintético, fusionado al gen reportero de la enzima beta-glucuronidasa (GUS), el cual va a reaccionar en presencia de auxinas y al estar presente el sustrato de la enzima que va a ser hidrolizado dando como resultado un precipitado azul (Ulmasov *et al.*, 1997). La línea reportera DR5::GUS es un marcador enfocado a la expresión de genes regulados por auxinas en plantas.

### 2.3 RIZOBACTERIAS

Procariotes y eucariotes han coexistido por millones de años en la Tierra. Como resultado de esto han surgido muchas asociaciones, donde los procariotes han establecido tanto relaciones benéficas como perjudiciales con eucariotes (Badri *et al.*, 2009).

Las bacterias habitantes de la rizósfera (volumen de suelo que rodea a la raíz de la planta) se les denomina rizobacterias. Las plantas exudan enormes cantidades de componentes químicos a través de sus raíces como azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, fenólicos, esteroides, enzimas, proteínas, reguladores de crecimiento y metabolitos secundarios, siendo hasta un 40% de los fotosintatos de la planta exudados por la raíz, debido a esto, esta región es rica en nutrientes, y un lugar adecuado para que los microorganismos prosperen. La rizósfera soporta grandes cantidades de poblaciones microbianas, en ella se encuentran habitando de 10 a 100 veces más microorganismos que en el resto del suelo; los cuales interactúan con la planta de manera benéfica, neutra o dañina. Como ya se ha dicho a las rizobacterias benéficas para las plantas se les ha denominado Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal o PGPR (Kai y Piechulla, 2009, Ping y Boland 2004, Badri *et al.*, 2009, Hass y *et al.*, 2002).

### 2.3.1 EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

Las plantas y ciertas rizobacterias establecen asociaciones benéficas mediadas por el intercambio de metabolitos químicos. Las raíces proveen de ácidos orgánicos altamente energéticos que son metabolizados por los microorganismos, mientras que los microorganismos especializados referidos como PGPR generan un conjunto de compuestos biológicamente activos que benefician el desarrollo de la planta (Zhang *et al.*, 2007).

Las PGPR colonizan las raíces de las plantas y pueden modular el desarrollo de la planta, estimulando el crecimiento de ésta (Ping y Boland, 2004). Las PGPR se encuentran presentes en el suelo de manera natural, como parte de los microorganismos que se encuentran en la rizósfera, estableciendo una relación simbiótica con la planta (Banchio *et al.*, 2009). Se ha encontrado que dentro de estos microorganismos se encuentran bacterias tanto Gram+ como Gram- (Hass *et al.*, 2002) siendo los géneros más abundantes *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Fig. 7) (Banchio *et al.*, 2009; Ping y Boland, 2004; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Whipps, 2001).

El término de PGPR fue definido por primera vez por Klopper y Schroth en 1978 (Kai y Piechulla, 2009; Ping y Boland, 2004), y se utilizó para definir y separar aquellas bacterias habitantes de la rizósfera que promovieran un efecto benéfico en el desarrollo de las plantas como aumento en la germinación, en el peso de la planta, control de patógenos para la planta, fijadoras de nitrógeno, entre otros, del resto de las bacterias (Banchio *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que algunas de estas PGPR pueden modular la arquitectura de la raíz, tal es el caso de *Bacillus megaterium* UMCV1 la cual se observó que tiene un efecto acortando la raíz primaria y aumentando el número y longitud de raíces laterales vía citocininas (López-Bucio *et al.*, 2007; Ortiz-Castro *et al.*, 2008).

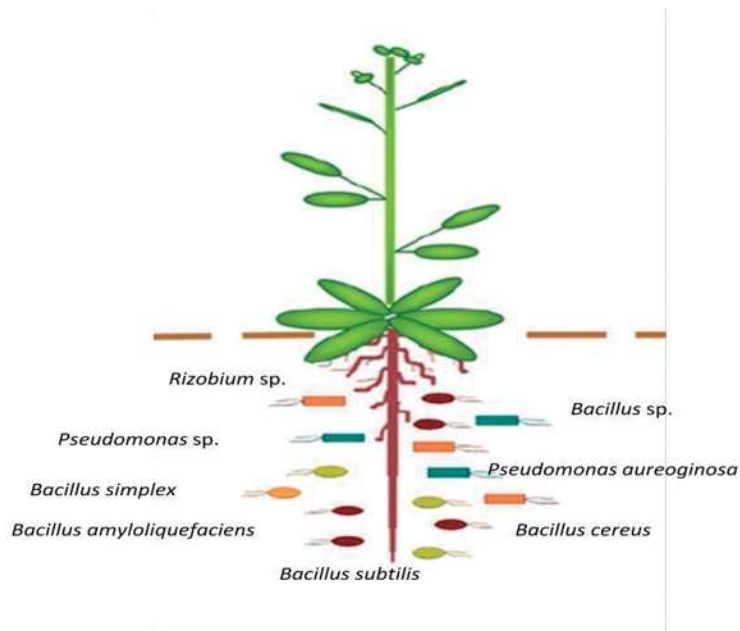


Figura 7. La rizósfera alberga gran cantidad de microorganismos, entre los que se encuentran las PGPR, cuyos géneros más representativos son *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* entre otros y los cuales promueven el desarrollo de las plantas (Banchio *et al.*, 2009; Ping y Boland, 2004; Ortíz-Castro *et al.*, 2008).

Se han propuesto a las PGPR como una alternativa para ser utilizadas en los cultivos y aumentar la producción de los campos, ya que se ha observado que pueden incrementar la disponibilidad de los nutrientes del suelo, por lo que al utilizarlos como una alternativa biotecnológica, se reduciría la necesidad de fertilizantes, aplicándolas en los campos que en la actualidad están sufriendo de un cambio por la acumulación de minerales como nitratos y fosfatos. De esta manera las PGPR son una alternativa para mantener una adecuada nutrición en las plantas y reducir los efectos ambientales negativos que provocan los fertilizantes que son causa de preocupación mundial, ya que cada año se pierden miles de hectáreas por causa del desgaste de los suelos como consecuencia del uso excesivo de fertilizantes. (Yang *et al.*, 2009).

### 2.3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS PGPR

Durante la interacción planta-microorganismo, las PGPR pueden beneficiar a la planta estimulando su desarrollo mediante diversos mecanismos como son el biocontrol, biofertilización y fitoestimulación (Fig. 8). En el biocontrol, las PGPR inducen resistencia sistémica en la planta o también, emiten compuestos con actividad antimicrobiana, como metabolitos antifúngicos como las fenasinas, pioluteorinas, los lipopeptidos cíclicos o exoenzimas, los cuales contribuyen al control en el crecimiento de microorganismo patógenos para la planta y de esta forma benefician a la planta de manera indirecta.

La biofertilización es un mecanismo directo mediante el cuál las rizobacterias estimulan la captación de nutrientes presentes en el suelo. Este mecanismo se da mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato o quelación de hierro por medio de fosfatasas o sideróforos emitidos por las rizobacterias. Y por último tenemos la fitoestimulación, en la cual las PGPR sintetizan y exudan hormonas o compuestos con similitud estructural que mimetizan la acción de las hormonas como auxinas, giberelinas, octadecanoides, etileno, citocininas o compuestos como el jasmonato; así mismo controlan la síntesis de hormonas como es el caso de rizobacterias que controlan la biosíntesis de etileno vía la ACC diaminasa. También se controla el desarrollo de la planta manipulando las complejas y balanceadas rutas hormonales. Cabe destacar que los últimos mecanismos son considerados como directos (Kai y Piechulla, 2009; Ping y Boland, 2004; Cattelan *et al.*, 1999; Whipps, 2001).

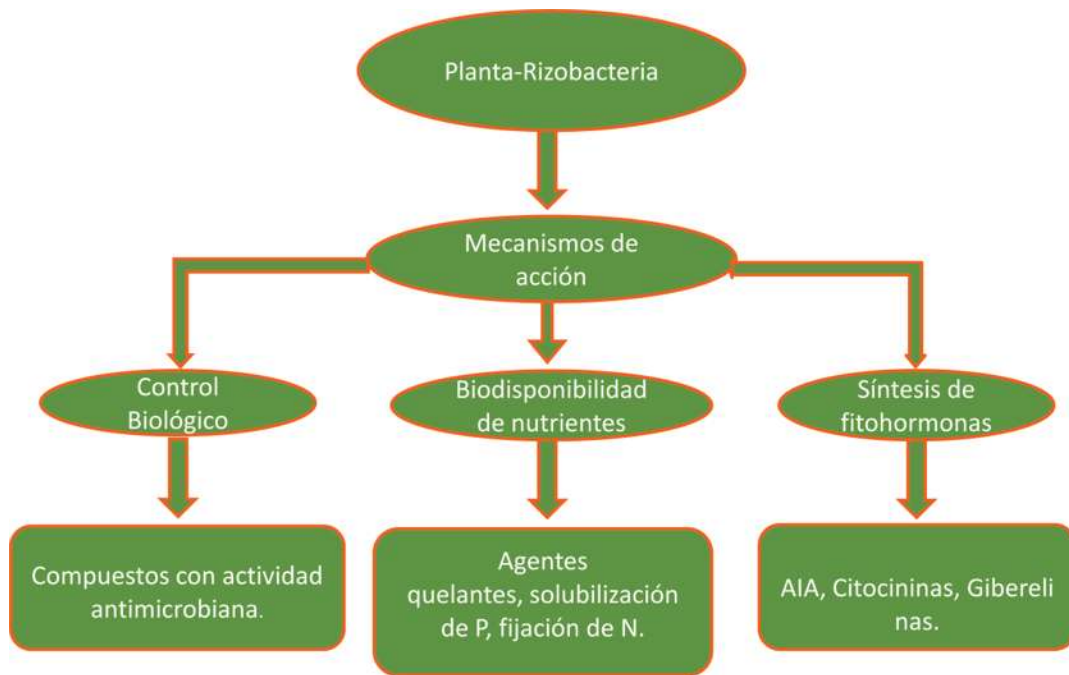


Figura 8. Diagrama de los mecanismos mediante los cuales las PGPR modulan el desarrollo de la planta durante la interacción, se pueden apreciar mecanismos tanto directos como indirectos.

## 2.4 LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

Los compuestos volátiles son compuestos de una gran diversidad estructural cuya presión de vapor es suficientemente alta como para estar en estado gaseoso y cuyo peso molecular es usualmente inferior a 300 g/mol.

En la naturaleza podemos encontrar una gran diversidad de compuestos volátiles que varían en peso molecular (tamaño), forma y grupos funcionales como son los alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos, entre otros.



#### 2.4.1 EL PAPEL DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA NATURALEZA

Hablar de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) es hablar de compuestos químicos con un papel muy importante en la estructura de la vida en nuestro planeta, y estos son producidos por animales, plantas, hongos y aunque al último pero no menos importante por bacterias (Schulz y Dickschat, 2007), en estos sistemas naturales, los compuestos volátiles tiene una gran diversidad de funciones; una de las más importantes es la comunicación, ya sea intra o interespecífica; debido a que entre los distintos seres vivos es la forma universal por la cual se mantienen en contacto, interactuando y manteniendo hasta cierto punto control con los otros organismos, es importante mencionar que la comunicación entre animales y más específicamente en el hombre es a través de los sentidos donde el sistema olfatorio puede reconocer entre 10 000 y 100 000 compuestos volátiles, sin embargo, en otros organismos que carecen de sistema nervioso se han desarrollado otros sistemas sensoriales que les permite estar en contacto con el ambiente y con otros organismos y que estos sistemas sensoriales son capaces de detectar compuestos químicos, en sus mayoría compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles de las plantas son metabolitos que éstas emiten por el aire. Las plantas toman ventaja de sus procesos anabólicos para producir compuestos volátiles, los cuales son utilizados para protegerse contra factores bióticos a abióticos, además de proporcionarles información del medio exterior que les rodea. Los papeles más ancestrales e importantes de los compuestos volátiles de la planta son la defensa, así como la atracción de polinizadores. De manera general los compuestos volátiles de las plantas se clasifican en terpenoides, compuestos con anillos aromáticos, derivados de ácido grasos y volátiles derivados de aminoácidos como la fenilalanina. Los terpenos juegan un papel fundamental generando la gran diversidad química de los volátiles de las plantas. Mientras que los compuestos de uno o dos carbonos como el metanol o el etileno son de los más comunes. El etileno es el único compuesto para el cual se ha descrito un receptor aunque su función aun no esta del todo clara, aunque se ha propuesto que su papel es equivalente botánico de un propiocepción (Baldwin, 2010).

## 2.4.2 EL PAPEL DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES BACTERIANOS

Ya específicamente hablando de los microorganismos, el conocimiento de su capacidad de producir compuestos volátiles, ha sido muy estudiada por el hombre y además se ha utilizado en la industria por sus aromas o sus propiedades repelentes (Schulz y Dickschat, 2007).

En los microorganismos se piensa que los volátiles son utilizados en la comunicación, así como la defensa, esto debido a las propiedades antifúngicas y bactericida observadas tal vez como mecanismos de competencia con otros microorganismos que se encuentran dentro de un mismo nicho (Schulz y Dickschat, 2007).

Los volátiles bacterianos pueden también servir como señales para atraer o repeler diferentes animales. Además también cumplen otras funciones como inducir resistencia sistémica contra patógenos o la promoción del crecimiento en plantas (Schulz y Dickschat, 2007). Todo esto puede estar indicando que hay una estrecha relación entre las plantas y las rizobacterias, donde la planta puede interactuar con la bacteria a través de receptores específicos (van Loon, 2007 y Zhang *et al.*, 2007).

## 2.4.3 LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR RIZOBACTERIAS

### PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL ACTIVAN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HORMONAL

Ryu *et al.* en 2003, encontraron que compuestos volátiles bacterianos promovían el desarrollo vegetal en plantas de *Arabidopsis thaliana*. En un estudio realizado por los autores observaron que al exponer plantas de *A. thaliana* a los compuestos volátiles de seis PGPR, únicamente dos tuvieron un efecto promotor mediado por compuestos volátiles, observándose un aumento de hasta dos veces el área foliar. Estas rizobacterias fueron *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a y *Bacillus subtilis* GB03 (Fig. 9). Al hacer el análisis

del perfil de compuestos volátiles emitidos por ambas PGPR, así como de una bacteria no promotora (DH5 $\alpha$ ) y el medio solo, encontraron que el perfil de compuestos de GB03 e IN937a variaba entre sí, sin embargo había dos compuestos que estaban presentes en las dos rizobacterias y eran muy abundantes, estos compuestos fueron 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol (Fig. 10), ambos compuestos son productos de la ruta de fermentación anaeróbica. Los bioensayos con el 2,3-butanediol puro mostró un incremento en el área foliar de la planta. Al realizar un análisis del efecto de los compuestos volátiles en diferentes plantas mutantes insensibles y/o deficientes de diferentes vías hormonales vegetales se observó que estos compuestos activan vías de señalización dependientes de citocininas para el caso de GB03 mientras que IN937a no tuvo efecto aparente dentro de ninguna de las rutas hormonales analizadas. Este autor es el primero que pone en manifiesto que las bacterias pueden estar actuando en el desarrollo de las plantas a través de compuestos volátiles, un mecanismo muy común en la comunicación entre organismos y que no había sido analizado a profundidad como parte de los mecanismos por los cuáles las plantas y las bacterias establecen una relación benéfica.

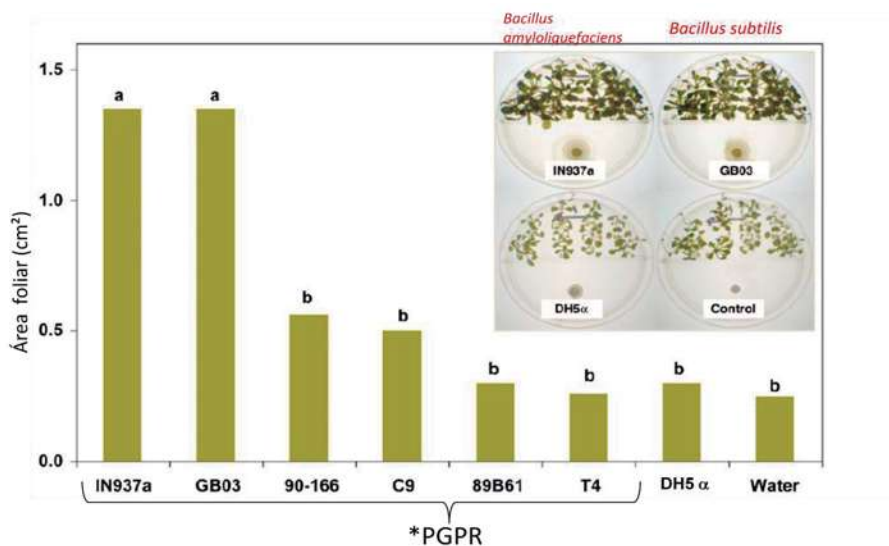


Figura 9. Efecto de las PGPR *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a en el desarrollo del área foliar de plantas de *A. thaliana* mediante la emisión de compuestos volátiles, comparado con otras PGPR como son *Serratia marcescens* 90-166, *B. pasteurii* C-9, *Pseudomonas fluorescens* 89B61 y *B. pumilus* T4, así como un control negativo *E. coli* DH5 $\alpha$  y el control sin inocular (Ryu *et al.*, 2003).

Utilizando la técnica de SPME se ha podido establecer que en los diversos compuestos volátiles emitidos por rizobacterias como lo es *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* se encuentran principalmente alcoholes, como lo son 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol y butano-1-metoxi-3-metil, así como los ya mencionados 2,3-butanediol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), también se producen compuestos como cetonas, aldehídos, ácidos, ésteres, éteres entre otros; los cuales son compuestos producto de distintas rutas metabólicas bacterianas, (Ryu *et al.*, 2003; Farag *et al.*, 2006).

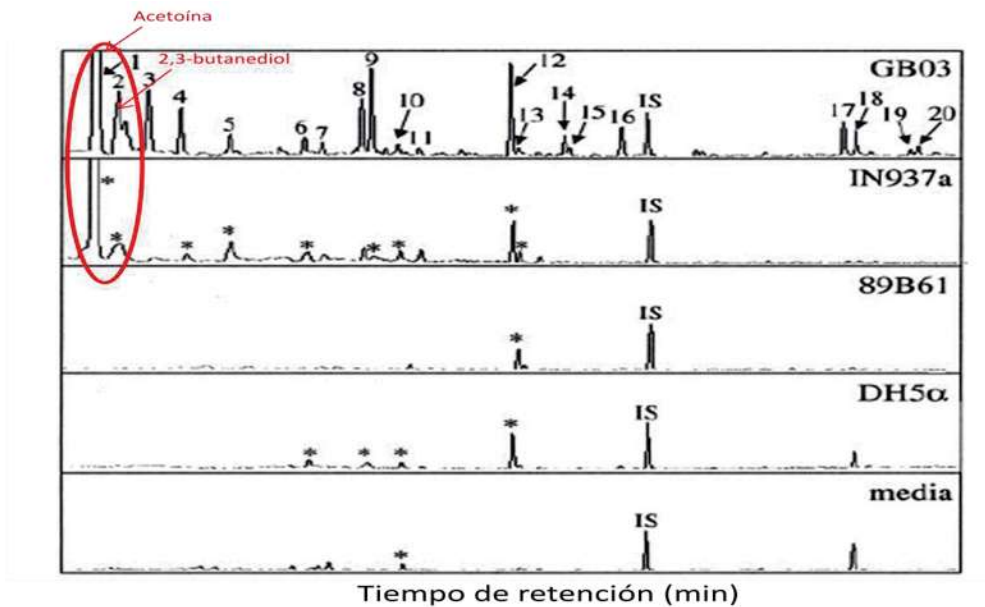


Figura 10. Perfiles cromatográficos de las rizobacterias *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a. En los círculos se pueden apreciar los compuestos Acetoína y 2,3-butanediol los cuales son muy abundantes y presentes en ambas rizobacterias. 89B61 (rizobacteria promotora que no emite volátiles), DH5α (*E. coli* bacteria no promotora) y el medio de cultivo sin inocular son los controles (Ryu *et al.*, 2003)

Después de lo propuesto por Ryu *et al.* en 2003 acerca del efecto de los volátiles de GB03 era a nivel de regulación de citocininas, Zhang *et al.* en 2007 proponen que el perfil de compuestos volátiles de GB03 estaba modulando el desarrollo de la planta mediando la síntesis y el transporte de auxinas en las plantas expuestas a estos compuestos. La idea de que las auxinas podrían estar modulando el efecto en las plantas de *Arabidopsis* surge después de que estos autores hacen un análisis del transcriptoma de plantas de *Arabidopsis* expuestas al perfil de compuestos volátiles y encuentran que los genes que se encienden durante esta interacción son principalmente de síntesis de auxinas y flavonoides; de enzimas relacionadas con pérdida de pared celular, proteínas de respuesta a estrés así como de síntesis de cloroplastos. Estos autores reportaron que cuando los transportadores de auxinas están inhibidos, la acumulación de auxinas se restringe a su sitio de síntesis, además se observa una producción de auxinas mayor en plantas que han sido expuestas que en las plantas sin inocular.

Ya se había observado que en plantas de *Arabidopsis* expuestas al perfil de compuestos volátiles de GB03 eran más verdes que en plantas no expuestas, por lo que al hacer diversos análisis se encuentra que hay una regulación de la fotosíntesis mediada por los volátiles de GB03, aumentando los niveles de eficiencia fotosintética y del contenido de clorofila en las plantas de *Arabidopsis* en presencia de los compuestos volátiles de GB03, y los autores encuentran que la fotosíntesis esta siendo regulada por un aumento de los niveles de ácido abscísico (ABA) en la planta, reprimiendo la ruta sensora de glucosa dependiente de hexocinasa, impidiendo que la planta detecte niveles altos de azúcares y por lo tanto no detenga la fotosíntesis (Zhang *et al.*, 2008), por lo que los compuestos volátiles podrían estar regulando directamente la ruta de ABA y ésta a la vez regula la ruta sensora de glucosa dependiente de hexocinasa y también podría estar regulando otros aspectos del desarrollo de la planta dependiente de este regulador hormonal.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La raíz es un órgano de las plantas que es muy importante ya que le proporcionan anclaje y toma de nutrientes y agua a la planta. La raíz es el sitio de la planta donde a lo largo de su desarrollo mantiene diversas asociaciones con distintos microorganismos que habitan la rizósfera y con los cuales mantiene una comunicación específica. Dentro de estos microorganismos se encuentran los microorganismos benéficos con los que la planta establece una relación simbiótica y a los cuales se les ha denominado rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Las PGPR promueven el desarrollo de la planta a lo largo de su ciclo de vida mediante diversos mecanismos, como por ejemplo la solubilización de nutrientes, la emisión de compuestos con actividad antimicrobiana o emitiendo factores hormonales o compuestos que los mimetizan. Recientemente se ha propuesto que los compuestos volátiles emitidos por las PGPR participan en la modulación del desarrollo de las plantas durante la interacción planta-rizobacteria, y se ha descrito a la acetoina como un compuesto volátil responsable de un aumento del área foliar observado en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, debido a que no es muy claro el efecto de la acetoina en el desarrollo de *Arabidopsis* y a que hay muy pocos estudios sobre el papel de los compuestos volátiles en la modulación del desarrollo de las plantas, nosotros proponemos que puede haber otros compuestos volátiles emitidos por las rizobacterias que podrían estar participando.

Estudios previos sobre las vías de señalización mediante las cuales las rizobacterias promotoras modulan el desarrollo de las plantas se han enfocado principalmente en el efecto de los compuestos volátiles en el área foliar destacando la participación de vías de señalización dependientes de citocininas y etileno, así como la homeostasis de auxinas (Ryu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007), aunque aún no está claro si estas vías de señalización son ubicuas en todas las rizobacterias. Sin embargo siendo la raíz un órgano tan importante en la planta por llevar a cabo diversas funciones de absorción de agua y nutrientes, se tiene un especial interés en estudiar el efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias en la arquitectura de la raíz, así como las vías de

señalización mediante las cuales los compuestos volátiles podrían estar modulando los cambios morfogénicos de la raíz, y si el efecto es diferencial entre las rizobacterias. Cosa que ningún otro grupo de investigación ha hecho.

#### 4. HIPÓTESIS

Las PGPR producen compuestos volátiles que modifican la homeostasis de auxinas y alteran la arquitectura de la raíz de manera diferencial.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los compuestos volátiles emitidos por distintas rizobacterias en la homeostasis de auxinas y en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

#### 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un escrutinio de una colección de PGPR en busca de bacterias que induzcan el desarrollo vegetal mediante la emisión de compuestos volátiles.
- Evaluar el efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias en la morfogénesis de la raíz de *A. thaliana*.
- Determinar la identidad de algunas rizobacterias representativas de los efectos observados.
- Evaluar el efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias en la expresión de genes de respuesta a auxinas.
- Determinar el perfil de compuestos volátiles producidos por las rizobacterias *in vitro* y durante la interacción planta-microorganismo.



## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se seleccionaron al azar 12 rizobacterias de la colección de cepas rizosféricas del Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, las cuales son las siguientes L254, L255, L263, L264, L265a, L265b, L266, L268, L270, L271, L272a y L272b. Como planta modelo se utilizó a *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0). Se estableció una interacción mediada por compuestos volátiles entre las plantas de *Arabidopsis* y cada una de las rizobacterias, así como un control sin inocular y se evaluaron parámetros de Biomasa Total (BT), Longitud de Raíz Primaria (LRP), Número y Longitud de Raíces Laterales (NRL y LRL respectivamente); de la misma manera se realizó el análisis de los compuestos volátiles tanto de las bacterias aisladas como durante la interacción planta-rizobacteria. Con ambos parámetros se llevó a cabo un análisis de correlación entre los compuestos volátiles y los diferentes parámetros evaluados en la raíz. Por otro lado, se realizó la caracterización molecular para la identificación de los aislados y el análisis de la expresión de la línea reportera DR5::GUS para el análisis de auxinas (Fig. 11).

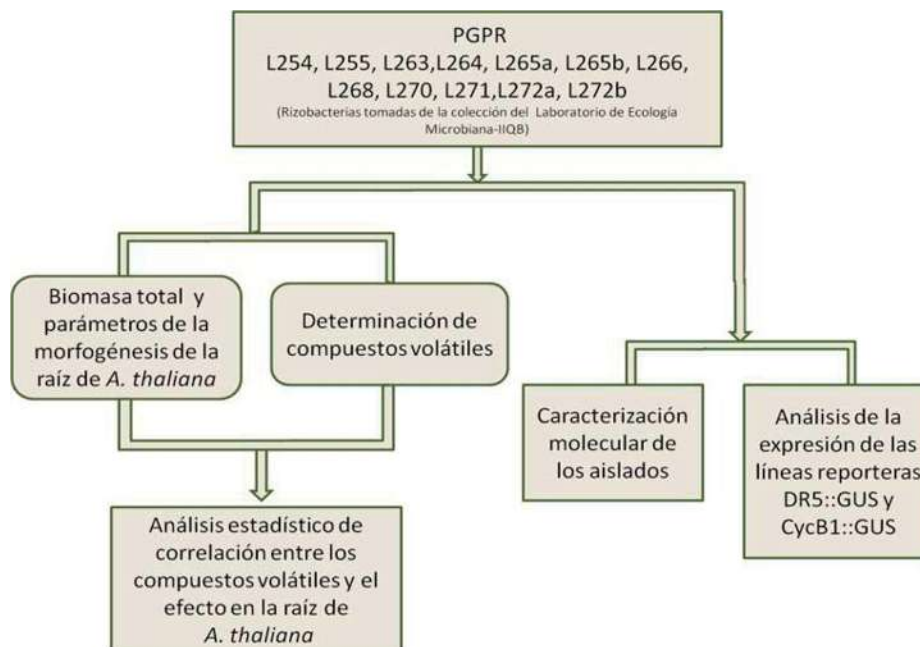


Figura 11. Diagrama de la estrategia experimental

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se utilizó como planta modelo a *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) donada por el laboratorio de Fisiología del Desarrollo Vegetal de IIQB, debido a que tiene un periodo de vida corto y a que es susceptible a ser crecida *in vitro*. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 95% etanol (vol/vol) durante 5 min, hipoclorito 20% (vol/vol) durante 7 min, posteriormente se hicieron 4 lavados con agua estéril y se pusieron a vernalizar a 4°C durante 48 h. Las semillas fueron germinadas en cajas de petri divididas (I Plates) con medio MS 0.2x (mezcla de sales basales Murashige and Skoog) (Fig. 12). Las cajas fueron colocadas verticalmente en un ángulo de 65°, para permitir que la raíz creciera sobre la superficie del agar y que los hipocotilos no tuvieran obstáculos. Las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, a una intensidad de luz de 200  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , una temperatura de 25°C.

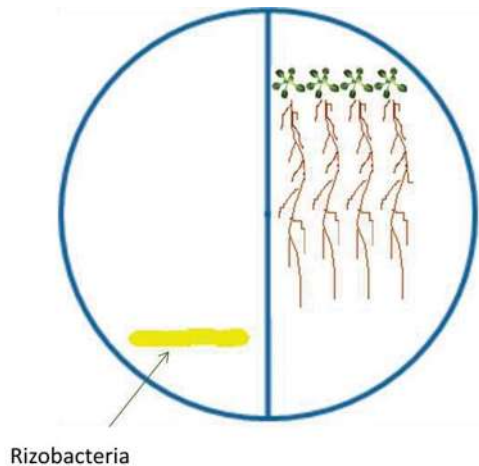


Figura 12. Imagen de la caja de petri dividida. En la parte distal de la caja se pusieron cuatro semillas de *A. thaliana* Col-0 y en la parte proximal inferior se inoculó la rizobacteria. La división fue para evitar el contacto entre la planta y la rizobacteria mediante la difusión de metabolitos.

## 8.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS RIZOSFÉRICAS

Para activar las cepas rizosféricas que estaban en Caldo Nutritivo y glicerol a -20°C, se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^9$  cfu en caldo soya tripticaseina (TSB) y pusieron a crecer durante 24 h a 30°C con agitación constante. Las cepas rizosféricas fueron donadas por el laboratorio de Ecología Microbiana del IIQB y su método de aislamiento se reportó por Duarte-Sotelo *et al.*, 2004. Posteriormente se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^9$  cfu de las bacterias ya activadas y se inocularon en cajas petri con medio agar soya tripticaseina (TSA) y se dejaron incubando por 24 h a 30°C. Las rizobacterias seleccionadas fueron L254, L255, L263, L264, L265a, L265b, L266, L268, L270, L271, L272a y L272b. Para los análisis de compuestos volátiles y promoción de crecimiento las rizobacterias se crecieron en cajas divididas con medio Murashige-Skoog (MS).

## 8.3 EXPERIMENTOS DE INOCULACIÓN

Para evaluar el efecto de los compuestos volátiles emitidos por las rizobacterias en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*, se utilizaron cajas de petri divididas (I-plates) con medio MS (Murashige-Skoog). Se colocaron cuatro semillas de *Arabidopsis* en la mitad distal de la caja, cuatro días después de la germinación cada una de las rizobacterias fue inoculada con aproximadamente  $1 \times 10^9$  cfu en la mitad proximal de la caja dividida, se realizaron 5 replicas. Las cajas fueron incubadas durante diez días en una cámara de crecimiento bajo las condiciones ya mencionadas anteriormente (Fig. 12). Después de 10 días se midieron los parámetros de longitud de raíz primaria (LRP), número de raíces laterales (NRL), longitud de raíces laterales (LRL) y Biomasa total (BT).

#### 8.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS

Los fragmentos terminales 5'-3' de las secuencias del 16s rDNA de los aislados L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a fueron amplificados y secuenciados utilizando los primers universales para 16S fd1 y rd1 (Weisburg *et al.*, 1991). La amplificación y secuenciación fueron hechas como se ha sido descrito anteriormente (Valencia-Cantero *et al.*, 2003). Las secuencias amplificadas fueron comparadas con secuencias reportadas en la base de datos NCBI, usando el algoritmo de Blast nt (Altschul *et al.*, 1990).

#### 8.5 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES BACTERIANOS

Las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a fueron inoculadas en placas con medio MS, y se pusieron en una cámara de crecimiento a las condiciones anteriormente mencionadas con el fin de que las condiciones de crecimiento fueran igual a cuando esta en interacción con la planta. Diez días después de la inoculación, los volátiles fueron colectados mediante la técnica de SPME (Fig. 13A) empleando una fibra azul (Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno), la cual se incubó durante 1h. Se realizaron 3 replicas de cada rizobacteria. La presión durante la corrida fue de 7Pa, con un voltaje de 70 eV. Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de fragmentaciones de los espectros de masa con la librería NIST/EPA/NIH 2002.

## 8.6 ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN LA PLANTA

Para evaluar los compuestos volátiles de la planta se colocaron cuatro semillas de *Arabidopsis* en la parte de distal de la caja dividida (I-plates) con medio Murashige-Skoog. Las cajas fueron incubadas durante 14 días en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas. En el día 14, se colectaron los volátiles utilizando la técnica de SPME (Fig. 13A), para lo cual se utilizó una fibra azul (Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno) que se dejó incubando durante una hora en el espacio de cabeza de la caja dividida. Posteriormente se inyectó para su desorción en un cromatografo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Fig. 13B) bajo las condiciones ya mencionadas. Como control se utilizó el medio Murashige-Skoog (MS) para posteriormente eliminar los compuestos que fueran liberados por éste y de esta manera los compuestos seleccionados en el análisis fueran emitidos exclusivamente por los tratamientos de las rizobacterias, las interacciones y la planta sin inocular. Se realizaron 3 replicas de la planta y del control. Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de fragmentaciones de los espectros de masa con la librería.

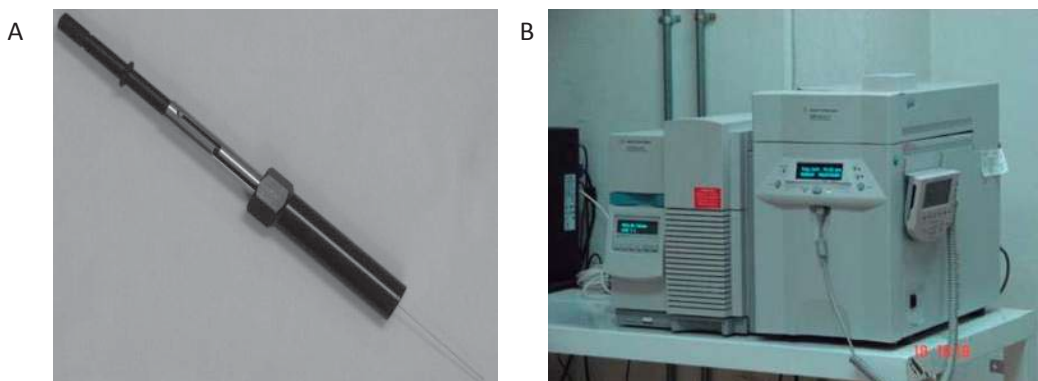


Figura 13. Dispositivo de SPME (A) y Cromatografo de Gases (GC-MS)(B)

## 8.7 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA INTERACCIÓN

Para realizar los análisis de los volátiles emitidos durante la interacción se utilizaron cajas divididas, se pusieron cuatro semillas a germinar en la parte distal de caja, cuatro días después de la germinación se inocularon las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a en la parte proximal de la caja dividida y se incubaron en la cámara de crecimiento bajo las condiciones ya descritas anteriormente durante diez días. Al final de este periodo se realizaron los análisis de los compuestos volátiles emitidos durante la interacción utilizando la misma técnica descrita para el análisis de compuestos volátiles en este escrito (Fig. 14).

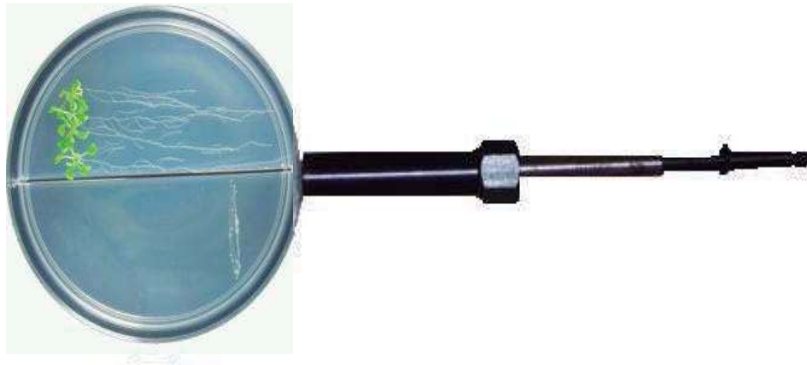


Figura 14. Fibra de SPME expuesta al espacio de cabeza de la caja de petri dividida en la interacción, con plantas de 14 días de edad, 10 días después de la inoculación.

## 8.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DR::GUS

Para el análisis de expresión del marcador de genes regulados por auxinas DR5::GUS, se colocaron cinco semillas en la parte distal y en la parte proximal de caja se inocularon las rizobacterias, se utilizaron cajas divididas con medio MS 0.2x (Fig. 12). Este ensayo se llevó a cabo con las rizobacterias *B. cereus* L254, L255 y L265a, *B. simplex* L266, *B. nealsonii* L270 y *Bacillus* sp. L272a. Diez días después de la inoculación, se realizaron los análisis histoquímicos de la actividad de GUS, para lo cual las plántulas se colocaron

en buffer de reacción de GUS (0.5 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronido en 100 mM fosfato de sodio, pH 7) y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente las plántulas se expusieron a un proceso de clareo mediante el método reportado por Malamy y Benfey (1997). Se analizaron 20 plantas transgénicas por tratamiento.

## 8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los efectos de las bacterias en los diferentes parámetros evaluados, fueron analizados con un diseño experimental totalmente al azar realizando un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Duncan. Para evaluar el grado de interacción de los diferentes parámetros, se realizó un análisis de cluster. Todos los análisis estadísticos fueron hechos utilizando el software Statistica 8.0.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 EFECTO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE LAS RIZOBACTERIAS EN LA BIOMASA DE LAS PLANTAS DE *A. thaliana*

Para estudiar el efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias en la biomasa de las plantas de *Arabidopsis*, se utilizaron cajas divididas, con la finalidad de que los efectos observados en las plantas fueran únicamente por los compuestos volátiles. Los resultados mostraron que los compuestos volátiles microbianos estimulan el desarrollo de las plantas. Diez días posteriores a la inoculación se midió la biomasa de las plántulas y se encontró que solo algunas rizobacterias estimulaban el desarrollo, lo cual se veía reflejado en un aumento en el área foliar y el tamaño de la raíz con respecto a las plántulas sin inocular (Fig. 15). Las rizobacterias L254, L263, L265a, L265b y L266 fueron las mejores promotoras de crecimiento mediante la emisión de compuestos volátiles, porque incrementaron hasta dos veces la biomasa comparadas con la plantas sin inocular (Fig. 16). Por otra parte, no se observó un incremento significativo en la biomasa de las plantas expuestas a los volátiles de las rizobacterias L255, L264, L268, L272a y L272b.



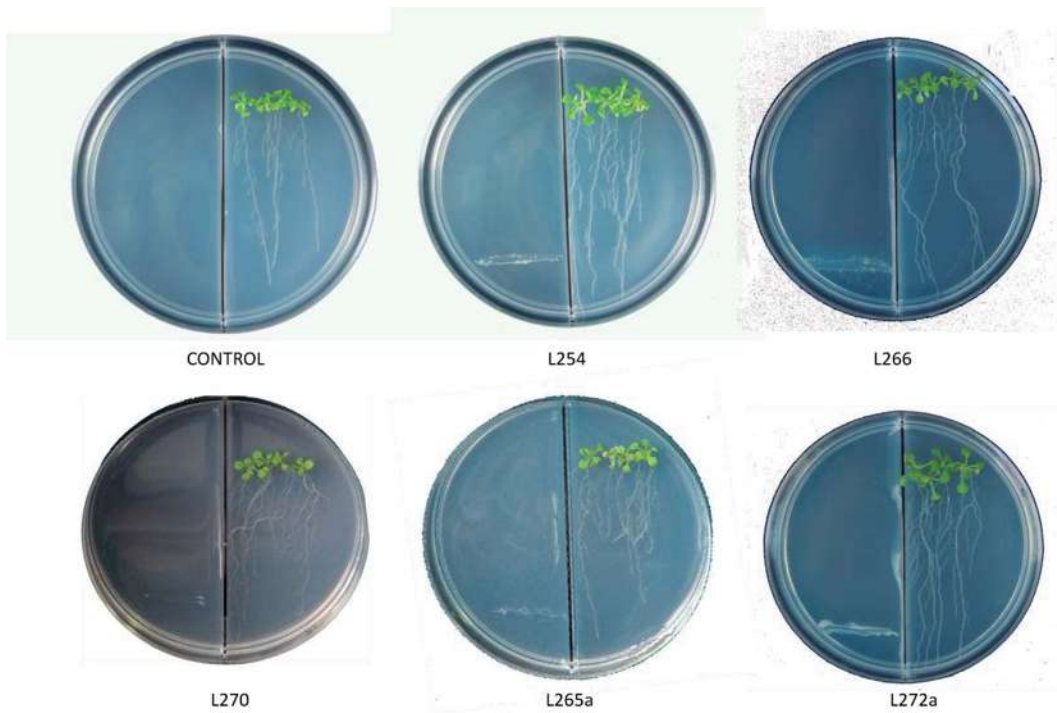


Figura 15. Imágenes representativas del efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias L254, L266, L270, L265a y L272a en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Se puede apreciar que hay un aumento en el área foliar, así como cambios en la arquitectura de raíz en los tratamientos comparados con el control sin inocular.

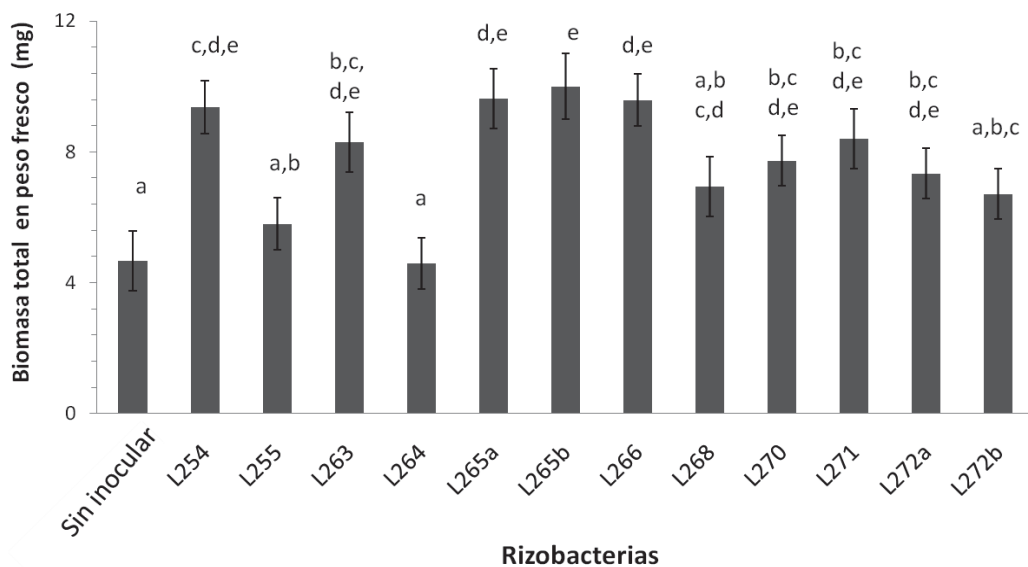
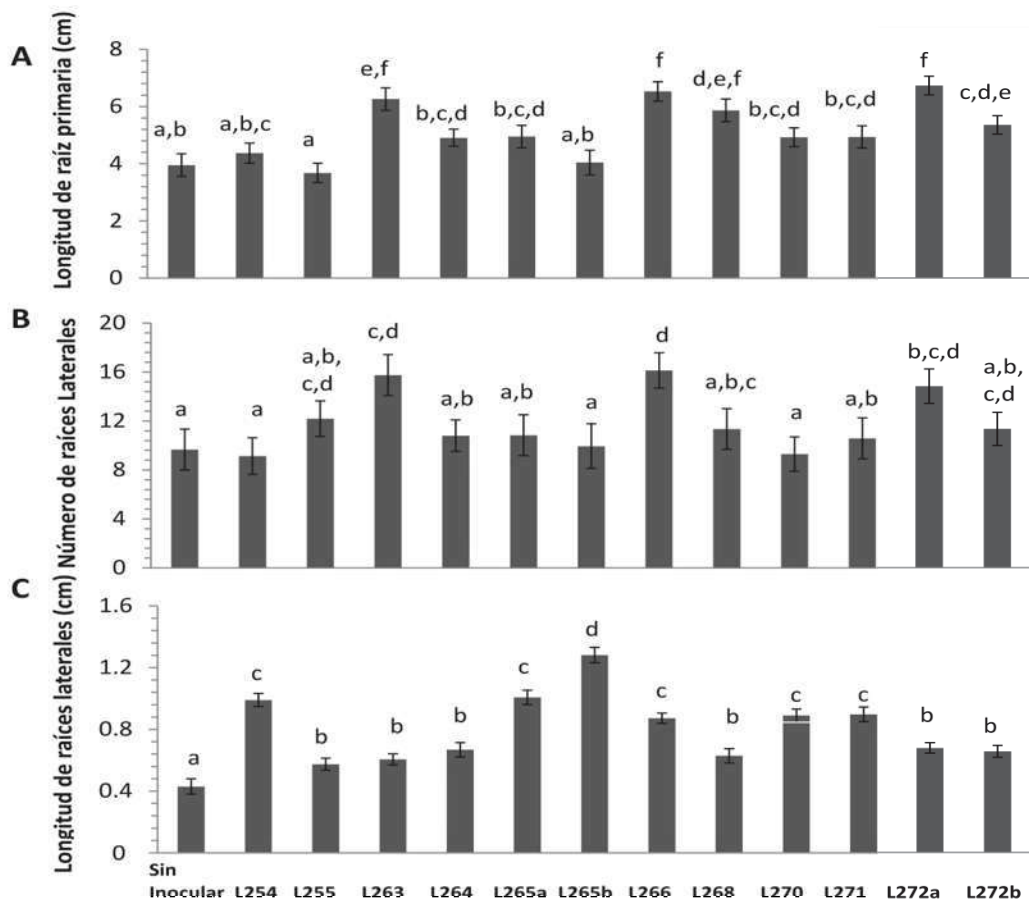


Figura 16. Efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias en la producción de biomasa en plantas de *Arabidopsis*. Se utilizaron cajas divididas, donde se inoculó la rizobacteria en la parte proximal y en la parte distal se germinaron las plántulas. Se grafica el peso fresco total de las plantas expuestas a las rizobacterias y el control sin inocular. Las diferentes letras nos muestran las diferencias estadísticas (Duncan,  $p=0.05$ ,  $n=16$ ).

## 9.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE LAS DISTINTAS RIZOBACTERIAS EN LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ DE ÁRABIDOPSIS

Después de haber determinado la biomasa, se prosiguió a realizar el estudio del efecto de los compuestos volátiles en la modulación de la arquitectura de la raíz. Para lo cual se midieron los parámetros de longitud de raíz primaria (LRP), número (NRL) y longitud de raíces laterales (LRL) (Fig. 17). Los resultados de este estudio nos mostraron que los compuestos volátiles de nueve de las doce rizobacterias estimulan LRP, estas rizobacterias fueron L263, L264, L265a, L266, L268, L270, L271, L272a y L272b, y de las cuales L263, L266 y L272a fueron las que tuvieron un mayor efecto (Fig. 17A). Por otro lado L266 fue la única de este grupo que promovió un incremento en la biomasa. Con respecto a el parámetro de NRL nuevamente L263, L266 y L272a fueron las que promovieron un aumento en el número de raíces laterales (Fig. 17B). En lo referente a la LRL la rizobacteria L265b fue la que estimuló en mayor medida el crecimiento de las raíces laterales (Fig.17C), de igual manera es la que tuvo un mayor efecto en biomasa, mientras que L263 fue la que presentó una menor LRP. Aunque el efecto de las otras rizobacterias en la LRL fue estadísticamente diferente a L265b, también son estadísticamente diferentes a las plántulas sin inocular, y muestran también un efecto estimulador.



### Rizobacterias

Figura 17. Efecto de los volátiles de las rizobacterias en los parámetros de la morfogénesis de la raíz. Las gráficas muestran el efecto de los volátiles de las rizobacterias en los diferentes parámetros de la arquitectura de la raíz como (A) Longitud de raíz primaria LRP, (B) Número de raíces laterales NRL, (C) Longitud de raíces laterales LRL. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas (Duncan,  $p=0.05$ ,  $n=16$ ).

La Fig. 18 muestra un grupo de fotografías donde se puede observar que los aislados L254, L265a, L270 y L272a modificaron la arquitectura de la raíz en comparación a las plantas sin inocular y que esta modificación fue diferente entre las rizobacterias. Los imágenes muestran que las rizobacterias L254 y L270 aumentaron el grosor de la raíz primaria comparado con las otras rizobacterias, y se observó un engrosamiento de las raíces laterales en las plantas expuestas a los volátiles de L254, también se observó que L254, L265a, L270 y L272a aumentaron en el número y longitud de los pelos radiculares así como en la LRL y NRL (Fig. 18).

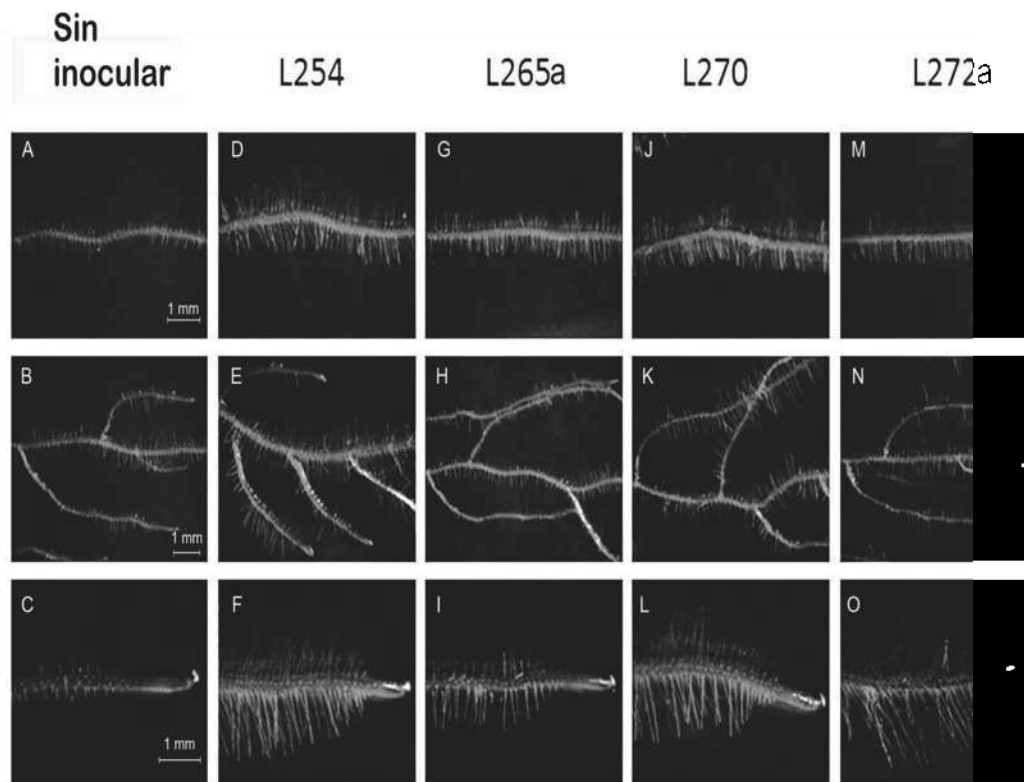


Figura 18. Efecto de los volátiles bacterianos en la arquitectura de la raíz. Fotografías representativas de los efectos en la formación de pelos radiculares en raíz primaria (A, D, G, J, M), formación de raíces laterales (B, E, H, K, N) y la punta de la raíz (C, F, I, L, O) en plantas sin inocular y plantas inoculadas con las distintas rizobacterias.

En la Fig. 19 se muestra un análisis de correlación en el que se determinó como los diferentes parámetros de la raíz como son LRP, NRL y LRL podrían estar afectando la producción de biomasa. En este análisis encontramos que todos los parámetros de la raíz, tuvieron una correlación positiva con el peso fresco total ( $r = 0.21, 0.14$  y  $0.82$  respectivamente). Sin embargo, LRL es la que tuvo una correlación significativa con el peso fresco, lo que nos indicó que un aumento en la longitud de las raíces laterales se refleja positivamente con un aumento en el peso fresco total de la planta.

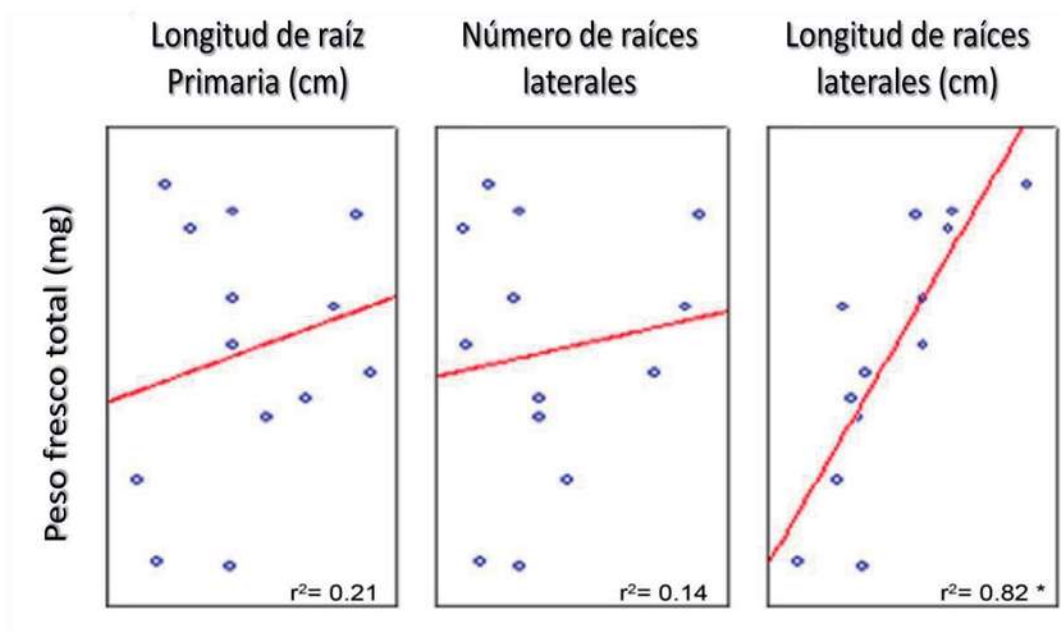


Figura 19. Análisis del índice de correlación de los parámetros de laterales raíz (Longitud de raíz primaria, Número de raíces laterales y Longitud de raíces laterales) y el peso fresco total. Nivel de significancia en  $p=0.05$ ,  $n=13$ .

### 9.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS RIZOBACTERIAS L254, L255, L265A, L266, L270 Y L272A

Para continuar con los análisis más finos se decidió seleccionar un grupo de seis rizobacterias representativas de los distintos efectos observados en los parámetros medidos de BT, LRP, NRL y LRL. Una vez seleccionadas se prosiguió a hacer la caracterización molecular de las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a mediante la secuenciación del gen 16S rDNA y así conocer la identidad de estas rizobacterias (Tabla 1).

Los productos de amplificación (Fig. 20) se mandaron secuenciar y lo que se obtuvo fue que las rizobacterias correspondieron al género *Bacillus*, siendo L254, L255 y L265a pertenecientes a *Bacillus cereus*, L266 obtuvo un 99% de identidad con *Bacillus simplex*, mientras que L270 tuvo un 100% de identidad con *Bacillus nealsonii* y la rizobacteria L272a tuvo un 100% de identidad con *B. cereus/thurigensis/anthracis*.

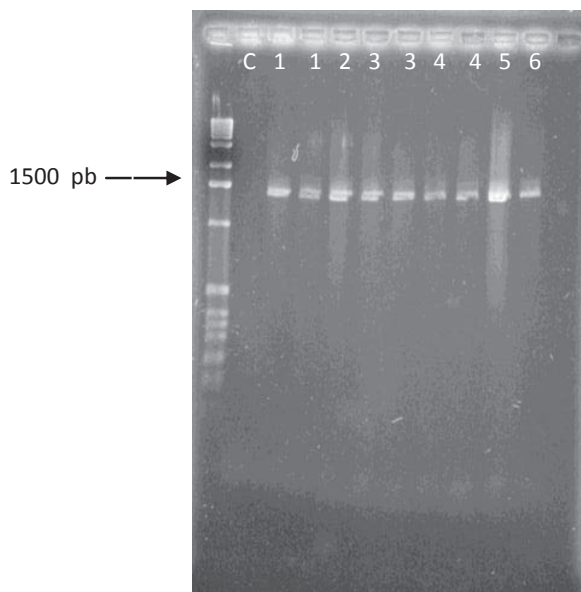


Figura 20. Gel de agarosa 1% donde se muestran los productos de amplificación del 16S rDNA mediante la técnica reportada por Valencia-Cantero *et al.*, 2003. En los carriles de izquierda a derecha encontramos las bandas del control (C), L254 (1), L255 (2), L265a (3), L266 (4), L272a (5) y L270 (6).

Tabla 1. Caracterización molecular de las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a por un análisis del 16S rDNA

Aislado bacteriano	Número de bases de rDNA secuenciadas	Máxima identidad	Género/Especie
L254	769	99%	<i>Bacillus cereus</i>
L255	926	99%	<i>B. cereus</i>
L265a	802	100%	<i>B. cereus</i>
L266	361	99%	<i>B. simplex</i>
L270	797	100%	<i>B. nealsonii</i>
L272a	1520	100%	<i>B. cereus/thuringensis/anthracis</i>

Las secuencias de 16S rDNA fueron comparados con el GenBank usando el algoritmo blastn para determinar el porcentaje de homología ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

#### 9.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA LÍNEA REPORTERA DR5::GUS EN PLANTAS EXPUESTAS A LOS VOLÁTILES DE DIFERENTES PGPR

Con los experimentos anteriores se demostró que *B. cereus* L254, L255 y L265a, *B. simplex* L266, *B. nealsonii* L270 y *Bacillus* sp. L272a promueven de manera diferencial cambios en la morfogénesis de la raíz. Para determinar si los compuestos volátiles de las rizobacterias en estudio activan la ruta de señalización de auxinas, ya que es la principal vía que regula este tipo de procesos morfogénicos de las plantas, se decidió emplear el marcador de genes regulados por auxinas DR5::GUS. Al hacer el análisis del marcador se encontró que había un aumento en la expresión del marcador en la punta de la raíz, en los haces vasculares de las raíces y en las nervaduras de las hojas de todas las plantas expuestas a los volátiles de todas las rizobacterias analizadas comparadas con el control sin inocular (Fig. 21), siendo este efecto más notable en las plantas expuestas a los compuestos volátiles de *B. simplex* L266. También se observó un engrosamiento de las raíces primarias en las plantas expuestas a los volátiles de *B. cereus* L254, L255 y L265a, *B. nealsonii* L270 y *Bacillus* sp. L272a. En las raíces laterales (RL) se observó un patrón similar de expresión que en la raíz primaria (RP).

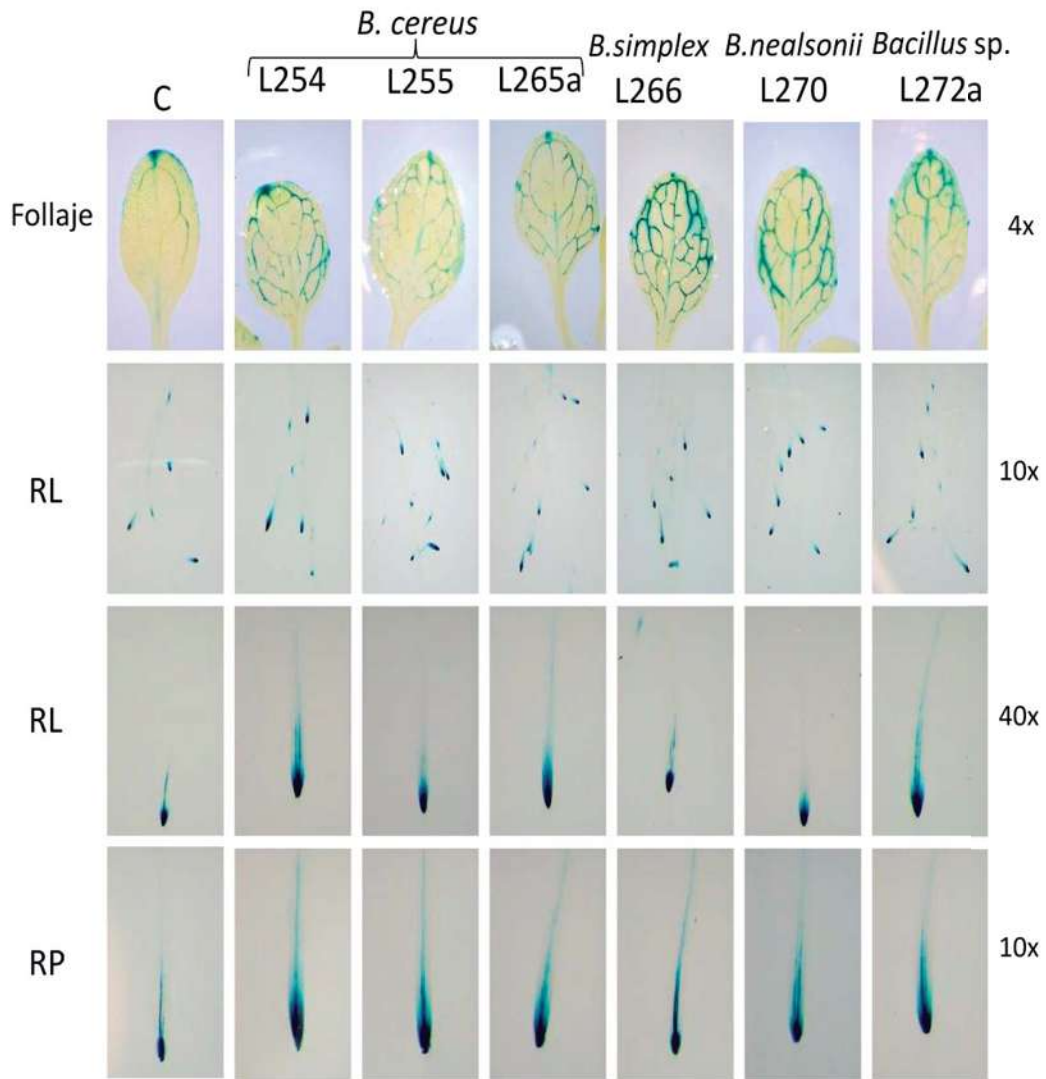


Figura 21. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por las PGPR en la expresión de genes regulados por auxinas. Plántulas de cuatro días después de la germinación fueron expuestas a los compuestos volátiles de seis diferentes rizobacterias promotoras en medio MS 0.2x. La expresión del marcador DR5::GUS se ve incrementado en la raíz primaria (RP) y las raíces laterales (RL) en las plantas inoculadas comparadas con las plantas sin inocular. También se incrementó la expresión en las nervaduras de las hojas de las plantas inoculadas.



## 9.5 DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE *ARABIDOPSIS*, LAS RIZOBACTERIAS Y LA INTERACCIÓN PLANTA-RIZOBACTERIA

Al evaluar los perfiles cromatográficos de la planta sin inocular, las rizobacterias y la interacción planta-rizobacteria, se encontró que hubo diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en distintas regiones de los cromatogramas (Fig. 22). Hubo compuestos que únicamente se encontraron en la planta, como el ácido octanoico con un tiempo de retención (Tr) de 43.91min, otros que solo estuvieron presentes en la rizobacteria como el benzaldehído (Tr. 24.34 min), también se encontraron compuestos que únicamente se detectaron en los perfiles de la interacción como el limoneno (Tr.8.96 min). Por otra parte se identificaron compuestos presentes tanto en la planta sin inocular como en la interacción y cuya abundancia incrementó durante la interacción como el eucaliptol (Tr. 9.91 min). Otros compuestos se detectaron tanto en la rizobacteria y en la interacción como la butirrolactona (Tr. 28.54 min), o por último el caso de la acetofenona (Tr. 29.35 min) la cual se encontró en los perfiles cromatográficos de la planta, la rizobacteria y la interacción, aunque sus abundancias fueron diferentes en todos los casos (Fig. 22).

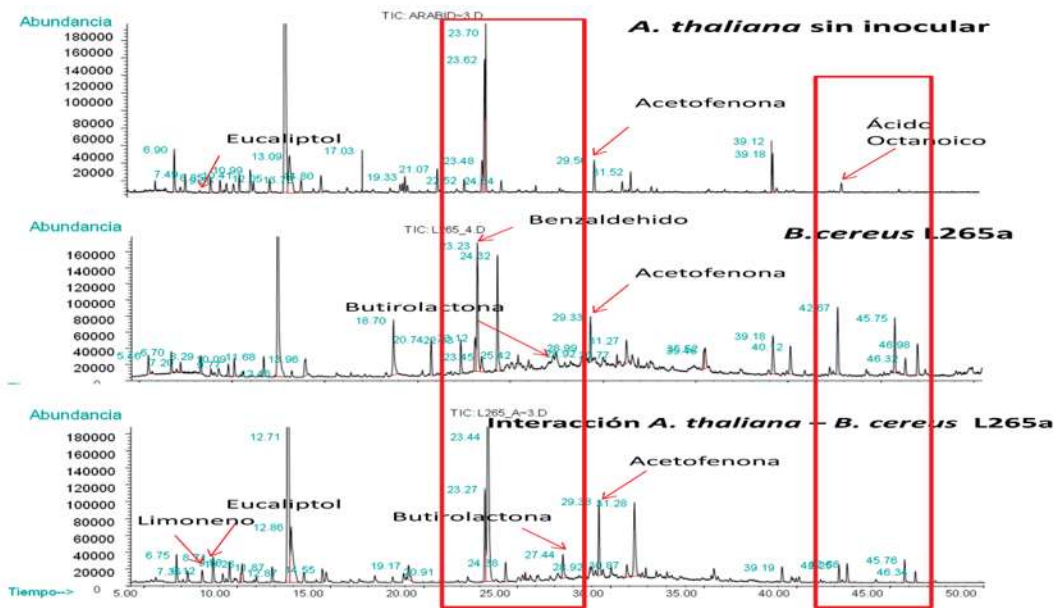


Figura 22. Perfiles cromatográficos representativos de los compuestos volátiles de la planta sin inocular, la rizobacteria *B. cereus* L265a y de la interacción planta- *B. cereus* L265a. Los rectángulos muestran las zonas de mayor diferencia tanto cualitativa como cuantitativa.

### 9.5.1 COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA PLANTA

En el perfil cromatográfico de la planta únicamente se detectaron 9 compuestos, de los cuales se encontraron dos alcoholes, una cetona y seis terpenos; cabe destacar que no se identificó ningún aldehído (Tabla 2). Aunque en la planta solo se encontró una cetona su abundancia relativa correspondió al 31.87% del total de los compuestos identificados (Tabla 3).

En los perfiles cromatográficos de las plantas, los compuestos volátiles más representativos fueron el 3-careno, el eucaliptol y el terpinoleno, el 6-metil-2-heptanol y la acetofenona (Tabla 4). Aunque como se puede observar en la tabla 4, el 6-metil-2-heptanol y la acetofenona, también fueron identificados en las rizobacterias pero en menor concentración.

## 9.5.2 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE LAS RIZOBACTERIAS

El número de compuestos identificado en las rizobacterias vario entre 17-20, siendo de *B. cereus* L255 la que menor número de compuestos presentó con solo 17, mientras que *B. cereus* L265a fue la que tuvo más (20 compuestos), (Tabla 2). El análisis de los perfiles cromatográficos mostró la presencia de alcoholes aldehídos y cetonas, entre otros. De estas familias de compuestos, se encontró que las cetonas fueron más diversas en número (8 a 9 compuestos). Cabe destacar que bajo nuestras condiciones de análisis no se identificó la presencia de terpenos en las rizobacterias. La abundancia relativa de la familia de los aldehídos y las cetonas fue similar entre las rizobacterias y además fueron las que se encontraron en mayor concentración comparados con los alcoholes (Tabla 3).

**Tabla 2. Comparación de número de compuestos volátiles emitidos por las diferentes rizobacterias y que son agrupados por grupo funcional.**

Grupo Funcional	Número de Compuestos por Familia						
	<i>A. thaliana</i>	<i>B. cereus</i> L255	<i>B. nealsonii</i> L270	<i>Bacillus</i> sp. L272a	<i>B. cereus</i> L254	<i>B. cereus</i> L265a	<i>B. simplex</i> L266
Alcoholes	2	4	4	4	3	4	4
Aldehidos	0	2	4	4	4	4	4
Cetonas	1	8	8	8	8	9	8
Terpenos	6	0	0	0	0	0	0
Otros	0	3	3	3	3	3	2
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>18</b>

Tabla 3. Abundancia relativa de los compuestos volátiles por grupo funcional que fueron detectados en la planta y en las rizobacterias.

Grupo Funcional	Abundancia Relativa de Volátiles (%)						
	<i>A. thaliana</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. nealsonii</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. simplex</i>
		L255	L270	L272a	L254	L265a	L266
Alcoholes	22.49	4.65	10.95	5.82	4.18	6.56	9.57
Aldehidos	0	29.52	42.78	49.72	51.65	45.11	43.97
Cetonas	31.87	56.69	39.13	39.14	39.42	40.45	41.16
Terpenos	45.64	0	0	0	0	0	0
Otros	0	9.14	7.14	5.31	4.74	7.88	5.31
Total	100	100	100	100	100	100	100

En la Tabla 4 se muestra una selección de compuestos volátiles más representativos que emiten las rizobacterias en medio MS (Tabla 4). El tridecanal, el tetradecanal, el 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y el ciclodecano son compuestos que se encontraron en todas las rizobacterias pero, el 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona tuvo abundancias relativas muy variables entre las diferentes rizobacterias siendo de 5.97% en *Bacillus* sp. L272a hasta 36.71% en *B. cereus* L255. Por otro lado se identificaron compuestos que únicamente estuvieron presentes en solo algunas de las rizobacterias, como el benzaldehído en *B. nealsonii* L270, *Bacillus* sp. L272a, *B. cereus* L254 y *B. simplex* L266 (3.83, 24.09, 11.26, 8.84% respectivamente) o la butirrolactona presente únicamente en *B. cereus* L265a.

**Tabla 4. Compuestos volátiles representativos que fueron emitidos por la planta y las diferentes rizobacterias.**

El análisis de compuestos volátiles se realizó por SPME-GC-MS y tanto la planta como las rizobacterias fueron crecidas en medio MS.

Compuesto	Abundancia Relativa de Volátiles (%)						
	<i>A. thaliana</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. nealsonii</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. simplex</i>
		L255	L270	L272a	L254	L265a	L266
3-Careno	9.33	0	0	0	0	0	0
Eucaliptol	8.12	0	0	0	0	0	0
Terpinoleno	12.57	0	0	0	0	0	0
6-Metil-2-heptanol	16.05	0.88	0.91	2.02	1.32	0.9	1.31
Benzaldehido	0	0	3.83	24.09	0	11.26	8.84
Butirolactona	0	0	0	0	0	2.17	0
Acetofenona	31.87	9.8	20.02	22.78	16.27	9.31	20.43
Tridecanal	0	13.7	17.89	15.13	19.44	17.91	18.77
Tetradecanal	0	15.82	18.83	9.51	16.31	14.38	14.34
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	0	36.71	8.2	5.97	12.06	14.59	9.14
Ciclododecano	0	1.47	2.41	1.45	1.63	2.41	2.44

### 9.5.3 COMPUESTOS VOLÁTILES IDENTIFICADOS DURANTE LA INTERACCIÓN PLANTA-RIZOBACTERIA

Realizando el análisis de compuestos volátiles durante la interacción planta-rizobacteria, se encontró que el perfil cromatográfico estaba representado por las mismas familias de compuestos que se reportaron para la planta y las rizobacterias, estos fueron alcoholes, aldehídos, cetonas (Tabla 5).

En el caso de la interacción el número de compuestos entre las diferentes interacciones aumentó con respecto al número de compuestos identificados en las rizobacterias solas, siendo 19 compuestos para el caso de *B. cereus* L255 hasta 31 para *B. cereus* L265a. En el caso de los alcoholes, aldehídos y

terpenos el número de compuestos en la interacción fue semejante entre bacterias teniendo cada uno de estos entre 3-6, 1-3 y 8-9, respectivamente. Con respecto a los terpenos se encontró que mientras que en la planta había únicamente 6 terpenos, durante la interacción el número de terpenos por tratamiento varió dependiendo de la rizobacteria con la cual se estaba llevando a cabo la interacción, por ejemplo en la interacción de *Arabidopsis*- *B. cereus* L255 solo se identificó un terpeno que fue el eucaliptol; en la interacción de *Arabidopsis*- *B. cereus* L265a se identificaron 11 terpenos entre los cuales se cita al 3-careno, el eucaliptol y el terpinoleno (Tabla 5 y 7) mientras que en algunos casos como el de la interacción *Arabidopsis*- *B. cereus* L254 no se detectó la presencia de terpenos. En lo referente a las abundancias relativas, los alcoholes son los que tuvieron más oscilaciones en sus abundancias. Por ejemplo la interacción *Arabidopsis*-*B. cereus* L265a tuvo un mayor número de alcoholes (6), cuya abundancia correspondió al 2.78%, mientras que en el caso de la interacción *Arabidopsis*- *B. cereus* L255 sólo se identificaron 4 alcoholes y su abundancia relativa representó el 20.26% (Tabla 6).

**Tabla 5. Número de compuestos volátiles por familia detectados durante la interacción planta-rizobacteria.**

Grupo Funcional	Número de Compuestos por Familia						
	<i>A. thaliana</i>	Ara-L255	Ara-L270	Ara-L272a	Ara-L254	Ara-L265a	Ara-L266
Alcoholes	2	4	4	5	5	6	3
Aldehídos	0	2	2	3	1	1	2
Cetonas	1	8	9	9	8	8	8
Terpenos	6	1	5	3	0	11	3
Otros	0	4	3	3	6	5	4
Total	9	19	23	23	20	31	20

**Tabla 6. Abundancias relativas de las familias de compuestos detectadas durante la interacción planta-rizobacteria**

Grupo Funcional	Abundancia Relativa de Volátiles (%)						
	<i>A. thaliana</i>	Ara-L255	Ara-L270	Ara-L272a	Ara-L254	Ara-L265a	Ara-L266
Alcoholes	22.49	20.26	10.03	8.43	16.37	2.78	4.64
Aldehídos	0	17.67	11.18	14.28	11.05	4.59	21.75
Cetonas	31.87	52.01	51.96	51.68	53.59	35.95	45.61
Terpenos	45.64	2.19	10.98	16.02	0	46.82	19.27
Otros	0	7.87	15.85	9.59	18.99	9.88	8.73
Total	100	100	100	100	100	100	100

En lo referente a los compuestos volátiles detectados en la interacción (Tabla 7), se encontraron compuestos que estuvieron presentes en todas las interacciones como el 6-metil-2-heptanol, también hubo compuestos que se habían detectado en la planta y que permanecieron presentes en algunas interacciones como el 3-careno, que únicamente se encontró en las interacciones con *B. nealsonii* L270 y *B. cereus* L265a. También se encontraron compuestos en la interacción y que además estaban en todas las rizobacterias como tridecanal, tetradecanal, 6,10,14-trimeti-2-pentadecanona y el ciclodecano, y destaco el caso del tetradecanal que no se encontró durante la interacción *Arabidopsis*- *B. cereus* L254 , sin embargo si se había identificado en la rizobacteria. También destacan los compuestos que durante la interacción aparecen *de novo* como el isobornil tiocianoacetato y la  $\alpha$ -isoforona que se encontraron en la interacción con *B. nealsonii* L270, la acetoína presente solo en la interacción con *Bacillus* sp. L272a, el (S)-(+)-6-Metil-1-octanol el cual se encontró exclusivamente en *B. cereus* L255 y por último el mentol, que a excepción de los demás compuestos nuevos se detecto en las interacciones con *B. nealsonii* L270, *Bacillus* sp. L272a y *B. simplex* L266.

Tabla 7. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS durante la interacción planta-rizobacteria

Compuesto	Abundancia Relativa de Volátiles (%)						
	<i>A. thaliana</i>	Ara-L255	Ara-L270	Ara-L272a	Ara-L254	Ara-L265a	Ara-L266
3-Careno	9.33	0	0.81	0	0	2.78	0
Eucaliptol	8.12	2.19	1.9	2.21	0	1.4	2.01
Terpinoleno	12.57	0	0	0	0	17.55	0
<u>3-Hidroxi-2-butanona (Acetoína)</u>	0	0	0	8.33	0	0	0
6-Metil-2-heptanol	16.05	1.25	1.91	3.1	2.49	0.18	1.57
<u>Isobornil tiocianoacetato</u>	0	0	2.1	0	0	0	0
<u><math>\alpha</math>-Isoforona</u>	0	0	3.57	0	0	0	0
Butirolactona	0	0	0	0	0	5.29	0
<u>(S)-(+)-6-Metil-1-octanol</u>	0	16.19	0	0	0	0	0
<u>Mentol</u>	0	0	4.66	13.29	0	0	16.07
Acetofenona	31.87	19.79	31.79	27.49	20.62	16.4	22.46
Tridecanal	0	10.05	6.73	8.51	11.05	0	13.12
Tetradecanal	0	7.62	4.45	5.39	0	4.59	8.63
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	0	12.5	7.06	7.7	12.15	8.75	13.16
<u>Ciclododecano</u>	0	1.73	3.07	1.03	2.01	1.37	2.47



## 10. DISCUSIÓN

El sistema radicular provee de anclaje, agua y nutrientes del suelo a la planta, además de ser el sitio de síntesis de algunas hormonas como auxinas y citocininas, que son fundamentales para los procesos de desarrollo (Ortíz-Castro *et al* 2009). La raíz es un órgano de planta que presenta alta plasticidad y su morfología y fisiología se modifica en respuesta a factores internos propios de la planta y a factores externos como los son la presencia de materia orgánica y los cambios en el ambiente. Los mecanismos de promoción reportados hasta la fecha para las PGPR implican la síntesis de fitohormonas y otros compuestos con actividad antimicrobiana, sin embargo, el papel de los compuestos volátiles de las PGPR se determinó hace a penas unos años (Ryu *et al.*, 2003), aunque no se sabe si este efecto es ubicuo entre las PGPR.

En este estudio se determinó el efecto de doce rizobacterias y su efecto en la modulación de la arquitectura de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* mediante la emisión de compuestos volátiles. De esta manera se evaluaron los cambios en la arquitectura de la raíz de plantas que habían estado expuestas a los compuestos volátiles de la diferentes rizobacterias, y se encontró que no todos los aislados estimularon la producción de biomasa en *Arabidopsis*, siendo *B. cereus* L255, y los aislados L264, L268 y L272b estadísticamente similares a las plantas control sin inocular (Fig. 17).

Este resultado nos indicó que los compuestos volátiles de las rizobacterias tuvieron un efecto específico sobre el desarrollo de la planta. Los compuestos volátiles son los partícipes fundamentales de la comunicación química entre los organismos de todos los reinos, actuando como señales de atracción, repulsión o precaución. En particular en los microorganismos, se emiten compuestos volátiles que les sirven como señales de comunicación o defensa (Schulz y Dickschat, 2007, Kai *et al* 2009). Debido a la cercanía de las rizobacterias con las raíces de la planta, se ha especulado que estos organismos mantienen una estrecha comunicación mediante compuestos volátiles, y más específicamente las PGPR con las raíces de la planta. En este estudio se estableció un sistema de cajas divididas para evitar el contacto directo de la rizobacteria con la planta

y que el efecto que estuviéramos observando fuera promovido exclusivamente por los compuestos volátiles, y los resultados demostraron que algunas rizobacterias estimularon fuertemente la producción de biomasa, tal es el caso de las rizobacterias *B. cereus* L254, *B. cereus* L265a, L265b y *B. simplex* L266, las cuales también tuvieron un efecto modulador de la arquitectura de la raíz (Fig. 18).

También se encontró que las plantas modifican la arquitectura de la raíz de manera diferencial en respuesta a los volátiles emitidos por cada una de las rizobacterias, lo que sugiere que la planta emplea un mecanismo de señalización selectivo y ampliamente efectivo para discriminar entre microorganismos y de esta manera alterar la su arquitectura radicular.

El resultado del análisis del índice de correlación (Fig. 19) mostró que existe una correlación positiva entre la producción de biomasa y la longitud de las raíces laterales, lo que indica que este parámetro puede estar implicado en la regulación de la promoción de crecimiento por parte de las PGPR.

Con este trabajo se especula que la respuesta de la planta a los compuestos volátiles de las rizobacterias por medio de la alteración de la arquitectura de la raíz podría ser un aspecto de relevancia ecológica, ya que al haber mayor área radicular aumenta la colonización de ésta, por lo tanto aumenta las interacciones simbióticas entre la planta y las asociaciones bacterianas benéficas, lo que se ve reflejado en un aumento en la promoción de crecimiento de la planta, que a la vez emite más exudados como compuestos carbonados, lo cual les beneficia a las poblaciones microbianas que habitan la rizósfera, incrementándolas.

El análisis de secuencias del 16S rDNA de las rizobacterias que se escogieron como representativas de los efectos de todos los parámetros analizados, fueron a L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a, indicó que todas ellas pertenecían al género *Bacillus* (Tabla 1). El género *Bacillus* es uno de los mejor caracterizados, de los cuales una inmensa mayoría se han encontrado en el suelo. *Bacillus* se define como una bacteria Gram positiva, con forma de bacilo, que puede ser aerobia o anaerobia facultativa y produce endoesporas en respuesta a déficit nutricionales o ambientales (Alcaraz *et al.*, 2010).

Recientemente, *B. cereus* y *B. simplex* se aislaron de la rizósfera de un pasto y se probó su efecto promotor en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), y lo que los autores encontraron fue que estas dos rizobacterias (*B. cereus* y *B. simplex*) aumentaban el peso seco del brote y la raíz e incrementaban la longitud de la raíz, lo cual fue relacionado con la producción de auxinas por parte de la bacteria (Hassen y Labuschagne, 2010). En el presente trabajo se evaluó el efecto los compuestos volátiles de cepas de *B. cereus* (L254 y L265a) y *B. simplex* (L266) en el desarrollo de *A. thaliana* y se observó que éstas incrementaron hasta dos veces el peso fresco y el crecimiento de raíces laterales en plántulas *Arabidopsis in vitro* (Fig. 17 y 18C), lo que provee evidencia de que los compuestos volátiles emitidos por estas rizobacterias están involucrados en la promoción de crecimiento. La caracterización molecular del aislado L270 arrojó una identidad del 100 % con *B. nealsonii* de la cual no hay ningún reporte previo donde se mencione como una bacteria habitante de la rizósfera y mucho menos como una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal. El aislado L272a arrojó un 100% de identidad con *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*. En la base de datos hay cerca de 1000 secuencias genómicas completas de procariotes, de los cuales aproximadamente 85 son genomas del género *Bacillus*, de los cuales un 61% se clasifican como *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*, por lo que se recomienda la utilización de otros marcadores para su mejor identificación como hibridación comparativa del genoma (CGH), regiones intergénicas (ITS) o mediante la caracterización bioquímica (Alcaraz *et al.*, 2010).

Se ha reportado que diferentes mecanismos de señalización en las plantas se encienden en respuesta a los compuestos volátiles de las rizobacterias. Recientemente Ryu *et al.*, en 2003 mencionaron que los compuestos volátiles de las rizobacterias pueden activar rutas de señalización hormonales e inducir cambios en el desarrollo. De aquí que estos autores probaron mutantes de *Arabidopsis* de las diferentes rutas de señalización hormonal de las plantas, encontrando que los compuestos volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03 activaban las vías de señalización dependientes de citocininas y etileno, sin embargo los compuestos volátiles *B. amyloliquefaciens* IN937a promovían el desarrollo de *Arabidopsis* de manera independiente de esta vía, lo que sugiere que otras rutas de señalización hormonal podría estar participando en la

promoción de crecimiento regulada por los compuestos volátiles de las rizobacterias. Posteriormente Zhang *et al* en 2007 propone que los compuestos volátiles de *B. subtilis* GB03 tienen un efecto en el desarrollo de la planta aumentando el área foliar mediante la regulación de la homeostasis de auxinas de la planta, modulando el transporte y la síntesis de auxinas. En el presente trabajo se encontró que las rizobacterias *B. cereus* L254, *B. cereus* L255, *B. cereus* L265a, *B. simplex* L266, *B. nealsonii* L270 y *Bacillus* sp. L272a regulan el desarrollo de la planta y la arquitectura de la raíz mediante la ruta de señalización dependiente de auxinas modulando la homeostasis de auxinas, probablemente aumentando la síntesis de auxinas en las raíces, y estimulando su transporte, ya que se observó un aumento en la expresión del marcador de genes regulados por auxinas DR5::GUS en la cofia de la raíz y en los haces vasculares así como en las nervaduras de las hojas (Fig. 21).

Este resultado sugiere que los compuestos volátiles bacterianos incrementan la velocidad de movilización de auxinas en la planta, lo que impide que se acumulen concentraciones inhibitorias en los meristemos y por lo tanto no exista una inhibición del crecimiento de la raíz principal, si no al contrario, que ésta incremente su tamaño. Si recordamos Zhang *et al* 2007 habían observado que *Bacillus subtilis* GB03 regula el desarrollo de la planta mediante la homeostasis de auxinas. En este trabajo se encontró que todas las rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus* incrementaron la expresión de genes regulados por auxinas, aunque no se descarta la posibilidad de que la complejidad en la modulación del desarrollo de la planta involucre otros mecanismos de señalización hormonal como citocininas, ya que previamente se reportó que *B. megaterium* modulaba la arquitectura de la raíz a través de la ruta de citocininas (Ortíz-Castro *et al.*, 2008).

En un trabajo previo se reportó que los compuestos volátiles acetoina (3-hidroxi-2-butanona) y 2,3-butanediol, producidas por dos rizobacterias promotoras del desarrollo de *Arabidopsis* (Ryu *et al* 2003, Farag *et al* 2006). Durante el análisis de compuestos volátiles de las rizobacterias L254, L255, L265a, L266, L270 y L272a no se identificó la presencia de ninguno de estos compuestos dentro del perfil de compuestos de las rizobacterias, muy probablemente por el medio de cultivo que se utilizó para cultivar a las

bacterias, ya que Ryu usó medio agar soya tripticaseína (TSA) (Ryu *et al.*, 2003) y nosotros utilizamos medio MS. Sin embargo vimos acetoina únicamente durante la interacción *Arabidopsis*- L272a, pero como esta cepa no fue la mejor, sugiere fuertemente que otros compuestos están implicados en el desarrollo vegetal bajo nuestras condiciones de trabajo.

La diversidad de compuestos identificados en este trabajo de tesis indica que probablemente algunos de estos compuestos podrían estar implicados en la modulación del desarrollo de *Arabidopsis* (Tabla 3) Las familias de compuestos más abundantes dentro del perfil cromatográfico de compuestos pertenecientes a las rizobacterias fueron alcoholes, aldehídos y cetonas (Tabla 2), de los cuales las cetonas fueron las que estuvieron más representadas encontrándose ocho cetonas diferentes mientras que para los alcoholes y los aldehídos únicamente se encontraron cuatro. Farag *et al* en 2006 ya habían reportado la presencia de alcoholes, cetonas y aldehídos en el perfil cromatográfico *B. subtilis* GB03 utilizando la técnica de SPME-GC.MS. El benzaldehído se identificó en *B. cereus* L265a, *B. simplex* L266, *B. nealsonii* L270 y *Bacillus* sp. L272a, la acetofenona y el 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, son compuestos que fueron identificados en todas las rizobacterias analizadas y los reportes en la literatura indican que estos compuestos poseen actividad antimicrobiana (Kloepper *et al.* 1999; Sivakumar *et al* 2008; Yayli *et al* 2006; Roy *et al* 2009). Interesantemente se observó que *B. cereus* L265a produce butirolactona. Este compuesto ha sido reportado que actúa como autoinductor en la señalización de quórum-sensing (QS) (Miller y Bassler 2001). Estudios recientes en el grupo de trabajo indican que las raíces de las plantas pueden percibir señales de QS y alterar la arquitectura de la raíz (Ortíz-Castro *et al* 2008), por lo que no se puede descartar la posibilidad que compuestos volátiles que forman parte de la señalización de QS formen parte de los compuestos volátiles que participan en la modulación de desarrollo durante la interacción planta-rizobacteria.

Este estudio es el primero donde se lleva a cabo el análisis de los compuestos volátiles durante la interacción. Donde los compuestos volátiles son emitidos tanto por la rizobacteria como por la planta. El análisis de compuestos durante dicha interacción sugiere la existencia de una comunicación mediante el

intercambio de señales químicas, las cuales fueron diferentes entre cada interacción. Esto se ve reflejado muy claramente con los terpenos, ya que se detectaron seis terpenos en la planta mientras que durante las interacciones hubo mucha variabilidad en el número de terpenos en cada interacción, por ejemplo durante la interacción con *B. cereus* L265a se detectaron 11 terpenos mientras que en la interacción con *B. cereus* L254 no se detectó ningún terpeno (Tabla 3). Esta variación es un indicio de que la planta percibe y responde ante la presencia de las bacterias. Entre los terpenos que se encontraron en la planta y que se mantuvieron en algunas de las interacciones tenemos al eucaliptol el cual es un terpeno con actividad antimicrobiana además de ser un compuesto alelopático o el terpinoleno el cual se ha reportado con actividad antimicrobiana (Chen *et al*, 2004) Otro terpeno encontrado durante la interacción y que tiene actividad antimicrobiana es el mentol (Mucciarelli *et al* 2003). Otro ejemplo claro de que la comunicación es específica entre la planta y la rizobacteria durante la interacción fue la identificación de compuestos que fueron sintetizados *de novo*, es decir no fueron encontrados ni en la planta sin inocular, ni en la rizobacteria; tal es el caso de la  $\alpha$ -isoforona y el isobornil tiocianoacetato que estuvieron presentes solo en la interacción de *Arabidopsis* con *B. nealsonii* L270. Un compuesto biomarcador de la interacción *Arabidopsis*-*B. cereus* L255 es el (s)-(+)-6-metil-1-octanol.

De acuerdo con los resultados de este trabajo se puede destacar que cada una de las rizobacterias probadas, tiene su propia huella química, la cual de acuerdo con nuestros estudios las plantas pueden percibir, de manera que su respuesta en la modificación de la morfogénesis de la planta es diferente para cada una de las rizobacterias, ya que como recordamos tres de las rizobacterias probadas en este trabajo son *Bacillus cereus* sin embargo sus efectos y sus perfiles cromatográficos tanto de manera aislada como durante la interacción son totalmente diferentes.

## 11. APORTACIONES DEL TRABAJO

En este estudio se estableció que la comunicación planta-rizobacteria es específica, ya que de acuerdo con nuestros resultados la planta puede reconocer a la rizobacteria con la que está interactuando y responder de manera diferencial, lo que se ve reflejado en que cada una de las rizobacterias tuvo un efecto distinto sobre la morfogénesis de la planta, siendo más claro para el caso de las cepas de *B. cereus* L254, L255 y L265a, las cuales a pesar de pertenecer a la misma especie desencadenaron respuestas diferentes en la arquitectura de la raíz y la biomasa de la planta. En la Fig. 23 podemos observar como *B. cereus* L254 y L265a, *B. simplex* L266 y el aislado L265b fueron las rizobacterias que estimularon un aumento en la biomasa, así como L265 b fue el mejor promotor de LRL y las rizobacterias L263, *B. simplex* L266 y *Bacillus* sp. tuvieron un efecto promotor tanto en las LRP y NRL. Además que en este estudio se identificó a la rizobacteria *B. nealsonii* como PGPR y de la cual no hay reportes previos como rizobacteria promotora de crecimiento vegetal.

De manera general se observó que las rizobacterias estimularon la movilización de auxinas en las plantas, además de que hay un aumento en la expresión del marcador de genes regulados por auxinas en la punta de la raíz, siendo este trabajo el primero donde se hace un análisis sobre la expresión del marcador DR5::GUS en la raíz de plantas expuestas a los volátiles de PGPR, y de acuerdo con nuestros resultados se está sugiriendo que los compuestos volátiles de las rizobacterias están modulando el crecimiento de la planta mediante la homeostasis de auxinas a nivel de biosíntesis y transporte; sin embargo no se sabe que está pasando con la conjugación y el catabolismo de las auxinas, por lo que hacen falta realizar más estudios .

Este trabajo es el primero en el que se hace un análisis de los compuestos volátiles durante la interacción, y en este análisis se identificaron compuestos que se sintetizaron de *nov*o como el isobornil tiocianoacetato, la  $\alpha$ -isoforona, el



(S)-(+)-6-Metil-1-octanol y el mentol, los cuales podrían participar de los cambios morfogénéticos observados en la planta durante la interacción.

No se descarta la posibilidad de que el efecto observado en las plantas se debe al perfil de compuestos volátiles emitidos por las rizobacterias durante la interacción más que a los volátiles emitidos de forma constitutiva por cada una de las bacterias.

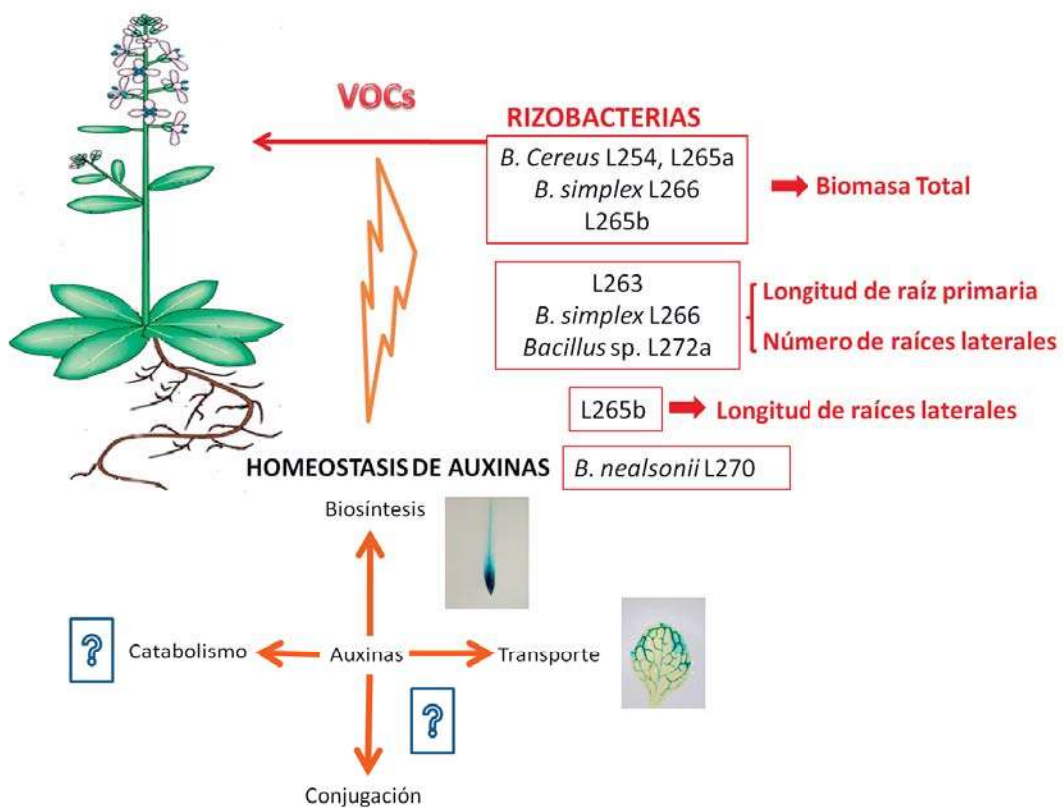


Figura 23. Aportaciones realizadas en este trabajo.



## 12. PERSPECTIVAS

- Probar los compuestos puros que hayan sido seleccionados en los perfiles y establecer la relación probable con el efecto observado en la modulación de la arquitectura de la raíz.
- Cuantificar el contenido de auxinas en las plantas de *Arabidopsis* expuestas a los compuestos volátiles bacterianos.
- Llevar a cabo el análisis del efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias aquí estudiadas en líneas reporteras de distintas vías hormonales en plantas de *A. thaliana*.
- Evaluar el efecto de los compuestos volátiles de las rizobacterias sobre la elongación celular utilizando el marcador de Expansina.

## 13. CONCLUSIÓN

Los distintos compuestos volátiles de las rizobacterias disparan respuestas diferenciales en los programas morfogénéticos en la raíz de las plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante procesos que involucran la modulación de la homeostasis de auxinas.

## 14. REFERENCIAS

Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L y Olmedo G (2010) BMC Genomics. **11**: 332-348

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, y Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**: 403-410.

Baldwin IT (2010) Plant volátiles. Current Biology. **20** (9): R392-R396.

Banchio E, Xie X, Zhang H y Paré PW (2009) Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil . J of Agricultural and Food Chemistry. **57**: 653-657.

Bradi DV, Weir TL, van der Lelie D y Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. Current Opinion in Biotechnology. **20**: 642-650.

Campbell R, Graves M (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: Lynch J (ed) The Rhizosphere. Wiley Interscience Publication, England, pp 11-34.

Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ (1999) Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J. **63**: 1670-1680.

Celenza Jr. JL, Grisafi PL y Fink GR (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*. **9**: 2131-2142.

Chen F, Ro D-K, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E y Tholl D (2004) Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiology*. **135**: 1956-1966.

Chapman K, Groot EP, Nichol SA y Rost TL (2003) Primary root growth and the pattern of root apical meristem organization are coupled. *J. Plant Growth Regul.* **21**: 287-295.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C y Barka E (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959.

Eckardt N (2005) MicroRNAs Regulate Auxin Homeostasis and Plant Development. *Arabidopsis book*. **17**: 1335–1338.

Farag M, Ryu C, Summer L y Paré P (2006) GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochem.* **67**: 2262-2268.

Greulach V.A y J.A. Edison( 1970) *Las Plantas. Introducción a la Botánica Moderna*. Ed Limusa-Wiley S.A. México. 679 pp.

Grieson C y Schiefelbein J (2002) Root hairs. The Arabidopsis book. DOI:10.1199/tab.0060.

Haas D, Keel C y Reimann C (2002) Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**: 385-395.

Hassen AI y Labuschagne N (2010) Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-010-0365-z.

Jefferson RA (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*. **5**: 387-405.

Kai M y Piechulla B (2009) Plant growth promotion due to rhizobacterial volátiles – An effect of CO<sub>2</sub>?. *FEBS Letters*. **538**: 3473-3477.

Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B y Piechulla B (2009) Bacterial volátiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 1001-1012.

Kloepper JW, Rodriguez-Ubana R, Zhender GW, Murphy JF, Sikora E y Fernández C (1999) Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. **28**: 21-26.

López-Bucio J, Campos-Cuevas J C, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R y Valencia-Cantero E (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin and ethylene independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Microbe Interact. **20**: 207-217.

Lugtenberg B, Chin-A-Woeng T y Bloemberg G (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. Antonie van Leeuwenhoek. **81**: 373-383.

Malamy JE y Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral root of *Arabidopsis thaliana*. Development. **124**: 33-44.

Meyerowitz EM y Somerville CR (1994) Arabidopsis. Ed. Cold Spring Harbor Press New York. USA. 1300 pp.

Michniewicz M, Brewer PB y Frimi J (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. American Society of Plant Biologists: The Arabidopsis Book. DOI:10.1199/tab.0108.

Miller MB y Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. Annu Rev. Microbiol. **55**: 165-199.

Mucciarelli M, Scannerini S, Berteaux C y Maffei M (2003) *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytologist. **158**: 579-591

Ortíz-Castro R, Martínez-Trujillo M y López-Bucio J (2008) *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **31**: 1497-1509.

Ortíz.Castro R, Valencia-Cantero E y López-Bucio J (2008) Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior.* **3**:4, 263-265.

Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L y López-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior.* **4**: 701-712.

Pérez VJ, García EG y Esparza GF (2002) Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. **21**: 297-300.

Ping L y Boland W (2004) Signals from underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* **9**:263-266.

Robbins W.W, W.T Elliot y C.R. Stocking (1974) *Botánica*. Ed. Limusa-Wiley S.A. México. 600 pp.

Roy S, Rao K, Bhuvaneshwari Ch, Giri A y Mangamoori LN (2009) Phytochemical analysis of *Andrographis paniculata* extract and its antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-009-0146-8.

Ryu C-M, Farag MA, Hu Ch-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW y Kloepper JW (2003) Bacterial volátiles promote growth in *Arabidopsis*. PNAS. **100**: 8, 4927-4932.

Salisbury FB y Ross CW (1992) Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A, Thomson learning. España. 987 pp.

Scheres B, Benfey P y Dolan L (2002) Root development. The Arabidopsis book. DOI:10.1199/tab.0101.

Schulz S y Dickschat J (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. Nat. Prod. Rep. **24**: 814-842.

Sivakumar PM, Sheshayan G y Doble M (2008) Experimental and QSAR of acetophenones as antibacterial agents. Chem. Biol. Drug. Des. **72**: 303-313.

Soleimani M, Shamsbakhsh M, Taghavi M y Kazemi Sh (2005) Biological control of stem and root-rot of wheat caused by *Bipolaris* spp. by using antagonistic bacteria, fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. J. Biol. Sci. **5**: 347-353.

Teale WD, Paponov IA y Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature reviews: Molecular Cell Biology. **7**:847-859.



Ulmasov T, Murfett J, Hagen G y Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*. **9**:1963-1971.

van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.

Valencia-Cantero E, Martínez-Romero E y Pena-Cabrales JJ (2003) The corrosion effects of sulfate-and ferric-reducing bacterial consortia on steel. *Geomicrobiol. J.* **20**: 157-170.

Weisburg W, Barns SM, Pelletier DA y Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.

Whipps J (2001) Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487-511.

Yang J, Kloepper J y Ryu C (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **14**: 1-4

Yayli N, Gülec C, Ücücü O, Yasar A, Ülker S, Coskuncelebi K y Terzioglu S (2006) Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. *Turk Journal Chem.* **30**: 71-76.

Zhang H, Kim M-S, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu C-M, Allen R, Melo IS y Paré PW (2007) Rhizobacterial volatile emissions

regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. **226**: 839-851.

Zhang H, Xie X, Kim M-S, Korniyev DA, Holaday S y Paré PW (2008a) Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels *in planta*. *The Plant Journal*. **56**: 264-273.