



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-  
BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA**

**“Determinación de los efectos diferenciales de los compuestos  
orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diversas  
rizobacterias en plantas de *Sorghum bicolor*”**

**TESIS**

Que presenta:

**BIÓL. MARIA ELIZABETH AVILES GARCIA**

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Asesor: Doctor en ciencias Eduardo Valencia Cantero

Co-asesor: Doctor en Ciencias Gustavo Santoyo Pizano

Morelia, Michoacán. Agosto de 2015

Agradezco a CONACYT por la beca No. 277237 que me otorgo para realizar mis estudios de maestría.

Las actividades para desarrollar el presente trabajo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 128341 y el Consejo de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 2.22.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1 La rizósfera .....	5
2.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	6
2.3 Exudados radiculares .....	8
2.4 Compuestos Orgánicos volátiles (VOCs).....	11
2.5 Las plantas gramíneas.....	13
2.6 El cultivo del sorgo.....	14
2.7 El gen <i>SbFRO1</i> implicado en los mecanismos de absorción de Fe .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares .....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
6.1 Material biológico.....	23
6.1.1 Semillas.....	23
6.1.2 Bacterias .....	23
6.2 Medios de cultivo .....	23
6.2.1 Agar nutritivo (AN).....	23
6.2.2 Medio Luria-Bertani (LB) .....	23
6.2.3 Medio de cultivo (PY) .....	23
6.2.4 Murashige-Skoog(MS) .....	24

6.3 Establecimiento del sistema experimental .....	25
6.3.1 Esterilización .....	25
6.3.2 Germinación.....	25
6.3.3 Eliminación del endospermo .....	26
6.3.4 Inoculación bacteriana .....	26
6.3.5 Condiciones de crecimiento.....	27
6.4 Análisis del crecimiento vegetal.....	27
6.5 Análisis estadístico .....	28
6.6 Extracción de exudados radiculares de plantas de <i>S. bicolor</i> .....	28
6.6.1 Extracción de ácidos orgánicos a pH ácido:.....	29
6.6.2 Derivatización de ácidos orgánicos.....	29
6.6.3 Identificación de ácidos orgánicos por GC-MS .....	30
6.6.4 Análisis de componente principal.....	31
6.7 Análisis de la expresión del gen <i>SbFRO1</i> en presencia de VOCs de diversas rizobacterias .....	31
6.7.1 Aislamiento de ARN con trizol.....	31
6.7.2 Cuantificación del ARN .....	32
6.7.3 Síntesis de ADNc .....	32
6.7.4 Curva estándar de los genes <i>SbFRO1</i> y <i>SbACTINA</i> .....	33
6.7.5 Análisis de expresión .....	34
6.7.6 Análisis estadístico.....	34
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Efecto de los VOCs bacterianos sobre la biomasa de <i>Sorghum bicolor</i> . 36	
7.2 Exudados radiculares de plantas de <i>Sorghum bicolor</i> expuestas a los VOCs bacterianos.....	40
7.3 Análisis de la expresión del GEN <i>SbFRO1</i> en plantas <i>Sorghum bicolor</i> expuestas a los VOCs bacterianos de diferentes rizobacterias. ....	47

8.	DISCUSIÓN .....	50
9.	CONCLUSIONES .....	57
10.	CONCLUSIÓN GENERAL .....	57
11.	LITERATURA CITADA .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la rizósfera.....	6
<b>Figura 2.</b> Efecto de las bacterias PGPR <i>Bacillus subtilis</i> GB03 y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN937a en el desarrollo del área foliar en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expuestas a los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bacterianos (Ryu <i>et al.</i> , 2003). .....	12
<b>Figura 3.</b> <i>S. bicolor</i> PIONEER 82W21.....	14
<b>Figura 4.</b> Clasificación taxonomía de <i>S. bicolor</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Principales países productores de sorgo 2014-2015. (Sagarpa, <a href="http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/mapasTablero/principalesProductoresSorgo.php">www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/mapasTablero/principalesProductoresSorgo.php</a> ) Consultado el 12 de Agosto de 2015.....	16
<b>Figura 6.</b> Producción de Sorgo en México. Fuente: SIAP-SAGARPA 2012. ...	17
<b>Figura 7.</b> Representación de las dos estrategias de adquisición de hierro empleadas por las plantas.....	18
<b>Figura 8.</b> Expresión de <i>SbFRO1</i> en plantas de <i>S. bicolor</i> inducido por la cepa UMCV2 y DMHDA (Alejandre-Ramírez <i>et al.</i> , 2013). .....	19
<b>Figura 9.</b> Contenido de las soluciones stock para el medio MS .....	24
<b>Figura 10.</b> Germinación de las semillas de <i>S. bicolor</i> .....	25
<b>Figura 11.</b> Colección de exudados radiculares de plantas de <i>S. bicolor</i> inoculadas con <i>A.agilis</i> UMCV2. ....	28
<b>Figura 12.</b> Cromatógrafo de gases empleado en este trabajo.....	30
<b>Figura 13.</b> Rampa utilizada para el análisis de exudados radiculares por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	31
<b>Figura 14.</b> Sistema <i>in vitro</i> para exponer plantas de <i>S. bicolor</i> a los VOCs bacterianos.....	36
<b>Figura 15.</b> Gráfica del efecto de los VOCs de las rizobacterias <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, <i>Bacillus cereus</i> L2-64, <i>Bacillus subtilis</i> M4-96 y <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021. En A)-peso fresco de los brotes, y en B)-peso fresco de la raíz de plantas de <i>Sorghum bicolor</i> .....	37
<b>Figura 16.</b> Grafica del efecto de los VOCs de las rizobacterias <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, <i>Bacillus cereus</i> L2-64, <i>Bacillus</i>	

<i>subtilis</i> M4-96 y <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021. En A)-la longitud aérea, y en B)-la longitud de la raíz de plantas de <i>Sorghum bicolor</i> .....	38
<b>Figura 17.</b> Gráfica del efecto de los VOCs de las rizobacterias <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, <i>Bacillus cereus</i> L2-64, <i>Bacillus subtilis</i> M4-96 y <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021. En A)-número de raíces laterales, y en B)-concentración de clorofila de plantas de <i>Sorghum bicolor</i> .....	39
<b>Figura 18.</b> Esquema del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los compuestos exudados por plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de las rizobacterias <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021 .....	45
<b>Figura 19.</b> Dendograma de los compuestos exudados por plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de las rizobacterias <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021.....	46
<b>Figura 20.</b> Figura representativa del RNA extraído de las raíces de plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de diferentes rizobacterias. 1 (tratamiento control), 2 (tratamiento UMCV2), 3 (tratamiento L2-64), 4 (tratamiento M4-96), 5 (tratamiento PAO1) y 6 (tratamiento 1021).....	47
<b>Figura 21.</b> Curva de amplificación para el gen <i>SbACTINA</i> .....	47
<b>Figura 22.</b> Curva de amplificación del gen <i>SbFRO1</i> .....	48
<b>Figura 23.</b> Expresión relativa mediante del gen <i>SbFRO1</i> en plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas durante 48 horas a los VOCs de las <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021, mediante la técnica qPCR.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diversidad de exudados radiculares secretados por las plantas. (Modificado de Vadry y Vivanco 2009).....	10
<b>Tabla 2.</b> Compuestos identificados como exudados radiculares de plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de las rizobacterias <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021. Las cantidades mostradas de los compuestos exudados son expresadas en $\mu\text{g/planta}$ . .....	41
<b>Tabla 3.</b> Exudados radiculares de plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de las rizobacterias <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021. Las cantidades mostradas en la Tabla indican el total de exudados encontrados y el número de compuestos que son específicos en cada uno de los tratamientos.....	43
<b>Tabla 4.</b> Compuestos mayoritarios y específicos en los exudados radiculares de plantas de <i>S. bicolor</i> expuestas a los VOCs de las rizobacterias <i>A. agilis</i> UMCV2, <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>B. cereus</i> L2-64, <i>B. subtilis</i> M4-96 y <i>S. meliloti</i> 1021. ....	44

## RESUMEN

En el presente estudio se determinó los efectos de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diversas rizobacterias, incluidas *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus cereus* L2-64, *Bacillus subtilis* M4-96 y *Sinorhizobium meliloti* 1021, sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *Sorghum bicolor*. Así mismo, se analizó si dichas rizobacterias modulan la expresión del gen *SbFRO1* de *S. bicolor*. Los resultados muestran que plantas de *S. bicolor* responden diferencialmente a la presencia de las bacterias analizadas en este trabajo, donde la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 y *P. aeruginosa* PAO1 produjeron un efecto promotor del crecimiento vegetal. En el caso de los exudados producidos por *S. bicolor* también fueron distintos cuando las plantas fueron estimuladas con los volátiles producidos por diferentes rizobacterias. Finalmente, las plantas de sorgo al ser expuestas a los VOCs emitidos por las bacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021, se observó que la expresión de *SbFRO1* es significativamente mayor a diferencia del control. En el caso de las plantas expuestas a los volátiles de *B. cereus* L2-64, se observó que la expresión del gen es reprimida. Lo anterior sugiere que la gramínea puede percibir diferencialmente la presencia de bacterias con diversas funciones ecológicas, así como modificar su crecimiento y la expresión de genes como *SbFRO1*, posiblemente modulando la adquisición de hierro.

## **ABSTRACT**

In the present study the effects of volatile organic compounds (VOCs) produced by various rhizobacteria, including *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, L2-64 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Sinorhizobium meliloti* 1021 M4-96 on growth was determined and development of plants *Sorghum bicolor*. He also analyzed whether such rizobacterias modulate gene expression *SbFRO1* *S. bicolor*. The results show that *S. bicolor* plants respond differently to the presence of the bacteria analyzed in this paper, where rizobacteria *A. agilis* UMCV2 *P. aeruginosa* PAO1 and produced a plant growth promoting effect. For exudates produced by *S. bicolor* they were also different when plants were stimulated with different volatiles produced by rhizobacteria. Finally, the sorghum plants when exposed to VOCs emitted by *A. agilis* UMCV2 bacteria, *P. aeruginosa* PAO1, *B. subtilis* and *S. meliloti* 1021 M4-96, we observed that expression is significantly higher *SbFRO1* unlike control. In the case of plants exposed to volatile L2-64 *B. cereus* it was observed that gene expression is repressed. This suggests that the grass can differentially sense the presence of bacteria with diverse ecological functions as well as modify their growth and gene expression as *SbFRO1* possibly modulating the iron acquisition.

## **PALABRAS CLAVE:**

*Sorghum bicolor*, rizobacterias, exudados radiculares, VOCs, *SbFRO1*

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos que se distribuyen en una gran diversidad de ambientes. Los ambientes naturales de las bacterias son extremadamente diversos, cualquier ambiente que sea adecuado para organismos pluricelulares, también lo es para el crecimiento de bacterias.

El crecimiento microbiano más importante tiene lugar en la superficie de las partículas del suelo (Madigan *et al.*, 2004). En el suelo se forman relaciones complejas entre las diferentes poblaciones bacterianas, otros microorganismos y las raíces de las plantas, originando auténticos ecosistemas. La rizosfera es definida como el volumen del suelo influenciado por las raíces de la planta, en el cual importantes e intensivas interacciones son llevadas a cabo entre el mismo suelo, los microorganismos y las raíces (Ngoma *et al.*, 2012).

Las funciones de los microorganismos rizosféricos entre los que destacan hongos y bacterias tienen un alto impacto sobre el crecimiento vegetal. Las especies vegetales que crecen en ambientes con bajos nutrientes, producen exudados radiculares que son empleados como señales químicas para reclutar microorganismos simbióticos involucrados en la nutrición vegetal (Ngoma, *et al.*, 2012). Los exudados radiculares también pueden modularse para antagonizar microorganismos con efecto patógeno sobre las plantas (Berendsen *et al.*, 2012).

Entre los ejemplos más estudiados está la asociación entre plantas leguminosas (Fabaceae) y bacterias del orden Rhizobiales. En la rizósfera, las raíces de las leguminosas exudan compuestos flavonoides que inducen los genes *nod* de las *Rhizobia*, lo que conduce a la síntesis de los factores Nod (lipoquitos-oligosaccharidos), que a su vez comunican la presencia del micro simbionte a la planta, lo que produce el inicio del proceso de asociación planta-bacteria que desemboca en la llamada nodulación (Gage 2004; Bensmihen *et al.*, 2011). En este proceso las bacterias se albergan en estructuras especializadas llamadas nódulos formadas a partir de las células corticales de las raíces de las plantas, donde se diferencian en bacteroides y llevan a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (Jones *et al.*, 2007).

No obstante que este es un sistema que ha sido estudiado por décadas, nuevos niveles de comunicación *Rhizobia-leguminosa* están siendo descritos, así por ejemplo se ha reportado la existencia de un sistema de comunicación planta bacteria con base en compuestos orgánicos volátiles (VOCs) (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013a).

Otros sistemas de interacción planta-microorganismo han sido mucho menos estudiados. Tal es el caso de las plantas gramíneas (Poaceae) y su flora bacteriana. Recientemente se ha mostrado que la planta de sorgo (*Sorghum bicolor*) es capaz de percibir los VOCs producidos por la rizobacteria *Arthobacter agilis* UMCV2 lo cual conduce a un incremento en el crecimiento de la planta y a una sobreexpresión del gene que codifica para la proteína FRO, involucrada en la reducción de iones férricos (Cástulo-Rubio *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, se utiliza a la planta de *S. bicolor* como modelo de planta gramínea y se estudia la capacidad de la planta para detectar de forma específica los VOCs producidos por diversas rizobacterias, no solo de aquellas que tienen un efecto benéfico, sino también de aquellas que son potencialmente patógenas o que presumiblemente no establecen relaciones con las plantas. Con este trabajo se busca ampliar el conocimiento de las relaciones planta-microorganismo utilizando plantas de importancia económica mayúscula como son las gramíneas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 La rizósfera

La distribución de los microorganismos en el suelo no es homogénea, se concentra en ambientes como la rizósfera que es el volumen del suelo que es influenciado por la raíz de una planta. Esta influencia es ejercida a través de los exudados radiculares, y se extiende entre 1 y 3 mm de la superficie de la raíz hacia el suelo (Mengel y Kirkby, 2001), aunque puede variar dependiendo de la especie vegetal que se trate.

La rizósfera puede dividirse en tres regiones: 1) endorrizósfera, que corresponde a la parte donde se encuentran los tejidos corticales de la raíz; 2) ectorrizósfera, que es la región externa que incluye al suelo que se encuentra en contacto con la raíz; 3) rizoplano que es la interface entre el suelo y la raíz (Cambel y Graves, 1990).

Los microorganismos rizosféricos, principalmente hongos y bacterias a la vez que son altamente influenciados por la raíz de la planta, tienen un alto impacto sobre el crecimiento vegetal. Las especies vegetales que crecen en ambientes con bajos nutrientes, emplean sus exudados radiculares como señales para asociarse y seleccionar en algunos casos con microorganismos simbióticos, involucrados en la nutrición vegetal (Ngoma *et al.*, 2012). De esta manera, las plantas pueden beneficiarse de las capacidades de adquisición de nutrientes por parte de microorganismos benéficos rizosféricos. Sin embargo, las comunidades microbianas se relacionan con las plantas de varios modos y tales interacciones pueden ser no solamente benéficas, si no también perjudiciales o neutras (comensales), según su efecto en el desarrollo vegetal (Cambel y Graves, 1990).

El término rizobacteria ha sido aceptado para describir bacterias de la rizósfera las cuales exhiben colonización de la raíz (Schroth and Hancock, 1982). La Figura 1 muestra un esquema general de la rizósfera.

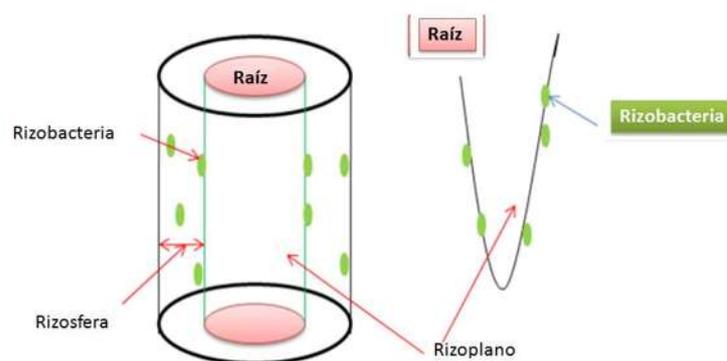


Figura 1. Representación esquemática de la rizósfera.

## 2.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias rizosféricas que presentan capacidades para promover el crecimiento vegetal se han denominado PGPR. El término PGPR (por sus siglas en el idioma inglés, **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**) fue descrito por primera vez por Kloepper y Schroth en 1978 y se utilizó para definir y separar aquellas bacterias habitantes de la rizósfera que promovieran un efecto benéfico en el desarrollo de las plantas, a través de diversos mecanismos. A continuación se describen algunos de ellos.

Las PGPR pueden promover el crecimiento por diversas vías, de forma directa: 1) La biofertilización es un mecanismo directo mediante el cual las PGPR estimulan la capacidad de captación de nutrientes presentes en la atmósfera o el suelo. Este mecanismo se da mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fósforo por medio de fosfatasas, o quelación de hierro por medio de sideróforos emitidos por las rizobacterias solubilizando nutrientes en la rizósfera, los cuales de otro modo serían inaccesibles. (Ortiz-Castro *et al.*, 2013; Hassan, 2013).

2) Debido al contacto íntimo planta- bacteria, las bacterias pueden brindar beneficios a su hospedero, excretando fitohormonas o compuestos con similitud estructural que mimetizan la acción de las hormonas en el interior de las plantas a través de bacterias endófitas o en su superficie (Ortiz-Castro *et al.*, 2013; Sukumar *et al.*, 2013). Algunas fitohormonas incluyen el ácido indolacético, auxinas, giberelinas, octadecanoides, etileno, citocininas o

compuestos como el jazmonato; así mismo controlan la síntesis de hormonas como es el caso de algunas rizobacterias que controlan la biosíntesis y etileno vía actividad de ACC deaminasa (Gutiérrez-Luna 2010, Kai y Pechua, 2009).

3) Las bacterias también pueden proteger a las plantas contra algunos patógenos y así promover su crecimiento (Santoyo *et al.*, 2012). El biocontrol es un mecanismo indirecto mediante el cual las PGPR inducen resistencia sistémica en la planta o también, emiten compuestos con actividad antimicrobiana, como pueden ser metabolitos anti-fúngicos como las fenazinas, pioluteorinas, lipopéptidos cíclicos o exoenzimas los cuales contribuyen al control en el crecimiento de microorganismos patógenos para la planta y de esta forma se ejecuta un beneficio sobre la planta de manera indirecta (Ping y Boland, 2004, Whipps, 2001).

Las bacterias PGPR se encuentran como parte de los microorganismos presentes en la rizósfera estableciendo una relación simbiótica con la planta. Se han encontrado bacterias tanto Gram negativas así como Gram positivas, siendo los géneros más abundantes *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*. Se ha reportado que *Bacillus magaterium* UMCV1 posee la capacidad de modular la arquitectura de la raíz, acortando la raíz primaria y ocasionando un aumento en la longitud de la raíz y el número de raíces laterales vía citocininas (López- Bucio *et al.*, 2007; Ortiz-Castro *et al.*, 2008).

*Azospirillum* spp. es un género de bacterias fijadoras de nitrógeno, que produce auxinas, citocininas y giberelinas que estimulan el desarrollo de la raíz de la planta y de esta manera plantas de importancia agrícola pueden incrementar su producción de manera considerable (Ping y Boland, 2004).

*Pseudomonas* es un género ubicuo que habita comúnmente el suelo rizosférico, capaz de liberar al medio compuestos con una elevada actividad antimicrobiana. Produce un arsenal de metabolitos, tales como los antibióticos (fenazinas y floroglucinoles) y cianuros (HCN) que reprimen y/o eliminan a

microorganismos potencialmente patógenos para las plantas (Ping y Boland 2004).

La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 fue aislada de la rizósfera de maíz, ha demostrado incrementar la adquisición de Fe (III) a Fe (II) cuando es inoculada en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris*. Es capaz de estimular el crecimiento de plantas de *A. thaliana*, *M sativa* y *Medicago truncatula* en condiciones *in vitro*, además de inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos (Valencia Cantero *et al.*, 2007, Velázquez-Becerra *et al.*, 2011; Velázquez-Becerra 2013; Orozco- Mosqueda *et al.*, 2013b).

Algunos autores han propuesto que las PGPR podrían ser 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 la aplicación de los fertilizantes. Siendo así una alternativa para mantener una adecuada nutrición en las plantas y reducir efectos ambientales negativos provocados por fertilizantes, ya que cada año se pueden llegar a perder miles de hectáreas a causa del desgaste de los suelos como consecuencia del uso excesivo de fertilizantes (Bashan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009).

### **2.3 Exudados radiculares**

Las plantas a través de sus raíces secretan compuestos de alto y bajo peso molecular llamados exudados radiculares, estos compuestos pueden actuar como moléculas señal para atracción microbiana o ser usados como fuente de carbono para nutrición microbiana (Ngoma *et al.*, 2012).

Los compuestos carbonados presentes en los exudado radiculares de bajo peso molecular incluyen azúcares, ácidos orgánicos, y aminoácidos. La raíz es capaz de sintetizar, acumular y liberar continuamente distintos compuestos o exudados de naturaleza química diversa a la rizósfera. Algunos autores consideraban que la zona más próxima a la punta de la raíz era el mayor punto de exudación, sin embargo se ha encontrado que otras partes de la raíz también pueden exudar compuestos orgánicos; por ejemplo asparagina y

treonina desde el meristemo y la zona de elongación; ácido glutámico, valina, leucina y fenilalanina desde la zona de los pelos radiculares; y ácido aspártico desde la raíz entera (Badri y Vivanco, 2009).

Los exudados radiculares intervienen en interacciones tanto positivas como negativas. Las interacciones positivas incluyen asociaciones simbióticas con microorganismos benéficos, tales como micorrizas, rizobias y otras rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Badri y Vivanco, 2009).

Existen algunas bacterias que pueden detectar determinando compuesto para asociarse con la planta; por ejemplo, la secreción de ácido málico puede atraer a la bacteria benéfica del suelo *Bacillus subtilis* hacia la raíz de la planta y esta interacción juega un papel relevante en la protección de las plantas contra el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* (Antoun y Prevost, 2006). Como resultado de esta acción la liberación de compuestos carbonados de plantas en la rizósfera resulta en un incremento en la biomasa y actividad microbiana (Ngoma *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que la diversidad y actividad de los microorganismos en la rizósfera de especies vegetales podría estar relacionada con la variación de exudados y que los cambios temporales y espaciales de fuentes de carbono que se presenta a lo largo del sistema radicular influyendo en la composición y estructura de la comunidad rizosférica bacteriana. Por su parte los microorganismos también influyen sobre las especies vegetales a las que colonizan estableciendo con ellas relaciones simbióticas, mutualistas o bien de competencia por espacios.

Clase de compuesto	Molécula
Carbohidratos	Arabinosa, glucosa, galactosa, fructosa, sucrosa, pentosa, ramnosa, rafinosa, ribosa, xilosa y manitol.
Aminoácidos	Los 20 convencionales junto con hidroxiprolina, homoserina, ácido mugineico, ácido aminobutírico
Ácidos orgánicos	Ácido acético, ácido succínico, ácido aspartico, ácido malico, ácido glutámico, ácido salicílico, ácido shiquímico. Ácido isocitríco, ácido sinápico, ácido cafeíco, ácido hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido tartarico y ácido ferulico, ácido cumárico, ácido mugineico, ácido oxálico, ácido cítrico
Flavonoides	Naringenina, kaempferol, quercitina, miricetina, naringina, rutina, genisteína, strigolactona
Ligninas	Catecol, ácido benzoico, ácido níctico, floroglucinol, ácido cinámico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido siringico.
Coumarinas	Umbeliferona
Auronas	Benzil auronas, sinapatos, sinapoil colina
Glucosinolatos	Ciclobrasinona, desufogonapina, desulfoprogoitrina, desulfonapoleiferina, desulfoglucoalina
Antocianinas	Cianidina, delphinidina, pelargonidina
Indoles	Ácido indol-3-acético, brasitina, sinalexina, brasilexina, metil indol carboxilato, camalexina glucósido.
Ácidos grasos	Ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico.
Esteroles	Campesterol, sitosterol, stigmasterol.
Alomonas	Jugulona, sorgoleona, 5,7,4'-trihidroxi-3', 5'-dimetoxiflavona
Proteínas y enzimas	Proteínas PR, lectinas, proteasas, fosfatasa ácida, peroxidasas, hidrolasas y lipasa.

Tabla 1. Diversidad de exudados radiculares secretados por las plantas. (Modificado de Vadry y Vivanco 2009).

## 2.4 Compuestos Orgánicos volátiles (VOCs)

Los compuestos orgánicos volátiles o VOCs, (por sus siglas en inglés, **Volatile Organic Compounds**), son compuestos orgánicos que contienen carbono. Poseen una alta presión de vapor 0.01 kPa. o más de 293.15 °K (20°C) en condiciones normales para evaporarse e integrarse a la atmosfera, es decir por su alta presión de vapor se encuentran en estado gaseoso, poseen un peso molecular usualmente inferior a 300 g/mol (Dudavera y Negre, 2005). Estas moléculas son químicamente muy diversas, entre sus formas más representativas podemos encontrar derivados de ácidos grasos, terpenos, alcoholes y moléculas de otras familias químicas.

Los compuestos orgánicos volátiles son producidos por animales, humanos, hongos, plantas y bacterias (Schulz y Dickschat, 2007). Las bacterias pueden producir una amplia variedad de compuestos volátiles. Estos pueden ser liberados por distintos factores como: ruptura celular, para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, como atrayentes, repelentes humanos para inducir resistencia vegetal contra especies bacterianas patógenas o para promover el crecimiento vegetal. Las moléculas señal liberadas durante la interacción planta-bacteria sugieren que existe comunicación entre ambos durante varios estados del desarrollo vegetal y es justamente este diálogo el que determina el curso final de la relación, ya sea de patogenicidad o simbiosis (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

Las actividades o funciones importantes de los compuestos orgánicos volátiles de la planta son la defensa. De manera general los compuestos volátiles de las plantas se clasifican en terpenoides, compuestos con anillos aromáticos, derivados de ácidos 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 (Baldwin, 2010). En la última década se ha demostrado que las plantas y los microorganismos pueden comunicarse entre sí mediante la emisión de VOCs. Las plantas producen una gran cantidad de compuestos orgánicos volátiles que

tienen la función de atraer polinizadores, dispersores de semillas o enemigos naturales de herbívoros (Maldonado Cortés, 2013).

Respecto a los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bacterianos y su interacción con las plantas, Ryu y colaboradores en el 2003, mostraron que los VOCs bacterianos son capaces de promover el desarrollo vegetal en plantas de la especie *Arabidopsis thaliana*. Los autores mostraron que al exponer plantas de *Arabidopsis thaliana* a los VOCs de 6 diferentes cepas bacterianas, dos tratamientos resultaron tener un efecto promotor mediado por VOCs, mostrado incremento de hasta dos veces mayor el área foliar respecto al control, estas rizobacterias fueron *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a y *Bacillus subtilis* GB03 (Figura 2).

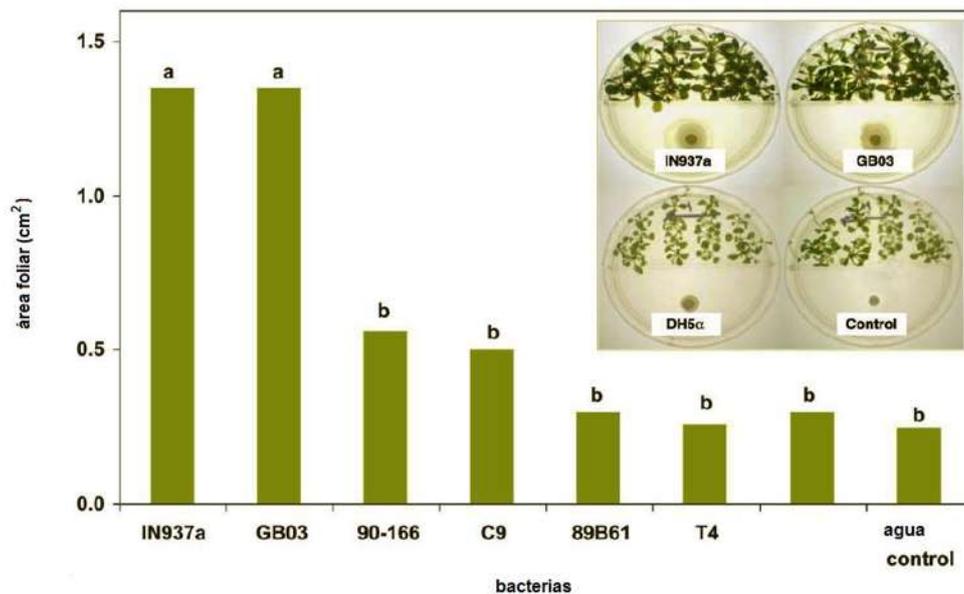


Figura 2. Efecto de las bacterias PGPR *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a en el desarrollo del área foliar en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bacterianos (Ryu *et al.*, 2003).

En este trabajose le atribuye el efecto promotoren las plantas a los compuestos 3- hidroxy-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol. Este reporte es primer trabajo en el cual se pone de manifiesto que las bacterias pueden afectar el desarrollo de las plantas a través de compuestos orgánicos volátiles.

Posteriormente Zhang y colaboradores en el 2007 examinaron los niveles de expresión de diversos genes en plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a los VOCs de la bacteria *B. subtilis* GB03. Encontraron un grupo de aproximadamente 600 genes expresados diferencialmente, muchos de ellos relacionados con modificaciones en la pared celular, metabolismo primario y secundario y la homeostasis de auxinas, mostrando así que los VOCs bacterianos influyen directamente en las rutas metabólicas involucradas en la morfogénesis de las plantas.

Velázquez-Becerra y colaboradores en 2011 mostraron que la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 produce dimetilhexadecilamina, un compuesto volátil estructuralmente relacionado a las acil-homoserinalactonas (AHLs), y este compuesto es capaz de promover el desarrollo de la planta *M. sativa*, sin que hasta este momento se conozca cómo actúa en la planta para promover su crecimiento, pero demostrando que la planta puede responder fisiológicamente a la presencia de la bacteria.

## **2.5 Las plantas gramíneas**

Las gramíneas son una familia de plantas herbáceas o muy raramente leñosas pertenecen al orden Poales de las monocotiledoneas con más de 820 géneros y cerca de 12,100 especies descritas, las gramíneas son la cuarta familia con mayor riqueza de especies luego de las compuestas, las orquídeas y las leguminosas. Sin embargo las gramíneas son las plantas con una gran importancia económica, la dieta humana se basa principalmente en gramíneas tanto en forma directa en granos de cereales, sus derivados como harinas y aceites o de forma indirecta a través de los productos producidos por ganado y aves de corral que se alimentan de pastos o granos. Entre las especies más destacadas tenemos la caña de azúcar, trigo, arroz, maíz, sorgo, cebada, avena y centeno.

Además de su utilización como alimento y forraje, las gramíneas son utilizadas por el hombre en la elaboración de productos médicos, artesanales y en la industria. Algunos representantes de esta familia son elementos importantes de la conservación y regeneración de suelos, desempeñan un papel ecológico

fundamental con respecto a la vida de la fauna silvestre (Dávila y Sánchez-Ken 1996 en Alejandre-Ramírez, 2013 y Langer, 1984).

El valor nutritivo de los forrajes está determinado por la presencia de altos porcentajes de sustancias nutritivas como proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos, que son necesarios para salud, crecimiento y salud de los animales así como también por las adaptaciones biológicas que permiten su fácil y rápida reproducción vegetativa. En general las gramíneas presentan una mayor cantidad de carbohidratos, mientras que las leguminosas presentan más contenido de proteínas (Dávila y Sánchez-Ken, 1996 en Alejandre-Ramírez, 2013 y Kent, 1983).

## 2.6 El cultivo del sorgo

El sorgo tiene el nombre científico *Sorghum bicolor*, es una planta anual cuya distribución se encuentra desde Canadá hasta Sudamérica, incluyendo las Antillas y el Viejo Mundo, (Dávila *et al.*, 2006). En la Figura 3 se muestra una fotografía del fenotipo de la planta. Tiene hábito y fisiología vegetal (metabolismo de las plantas C<sub>4</sub>) similares a los del maíz (*Zea mays*).



Figura 3. *S. bicolor* PIONEER 82W21.

Presenta un sistema radical profuso que le brinda una estructura de soporte muy desarrollada, esto le permite acumular gran cantidad de reservas; además le confiere una mayor capacidad de penetración y mejor persistencia en climas secos, donde la escasez de agua se mantiene por períodos prolongados. Su tallo es grueso, con espinas que nacen por pares, y la altura puede oscilar de 1 a 3 m. Los nudos presentan abundantes pilosidades. Las hojas son alternas,

aserradas, lanceoladas, anchas y ásperas en su margen; estas tienen la propiedad de quitinización durante los períodos secos, lo que retarda el proceso de desecación (González, 1961 y Duke, 1983). La clasificación taxonómica del sorgo se muestra en la Figura 4.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poacea
Género	Sorghum
Especie	<i>S. bicolor</i>

Figura 4. Clasificación taxonomía de *S. bicolor*

El cultivo del sorgo representa una producción mundial de 53.8 millones de toneladas (Gallardo, 2007); es el quinto cereal de mayor importancia en mundo, seguido del trigo, el arroz, el maíz y la avena. Los principales lugares de producción de sorgo se encuentran en las regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Hidalgo, 1997; Doggett, 1998); los países con mayor producción son Estados Unidos, India, Nigeria México y China, quienes participan con el 69% de la producción. México aporta alrededor del 14% de las cosechas mundiales de este grano. (Gallardo, 2007, Calvo *et al.*, 2005).

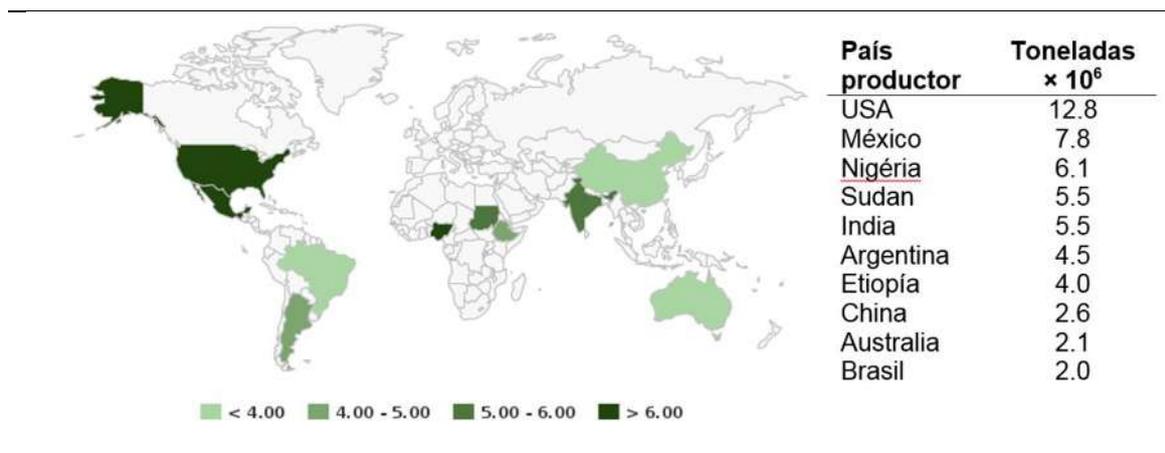


Figura 5. Principales países productores de sorgo 2014-2015. (Sagarpa, [www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/mapasTablero/principalesProductoresSorgo.php](http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/mapasTablero/principalesProductoresSorgo.php)) Consultado el 12 de Agosto de 2015.

Este cultivo ofrece perspectivas favorables en relación con otros granos debido a que necesita menos requerimientos agro-técnicos en general y presenta una mayor plasticidad respecto a la época de siembra y tipo de suelo. El color del grano varía desde un blanco traslúcido hasta un pardo rojizo muy oscuro, con tonos rosado, rojo, amarillo, pardo y colores intermedios; sus semillas son esféricas y oblongas, de aproximadamente 3 mm de tamaño. Las flores tienen estambres y pistilos, pero se han encontrado en Sudán sorgos dioicos. (Pérez *et al*, 2010). Es una planta que puede crecer desde 0 a los 1 500 msnm, pero la mejor altura para su cultivo está entre 0 y 800 m.

En lo referente al cultivo del sorgo en México, este ocupa el segundo lugar en importancia después del maíz en cuanto a la superficie cosechada y la producción obtenida de los principales granos básicos, ya que es el principal ingrediente en la formulación de alimentos balanceados en el sector pecuario. Tamaulipas es el principal productor nacional, al concentrar el 40.3% del volumen (SIAP-SAGARPA, 2012). Otras entidades con una producción importante de sorgo son: Guanajuato (21.5%), Michoacán (10.2%), Sinaloa (6.5%), Nayarit (5.3%) y Jalisco (2.7%). El 53% de la superficie se cultiva en el ciclo Primavera-Verano y el 47% restante en el Otoño-Invierno. (SIAP-

SAGARPA, 2012). En la Figura 6 se resumen en un gráfico los porcentajes de producción de Sorgo en México por Estado.



Figura 6. Producción de Sorgo en México. Fuente: SIAP-SAGARPA 2012.

## 2.7 El gen *SbFRO1* implicado en los mecanismos de absorción de Fe

El Fe es el elemento más abundante del planeta y ocupa el cuarto lugar como constituyente de las rocas de la corteza terrestre (Schmidt, 1999). El contenido de promedio de hierro en los suelos varía entre 2 % y 6% no obstante, la proporción de hierro soluble es extremadamente baja, debido a la cual la deficiencia de hierro es la más extendida de las deficiencias minerales de las plantas por micronutrientes. El hierro participa, y es parte fundamental, de diversas fases durante la biosíntesis de clorofila y el mantenimiento del sistema captador de energía luminosa. Por lo tanto, la escasez de hierro produce clorosis y como consecuencia, la disminución de la capacidad fotosintética, siendo uno los síntomas más evidentes de la deficiencia de hierro en las plantas (Ishimaru *et al.*, 2006).

Al ser el hierro un elemento poco disponible para las plantas estas han desarrollado dos estrategias para la toma y adquisición de dicho elemento. La estrategia I, usada por todas las plantas superiores excepto las gramíneas, en la cual la adquisición de hierro ocurre en tres reacciones principales: 1) excreción de protones a través de la membrana plasmática por medio de una

ATPasa para acidificar la rizósfera y dirigir más hierro en solución. La ATPasa ha sido identificada en plantas de *Cucumis sativus*(CsHA1) y en *Arabidopsis thaliana* entre otras plantas (Colangeo y Guerinot, 2004). 2) reducción de Fe(III) por una férrico quelato reductasa (FRO) a su forma más soluble de Fe(II); 3) el transporte de Fe(II) al interior de las células de la raíz, a través de la membrana plasmática mediante los transportadores IRT (Schmit,2003).

La estrategia II incluye a las gramíneas cuyas raíces secretan compuestos conocidos como fitosideróforos (PS) que son ligandos de bajo peso molecular específicos para el Fe(III) en respuesta a la deficiencia de hierro. Son aminoácidos no proteínicos sintetizados a partir de la metionina vía nicotianamina (NA) para dar ácidos mugineicos, que quelan o ligan eficientemente el Fe (III) mediante los grupos amino y carboxilo (Higuchi *et al.*, 1999). Una vez formado el complejo  $Fe^{3+}$ - PS, Se piensa que el complejo Fe(III)-ácido mugineico se internaliza por un sistema específico de transporte (transportador YS1). Una estrategia similar de ligación es usada por una amplia variedad de bacterias y hongos (Helly Stephan, 2003, Römheld y Marschner, 1986).

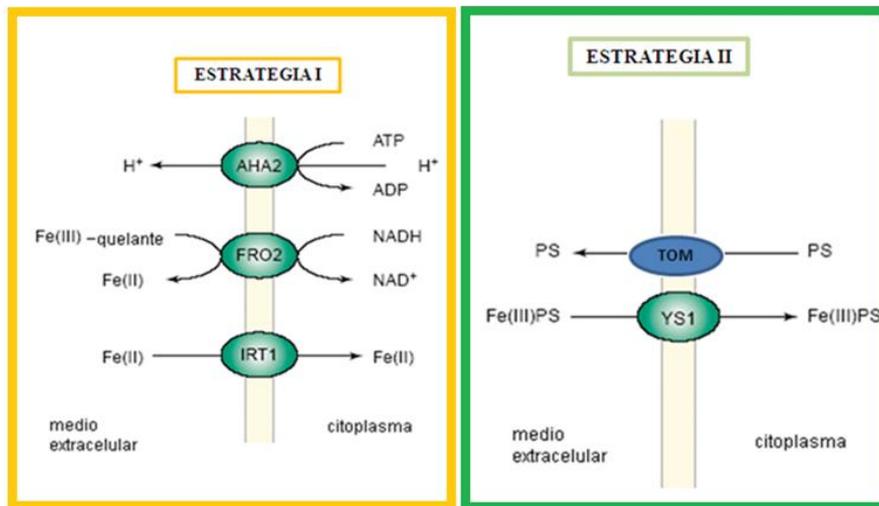


Figura 7. Representación de las dos estrategias de adquisición de hierro empleadas por las plantas.

En las plantas estrega I, la enzima férrico quelato reductasa (FRO) es requerida por la mayoría de las plantas para la adquisición del hierro soluble.

Las proteínas férrico quelato reductasa pertenecen a una superfamilia de flavocitocromos que transportan electrones a través de la membrana (Robinson *et al.*, 1999). Waters y colaboradores en el 2002 describieron el gen *FRO1* en plantas de chícharo (*Pisum sativum*) el cual codifica para una férrico quelato reductasa de 712 aminoácidos con dominios FAD, NADH y oxido reductasa. Determinaron los sitios de expresión de *FRO1* en raíces, hojas y nódulos. Los niveles de ARNm de *FRO1* en plantas crecidas en deficiencia de hierro se detectaron a lo largo de la raíz, en células del mesófilo de las hojas así como en los nódulos, particularmente se detectó en la zona de la infección y de la región de fijación de nitrógeno. Estos resultados indican que *FRO1* actúa en la raíz para la absorción de hierro y sugieren un papel en la distribución de Fe en toda la planta. La caracterización de *FRO1* también ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la regulación de la absorción de Fe.

A pesar de que las gramíneas son plantas a las cuales se les ha identificado como estrategias II, Mikami y colaboradores en el 2001 identificaron y demostraron la expresión de genes *FRO* (de la estrategia I) en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) y sorgo (*S. bicolor*). Mediante amplificación de PCR identificaron dos fragmentos con elevada identidad a genes *MtFRO* en las bases de datos del genoma de cebada, los cuales fueron designados como *HvFRO1* y *HvFRO2*. Los investigadores observaron que la cebada (*H. vulgare*) puede transportar Fe de manera más eficiente que el sorgo a sus tilacoides en condiciones de deficiencia en Fe.

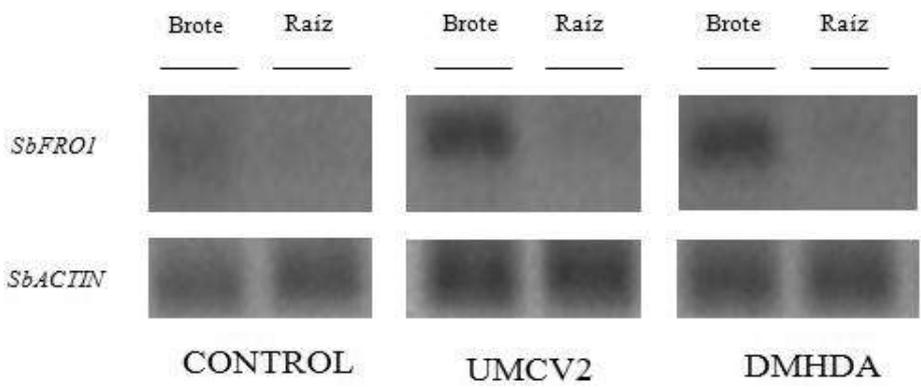


Figura 8. Expresión de *SbFRO1* en plantas de *S. bicolor* inducido por la cepa UMCV2 y DMHDA (Alejandre-Ramírez *et al.*, 2013).

Alejandro-Ramírez en el 2013, realizó un análisis *in silico* de las posibles secuencias de genes homólogos a *FRO* que codifican para la enzima férrico quelato reductasa en el genoma de *S. bicolor*. Como resultado se obtuvo una secuencia similar a la de los genes *FRO* de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* y *Oriza sativa*. Amplificando el transcrito del gen putativo *SbFRO1* en la parte aérea de las plantas de *S. bicolor*. El trabajo anterior demostró que dicho gen responde a la presencia de del compuesto volátil DMHDA, producido por la cepa UMCV2. Sin embargo, no se analizaron otros compuestos volátiles producidos por diversas rizobacterias.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En las interacciones planta-rizobacteria los efectos sobre la planta oscilan de benéficos a perjudiciales. Se conoce que las plantas pueden detectar metabolitos bacterianos y responder de forma diferencial a estos metabolitos, sin embargo se desconoce el papel de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en la diferenciación que las plantas realizan entre bacterias benéficas y patógenas.

## **4. HIPÓTESIS**

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diversas rizobacterias benéficas, perjudiciales y neutras, son detectados diferencialmente por plantas de *S. bicolor*.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar los efectos diferenciales de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diversas rizobacterias en plantas de *S. bicolor*.

### **Objetivos particulares**

1. Caracterizar el efecto de los VOCs de diversas rizobacterias benéficas, perjudiciales y neutras sobre el crecimiento de *S. bicolor*.
2. Determinar la respuesta diferencial de *S. bicolor* a los VOCs de las rizobacterias benéficas, perjudiciales y neutras sobre los exudados radiculares.
3. Determinar el efecto de los VOCs de rizobacterias sobre el gen *SbFRO1*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Material biológico**

#### **6.1.1 Semillas**

Se utilizaron las semillas de la planta de sorgo (*S. bicolor*) PIONEER<sub>MR</sub> 82W21.

#### **6.1.2 Bacterias**

Se utilizaron las bacterias PGPRs *Arthrobacter agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), *Bacillus subtilis* M4-96 (Pérez-Flores, 2013) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013a). La bacteria fitopatogena *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Ortíz-Castro *et al.*, 2011) y la rizobacteria comensal *Bacillus cereus* L2-64 (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010).

### **6.2 Medios de cultivo**

#### **6.2.1 Agar nutritivo (AN)**

El agar nutritivo de la marca BIOXON es un medio sólido enriquecido que se preparó disolviendo 23 gr/L en agua purificada, se esterilizó a 15 psi durante 15 minutos en olla de presión. Este medio fue utilizado para el crecimiento de las bacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2 a 25°C, mientras que *Bacillus cereus* L2-64 y *Bacillus subtilis* M4-96 se incubaron a 30°C.

#### **6.2.2 Medio Luria-Bertani (LB)**

El medio de cultivo Luria-Bertani (LB) es un medio sólido enriquecido que fue preparado de la siguiente forma: 10 gr/L de NaCl, 10 gr/L de peptona de caseína, 5 gr/L de extracto de levadura, 18 gr/L de agar bacteriológico en agua desionizada y se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión. Este medio fue utilizado para el crecimiento de la bacteria *P. aeruginosa* PAO1 a 30°C.

#### **6.2.3 Medio de cultivo (PY)**

Es un medio selectivo sólido que se utilizó para crecer a la bacteria *Sinorhizobium meliloti* 1021 a 30°C. Se preparó con 3 gr/L de extracto de levadura, peptona de caseína 5 gr/L, 15 gr/L de agar bacteriológico y CaCl<sub>2</sub> a 7

mM en agua desionizada y se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión.

#### 6.2.4 Murashige-Skoog(MS)

El medio MS es un medio para crecimiento vegetal *in vitro*. Se preparó a partir de las soluciones Stock mostradas en la Figura 8, a una concentración de 0.2X con 6 gr/L de agar Plant TC de Phyto Technology (N° de producto A111) para micropropagación y se aforó con agua desionizada. Se ajustó el pH a 6.5 con una solución NaOH 2M. Una vez preparado el medio se esterilizó a 15 psi durante 20 minutos en olla de presión.

Stock 1 (50 mL)	Stock 2 (250 mL)	Stock 3 (100 mL)	Stock 4 (100mL)	Stock 5 (250 mL)	Stock 6 (250 mL)
CaCl <sub>2</sub> (25 gr)	MgSO <sub>4</sub> (9.25 gr)	FeSO <sub>4</sub> (0.5 gr)	MnSO <sub>4</sub> (1.69 gr)	Glicina (0.5 gr)	NH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> (41.25 gr)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (4.25 gr)	NaEDTA (0.7 gr)	ZnSO <sub>4</sub> (1.05 gr)	Piridoxina (0.0125 gr)	KNO <sub>2</sub> ( 47.5gr)
			H <sub>2</sub> BO <sub>2</sub> (0.62 gr)	Ac.Nicotínico (25 gr)	
			KI (0.83 gr)	Tiamina HCl (0.0025 gr)	
			Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ( 0.025 gr)	Myo-Inositol (2.5 gr)	
			CuSO <sub>4</sub> (0.0025 gr)		
			CoCl <sub>2</sub> (0.0025 gr)		

Figura 9. Contenido de las soluciones stock para el medio MS

## 6.3 Establecimiento del sistema experimental

### 6.3.1 Esterilización

Semillas de sorgo PIONEER<sub>MR</sub> 82W21 fueron esterilizadas bajo el siguiente protocolo en condiciones estériles en una campana LUMISTELL<sub>MR</sub> de flujo laminar:

Las semillas se enjuagaron con agua desionizada estéril y se decantaron. Se agregó etanol al 96% por 5 minutos, se agitaron vigorosamente, se decantaron y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada estéril para agregar una solución comercial de hipoclorito de sodio al 20% durante 8 minutos, 4 minutos agitando las semillas vigorosamente y 4 minutos manteniendo en reposo las semillas, se decantó el hipoclorito de sodio y se enjuagaron las semillas con agua desionizada estéril 6 veces. Finalmente se colocaron las semillas en placas Petri con medio MS 0.2X.

### 6.3.2 Germinación



Figura 10. Germinación de las semillas de *S. bicolor*.

Una vez esterilizadas las semillas de sorgo, éstas fueron colocadas en placas Petri con medio MS para su germinación durante 6 días en una cámara de

crecimiento PERCIVAL® modelo AR66LC8 con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 22°C y una intensidad de luz de 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **6.3.3 Eliminación del endospermo**

Posterior a la germinación se retiró cuidadosamente el endospermo que aún permanecía unido a la semilla con ayuda de un bisturí. Después de retirar el endospermo y con el propósito de esterilizar las plántulas, éstas últimas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 30 segundos y enjuagadas 3 veces con agua desionizada estéril. Lo anterior se realizó en campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

Una vez cortado el endospermo tres plántulas se colocaron en un sistema experimental de compartimentos separados para experimentos de interacción vía VOCs (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013b). Lo anterior consiste en obtener frascos de vidrio con capacidad de 170 mL, en los cuales se vaciaron 40 mL de Medio MS 0.2X, antes de solidificar se introdujeron viales de vidrio que contenían 3 mL de medio de cultivo para bacterias. Tres plantas por frasco fueron pasadas y una vez realizado lo anterior, se procedió a la inoculación con diferentes bacterias.

Así, las plantas introducidas en este sistema experimental crecen en medio MS, mientras que la bacteria inoculada, crece dentro del vial de vidrio que contiene su medio óptimo, de ésta manera planta y bacteria permanecen sin contacto directo durante el tratamiento.

### **6.3.4 Inoculación bacteriana**

La inoculación bacteriana para los diferentes experimentos se llevó a cabo de la siguiente manera: Se crecieron las bacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021 en cajas Petri, con sus respectivos medios de crecimiento y su temperatura óptima.

Una vez crecidas las bacterias, con cada una se realizó lo siguiente: con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron a las bacterias crecidas en caja Petri y se

colocaron en 1mL de agua desionizada estéril para homogenizar. En una celda de cuarzo se colocaron 900  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana realizada anteriormente; se realizó una lectura a 600 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys™ 20. Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó la siguiente fórmula: Volumen a inocular =  $(0.05)(0.1 \text{ mL})/\text{Absorbancia observada}$ , lo anterior corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia.

### **6.3.5 Condiciones de crecimiento**

Una vez transferidas las tres plantas por frasco e inoculadas con la bacteria según el tratamiento. Los frascos fueron llevados por 10 días a una cámara de crecimiento para plantas PERCIVAL<sub>MR</sub> modelo AR66LC8. La cámara se programó con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y 22°C una intensidad de luz de  $200 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Una vez transcurridos los 10 días se procedió a medir los parámetros para evaluar crecimiento vegetal.

### **6.4 Análisis del crecimiento vegetal**

Para evaluar el crecimiento vegetal se midieron diversos parámetros que describimos a continuación; los datos sobre la longitud de la parte aérea así como la longitud de la raíz primaria de las plantas de sorgo, se recabaron utilizando una escala graduada en mm. Se realizó un conteo visual para determinar el número de raíces laterales presentes en las plantas. El peso fresco de la parte aérea y del sistema radicular se obtuvo con el uso de una balanza analítica de la marca “Sartorius®”. Para la determinación del contenido de clorofila se usó un medidor de clorofila de la marca “OPTI-SCIENCES CCM-200®”. Se tomaron tres lecturas de cada hoja y se promediaron los resultados.

## 6.5 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los VOCs en las plántulas de sorgo al acabo de transcurridos 10 días, varios datos fueron procesados estadísticamente. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA 7, en el cual nuestros resultados fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza seguida de una prueba “pos hoc” de rangos múltiples de Duncan. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 6.6 Extracción de exudados radiculares de plantas de *S. bicolor*

Para este ensayo semillas de *S. bicolor* se germinaron en medio MS por 8 días en cámara de crecimiento PERCIVAL<sub>MR.</sub>, transcurridos los días se cortó el endospermo y las plántulas fueron esterilizadas para posteriormente ser transferidas a un sistema experimental para recolección de exudados radiculares. Este sistema consiste en lo siguiente: en campana de flujo laminar, dentro de frascos de vidrio con capacidad de 170 mL, se colocó un vial con 3 mL de medio para bacteria y otro frasco de vidrio con 15 mL de agua desionizada estéril, en este último se colocan 3 plantas que se sujetan a la boca del frasco con algodón estéril. De esta manera los exudados de las plantas quedaron depositados en el agua. Mientras que en el vial se depositó un inóculo con las diferentes bacterias. Este sistema contempla compartimentos separados, y la interacción planta-bacteria sería vía VOCs



Figura 11. Colección de exudados radiculares de plantas de *S. bicolor* inoculadas con *A. agilis* UMCV2.

Una vez colocadas las plantas de sorgo y el inóculo bacteriano en los frascos de vidrio, estos se llevaron a la cámara de crecimiento PERCIVAL<sub>MR</sub> por 8 días, durante este tiempo las hojas de las plantas fueron humedecidas cada 2 días con medio MS 0.2X con un pincel estéril. Posteriormente se realizó la extracción de los ácidos orgánicos de la solución de exudados radiculares producidos por la planta durante los 8 días de incubación que habían sido colectados en un vial con agua destilada.

#### **6.6.1 Extracción de ácidos orgánicos a pH ácido:**

Para extraer los ácidos orgánicos de los exudados radiculares de las plantas de *S. bicolor* se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo:

A la solución de exudados radiculares se le midió el pH y este se ajustó a 3.0. con una solución de HCL 1N. Se agregó 1 volumen de acetato de etilo, protegiendo en todo momento la mezcla de la luz. Se agitó la mezcla empleando un vortex. Se recupero la fase orgánica en la que se encontraban disueltos los ácidos orgánicos. Se colocó en un vial donde fue evaporada a sequedad total bajo una corriente de N<sub>2</sub> cromatográfico extraseco. El vial fue almacenado a -4°C protegido de la luz con papel aluminio hasta el momento de derivatizar la muestra.

#### **6.6.2 Derivatización de ácidos orgánicos**

Con la intención de analizar a los ácidos orgánicos presentes en los exudados radiculares por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), estos compuestos fueron derivatizados empleando el siguiente protocolo:

Los exudados radiculares desecados en el apartado 6.6.1 y contenidos en un vial de reacción fueron adicionados con 2 mL de una solución de metanol/cloruro de acetilo (2mL/ 500 µl), se sonicaron por 15 minutos, posteriormente se calentaron a 75°C por una hora. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Fueron secados bajo una corriente de gas N<sub>2</sub>

cromatográfico extraseco para después agregar 1 mL de diclorometano, y 1.5 mL de anhídrido acético. Se volvieron a calentar a 75° C por 1 hora. La muestra fue transferida a un vial ámbar de 4 mL, secado con gas N<sub>2</sub> y almacenado a -20 °C hasta ser posteriormente identificados por GC-MS.

### 6.6.3 Identificación de ácidos orgánicos por GC-MS

Todos los extractos fueron analizados en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 series II), acoplado a un detector de masas (Agilent 5973) y una columna HP5-MS de 30mx 0.2 µm x 0.2 mm. Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de los espectros de masa con la base de datos NIST/EPA/NIH, Chemstation Agilent Technologies Rev. D.04.00.2002. Las muestras secas de los exudados se re-suspendieron en 50 µL de diclorometano, de donde se tomó 1µL para inyectar en el cromatógrafo.



Figura 12. Cromatógrafo de gases empleado en este trabajo.

Las condiciones del cromatógrafo se describen a continuación:

<b>Condiciones del cromatógrafo</b>	
<b>Modo:</b>	Scan
<b>Temperatura del inyector</b>	270°C
<b>Temperatura del detector</b>	300°C
<b>Inyección</b>	1 µL de 50 µL de diclorometano
<b>Solvent Delay</b>	1.5 min
<b>Tiempo de corrida</b>	41 minutos
<b>Scanning Mass Range</b>	35. 00-400.00

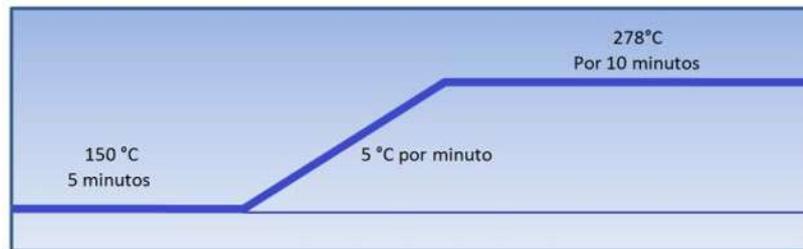


Figura 13. Rampa utilizada para el análisis de exudados radiculares por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### 6.6.4 Análisis de componte principal

Una vez identificado el tipo y cantidad de compuestos encontrados en cada uno de los tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con estos datos. Un ACP es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos; esta técnica nos sirve para encontrar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos. El análisis de compontes principales busca la proyección según la cual los datos queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados. Para realizar este análisis se utilizó el software JMP8.

### 6.7 Análisis de la expresión del gen *SbFRO1* en presencia de VOCs de diversas rizobacterias

Para realizar los experimentos de análisis de expresión de genes, se extrajo el ARN de plantas de sorgo expuestas a los volátiles de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, M4-96 *B. subtilis* y *S. meliloti* 1021.

#### 6.7.1 Aislamiento de ARN con trizol

Para la extracción del ARN se siguió el siguiente protocolo:

Se emplearon 200 mg de tejido fresco de raíz o de parte aérea de las plantas. Se vertieron 500  $\mu$ L de Trizol® (LifeTechnologies cat 15596-026) a viales de 1.5 mL, al cual se adicionó el tejido vegetal macerado momentos antes en un mortero con N<sub>2</sub> líquido e inmediatamente después se mezcló vigorosamente empleando un vortex. La mezcla se centrifugó 5 min a 12,000 g a 4°C para

remover fragmentos de tejido y se transfirió el sobrenadante a un vial nuevo. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó con vortex y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó 12, 000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa superior conteniendo el ARN fue recuperada (~ 600 µL) y adicionada con 500 µL de isopropanol. La muestra se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego fue remezclada invirtiendo repetidamente el vial. Posteriormente es centrifugada a 12, 000 g durante 10 minutos a 4°C, lo que produjo la formación de una pastilla blanca de RNA en el fondo del vial. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75 % mezclando en vórtex y centrifugando cinco minutos a 7500 g a 4°C. La pastilla se secó al aire por 10 minutos en campana de flujo laminar y posteriormente fue resuspendida en 50 µL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Se aplicó un tratamiento con ADNasa y se confirmó la integridad del ARN empleando una electroforesis en agarosa al 1.5 %.

### 6.7.2 Cuantificación del ARN

Para la cuantificación del ARN se usó agua desionizada como un disolvente para suspender los ácidos nucleicos, se colocó la mezcla en una celda de cuarzo, 3 µL de ARN + 997 µl de agua desionizada estéril; se hizo una lectura a 260 nm en un espectrofotómetro JENWAY<sup>MR</sup> modelo 73007305. La cuantificación de ARN, finalmente, se hizo con la siguiente fórmula:

$$\text{RNA} = \frac{(40\mu\text{g}) (\text{ABS}) (1000\mu\text{l})}{(3\mu\text{l}) (1000\mu\text{l})} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Una vez que se cuantificó el ARN se hicieron cálculos para tener las muestras a 500 ng y proceder con la síntesis de ADNc.

### 6.7.3 Síntesis de ADNc

Cada uno de los componentes del kit de síntesis de cDNA SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System For RT-PCR Catalogo No. 11904-018 marca

Invitrogen, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó antes de usarse. Se preparó la mezcla oligonucleótido/ARN en tubos estériles de 0.2 mL de acuerdo a las especificaciones del fabricante. 500 ng de ARN, 1 µl de la mezcla dNTP 10 mM, 1 µl de oligo (dT) (0.5 µg/µL), y agua tratada con DEPC para un volumen final de 10 µL. Se incubó cada muestra a 65 °C por 5 minutos, después se colocó en hielo por 1 minuto. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (1X), agregando cada compuesto en el siguiente orden: 2 µl de 10X RT buffer, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de 0.1 M DTT y 1 µL de inhibidor de ARNasa recombinante. Se agregó 9 µL de la mezcla de reacción a cada mezcla oligonucleótido/ARN, se mezcló suavemente y se colectó por centrifugación breve, se incubó a 42 °C por 2 minutos. Se adicionó 1 µL de Superscript™ II RT a cada tubo, se mezcló y se incubó a 42°C por 50 minutos. Se terminaron las reacciones a 70 °C por 15 minutos, se colocaron en hielo. Finalmente se colectaron las reacciones por centrifugación breve, se agregaron 1 µL de ARNasa H a cada tubo y se incubaron por 20 minutos a 37 °C.

#### 6.7.4 Curva estándar de los genes *SbFRO1* y *SbACTINA*

Se realizó una curva estándar para validar la expresión del gen endógeno y el gen problema bajo el siguiente protocolo:

Se inició con el ADNc obtenido anteriormente, a una concentración de 500 ng/µL. Se llevó a cabo una dilución para obtener un stock a 100 ng/µL para trabajar. Se realizaron las diluciones 1:5 en condiciones estériles y en campana de flujo laminar.

Dilución	Contenido	Concentración final
1	6 mL del stock ( 100 ng/µL ) + 24 µL de H <sub>2</sub> O des-ionizada	20 ng / µL
2	6 mL de la dilución 1 + 24 µL de H <sub>2</sub> O des-ionizada	4 ng / µL
3	6 mL de la dilución 2 + 24 µL de H <sub>2</sub> O des-ionizada	0.8/ng / µL
4	6 mL de la dilución 3 + 24 µL de H <sub>2</sub> O des-ionizada	0.16 /ng / µL
5	6 mL de la dilución 4 + 24 µL de H <sub>2</sub> O des-ionizada	0.032/ng / µL

Se preparó la siguiente mezcla:

Componente	Cantidad
Fast SYBR green, master mix	10 $\mu$ L
<i>SbActina</i> Up o bien <i>SbFRO1</i> UP	1 $\mu$ L
<i>SbActina</i> Up o bien <i>SbFRO1</i> LO	1 $\mu$ L
Agua des-ionizada estéril	4 $\mu$ L
cDNA	5 $\mu$ L
Volumen final	20 $\mu$ L

y se adicionaron 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción y 5  $\mu$ L de ADNc de cada tratamiento. Se cerraron los tubos sin tocar la tapa, se dio un spin para el líquido y se colocaron en la placa del termociclador de la marca Applied Biosystems StepOne.

Para realizar la PCR en tiempo real (qPCR) se usaron los siguientes oligonucleótidos: *SbFRO1UP* (5'TGG CGA TCT TGA GCG ACA T 3'), *SbFRO1LO* (5'TCT TGG GCA TGC ATT GCT T 3'), *SbACTUP* (5' GGC TGA CGC CGA GGA TAT C 3') y *SbACTLO* (5' TGA CCA TAC CGG TTC CAT TGT 3'), fueron diseñados con el Software Primer Exprés Versión 3.0 de Applied Biosystem (Foster City, CA) con base en los genes de *Sbactin* y *SbFRO1* previamente reportados (Cástulo-Rubio *et al.*, 2015).

#### 6.7.5 Análisis de expresión

La cuantificación de *SbFRO1* en los diferentes tratamientos, se realizó con el método  $\Delta\Delta$ CT (Puckette *et a.*, / 2008) usando al gen de actina como control. Las muestras se analizaron usando el aparato de Applied Biosystem PCR en tiempo real, utilizando el siguiente protocolo de amplificación: 95 °C 4 min, seguido de 95 °C por 15 segundos, 63 °C 30 segundos durante 40 ciclos. Para la curva de fusión 95 °C por 15 segundos, 63 °C 1 min, posteriormente una incremento de 0.3 hasta llegar a 95 °C por 15 segundos.

#### 6.7.6 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se usó el software Excel en el cual se transcribieron los datos obtenidos de cada experimento y posteriormente se usó

el programa STATISTICA 7, en el cual nuestros resultados fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza seguida de una prueba “pos hoc” de rangos múltiples de Duncan. Se utilizaron letras diferentes para indicar las medias con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de los VOCs bacterianos sobre la biomasa de *Sorghum bicolor*

Para determinar el efecto de los VOCs bacterianos de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007), *P. aeruginosa* PAO1 (Ortíz-Castro *et al.*, 2011), *B. cereus* L2-64 (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010), *B. subtilis* (M4-96 Pérez-Flores 2013) y *S. meliloti* 1021 (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2013a) sobre la biomasa de plantas de *Sorghum bicolor* PIONEER 82W21, las semillas fueron esterilizadas y germinadas por 6 días en medio MS 0.2X, se cortó endospermo y las plántulas se desinfectaron con hipoclorito de sodio para posteriormente ser colocadas en el sistema experimental de frascos de vidrio con medio MS.



Figura 14. Sistema *in vitro* para exponer plantas de *S. bicolor* a los VOCs bacterianos.

Las plantas fueron inoculadas con cada una de las bacterias antes mencionadas para ser colocadas en cámara de crecimiento durante 10 días, Figura 14. Al transcurrir los 10 días se evaluó el efecto de los VOCs bacterianos sobre el crecimiento vegetal, para ello diversos parámetros fueron evaluados, mismos que son mostrados en las siguientes gráficas.

En la Figura 15-A podemos observar la gráfica que muestra el peso fresco de los brotes (expresado en miligramos) de plantas de sorgo, expuestas a los VOCs de diferentes rizobacterias. En la gráfica podemos apreciar que a diferencia del control no inoculado los tratamientos inoculados con UMCV2 y PAO1 muestran mayor peso fresco de los brotes, mientras que el tratamiento con 1021, muestra un ligero incremento. Para el resto de los tratamientos L2-64 y M4-96 su comportamiento fue muy similar al control. En lo referente al peso fresco de la raíz (miligramos) podemos observar los resultados en la Figura 15-B. Respecto al control no inoculado, en todos los tratamientos excepto el tratamiento L2-64, se observó un incremento respecto al control, L2-64 también se comportó de forma similar al control en este parámetro.

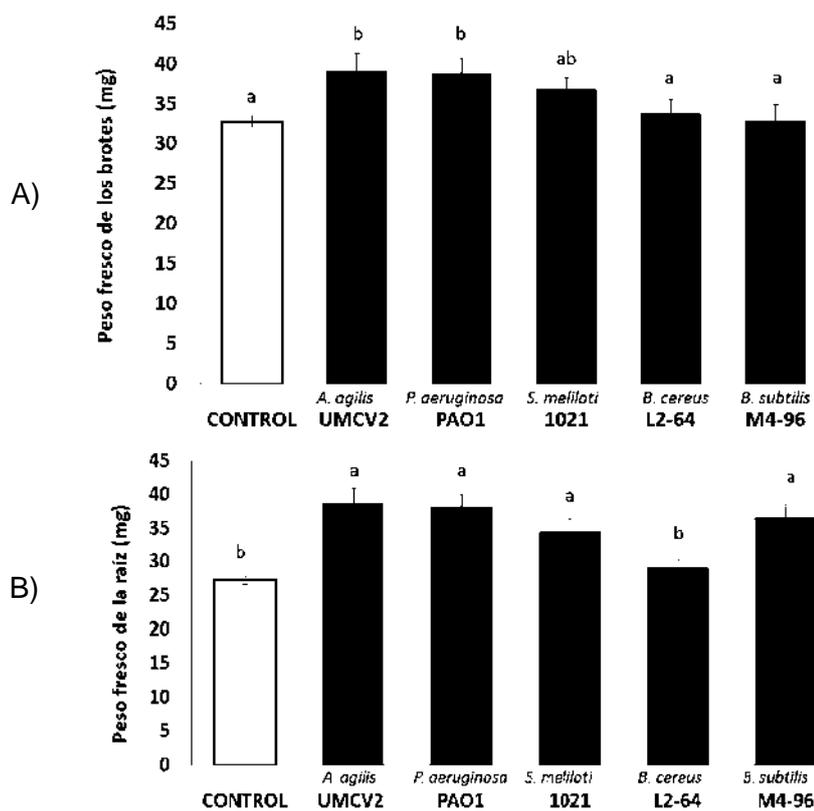


Figura 15. Gráfica del efecto de los VOCs de las rizobacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus cereus* L2-64, *Bacillus subtilis* M4-96 y *Sinorhizobium meliloti* 1021. En A)-peso fresco de los brotes, y en B)-peso fresco de la raíz de plantas de *Sorghum bicolor*.

En el presente trabajo a las plantas de sorgo también se les midió la longitud aérea y de la raíz expresada en centímetros. Los resultados los podemos observar en la Figura 16, donde en A observamos los resultados para longitud aérea, donde podemos observar que respecto del control no inoculado el tratamiento UMCV2 incremento este parámetro mayoritariamente que cualquier otro tratamiento, el tratamiento PAO1 también tuvo un incremento significativo, en los tratamientos 1021 y M4-96 existe una ligera tendencia al incremento, mientras que para el tratamiento con la cepa L2-64 no se observó una diferencia. Para el caso de la longitud de la raíz mostrada en la Figura 16-B, se observa que para este parámetro las plantas tratadas con las cepas PAO1 y L2-64 mostraron las raíces de mayor longitud y que a diferencia del resto de los 3 tratamientos inoculados (con UMCV2, 1021 y M4-96) son estadísticamente superiores al control.

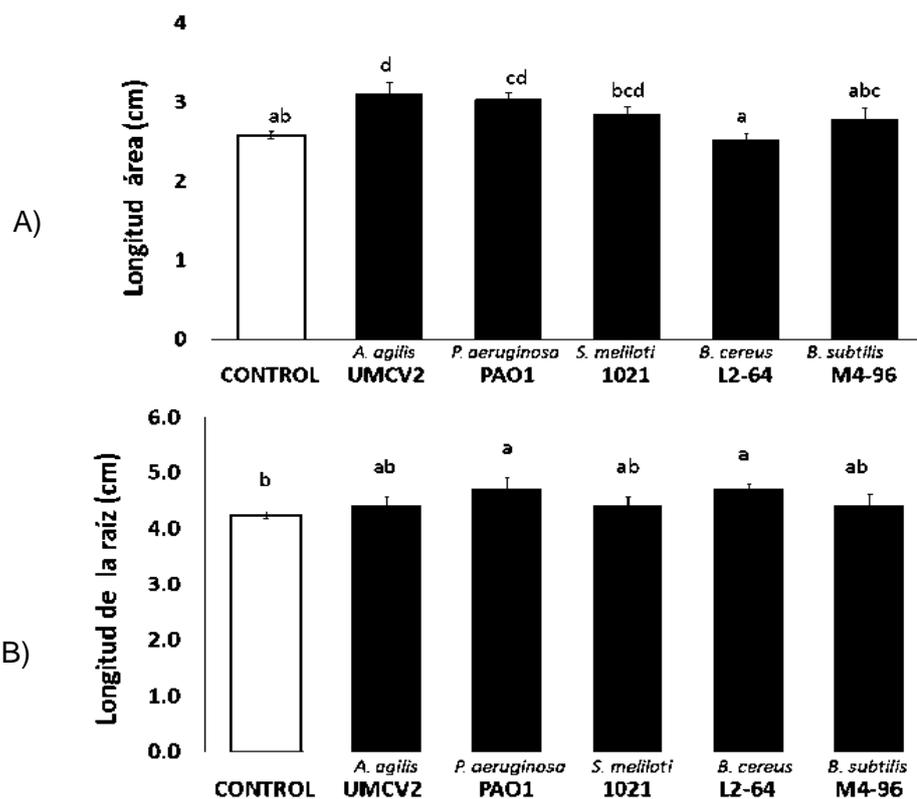


Figura 16. Grafica del efecto de los VOCs de las rizobacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus cereus* L2-64, *Bacillus subtilis* M4-96 y *Sinorhizobium meliloti* 1021. En A)-la longitud aérea, y en B)-la longitud de la raíz de plantas de *Sorghum bicolor*.

Los últimos parámetros en ser evaluados para determinar el efecto de los VOCs bacterianos sobre la biomasa de las plantas de sorgo fueron número de raíces laterales (expresada en unidades), y concentración de clorofila (expresada en % respecto al control), resultados que podemos apreciar en la gráfica de la Figura 17. En la Figura 17-A apreciamos el número de raíces laterales. Se observa que las plantas expuestas a los VOCs de las cepas UMCV2, PAO1 y M4-96 producen significativamente más raíces laterales que las plantas control. Las plantas tratadas con los VOCs de las cepas 1021 y L2-64 muestran ligera tendencia al incremento del número de raíces que sin embargo no es significativo. Para el caso de la clorofila contenida en las plantas de sorgo expuestas a los VOCs bacterianos Figura 17-B, observamos que el único tratamiento que mostró tener un efecto significativo respecto al control y al resto de los tratamientos, fue el tratamiento con los VOCs de la cepa UMCV2.

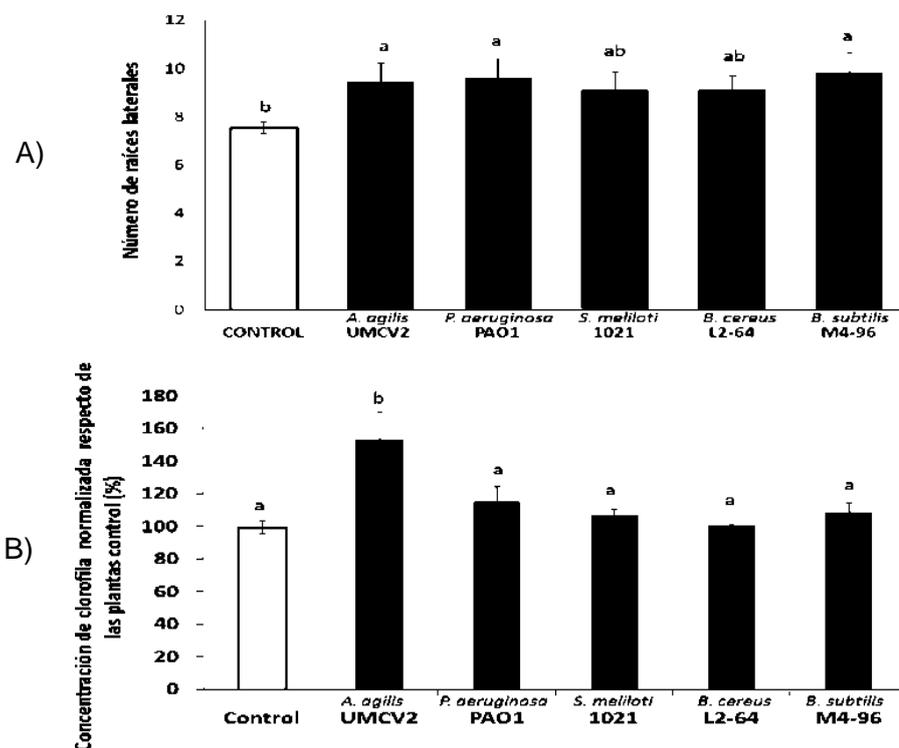


Figura 17. Gráfica del efecto de los VOCs de las rizobacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Bacillus cereus* L2-64, *Bacillus subtilis* M4-96 y *Sinorhizobium meliloti* 1021. En A)-número de raíces laterales, y en B)-concentración de clorofila de plantas de *Sorghum bicolor*.

## **7.2 Exudados radiculares de plantas de *Sorghum bicolor* expuestas a los VOCs bacterianos**

Las raíces de las plantas son capaces de sintetizar, acumular y liberar continuamente distintos compuestos o exudados de naturaleza química diversa en la rizósfera. En el presente trabajo se buscaron los exudados radiculares liberados por las plantas de sorgo expuestas a diferentes VOCs bacterianos, específicamente la fracción de ácidos orgánicos. Para lo cual plantas de *Sorghum bicolor* PIONEER-82W21 fueron esterilizadas y germinadas por 8 días, se cortó el endospermo y las plántulas fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 10%. Una vez esterilizadas las plantas estas fueron colocadas en el sistema experimental diseñado para extraer exudados radiculares. Dicho sistema experimental consistió en que una vez esterilizadas las plantas, estas fueron colocadas en un vial con agua desionizada estéril y este vial a su vez fue colocado dentro de un frasco de vidrio en donde se encontraba un tercer vial donde se colocaron  $1 \times 10^6$  UFC de cada una de las rizobacterias *A. agilis* (UMCV2), *P. aeruginosa* (PAO1), *B. cereus* (L2-64), *B. subtilis* (M4-96) y *S. meliloti* (1021). Una vez inoculadas las rizobacterias, las plantas fueron llevadas a cámara de crecimiento por 7 días. Trascurridos los 7 días se realizó la extracción de ácidos orgánicos a pH ácido. Esta fracción fue derivatizada para posteriormente ser identificada por GC-MS.

Los resultados de este experimento son mostrados en la Tabla 2, donde se observa que 39 compuestos en total fueron encontrados distribuidos en los 6 tratamientos.

Tabla 2. Compuestos identificados como exudados radiculares de plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021. Las cantidades mostradas de los compuestos exudados son expresadas en µg/planta.

COMPUESTO (µg/planta)	Control	UMCV2	L-264	M4-96	PAO1	1021
1,2 Etanediol					608.87	
1,2 Etanediol diacetato				512.82		
Ácido acético fenil ester	1019.70	1054.01	1060.69	1121.58	1005.03	857.21
1,4 Butanediol	960.65	1031.66	1066.48	979.85	906.55	845.66
1,2,3 Monoacetato de propanotriol	858.81	1014.19	918.73	915.61		904.82
2,6 Dimetilbenzaldehido					290.28	
n-Propil benzoato					539.48	
Ácido benzoil fórmico					818.40	
Anhídrido ftálico					847.48	
Triacetin	956.85	1083.49	1107.35	1151.48	882.78	1122.52
Ácido ftálico					908.50	
Ácido dehidroacético	904.13	1699.06	1145.80	1158.66	979.10	945.48
Dimetil ftalato	1119.75	1076.47	940.65	999.08	573.99	893.82
Ácido tereftálico	943.74	1049.27	902.96	354.17		844.77
Dimetil isoftalato	1005.15	1147.15	574.70	973.60		867.24
Ácido cítrico		1116.42				
3,5 Diacetil 2,6 dimetil 4H piran 4 ona	970.52	1520.86	1010.70	1026.75	890.65	897.31
Metil 2 etilhexil ftalato	8779.33	5090.94	4686.31	4413.62		3706.13
Ácido tetradecanoico	1665.61	1927.92	935.74	1015.79		868.96
Pentaeritritol		1160.80				858.03
Floroglucinol	1365.03	2226.22		1015.66		
Z-9 Ácido hexadecenoico	805.51	1555.16		1448.21		
Ácido hexadecanoico	1774.05	4112.82	1653.14	8835.68		1308.16
1-Butil 2-isobutil ftalato	16288.82	11008.45	11126.57	543.23		9467.63
Ácido ferúlico		1481.39				
Ácido heptadecanoico		923.24		1016.56		
Etil 2-metil ftalato				896.38		
Diisobutil ftalato					1472.94	
(Z,Z)-9,12 Ácido octadecadienoico	1037.41	1889.67		1322.71		
(Z)-9 Ácido octadecenoico	1944.93	2633.18				
(E)-9-Ácido octadecenoico	878.87	1721.06		1518.98		
Ácido octadecanoico	1651.87	3407.31		4279.34		
Ácido nonadecanoico		926.02				
Ácido eicosanoico		1012.50				
Tri(butoxietil) fosfato	1069.77	23689.83				
Ácido 10-nonadecenoico	901.82					
Ácido docosanoico		2475.07		1811.83		
n-octil ftalato	2940.20	7213.91				
Ácido tetracosanoico		939.72				

En la tabla 3 observamos que de los 39 compuestos encontrados 16 resultaron ser específicos de alguno de los tratamientos. Se muestra que para el tratamiento control, 22 compuestos fueron encontrados, de los cuales 1 compuesto es específico o bien que solamente se encontró en este tratamiento. Para el tratamiento UMCV2 un total de 29 compuestos fueron encontrados, de los cuales 6 son específicos para este tratamiento. En el tratamiento con las plantas expuestas a los VOCs de la cepa PAO1 se encontraron 13 compuestos y 7 de ellos fueron específicos para este tratamiento. Las plantas tratadas con los VOCs de las cepas 1021 y L2-64 produjeron 14 y 13 ácidos orgánicos respectivamente, pero en ninguno de estos tratamientos se encontraron compuestos específicos. Por último tenemos las plantas tratadas con los VOCs de las cepas M4-96 con 22 compuestos producidos y 2 compuestos específicos para este tratamiento. Como resumen encontramos que las plantas tratadas con los VOCs de las cepas UMCV2 y M4-96 produjeron la mayor cantidad de compuestos (29 y 22 respectivamente), mientras que en los tratamientos con las cepas UMCV2 y PAO1 produjeron la mayor cantidad de compuestos que no están presentes en otros tratamientos y por lo tanto los definimos como específicos del tratamiento (6 y 7 compuestos respectivamente).

Para el caso de las plantas tratadas con los VOCs de las cepas 1021 y L2-64 podemos observar que no se encontró ningún compuesto específico para cualquiera de los 2 tratamientos, si tomamos en cuenta solo esta característica podemos decir que son iguales y que ambos son muy parecidos al control ya que en este último solo se encontró un compuesto específico para este tratamiento.

Tabla 3. Exudados radiculares de plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021. Las cantidades mostradas en la Tabla indican el total de exudados encontrados y el número de compuestos que son específicos en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Total de exudados	Total de exudados específicos
Control sin bacteria	22	1
<i>A. agilis</i> UMCV2	29*	6*
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	13	7*
<i>S. meliloti</i> 1021	14	0
<i>B. cereus</i> L2-64	13	0
<i>B. subtilis</i> M4-96	22*	2

Otro aspecto interesante de estos compuestos encontrados fue el tipo de compuesto mayoritario para cada uno de los tratamientos que se muestran en la Tabla 4. Se observa que en la mayoría de los tratamientos el compuesto mayoritario pertenece a algún compuesto del grupo de los ftalatos, excepto para los tratamientos con las cepas UMCV2 y M4-96 con tri-(butoxietil) fosfato y el ácido hexadecanoico respectivamente. En el tratamiento PAO1 el compuesto mayoritario fue el Diisobutil ftálato, mismo que resulto ser parte de los compuestos específicos de este tratamiento. Situación que no ocurrió en el resto de los tratamientos en donde el compuesto mayoritario no resulta ser parte del grupo de compuestos específicos para el tratamiento.

En lo referente al tipo de compuestos específicos mostrados también en la Tabla 4; podemos observar que a lo largo de los tratamientos se encuentran diversos compuestos, así encontramos ácidos grasos como el ácido 10-nonadecenoico mostrado en el tratamiento control, algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico en el tratamiento UMCV2, en el tratamiento PAO1 podemos observar algunos compuestos derivados del ácido benzoico y ftalatos. Esta diversidad de compuestos encontrados en cada uno de los tratamientos nos muestra como la planta modifica este perfil de exudados radiculares en presencia de determinados VOCs bacterianos.

Tabla 4. Compuestos mayoritarios y específicos en los exudados radiculares de plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021.

Tratamiento	Compuesto mayoritario	Compuestos específicos
Control sin bacteria	1-Butil-2 isobutil ftalato	Ácido 10 nonadecanoico
<i>A. agilis</i> UMCV2	Tri-(butoxietil) fosfato	Ácido cítrico Pentaeritritol Ácido ferúlico Ácido nonadecanoico Ácido eicosanoico Ácido tetracosanoico.
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Diisobutil ftalato	1,2 Etanediol 2,6 Dimetilbenzaldehído n-Propil benzoato Ácido benzoil fórmico Ántridrido ftálico Ácido ftálico Diisobutil ftalato
<i>S. meliloti</i> 1021	1 Butil, 2 isobutil ftalato	ninguno
<i>B. cereus</i> L2-64	1 Butil, 2 isobutil ftalato	ninguno
<i>B. subtilis</i> M4-96	Ácido hexadecanoico	1,2 Etanediol diacetato Etil 2-metil ftalato.

Sabiendo la especie química y la cantidad de los compuestos encontrados en cada uno de los tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con estos datos. Un análisis de componentes principales es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos; esta técnica nos sirve para encontrar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos. El análisis de componentes principales busca la proyección según la cual los datos queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados. Para realizar este análisis se empleó el software JMP8.

La Figura 18 nos muestra la variabilidad de los datos de los compuestos exudados por plantas de sorgo representado en 2 dimensiones. En el eje de las X, el componente principal 1 explica el 49.2 % de la variabilidad de los datos, mientras que en el eje de las Y, en el componente 2 están explicados el 18.8 %

de la variabilidad de los datos. En los tratamientos de las plantas control, y de las plantas expuestas a los VOCs de las cepas UMCV2, 1021, PAO1, L2-64 y M4-96 podemos observar que claramente las tres réplicas de cada uno de los tratamientos se agrupan entre si y cada conjunto de datos de cada uno de los tratamientos se separase. Esta separación de cada uno de los tratamientos nos muestra que cada uno de ellos es diferente en lo referente al tipo y cantidad de sus compuestos. Los tratamientos más cercanos al control son los de las plantas tratadas con los VOCs de las cepas M4-96, L2-64 y 1021, los exudados de las plantas tratadas con los VOCs de las cepas UMCV2 Y PAO1 claramente que se alejan de los de las plantas control y del resto de los tratamientos, mostrando con ello una gran diferencia de estos dos últimos tratamientos.

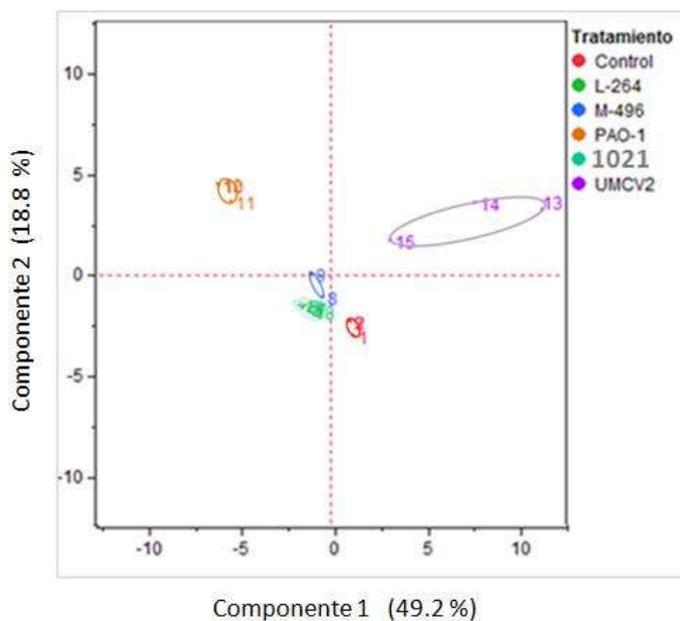


Figura 18. Esquema del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los compuestos exudados por plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021

La Figura 19 nos muestra un dendograma de los compuestos exudados por plantas expuestas a los VOCs de las bacterias como otra forma de mostrar como los tratamientos del presente trabajo son diferentes respecto a su tipo y concentración de exudados radiculares, que presentan al ser estimulados vía

VOCs bacterianos. Se puede observar que se forman tres grupos (A, B y C). Los cuales sugieren que pueden ser producidos por ciertas especies bacterianas y agrupados dependiendo de su naturaleza química. En el grupo A podemos observar que se agrupan los tratamientos más parecidos al control, mostrándonos 3 tratamientos que son el control, L2-64, M4-96 y 1021. El grupo B está formado por un solo tratamiento, PAO1 así mismo el grupo C representado por el tratamiento UMCV2, lo que nos indica que estos dos últimos tratamientos son muy diferentes entre el resto de los tratamientos, por ello forman grupos diferentes.

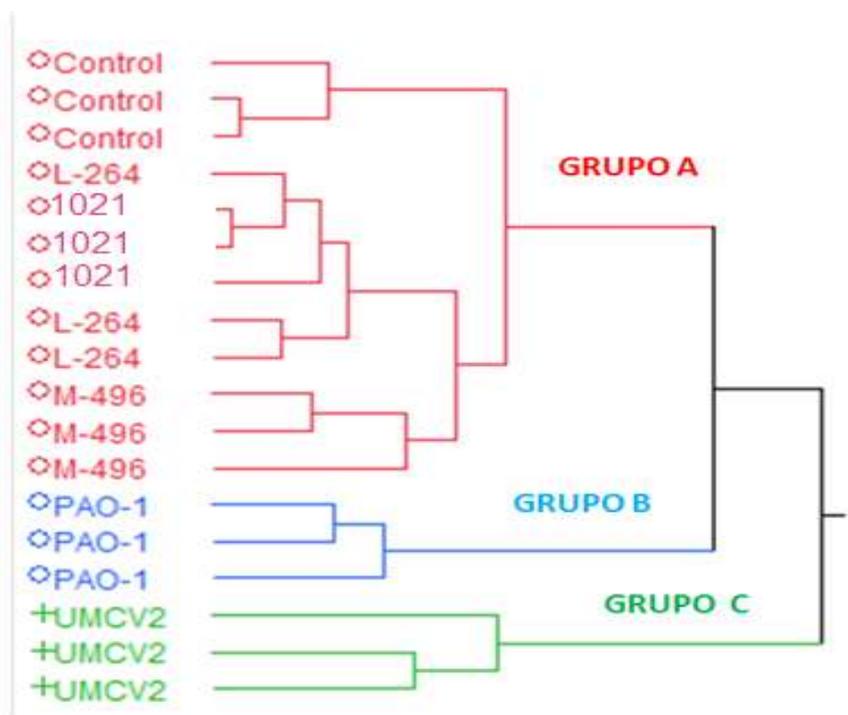


Figura 19. Dendrograma de los compuestos exudados por plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021.

### 7.3 Análisis de la expresión del GEN *SbFRO1* en plantas *Sorghum bicolor* expuestas a los VOCs bacterianos de diferentes rizobacterias.

Se extrajo el ARN de las plantas de *Sorghum bicolor* expuestas durante 48 horas a los VOCs bacterianos de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021.

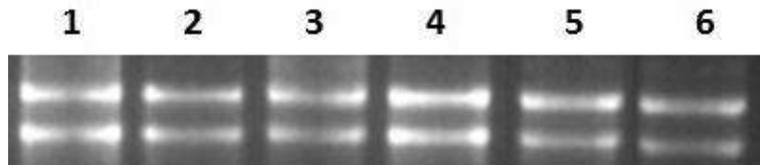
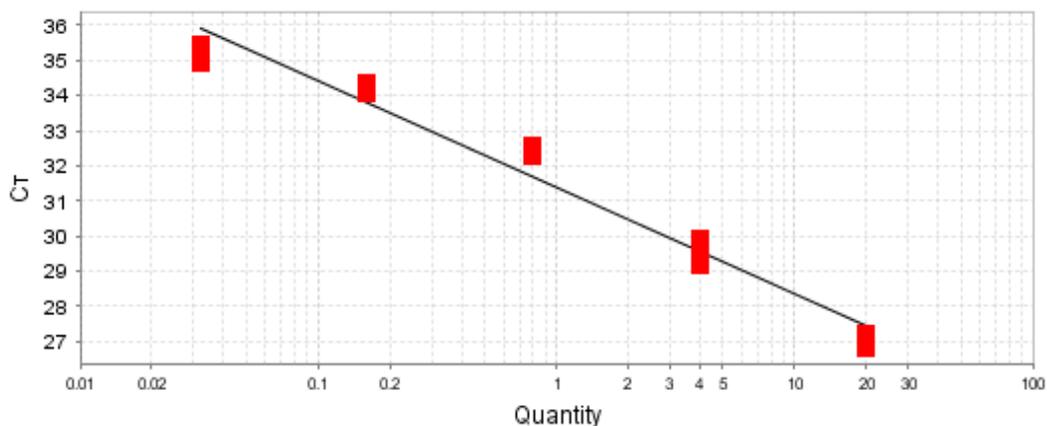


Figura 20. Figura representativa del RNA extraído de las raíces de plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs de diferentes rizobacterias. 1 (tratamiento control), 2 (tratamiento UMCV2), 3 (tratamiento L2-64), 4 (tratamiento M4-96), 5 (tratamiento PAO1) y 6 (tratamiento 1021).

Para realizar el análisis de expresión del gen *SbFRO1* por qPCR, primeramente se realizaron las curvas de amplificación para el gen problema (*SbFRO1*) y el gen de referencia o endógeno, que para este caso fue *SbActina*. Las curvas tienen el objetivo de observar y certificar que efectivamente el gen de referencia tenga la misma o similar tasa de amplificación que el gen problema. Los resultados de las curvas de amplificación son mostrados en las Figuras 21 y 22.



Target: *SbACTINA* Slope: -3.022 Y-Inter: 31.384  $R^2$ : 0.966 Eff%: 114.232

Figura 21. Curva de amplificación para el gen *SbACTINA*.

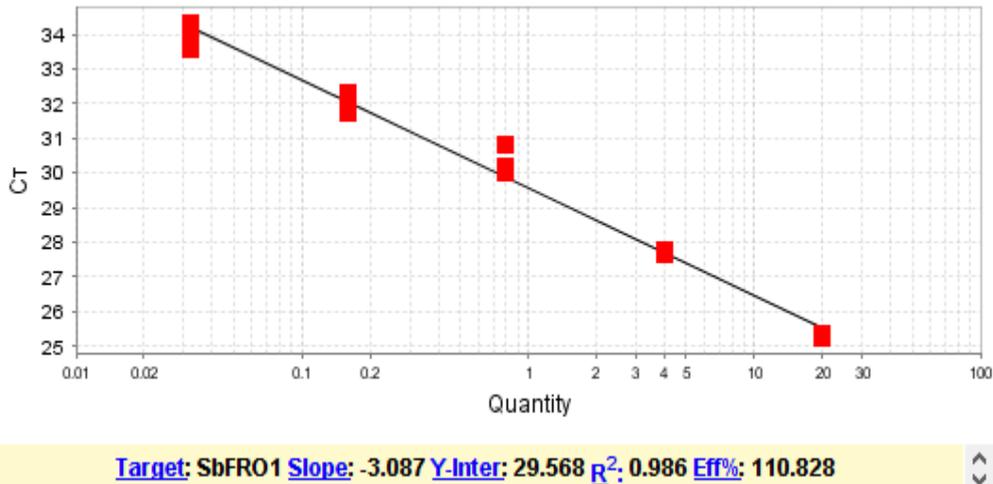


Figura 22. Curva de amplificación del gen *SbFRO1*.

En la Figura 21 se observa la curva de amplificación del gen *SbACTINA*, podemos observar que el coeficiente de correlación  $r^2 = 0.996$  muy cercano a 1, validando la curva de amplificación. En lo referente a la Figura 22 de igual manera que la grafica anterior se tiene la curva de amplificación pero ahora para el gen *SbFRO1*, la cual tiene un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.986$  también muy cercano a 1, lo cual también nos está indicando la validación de la curva. Si observamos las pendientes de amplificación de cada uno de nuestros genes podemos demostrar que la tasa de amplificación es muy parecida, validando así nuestro gen problema con el de referencia.

Una vez que observamos que los dos genes tienen la misma tasa de amplificación, procedimos a realizar los experimentos de expresión relativa del gen *SbFRO1*, bajo el estímulo de diferentes VOCs bacterianos. Los resultados son mostrados en la Figura 23.

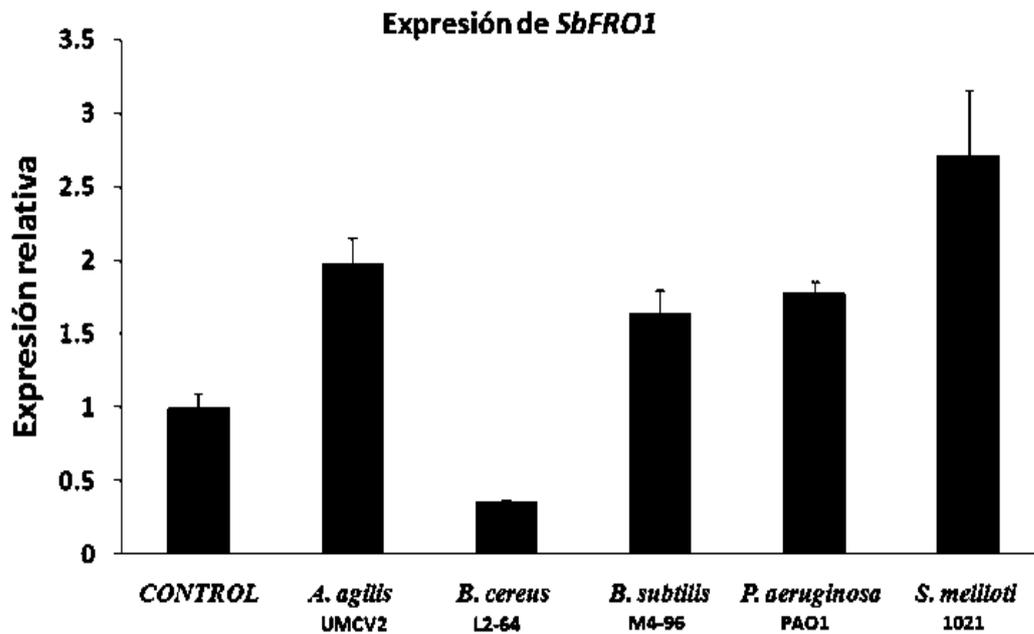


Figura 23. Expresión relativa mediante del gen *SbFRO1* en plantas de *S. bicolor* expuestas durante 48 horas a los VOCs de las *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021, mediante la técnica qPCR.

Los resultados en la expresión del gen *SbFRO1* en plantas de sorgo expuestas durante 48 horas a los diferentes VOCs de las rizobacterias *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. cereus* L2-64, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021 fueron muy diferentes.

Podemos observar que cuando las plantas de sorgo son expuestas a los VOCs de *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *B. subtilis* M4-96 y *S. meliloti* 1021; la expresión de este gen aumenta respecto a la condición control. Sin embargo cuando las plantas son expuestas a los VOCs de *B. cereus* L2-64 interesantemente observamos que esta expresión es incluso menor que con el control. En los tratamientos *B. subtilis* M4-96 y *P. aeruginosa* PAO1 tienen una expresión muy parecida. La mayor expresión se observó con el tratamiento *S. meliloti* 1021, donde la expresión es dos veces mayor que el control. En resumen, con este experimento se sugiere que la expresión del gen *SbFRO1* es modulado por los VOCs de rizobacterias.

## 8. DISCUSIÓN

### **Efecto de los VOCs bacterianos sobre el crecimiento de *S. bicolor***

Los mecanismos mediante los cuales las plantas pueden interaccionar con su entorno son muy complejos, debido principalmente a la gran diversidad de estrategias que utilizan. Las plantas, a través de los diferentes tejidos pueden emitir señales que permiten interactuar con los demás organismos, principalmente con microorganismos de la rizósfera. (Oliveros *et al.*, 2009).

En los últimos años la ecología química, la cual se encarga de estudiar las interacciones bióticas mediadas por sustancias químicas ha desarrollado grandes descubrimientos. Dichas interacciones son variables entre especies, así como los efectos ocasionados, y muchas de ellas están asociadas con metabolitos secundarios. Los compuestos volátiles, debido a sus propiedades como atrayentes de polinizadores, y como señales para ubicar, fuentes de comida, anidación, cría, recompensa, entre otros son de suma importancia durante dichas interacciones planta-microorganismo.

Los VOCs son emitidos por muchos organismos, por ejemplo las plantas, resultando ser mezclas complejas de muchos compuestos orgánicos, por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire a temperatura ambiente al tener presiones de vapor altas. Los microorganismos también producen VOCs en gran diversidad y cantidad (Dudavera y Negrete, 2005; Insam, 2010).

Estos volátiles están altamente involucrados en las relaciones planta-herbívoro planta-planta y planta-bacteria. (Marin-Loaiza *et al.*, 2007). Debido a la importancia en ciertas interacciones de los VOCs producidos tanto por plantas como por microorganismos resulta de nuestro interés estudiar el efecto de los VOCs producidos por un juego de bacterias con características muy particulares y sus efectos sobre plantas de *S. bicolor*.

En este trabajo, en un primer ensayo, se observó que el efecto de los VOCs bacterianos no estuvo exactamente correlacionado con la característica que se

consideraron para la elección de este conjunto de las rizobacterias empleadas. De esta manera tenemos que las plantas sometidas a los VOCs de las cepas PGPR, UMCV2, 1021, M4-96 produjeron una mayor biomasa total (peso fresco de los brotes más peso fresco de la raíz) que las plantas control, sin embargo sorprendentemente los VOCs de la bacteria fitopatógena PAO1 también promovieron una mayor acumulación de biomasa que las plantas no tratadas, mientras que las plantas con el tratamiento de los VOCs de la cepa comensal L2-64 (Gutiérrez- Luna *et al.*, 2010), produjeron resultados muy similares a los de las plantas control.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), son microorganismos del suelo que colonizan las raíces y estimulan el crecimiento vegetal. Tales bacterias han sido aplicadas a un amplio rango de cultivos con la finalidad de mejorar el crecimiento, emergencia de la semilla, mejoramiento del cultivo y control de enfermedades. (Ryu *et al.*, 2003). Aunque se esperaba un incremento en peso de la planta con los tratamientos de las bacterias PGPR, no se sabía que tan fuerte era el efecto promotor de la mezcla de VOCs de ese conjunto de bacterias ni mucho menos hacia donde podría ir dirigido algún efecto positivo, negativo o bien neutro. Es por ello que en los resultados de este experimento mostramos las gráficas del efecto de cada uno de los parámetros considerados en este estudio para evaluar el efecto de los VOCs bacterianos sobre el crecimiento de la planta de sorgo.

De las bacterias consideradas como PGPR, los mayores incrementos en los parámetros respecto al tratamiento control, se obtuvieron en las plantas sometidas a los VOCs de la cepa UMCV2, sin embargo, los otros tratamientos con bacterias PGPR también mostraron tener un efecto hacia el incremento respecto al control en al menos algún parámetro.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal benefician a las plantas a través de diferentes mecanismos; por ejemplo fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, sideróforos, solubilización de fosfatos, y biocontrol de patógenos. (Ortíz-Castro *et al.*, 2013). El conjunto de VOCs bacterianos mostraron tener un efecto diferencial aunque se tratara de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y aún más un efecto no esperado tratándose de la bacteria

patógena PAO1 con la planta *S. bicolor*. Podemos observar que los tratamientos con UMCV2 y PAO1 son los tratamientos donde existe una marcada diferencia hacia el incremento sobresaliendo en 6 parámetros medidos a diferencia del resto de los tratamientos, donde observamos que el efecto de los VOCs está dirigido hacia la raíz y no en la parte aérea.

El efecto de las PGPR ha sido demostrado en diversos cultivos; en cebada la bacteria *Pseudomonas sp.* 7NSK2 aumenta el peso seco 20% respecto al control, en canola un grupo de bacterias mejoran el rendimiento 6-13%, *P. fluorescens* y *Bacillus subtilis* poseen efecto promotor en algodón de un 8-40%, en maíz *P. fluorescens* incrementa la altura de las plantas hasta un 24 %, (Kloepper *et al.*, 1991).

Podría argumentarse que las diferencias entre tratamientos de los parámetros peso fresco de los brotes y de la raíz no es muy marcada la diferencia, podemos responder que tomando en cuenta el peso total de la planta (es decir peso fresco de los brotes más el peso fresco de la raíz) el tratamiento con UMCV2 incrementa un 29% y con PAO1 28% a respecto al control y eso nos da un efecto promotor a diez días de crecimiento de las plantas de sorgo, siendo estos porcentajes una ventaja a estadios más prolongados en el crecimiento de las plantas. Los VOCs potencian su efecto sobre una parte de la planta dependiendo del tipo de juego de VOCs bacterianos.

En este primer experimento la bacteria fitopatógena *P. aeruginosa* PAO1 mejora el crecimiento de plantas de sorgo. Este hecho fue sorprendente ya que se esperaba una inhibición del crecimiento por ser una bacteria fitopatógena. Sin embargo se reporta a PAO1 como capaz de incrementar el peso fresco de los brotes, el peso fresco de la raíz y así como el número de raíces laterales por planta en *Arabidopsis thaliana* colocadas en cajas Petri. (Ortíz-Castro *et al.*, 2011), proponiendo que este efecto podría ser por sustancias que se difunden a través del medio de crecimiento, y que la plicianina juega un papel relevante como regulador de la división celular sin afectar la integridad y viabilidad del meristemo (Ortiz-Castro *et al.*, 2014). El efecto de PAO1 cuando es inoculada cerca de la raíz en este sistema de cajas Petri produce un efecto promotor sobre la planta siempre y cuando la bacteria no toque la raíz; ya que si esto

llega a suceder la bacteria produce su efecto fitopatogena. En nuestro sistema experimental de interacción por VOCs nos indica que además de que esta bacteria fitopatogena puede tener una influencia positiva en el crecimiento de las plantas vía compuestos difusibles, también vía VOCs; como lo mostrado en nuestro sistema experimental de interacción por VOCs. Aunque en este trabajo no se evaluó el perfil de VOCs de los tratamientos más significativos que pudiera indicarnos el responsable o conjunto de VOCs responsables de este efecto promotor, se sabe por trabajos anteriores que en el caso de UMCV2 el VOC dimetilhexadecilamina (DMHDA) promueve el crecimiento de *M. Sativa*. (Velázquez-Becerra, 2011). En lo referente a los demás tratamientos sería interesante identificar los VOCs y aún más en el caso de PAO1.

### ***S. bicolor* produce diferentes exudados radiculares como respuesta a los VOCs bacterianos**

Los VOCs bacterianos poseen un efecto sobre la biomasa de las plantas, sin embargo esta característica morfológica no es la única. A nivel bioquímico se observó cómo se ve afectado la liberación de los exudados radiculares de plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs bacterianos. La raíz tiene la función de anclaje, toma de agua y nutrientes, sin embargo la raíz es mucho más que eso. Las raíces secretan un enorme espectro de compuestos alrededor del suelo, es decir en la rizosfera donde esta liberación de compuestos, está relacionada con la diversidad microbiana establecida. Los exudados radiculares son la principal fuente de carbono orgánico liberado por las plantas a la rizósfera (Nguyen, 2003).

Aunque existen diferentes compuestos de naturaleza química diversa que las plantas liberan en la rizosfera, en este ensayo el análisis fue dirigido hacia la fracción de ácidos orgánicos, por ello la extracción se realizó sobre un pH ácido. En la fracción analizada se obtuvieron 39 compuestos como un total general considerando los compuestos encontrados en todos los tratamientos, cada uno en concentraciones diferentes entre cada tratamiento. El número de compuestos o exudados encontrados fue suficiente para demostrar que existe una diferencia entre cada uno de los tratamientos, como nos lo muestra el análisis de componente principal (ACP), es decir que de alguna forma la planta

percibe los VOCs bacterianos, y es capaz de diferenciar los VOCs de cada bacteria; si bien se conoce que las rizobacterias pueden influenciar la liberación de exudados rizosféricos de las plantas (Badrí y Vivanco, 2009), en nuestro mejor conocimiento el presente trabajo es el primer reporte de una modificación específica de los exudados radiculares en respuesta a los VOCs de diferentes rizobacterias.

Entre los compuestos encontrados como exudados radiculares se identificaron ácidos grasos, ftalatos, compuestos derivados del ácido benzoico y alguno que otro ácido orgánico. Los exudados encontrados en los tratamientos son muy interesantes, algunos de estos podría decirnos cuál es la posible señal que los VOCs bacterianos están enviando a la planta y como esta última está respondiendo ante esa señal, es decir como se está interpretando esta comunicación. Los tratamientos con *A. agillis* UMCV2 y *P. aeruginosa* PAO1 son los tratamientos en donde se encuentra la mayoría de compuestos específicos encontrados para este ensayo, es decir compuestos que la planta libera al ser estimulada únicamente con los VOCs de estas bacterias. En el tratamiento con la cepa UMCV2 encontramos compuestos como el ácido cítrico, ferúlico, y 3 ácidos grasos. Otra familia de compuestos encontrados son los que derivan de los ftalatos, como anidrido ftálico, ácido ftálico, diisobutil ftalato reportados como metabolitos secundarios que participan en procesos aleloquímicos, o de competencia por espacio con otras plantas. (ZhongQun *et al.*, 2012; Maldonado-Cortez, 2013).

Se ha reportado que el ácido benzoico es producido de manera natural por las plantas y es precursor del ácido salicílico, ambos ácidos actúan como mediadores de la respuesta al estrés biótico, son reguladores críticos de la interacción de la planta con su ambiente. En el caso del tratamiento la cepa PAO1 aunque no se encontró como tal al ácido benzoico, si están presentes compuestos derivados de este ácido como son el n-propil benzoato, ácido benzoil fórmico, 2,6 dimetilbenzaldehído que bien podrían estar participando como respuesta a algún estrés detectado por la planta (Wildermuth, 2006).

Las plantas liberan exudados radiculares. Los exudados radiculares contienen largas cantidades de carbohidratos que tienden a estimular las poblaciones

bacterianas o influir en la degradación de contaminantes (LeFevre, 2013). Los exudados contienen sustancias tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos, polisacáridos, y compuestos húmicos, algunos de los cuales son conocidos que incrementan la desorción de los compuestos orgánicos hidrófobos de los suelos. (LeFevre, 2013). Aunque se desconoce el papel de cada uno de los compuestos encontrados podemos indagar que los ácidos orgánicos como el ácido cítrico podría ser una muy buena fuente de carbono (Shi *et al.*, 2011; Bais *et al.*, 2006), que la planta está liberando para reclutar a algunas bacterias benéficas mientras que los compuestos derivados del ácido benzoico sugerimos que al ser compuestos que la planta libera cuando se siente estresada por algún motivo, este caso podría ser al detectar los VOCs de la bacteria PAO1, lo que apunta a que las plantas de *S. bicolor* no obstante que incrementan su crecimiento en presencia de los VOCs de la cepa *P. aeruginosa* PAO1, la identifican como patógena. Sin embargo es necesario e interesante realizar más estudios para determinar el papel de cada uno de los compuestos.

### **Efecto de los VOCs de rizobacterias sobre la expresión del gen *SbFRO1***

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas, debido a que estas últimas tienen una necesidad adicional por dicho elemento debido a su relevancia como cofactor de la cadena transportadora de electrones fotosintética, además de estar involucrado en la síntesis de clorofila y mantiene la estructura y funcionamiento de los cloroplastos (Jeong *et al.*, 2008). La enzima férrico quelato reductasa es requerida por la mayoría de las plantas para la adquisición del hierro soluble. Las proteínas férrico quelato reductasa pertenecen a una superfamilia de flavocitocromos que transportan electrones a través de la membrana. (Robinson *et al.*, 1999; Mukherje *et al.*, 2006)

En la parte final de nuestro trabajo analizamos la expresión del gen *SbFRO1* modulado por las diferentes rizobacterias. Se puede observar que cada rizobacteria modula de forma diferencial la expresión de dicho gen. Lo anterior nos sugiere que cada bacteria contiene mecanismos que pueden modular la expresión de genes involucrados en la toma y distribución de hierro, en particular en gramineas como plantas de sorgo.

Nuestros resultados concuerdan con los de Cástulo-Rubio y colaboradores 2015, donde la bacteria UMCV2 y sus volátiles, incluyendo la DMHDA induce la expresión de *SbFRO1*. Por lo tanto, se puede sugerir que al inducirse el gen *SbFRO1*, se mejoran los mecanismos de adquisición de hierro. Se podría hipotetizar, que al igual que los resultados de Cástulo-Rubio y colegas, los genes *SbIRT*, puedan estar siendo modulados por los volátiles de las diversas bacterias empleadas en este trabajo, y por lo tanto, mejorando la distribución del hierro en tejidos como hojas, de forma similar a lo que pasa en plantas con estrategia I para la toma de hierro. Aunque esta hipótesis requiere más análisis.

## 9. CONCLUSIONES

*S. bicolor* responde diferencialmente a los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de *A. agilis* UMCV2, *P. aeruginosa* PAO1, *S. meliloti* 1021, *B. subtilis* M4-96 y *B. cereus* L2-64, impactando en el desarrollo vegetal.

Los tratamientos con *A. agilis* UMCV2 y *P. aeruginosa* PAO1 son los que produjeron un efecto promotor mayor sobre el crecimiento de *S. bicolor*.

Las plantas de *Sorghum bicolor* producen exudados diferentes al ser estimuladas por los VOCs de diferentes especies bacterianas.

Los VOCs de las bacterias *S. meliloti* 1021 y *A. agilis* UMCV2, inducen la expresión del gen *SbFRO1*.

## 10. CONCLUSIÓN GENERAL

Los VOCs producidos por las bacterias PGPR *A. agilis* UMCV2 y la patógena oportunista PAO1 son detectadas diferencialmente por plantas de sorgo. Mientras que la bacteria comensal *Bacillus cereus* L2-64 y *Bacillus subtilis* M4-96 no fueron claramente diferenciadas a través de sus VOCs. La bacteria PGPR *S. meliloti* 1021 es diferenciada por sus VOCs en la expresión del gen *SbFRO1*.

## 11. LITERATURA CITADA

**Alejandro-Ramírez N. 2013.** Modificación del desarrollo temprano de la planta estratega II *Sorghum bicolor* por *Arthrobacter agilis* UMCV2. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico–Biológicas.UMSNH. México. 80 p.

**Antoun H, Prevost D. 2006.** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. PGPR: Biocontrol Biofertil. pp. 1-38.

**Badrí DV, Vivanco JM. 2009.** Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environ. 32: 666-681.

**Baffes J. 1998.** Structural reforms and price liberalization in Mexican agriculture. J Int Development. 10: 575-587.

**Bais H, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol. 57: 233-266.

**Baldwin IT. 2010.** Plant volatiles. Curr Biol. 20: 392-396.

**Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu S, Hernandez JP. 2014.** Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant Soil. 378: 1-33.

**Bensmihen S, de Billy F, Gough C. 2011.** Contribution of NFP LysM domains to the recognition of Nod factors during the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. PLoS ONE. 6 (11): e26114.

**Berendsen R L, Pieterse CM, Bakker PA. 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. Trends Plant Sci. 17: 478-486.

**Calvo GR, Tamayo F, LM, Duchateau, MG. Aguirre BA. 2005.** Sistema Producto Sorgo del estado de Chiapas. Sagarpa-SDR. 117 pp.

**Colangelo EP, Guerinot ML. 2004.** The Essential basic hélix-loop-helix protein FIT1 is requerided for the iron deficiency response. Plant Cell. 16: 3400-341.

**Cambel R, Graves M. 1990.** Anatomy and community structure of the rhizosphere. P. 11-34. En: The Rhizosphere. (Lynch, J. Ed). Wiley interscience Publication. England. 458 pp.

**Cástulo-Rubio D, Alexandre-Ramírez N, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez L, Valencia-Cantero E. 2015.** Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. J. Plant Growth Regul. Doi: 10.1007/s00344-015-9495-8.

**Dudavera N, Negre F. 2005.** Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. Curr Opin Plant Biol. 8: 113-118.

**Dávila AP, Sánchez-Ken J. 1996.** La importancia de las gramíneas como forraje en México. Revista Ciencias. 44:32-34.

**Duke, J. 1983.** *Sorghum Xalmum* Parodi. Handbook of energy crops. [En Línea]:<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke-energy/Sorghum-Xalmum.html>.

**Doggett H. 1998.** *Sorghum*. 2<sup>nd</sup> edition. Longman Scientific and Tecnical. London. 512 p.

**Gage DJ. 2004.** Infection and Invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol Rev. 68: 280-300.

**Gallardo NY. 2007.** Sorgo, una alternativa productiva. Instituto Politécnico Nacional (IPN). [En línea]: <http://www.2000agro.com.mx/biotecnologia/sorgo-una-alternativa-productiva/> [Consulta: 2/9/13].

**González AT. 1961.** Experimentación sobre el cultivo de sorgo en Costa Rica. Tesis de Ingeniería y Agricultura. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica. 160 pp.

**Guerinot, ML. 1994.** Microbial iron transport. Annu Rev Microbiol. 48: 743-772.

**Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano Hernández J, Valencia Cantero E, Reyes de la Cruz H, Macias Rodriguez L. 2010.** Plant growth –

promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*. 51: 75-83.

**Hassan SHT. 2013.** Effect of biofertilization by using three *Azotobacter* isolates and two levels of mineral nitrogen fertilizer on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.,) growth, yield and some chemical constituents. *J Am Sci* 9: 437-446.

**Hell R, Stephan, UW. 2003.** Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*. 216: 541-551.

**Hidalgo JC. 1997.** Evaluación del control químico de cuatro malezas en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), en el valle zamorano. Proyecto especial del Programa de Ingenieros Agrónomos, Zamorano, Honduras. [En línea]: <http://fai.unne.edu.ar/biología/plantas/Alelopatia.htm>.

**Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Mori S.1999.** Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol*. 119: 471-480.

**Insam H, and Seewald MSA. 2010.** Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol Fertil Soils*. 46:199-213.

**Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Nishizawa NK. 2006.** Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup> phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *Plant J*. 45: 335-346.

**Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML. 2008.** Chloroplast Fe (III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10619-10624.

**Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007.** How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*. 5: 619–633.

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

**Kai M, Piechulla B. 2009.** Plant growth promotion due to rhizobacterial volátiles and effect of Co<sub>2</sub>?. FEBS Lett. 538: 3473-3477.

**Kent NL. 1983.** Technology of cereals: An introduction for students of food science and agriculture. Pergamon Press Ltd, Oxford.

**Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286: 885-886.

**Kloepper JW, Schrot MN. 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proc 4th Int Con. Plant Path Bact Angers. 879-882.

**Langer RHM. 1984.** Especies y variedades de gramíneas forrajeras. En: Las pasturas y sus plantas, Capítulo 3, pag.: 75-96. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.

**LeFevre GH, Hozalski RM, Novak PJ. 2013.** Root exudate enhanced contaminant desorption: an abiotic contribution to the rhizosphere effect. Environ Sci Technol. 47: 11545-11553.

**López- Bucio J, -Campos Cuevas JC. Hernández-Calderón E, Velásquez Becerra C. Farías-Rodríguez R, 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*. MPMI. 20: 207-217.

**Madigan MT, Martinko MJ, Parker J. 2004.** Brook Biología de los microorganismos. Décima edición. Prentice Hall. España. 1011 pp.

**Maldonado-Cortez CN. 2013.** Análisis de los exudados radiculares de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a los compuestos orgánicos volátiles que emite la rizobacteria *Arthrobacter agilis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán pp 89.

**Marín-Loaiza JC, Céspedes LC. 2007.** Compuestos volátiles de plantas. Origen emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. Fitotec Mex. 30: 327-351.

**Mengel K, Kirkby E. 2001.** Principles of plant nutrition. Fifth edition. Klumer Academic Press. Netherlands. pp. 84-88.

**Mikami Y, Saito A, Miwa E, Higuchi K. 2011.** Allocation of Fe and ferric reductase activities in mesophyll cells of barley and Sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiol Biochem.* 49: 513-519.

**Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL. 2006.** Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelatereductase (*FRO*) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta.* 223: 1178-1190.

**Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G. 2000.** Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere.* 41: 653-658.

**Nguyen C. 2003.** Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomoie.* 23: 375-396.

**Ngoma L, Babaloo OO, Ahmad F.2012.** Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scientific Sci Res Essay.* 7: 4003-4013.

**Orozco-Mosqueda Ma del C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Farías-Rodríguez R, Valencia-Cantero E. 2013a.** *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol.* 58: 579-585.

**Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E.2013b.** *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (Strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamin emission. *Plant Soil.* 362: 51–66.

**Ortiz-Castro R, Contreras- Cornejo HA. Macías- Rodríguez L. López-Bucio J. 2009.**The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4: 701-712.

**Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Rio R, Campos-García J, López-Bucio J. 2011.** Transkingdom signaling based on bacterial

cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc Natl Acad Sci USA. 108: 7253-7258.

**Ortíz-Castro R, Valencia-Cantero E, López-Bucio J. 2008.** Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. Plant Signal Behav. 3: 263-265.

**Ortiz-Castro R, Valencia-Cantero E, López-Bucio J. 2013.**The beneficial role of rhizosphere microorganisms in plant health and productivity: improving root development and nutrient acquisition. Acta Horticulturae. 1009: 241-250.

**Ortiz-Castro R, Pelagio-Flores R, Mendez-Bravo A, Ruíz-Herrera LF, Campos-García J and López- Bucio J. 2014.** Pyocyanin, a virulence factor producer by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in Arabidopsis. MPMI. 27: 364-378.

**Pérez A, Saucedo O, Iglesias J, Wencomo HB, Reyes F, Oquendo G, Milián EI. 2010.** Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Pastos y Forrajes. 33: 1-25.

**Pérez-Flores XP. 2013.** Efecto de los compuestos volátiles de *Bacillus subtilis* M4-96 en la estimulación del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico– Biológicas.UMSNH. México. 69 p.

**Ping L, Boland W. 2004.** Signals from underground: bacterial volátiles promote growth in *Arabidospsis*. Trends Plant Sci. 9: 263-266.

**Puckette MC, Tang Y, Mahalingam R.2008.**Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions.BMC Plant Biol8.1: 46. Doi: doi:10.1186/1471-2229-8-46.

**Robinson NJ, ProcterCM, Connolly EL, Guerinot ML. 1999.** A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature. 397: 694-697.

**Römheld V, Marschner H. 1986.** Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.* 80: 175-180.

**Ryu CM, Farag MA, Hu ChH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4927-4932.

**Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M. 2012.** Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci Technol.* 22: 855-872.

**Schmidt W. 1999.** Mechanism and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytol.* 141:1-26.

**Schmidt W. 2003.** Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.* 8: 188-193

**Schroth MN, Hancock JG. 1982.** Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.

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

**Shi S, Richardson AE, O'Callaghan M, De Angelis KM, Jones EE, Stewart A, Firestone MK, Condon LM. 2011.** Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 77: 600-610.

**Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC. 2013.** Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ.* 35: 909-919.

**Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J. 2007.** Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 291: 263–273.

**Velázquez- Becerra C, Macías-Rodríguez L,I. López- Bucio J. Altamirano-Hernández J. Flores- Cortez I. Valencia-Cantero E. 2011.** A volatile organic

compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamina, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. Plant Soil. 339: 329-340.

**Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández Soberano C, Valencia-Cantero E. 2013.**The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. Protoplasma. 250: 1251–1262.

**Waters BM, Blevins DG, Eide DJ.2002.** Characterization of *FRO1*, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. Plant Physiol. 129: 85-94.

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

**Wildermuth M C, 2006.** Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. Curr Opi Plant Biology. 9: 288-296.

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

**Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo S, Paré PW.2007.** Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. Planta. 226: 839–851.

**Zhong Qun H, Junan Z, HaoRu Z, Zhi H. 2000.** Different vegetables crops in response to allelopathic of hot pepper root exudates. W Appl Sci J. 9: 1289-1294.