



# UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TITULO:

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Bacillus subtilis* M496 EN  
LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *Arabidopsis*  
*thaliana* POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE LA VÍA AUXÍNICA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.

PRESENTA:

Q.F.B. XOCHITL PAOLA PÉREZ FLORES

ASESORA: D.C. LOURDES I. MACÍAS RODRÍGUEZ

ENERO 2013

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez.

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca No. 368822 que me otorgó para realizar mis estudios de maestría.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto (165738) y el Consejo de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2.24).

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, **Liborio Pérez García** y **Ma. Guadalupe Flores Méndez** por todo su amor, apoyo, confianza y a enseñarme a luchar por todo lo que quiero, son mi orgullo y ejemplo a seguir, los amo.

A mi hermano **Gerardo**, sobrinos, a mi compañero de lucha e ideales **Luis**, por su amor, motivación y los mejores momentos que he vivido.

A toda mi familia y personas que son parte importante de mi vida, por su apoyo, comprensión y gran cariño.

A la **D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez** por aceptarme para formar parte de su grupo de trabajo, compartir conmigo sus conocimientos y experiencias profesionales y personales y por todo su apoyo y confianza brindada, la admiro y respeto.

Al **D.C. Josué Altamirano Hernández** y **Q.F.B Perla T. García** por todo su apoyo y consejos, por siempre estar disponibles para ayudarme y ser grandes personas, este trabajo también es parte de ustedes.

A mis sinodales: **D.C. Elda Beltrán Peña**, **D.C. José López Bucio**, **D.C. Gustavo Santoyo Pizano** y **D.C. Eduardo Valencia Cantero**, por acceder a formar parte de mi comité de evaluación, por sus conocimientos compartidos, comentarios y sugerencias.

Al **M.C. Ramón Pelagio Flores** por su gran apoyo en el análisis de *DR5*:GUS, NPA y mutantes, por compartir sus conocimientos y ser un amigo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio y maestría: **Ale, Amira, Carlos, César, Chava, Deya, Eliseo, Hube, Jorge, Mau, Nancy, Omar, Perla y Rafa**, por todos los buenos momentos que compartimos.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

*En el pensamiento científico siempre están presentes elementos de poesía. La ciencia y la música actual exigen de un proceso de pensamiento homogéneo.*

*Albert Einstein*

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Generalidades de las plantas.....	4
2.2. Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal.....	6
2.2.1. Las auxinas en el crecimiento y desarrollo de las plántulas.....	8
2.2.2. Biosíntesis de auxinas.....	11
2.2.3. Transporte de auxinas.....	14
2.3. Doble y triple mutante en la vía auxínica ( <i>arf 7-1/19-1</i> y <i>tir1/afb2/afb3</i> ).....	19
2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.....	20
2.5. Línea maracadora de respuesta a auxinas <i>DR5::GUS</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
2.6. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	22
2.7. Compuestos orgánicos volátiles en la comunicación planta-microorganismo.....	23
2.8. <i>Bacillus subtilis</i> M496, un caso de estudio.....	35

3. JUSTIFICACIÓN.....	37
4. HIPÓTESIS.....	38
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. Objetivo general.....	38
5.1.2. Objetivos específicos.....	38
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	39
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
7.1. Material biológico.....	40
7.2. Desinfección de las semillas.....	40
7.3. Condiciones de crecimiento.....	41
7.4. Reactivación del <i>Bacillus subtilis</i> M496.....	41
7.5. Establecimiento del sistema de interacción y análisis de las variables del crecimiento.....	42
7.6. Análisis de los compuestos volátiles.....	43
7.7. Análisis de la expresión del marcador de respuesta a auxinas <i>DR5::GUS</i> .....	45
7.8. Análisis del efecto del inhibidor específico de transporte de eflujo de auxinas (NPA).....	46
7.9. Efecto de los VOCs de <i>B. subtilis</i> M496 sobre la morfología de las mutantes <i>arf 7-1/19-1</i> y <i>tir1/afb2/afb3</i> de Arabidopsis.....	46
7.10. Análisis del contenido del AIA.....	47
7.11. Análisis estadísticos.....	48
8. RESULTADOS.....	50

8.1.	Efecto de los compuestos volátiles de <i>Bacillus subtilis</i> M496 sobre la acumulación de biomasa en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
8.2.	Efecto de los compuestos volátiles emitidos por <i>B. subtilis</i> M496 sobre las variables de la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> .....	53
8.3.	Efecto de la densidad celular de <i>Bacillus subtilis</i> M496 sobre el crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	55
8.4.	Análisis de la expresión de <i>DR5::GUS</i> , en plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496.....	57
8.5.	Análisis del efecto del inhibidor del transporte de auxinas NPA, sobre el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> en presencia o ausencia de los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496.....	60
8.6.	Análisis de la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas <i>DR5::GUS</i> , en plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de NPA.....	65
8.7.	Análisis del efecto de 0.5, 1, 2, 4 y 8 $\mu$ M de NPA, sobre el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> a 10 ddi con los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496.....	69
8.8.	Análisis de la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas <i>DR5::GUS</i> , en plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de diferentes concentraciones de NPA.....	72
8.9.	Cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) en plántulas de <i>A. thaliana</i> expuesta a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496.....	74

8.10. Análisis del efecto de los compuestos volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 sobre el crecimiento y desarrollo de mutantes en la vía de señalización de auxinas.....	75
8.11. Determinación del perfil de compuestos volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 durante su interacción con <i>A. thaliana</i> por SPME .....	80
9. DISCUSIÓN.....	84
10.PERSPECTIVAS.....	93
11.CONCLUSIÓN.....	94
12.REFERENCIAS.....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del sistema radicular.....	6
Figura 2. Fitohormonas.....	8
Figura 3. Estructura química de las auxinas naturales.....	9
Figura 4. Homeóstasis de las auxinas.....	11
Figura 5. Rutas de biosíntesis del AIA.....	13
Figura 6. Transporte polar de auxinas.....	15
Figura 7. Localización de PIN en la raíz de <i>A. thaliana</i> .....	16
Figura 8. Señalización de las auxinas.....	19

Figura 9. Efecto de los VOCs emitidos por las PGPR sobre el crecimiento foliar de <i>A. thaliana</i> .....	25
Figura 10. Perfiles cromatográficos de <i>Bacillus subtilis</i> GB03 y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN937a.....	26
Figura 11. Efecto promotor dosis dependiente del 2,3-butanediol sobre el crecimiento foliar de <i>A. thaliana</i> .....	27
Figura 12. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en plántulas expuestas a los VOCs de <i>B. subtilis</i> GB03.....	29
Figura 13. Efecto de la aplicación del NPA en la expresión del marcador de respuesta a auxinas y sobre el crecimiento de la plántula expuesta a VOCs de <i>B. subtilis</i> M496.....	31
Figura 14. Efecto de los compuestos volátiles de diferentes rizobacterias sobre la biomasa de <i>A. thaliana</i> .....	32
Figura 15. Efecto de los volátiles de las rizobacterias sobre la morfogénesis de la raíz.....	33
Figura 16. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por las PGPR sobre la expresión de genes regulados por auxinas.....	34
Figura 17. Efecto de los VOCs emitidos por <i>B. subtilis</i> M496 sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .....	36

Figura 18. Efecto de los compuestos volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 sobre el crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
Figura 19. Efecto de los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> .....	54
Figura 20. Efecto de la densidad celular bacteriana de <i>B. subtilis</i> M496 sobre el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> .....	56
Figura 21. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el follaje de plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496.....	58
Figura 22. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria (MRP) y en la zona de formación de primordios (ZFP).....	59
Figura 23. Efecto del NPA sobre el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> sin inóculo e inoculada con <i>B. subtilis</i> M496.....	62
Figura 24. Efecto del NPA y los VOCs de <i>B. subtilis</i> M496, sobre la rizogénesis de <i>A. thaliana</i> .....	64
Figura 25. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en follaje de plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de NPA.....	66
Figura 26. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria (MRP) en plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de NPA.....	68

Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de NPA sobre el crecimiento y desarrollo de <i>A. thaliana</i> expuesta a los VOCs de <i>B. subtilis</i> M496.....	70
Figura 28. Efecto de diferentes de NPA y los VOCs de <i>B. subtilis</i> M496 sobre la arquitectura radicular.....	71
Figura 29. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en follaje de plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de varias concentraciones de NPA.....	72
Figura 30. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria de plántulas expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 en presencia de diferentes concentraciones de NPA.....	73
Figura 31. Cuantificación de AIA en plántulas de <i>A. thaliana</i> sin inóculo y expuestas a los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 después de 10 ddi.....	75
Figura 32. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por <i>B. subtilis</i> M496 sobre el crecimiento y desarrollo de mutantes de <i>A. thaliana</i> .....	77
Figura 33. Efecto de los volátiles de <i>B. subtilis</i> M496 sobre la morfogénesis radicular de mutantes de <i>A. thaliana</i> .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos volátiles de <i>A. thaliana</i> , <i>B. subtilis</i> M496 y de la interacción planta-bacteria identificados por SPME empleando GC-MS.....	82
---	----

## RESUMEN

Las plantas son organismos que regulan su crecimiento y desarrollo mediante la producción de fitohormonas, entre las cuales las auxinas son los reguladores maestros de dichos procesos. Sin embargo, debido a este estilo de vida sésil el crecimiento y desarrollo se ve influenciado también por diversos factores externos como la presencia de microorganismos del suelo rizosférico. Las rizobacterias benéficas mejor conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (**P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria por sus siglas en inglés) promueven el crecimiento y desarrollo vegetal por diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra la activación de las diversas vías de señalización de los fitoreguladores por la emisión de volátiles (VOCs). En este trabajo se determinó si *Bacillus subtilis* M496 emite VOCs que estimulan el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica. Para lograr el objetivo anterior, se empleó un sistema de interacción planta-rizobacteria en el que la comunicación entre ambos organismos fuera exclusivamente por VOCs. Con este sistema se estudió el efecto de la densidad celular bacteriana sobre la respuesta de la planta y se empleó un inhibidor específico del transporte de auxinas (NPA), así como la línea transgénica *DR5::GUS* y las mutantes afectadas en la respuesta a auxinas (*arf7-1/19-1* y *tir1/afb2/afb3*). El análisis de VOCs que emite la bacteria y durante su interacción con las plántulas se realizó por la técnica de microextracción en fase sólida (SPME). En tanto que el contenido de AIA se cuantificó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). Los resultados obtenidos mostraron un fuerte incremento en las biomásas

foliar y radicular en las plántulas expuestas a los VOCs emitidos por *B. subtilis* M496; también se observaron cambios significativos en la arquitectura radicular de la plántula como: incremento en el número de raíces laterales (NRL), aumento en la longitud de la raíz primaria (LRP) y raíces laterales (LRL). En cuanto a la parte aérea, los VOCs promovieron una mayor formación de hojas de roseta en comparación a las plántulas sin inóculo. Incrementar la densidad celular a tres estrías ( $2.2 \times 10^9$  CFU/mL) durante la interacción plántula-rizobacteria, inhibió el crecimiento de las plántulas con respecto a las plántulas inoculadas con una estría ( $7.3 \times 10^8$  CFU/mL), aunque la densidad de tres estrías promovió el crecimiento de la plántula en comparación a las plántulas sin inocular. El análisis de la línea transgénica *DR5::GUS*, mostró que las plántulas expuestas a los VOCs bacterianos presentaron una mayor expresión del marcador en los meristemas y nervaduras de las hojas, y en el meristemo de la raíz primaria, lo cual sugiere una activación del transporte de auxinas por parte de la rizobacteria. La aplicación del inhibidor del transporte de eflujo de auxinas NPA confirmó que los VOCs activan el transporte de auxinas. La cuantificación del contenido de AIA, mostró que estos compuestos inducen la síntesis de este fitoregulador en las plántulas. Los resultados con la doble y triple mutante en la vía de señalización auxínica específicamente en los receptores y factores de respuesta, mostraron que el incremento en la biomasa y la activación de programas de desarrollo como la rizogénesis es dependiente de la auxina. El análisis del perfil de VOCs de *B. subtilis* M496 en cultivo puro, indicó la presencia de acetoína en un 70 %, la cual se incrementó durante la interacción con *A. thaliana* en un 90 %. Debido a la abundancia de este compuesto se sugiere que la acetoína pudiera ser la

responsable de los efectos observados en la plántula sobre la promoción del crecimiento. Con este estudio se demuestra que *B. subtilis* M496 estimula el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* por un mecanismo dependiente de la densidad celular por activación de la síntesis y transporte de la auxina.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles y multicelulares cuyo crecimiento y desarrollo dependen de factores internos y externos, tanto bióticos como abióticos. Entre los primeros, se encuentra la producción de fitohormonas, donde destaca la participación de las auxinas que inducen una gran variedad de procesos para modular el crecimiento y desarrollo vegetal como la elongación, diferenciación celular, tropismo, dominancia apical y rizogénesis (Woodward y Bartel, 2005). Entre los factores externos se encuentran los del tipo biótico que de una u otra manera impactan a los internos, modulando así, los procesos morfogénéticos en la planta.

Estos organismos han desarrollado mecanismos de defensa y estrategias de comunicación con otros que les permiten adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno. En la rizósfera, que es el volumen de suelo que rodea la raíz (Pérez *et al.*, 2002), se establecen las interacciones entre las plantas y los microorganismos del suelo. Tales interacciones, pueden ser: asociaciones mutualistas con microorganismos benéficos como Rhizobiales, micorrizas, interacciones de protocooperación con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), interacciones neutras o bien perjudiciales en el caso de microorganismos patógenos.

Las PGPR son un grupo de rizobacterias que pertenecen a una gran diversidad de géneros entre los que se encuentran principalmente *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, entre otros (Ping y Boland, 2004; Ortíz-Castro *et al.*, 2008). Dichos

microorganismos han sido empleados como bioinoculantes para incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, permitiendo así una estimulación del crecimiento vegetal. Además algunos bioinoculantes pueden biocontrolar diversos fitopatógenos, lo que les confiere un valor agregado (Lugtenberg *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha establecido que la comunicación planta-PGPR se realiza a tres niveles: mediante la producción de compuestos difusibles que se encuentran disponibles en la rizósfera, durante el contacto físico al momento de la colonización y por la emisión de VOCs (Kumar *et al.*, 2006; Lugtenberg *et al.*, 2002 y Steeghs *et al.*, 2004).

Entre los compuestos difusibles que producen las PGPR están las fitohormonas como las auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, giberelinas y brasinoesteroides, entre otros que activan programas de desarrollo vegetal como la rizogénesis. Por su parte, las plantas secretan una gran diversidad de sustancias de alto y bajo peso molecular en forma de exudados que incluyen a los mucílagos, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, aminoácidos, fitosideróforos, flavonoides y vitaminas (Kumar *et al.*, 2006).

En cuanto a los VOCs que emiten las PGPR, se ha reportado que son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo vegetal (Ryu *et al.*, 2003). Los autores antes mencionados observaron que los VOCs emitidos por *Bacillus subtilis* GB03 promovían el desarrollo del área foliar en *Arabidopsis thaliana* y señalaron como posibles responsables a la acetoina y al 2,3-butanediol. Dicho estudio abrió un nuevo campo de investigación enfocado al análisis de los VOCs bacterianos sobre

la activación de las vías de señalización hormonales en las plantas, que a su vez estimulan el crecimiento vegetal. Posteriormente Zhang *et al.* (2007), determinaron que los VOCs de *B. subtilis* GB03 estimulaban la respuesta de la planta mediante un mecanismo dependiente de la vía auxínica. Con base a lo anterior, en el presente estudio se determinó si los VOCs liberados por la rizobacteria *Bacillus subtilis* M496 estimulan el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica, para lo cual se empleó al marcador de respuesta a auxinas (*DR5::GUS*) y las mutantes doble en los factores de respuesta a auxinas (*arf 7-1/19-1*) y triple en los receptores nucleares de auxinas (*tir1/afb2/afb3*).

## 2. ANTECEDENTES

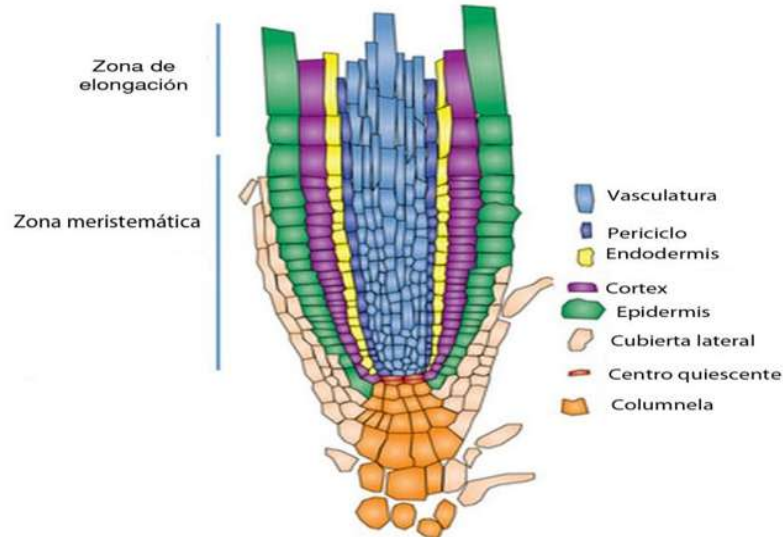
### 2.1. Generalidades de las plantas

Las plantas son organismos multicelulares complejos en los cuales existe división de funciones entre las células que forman los diferentes tejidos y órganos. En una planta podemos distinguir dos grandes sistemas, el follaje y la raíz. El follaje o parte aérea, incluye los tejidos vegetales que crecen por encima del suelo: tallo, hojas, brotes y frutos y es el sistema encargado de llevar a cabo la fotosíntesis y reproducción de la planta. El meristemo apical del follaje o SAM por sus siglas en inglés (shoot apical meristem) es el encargado de formar las hojas en la punta de las ramas integrando la información proveniente del primordio de la hoja preexistente antes de que produzca una hoja nueva (Sinha, 1999). Las hojas pueden ser simples como en *Arabidopsis* y tabaco, o compuestas de varias subunidades como en el tomate y chícharo (Sinha, 1999).

Por otra parte, el sistema radicular se encuentra formado por la raíz primaria, raíces laterales y adventicias y los pelos radiculares, todas estas estructuras le permiten a la planta anclarse al suelo y facilitar la captura de agua y nutrientes (Himanen *et al.*, 2002). Además de estas funciones fisiológicas, el sistema radicular es el mediador en el establecimiento de las interacciones simbióticas, neutras o perjudiciales con diversos microorganismos del suelo.

La primera raíz derivada de la planta se conoce como radícula, la cual se forma después de la germinación de la semilla y conduce al desarrollo de la raíz

primaria. Las raíces que se forman a partir de esta última son las raíces laterales o secundarias. Las raíces adventicias se originan en el tallo o las hojas (Clark y Fisher, 1986). La raíz está formada por varias capas celulares: epidermis, cortex, endodermis, periciclo y cilindro vascular. Las células que forman estos tejidos son producidas por cuatro células madre o iniciales que se encuentran localizada en el ápice de la raíz (Greulach y Edison, 1970). A lo largo de la raíz primaria se localizan tres regiones: meristemática donde se lleva a cabo la división celular, zona de elongación y de diferenciación (Fig. 1) (Dolan *et al.*, 1993). En el ápice radicular se localizan alrededor del centro quiescente las células iniciales, que constituyen un reservorio de células indiferenciadas. El centro quiescente desempeña un papel esencial en la organización y desarrollo de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). En la raíz de *Arabidopsis thaliana* la función del centro quiescente consiste en mantener el estado indiferenciado de las capas de células madre que se hallan en contacto con él y, posiblemente, ayudarlas a conservar su naturaleza.



**Figura 1. Estructura del sistema radicular.** Las células meristemáticas se encuentran cerca de la punta de la raíz, estas células generan la cofia y los tejidos superiores de la raíz. En la raíz se presentan tres zonas: zona de división, elongación y diferenciación siendo en esta última zona donde las células se diferencian para producir el xilema, floema, corteza y los pelos radiculares a partir de las células de la epidermis (Dolan *et al.*, 1993; Lincoln y Eduardo, 2002).

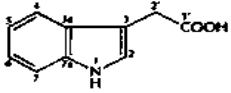
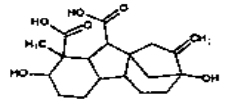
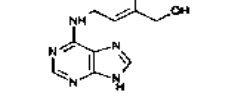
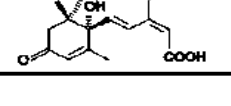
El crecimiento y desarrollo del follaje y la raíz depende de factores internos de la planta en el que las fitohormonas juegan un papel importante en el establecimiento del fenotipo. También los factores externos bióticos o abióticos pueden alterar la producción de hormonas y por lo tanto modificar el fenotipo original que tenía la planta.

## 2.2. Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal

Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto orgánico sintetizado en un órgano específico de la planta y transportado a otra parte, donde produce una respuesta fisiológica, son moléculas pequeñas esenciales para la regulación del

crecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia de la planta, que actúan como moléculas señal a bajas concentraciones (Lincoln y Eduardo, 2002). Sin embargo, las respuestas del órgano destino no necesariamente son promotoras, porque procesos como crecimiento o diferenciación en ocasiones son inhibidos (Salisbury y Ross, 1992; Lincoln y Eduardo, 2002). Este grupo de moléculas son de distinta naturaleza química (Fig. 2), e involucra a las fitohormonas clásicas como las como son auxinas, ácido abscísico, citocininas, giberelinas y etileno, cuya función ha sido ampliamente estudiada (Teale *et al.*, 2006); así como otras moléculas más pequeñas como los brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico, N-acil etanolaminas, glutamato y óxido nítrico (Gray, 2004; López-Bucio *et al.*, 2006; Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2007; Santner *et al.*, 2009).

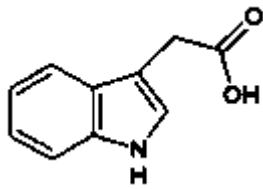
Cabe mencionar que el control entre el crecimiento, desarrollo y defensa en la planta se debe a una compleja red de comunicación cruzada en las vías de señalización hormonal, lo que permite a la planta adaptarse rápidamente a diferentes ambientes. Un ejemplo de la comunicación cruzada entre las fitohormonas es la establecida entre auxinas y citocininas que interactúan en el control de varios procesos del desarrollo en plantas, particularmente en la dominancia apical y desarrollo de la raíz y el brote, además, las auxinas regulan los niveles de citocinina y viceversa (Nordström *et al.*, 2004).

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

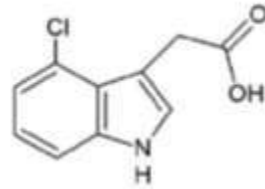
**Figura 2. Fitohormonas.** Las cinco fitohormonas más estudiadas y sus efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Teale *et al.*, 2006).

### 2.2.1. Las auxinas en el crecimiento y desarrollo de las plántulas

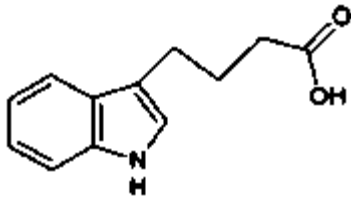
Las auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados y su nombre deriva de la palabra griega *auxein* que significa crecer. Existen un gran número de auxinas naturales: el ácido 1-naftalen acético, indol-3-etanol, indol-3-acetaldehído, ácido fenol acético, ácido indol-3-butírico, ácido 4-cloroindol-3-acético y el ácido indol-3-acético (AIA) (Fig. 3) (Simon y Petrasek, 2011).



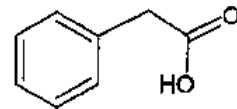
Ácido indol-3-acético (AIA)



Ácido 4-cloroindol-3-acético (AIA-4-Cl)



Ácido indol-3-butirico (AIB)



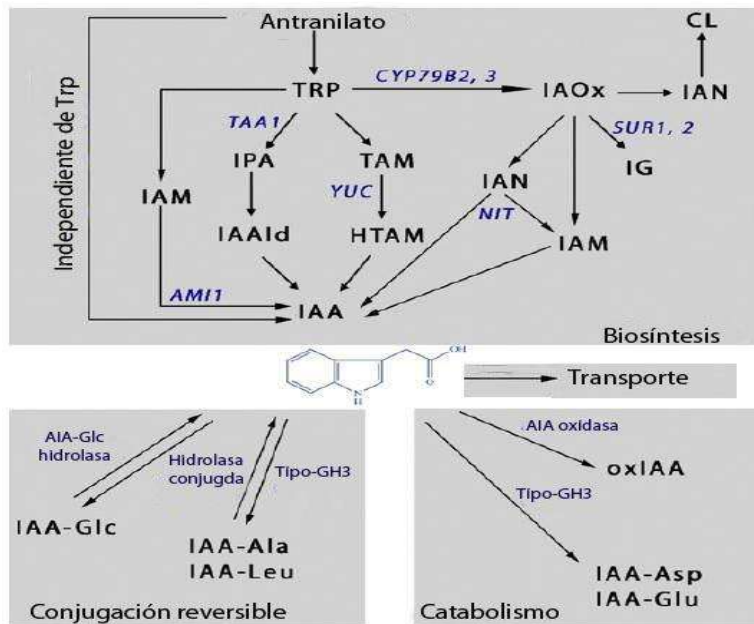
Ácido fenol-acético (AFA)

**Figura 3. Estructura química de las auxinas naturales.** AIB sirve como un almacén del AIA, AIA-4-Cl está involucrado en la estimulación del crecimiento del pericarpio, AFA presenta efectos más débiles que el AIA (Simon y Petrasek, 2011).

El AIA es la principal auxina vegetal y se sintetiza por dos vías, una dependiente de triptófano y la otra del ácido shikímico (Woodward y Bartel, 2005). El AIA actúa como molécula señal en procesos de gran importancia para el desarrollo de la planta durante todo su ciclo de vida. Algunos de estos procesos regulados por dicha fitohormona son la división, elongación y diferenciación celular, formación de meristemas apicales y radicales (Bishopp *et al.*, 2006; Teale *et al.*, 2006). Las auxinas están implicadas en la formación y emergencia de raíces laterales, organización del meristemo y respuesta gravitrópica (Teale *et al.*, 2006; Michniewicz *et al.*, 2007). Sin embargo, los efectos auxínicos son dependientes de la concentración de esta hormona, de tal manera que en *Arabidopsis*

concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M promueven el crecimiento de hipocotilos, follaje y disminución de la longitud de la raíz primaria, mientras  $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  M estimulan la longitud de la raíz primaria se ve promovida (Woodward y Bartel, 2005; Benjamis y Scheres, 2008).

La concentración de auxinas es regulada por un proceso homeostático, que mantiene un equilibrio interno estable entre la síntesis, conjugación, transporte y catabolismo (vía oxidativa) y que permite el crecimiento y desarrollo favorable de la planta (Fig. 4) (Eckardt, 2005; Tromas y Perrot, 2010). Las auxinas pueden estar en los tejidos de forma activa o inactiva mediante la conjugación con una gran variedad de moléculas, las cuales pueden ser de bajo peso molecular como la glucosa o de alto peso molecular como las glicoproteínas (Teale *et al.*, 2006). Entonces los procesos de conjugación y catabolismo son los que disminuyen los niveles de auxinas activas. Por otro parte, la síntesis *de novo* y la hidrólisis de los conjugados proporcionan la forma activa de auxinas en la planta, contribuyendo estos procesos a la regulación del desarrollo. Sin embargo, es el gradiente de concentración que se mueve entre las células lo que más influye en la regulación del desarrollo de la planta; de este modo el transporte de auxinas es uno de los procesos más importantes en el crecimiento de la planta (Teale *et al.*, 2006).

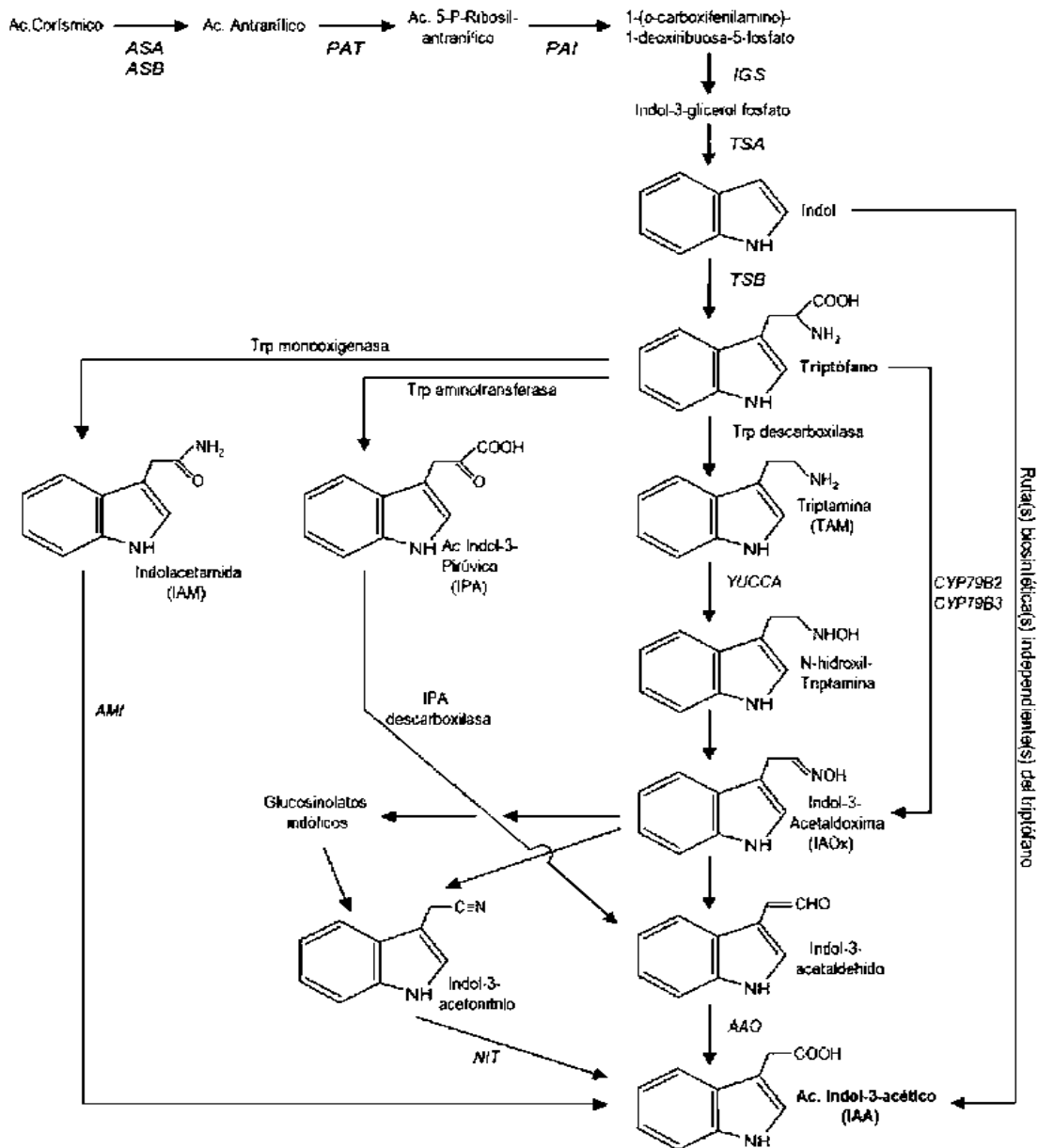


**Figura 4. Homeóstasis de las auxinas.** Los cuatro mecanismos que contralan la homeóstasis de auxinas, son: la biosíntesis, conjugación, transporte y catabolismo (Tromas y Perrot, 2010).

### 2.2.2. Biosíntesis de auxinas.

El AIA se sintetiza mayoritariamente en las hojas jóvenes así como en regiones con crecimiento activo como los cotiledones y los primordios de las raíces (Ljung *et al.*, 2001). Sin embargo, la síntesis de esta auxina no se limita a estos sitios, sino que puede ocurrir en la mayoría de los tejidos (Ljung *et al.*, 2005). Se ha propuesto que el AIA puede provenir de dos rutas principales, la dependiente de triptófano que a su vez consta de cuatro rutas que se distinguen por los siguientes intermediarios: indol-3-acetamida (IAM), indol-3-pirúvico (IPA), triptamina (TAM) e indol-3-acetaldoxima (IAOx). La ruta independiente de triptófano, parte del antranilato (vía del ácido shikímico) (Fig. 5) (Delker *et al.*, 2008; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010). La ruta IPA es la más común de las vías dependientes de

triptófano e involucra la reacción de desaminación del IPA seguida de una descarboxilación que resulta en la síntesis del indol-3-acetaldehído, el cual es oxidado para formar AIA. La vía TAM es similar a la vía IPA donde el orden de las reacciones de desaminación y carbonización está invertido. La vía dependiente del triptófano es la del IAN, en la cual el triptófano es convertido a indol-3-acetaldoxima y posteriormente a indol-3-acetonitrilo. Este último por medio de la acción de una nitrilasa lo convierte a AIA. Otra vía dependiente del triptófano es la que usa el intermediario IAM, la cual es utilizada por varias bacterias, involucrando la participación de la triptófano monooxigenasa e IAM hidrolasa (Jordán y Casaretto, 2006) (Fig. 5).

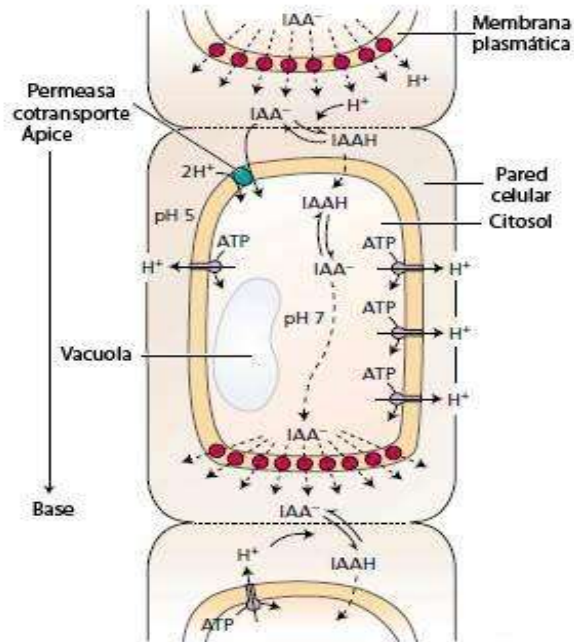


**Figura 5. Rutas de biosíntesis del AIA.** Las vías dependientes de triptófano son IAM, IPA, TAM e IAOx, las vías independientes de triptófano se muestran del lado derecho de la imagen (Jordán y Casaretto. 2006).

### **2.2.3. Transporte de auxinas.**

Las auxinas sintetizadas en los diferentes tejidos de la planta, son transportadas para regular el desarrollo. La distribución de las auxinas se lleva a cabo por dos rutas: transporte no polar y polar. El primer tipo es rápido y se lleva a cabo a larga distancia a través del floema, e involucra el flujo de auxinas desde los tejidos fuente a los blanco. Por otra parte, el transporte polar, se efectúa célula-célula, lentamente (Michniewicz *et al.*, 2007; Bohn-Courseau, 2010). Las auxinas son transportadas de la parte aérea a la raíz, (basipétalo). Una vez en la raíz, las auxinas continúan llegando a la punta principalmente a través de tejidos vasculares, a este movimiento se le denomina acropétalo. Las auxinas en la raíz se recirculan a las partes aéreas, con un movimiento basipétalo (Michniewicz *et al.*, 2007).

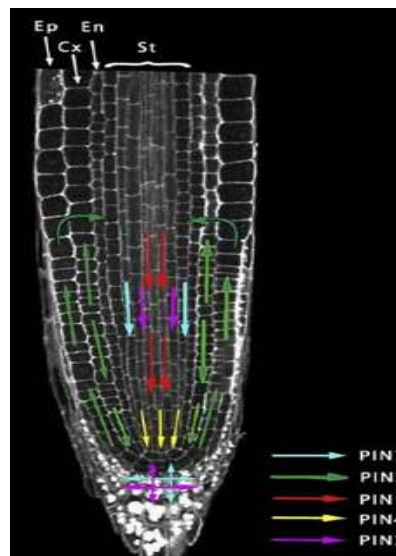
El transporte polar de auxinas es específico y requiere energía, las células utilizan ATPasas de la membrana plasmática para bombear protones del citosol a las paredes celulares. El pH ácido de las paredes celulares hace que el grupo carboxilo de las auxinas esté menos disociado que en el citosol, donde el pH es de 7 a 7.5. En el interior del citosol, el pH mayor hace que el grupo carboxilo de la auxina se disocie y adquiera carga negativa. A medida que aumenta la concentración de auxina cargada en el citosol, su salida sería más fácil en términos termodinámicos. Sin embargo, debido a su carga negativa, el transporte polar de auxinas requiere de un transportador de eflujo en el extremo basal de la célula (Salisbury y Ross, 1992; Lincoln y Eduardo, 2002) (Fig. 6).



**Figura 6. Transporte polar de auxinas.** En la imagen se muestra el movimiento de las auxinas entre las células y como van cambiando su carga a medida que van atravesando la pared celular y el citosol (Lincoln y Eduardo, 2002).

El transporte polar está mediado por el uso de acarreadores específicos de entrada (influjo) como las proteínas AUX1, compuestas de 485 aminoácidos y 11 dominios transmembranales (Bennett *et al.*, 1996) y de salida (eflujo), como los transportadores de la familia PIN, MDR (resistentes a múltiples fármacos) y PGP (fosfoglicoproteínas). La familia de las PIN consiste de proteínas específicas de la membrana plasmática integral que contienen de 6 a 10 dominios transmembranales y se expresan en tejidos y células que transportan auxinas y se encuentran localizadas asimétricamente (Mravec *et al.*, 2008). Las PIN son requeridas en todos los procesos del desarrollo vegetal que involucran a las auxinas: embriogénesis, organogénesis, actividad del meristemo radicular,

diferenciación y regeneración de tejidos, así como tropismo (Mravec *et al.*, 2008). Las proteínas PIN muestran distinta localización subcelular polar, la cual es determinada por la dirección del flujo de auxinas. En el meristemo de la raíz, PIN 1, 3, 4 y 7 se encuentran orientadas hacia el ápice de la raíz en las células del haz vascular, llevando el flujo de auxinas hacia el centro quiescente (QC). La proteína PIN2 se localiza en las células epidérmicas de la parte apical y es la encargada de redirigir el flujo de auxinas a la zona meristemática (Muller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2003) (Fig. 7). Un segundo grupo de transportadores de eflujo son las fosfoglicoproteínas PGP, éstos tienen una localización celular principalmente apolar, se ha propuesto que refuerzan el flujo de auxinas en la raíz mediado por las PIN mediante la estabilización de la localización de estos transportadores.



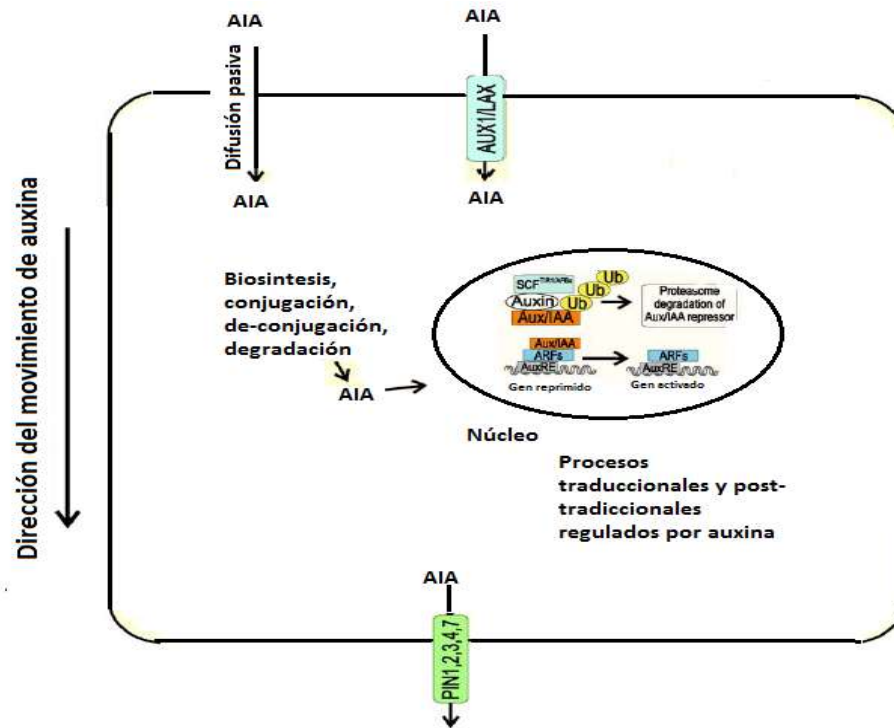
**Figura 7. Localización de los transportadores de eflujo PIN en la raíz de *A. thaliana*.** Localización polar de las proteínas PIN en las diferentes capas celulares. Ep: epidermis, Cx: cortex, En: endodermis y St: tejidos de la estela (Tromas y Perrot, 2010).

El transporte de auxinas ha sido estudiado con inhibidores como el ácido N-1-naftil-talámico (NPA) y el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (Fujita y Siono, 1996), estos dos compuestos no son compuestos naturales de las plantas, son compuestos químicos que se han utilizado para estudiar el transporte de auxinas, los cuales presentan efectos sobre la elongación del tallo y la raíz (Li *et al.*, 1994), el tropismo (Takahashi y Suge, 1991) y formación de pelos radicales (Gaither, 1975). Se sabe que los inhibidores del transporte de auxinas lo alteran cuando las auxinas son transportadas del ápice del brote al de la raíz. Varios de los efectos causados por el NPA, se ha propuesto que se deben a la interferencia con los transportadores de eflujo de auxinas (Bailly *et al.*, 2008), como los PGP. Dichos transportadores presentan tres sitios de unión: uno para las auxinas y los otros dos con una afinidad específica al NPA. Una vez realizada esta unión, estos transportadores no pueden regular de manera correcta a los transportadores PIN, por lo cual el transporte de eflujo de auxinas se ve afectado de manera general (Depta y Rubery, 1984).

Todos los procesos anteriormente mencionados regulan fuertemente el crecimiento y desarrollo de una planta y debido a la importancia de dichos procesos actualmente se cuenta con una amplia variedad de herramientas para estudiarlos de una manera más adecuada, una de estas herramientas es la planta de *Arabidopsis thaliana*.

Por otra parte, la percepción de las auxinas involucra tres componentes principales: A) receptores nucleares de auxinas de la familia TIR1/AFB's y el receptor de la membrana plasmática, el ABP1; B) los represores AUX/IAA y C)

factores transcripcionales de la familia ARF que permiten la expresión de los genes de respuesta temprana a las auxinas (Fig. 8). Los receptores nucleares de la familia TIR1/AFB's transducen la señal en respuestas específicas al regular la expresión de los genes de respuesta temprana agrupados en tres clases: *SAUR*, *GH3* y *AUX/IAA*. Los genes *SAUR* codifican RNAm pequeños y de vida corta; en *Arabidopsis* se han reportado aproximadamente 70, entre los *GH3* (20 genes en *Arabidopsis*), algunos codifican proteínas que conjugan al AIA. Finalmente los 29 genes *AUX* reportados en *Arabidopsis* codifican para proteínas nucleares de vida corta (Simon y Petrusek 2011).



**Figura 8. Señalización de las auxinas.** El AIA puede ingresar en un bajo porcentaje, mediante difusión pasiva. Sin embargo, para un mayor transporte se requieren transportadores de influjo de auxina AUX1/LAX. Los receptores de auxina nucleares de la familia TIR1/AFB de proteínas F-box, interactúan con el AIA para iniciar la degradación de los represores AUX/IAA mediante su ubiquitinación. Al degradar al represor, se liberan los factores de transcripción ARF, los cuales transcriben los genes de respuesta temprana a auxinas. Posteriormente, las auxinas salen de la célula mediante los transportadores de eflujo de la familia PIN (Modificado de Simon y Petrasek 2011).

### 2.3. Doble y triple mutante en la vía auxínica (*arf 7-1/19-1* y *tir1/afb2/afb3*).

Los ARF son los factores de transcripción que en ausencia de auxinas forman heterodímeros inactivos con las proteínas AUX/IAA, los ARF 7 y 19 son requeridos para el desarrollo de las raíces laterales. La familia TIR1/AFB's es una de las familias de receptores de auxinas, los cuales transducen la señal en respuestas

específicas al regular la expresión de los genes de respuesta temprana. Las mutaciones en las proteínas ARF dan como fenotipo plantas sin formación de raíces laterales y las mutaciones en TIR/AFB generan plantas con una deficiente formación de la raíz primaria y escasa formación de raíces laterales (Okushima *et al.*, 2007; Dharmasiri *et al.*, 2005).

#### **2.4. *Arabidopsis thaliana* como planta modelo.**

*Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de las *Brassicaceas* y está relacionada a plantas comestibles como el brócoli, la coliflor, la col y los rábanos (Koornneef *et al.*, 2004). Esta planta reúne numerosas ventajas que la hacen un modelo del estudio vegetal: su tamaño pequeño (30 cm) permite crecer un gran número de plantas en un espacio reducido, su ciclo de vida es corto de 6 a 8 semanas, presenta abundante producción de semillas (más de 10,000 semillas por planta), su autofertilización facilita mantener líneas y realizar cruzas controladas y existen diferentes “ecotipos” de esta planta. Su genoma organizado en 5 cromosomas está totalmente secuenciado. Al poseer uno de los genomas más pequeños detectados en plantas, es posible disponer de un banco de semillas mutagenizadas (Bennetzen, 2001; Dinneny y Benfey, 2009). Además de todas estas ventajas, la arquitectura del sistema radicular es una de las más simples haciéndola manejable durante la manipulación experimental (Scheres y Wolkenfelt, 1998).

## **2.5. Línea marcadora de respuesta a auxinas *DR5::GUS* en *Arabidopsis thaliana*.**

El marcador de genes regulados por auxinas *DR5::GUS* es una fusión entre un elemento de un promotor de respuesta a auxinas sintético, al gen reportero de la enzima beta-glucuronidasa (*GUS*), la cual se va a expresar en presencia de auxinas, y si además se encuentra presente, el sustrato de la enzima, al ser hidrolizado dará como resultado un precipitado azul (Ulmasov *et al.*, 1997). La línea reportera *DR5::GUS* es un marcador enfocado a la expresión de genes regulados por auxinas en plantas.

La expresión de genes durante el desarrollo de las plantas está regulada en gran parte por las fitohormonas. Recientemente se han identificado y caracterizado un grupo de genes de respuesta temprana que son inducidos por auxinas. Uno de estos genes, el *GH3*, contiene un promotor de respuesta a auxina, el cual presenta tres elementos (AuxREs) que pueden funcionar independientemente uno de otro. Los elementos acoplados confieren una expresión diferencial en presencia o ausencia de auxinas del gen reportero *GUS* presente en la fusión *DR5::GUS*, causando una represión de la expresión del gen reportero en ausencia de auxinas y la activación de la expresión en presencia de éstas. El promotor *DR5* es un tándem sintético de repeticiones directas de 11 pb del elemento de respuesta a auxinas D1-4 perteneciente al promotor del gen *GH3* (Ulmasov *et al.*, 1997). Por otra parte, el gen de la beta glucuronidasa (*GUS*) es un gen reportero que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa, que cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos tipo  $\beta$ -glucurónidos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-GLUC), el 4-metil umbeliferil glucurónido (MUG), el *p*-nitrofenil glucurónido (PNPG), entre

otros. La hidrólisis de dichos sustratos puede ser detectada mediante técnicas histoquímicas. El sustrato que actualmente se utiliza para la localización histoquímica de la actividad de la beta-glucuronidasa en los tejidos es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-Gluc). Este último forma un precipitado color azul en el sitio de actividad de la enzima. Este precipitado azul es el producto de la dimerización oxidativa estimulada por el oxígeno atmosférico y se amplifica el color adicionando un catalizador de la oxidación como la mezcla de ferricianuro/ferrocianuro de potasio (Jefferson *et al.*, 1987).

## **2.6. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o por sus siglas en inglés PGPR, se encuentran presentes en el suelo de manera natural como parte de los microorganismos de la rizósfera, estableciendo una relación simbiótica con la planta (Banchio *et al.*, 2009). Las PGPR incluyen un amplio rango de bacterias colonizadoras de la raíz con la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes y con ello el crecimiento y peso de la planta resultan favorecidos (Klopper y Schroth, 1978; Ping y Boland, 2004; Kai y Piechulla, 2009). Además las PGPR estimulan la germinación y controlan la presencia de fitopatógenos (Banchio *et al.*, 2009). Dentro de la categoría de las PGPR se encuentran bacterias tanto Gram+ como Gram- (Haas *et al.*, 2002), siendo los géneros más abundantes *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Whipps, 2001; Ping y Boland, 2004; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Banchio *et al.*, 2009). Los mecanismos propuestos para la promoción del crecimiento de la planta

por las PGPR incluyen la síntesis bacteriana de fitohormonas como el AIA, las citocininas y las giberelinas (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999). Por todos los beneficios que representan para las plantas, las PGPR se han propuestos como una herramienta alternativa para incrementar la producción de cultivos agrícolas.

## **2.7. Compuestos orgánicos volátiles en la comunicación planta-microorganismo.**

Las plantas produce fitohormonas que modulan su crecimiento y desarrollo, sin embargo existen diversos factores externos que también pueden alterar estos procesos como la presencia de microorganismos del suelo, específicamente en la rizósfera. En la última década se ha especulado que las plantas y los microorganismos se “comunican” entre sí mediante la emisión de VOCs. Los VOCs son compuestos que poseen un peso molecular usualmente inferior a 300 g/mol y por su alta presión de vapor se encuentran en estado gaseoso (Dudavera y Negre, 2005). Organismos de todos los reinos producen este tipo de compuestos que les permite interactuar entre sí. Diversos reportes en la literatura mencionan que el perfil de VOCs que emite cada organismo es diferente y estas diferencias pueden ser cualitativas y/o cuantitativas. Así que, individuos pertenecientes a la misma especie pueden presentar perfiles de compuestos diferentes, mismos que son susceptibles a ser alterados por la influencia de factores bióticos y abióticos presentes en su entorno (Dicke *et al.*, 2009; Vickers *et al.*, 2009; Holopainen y Gershezon, 2010).

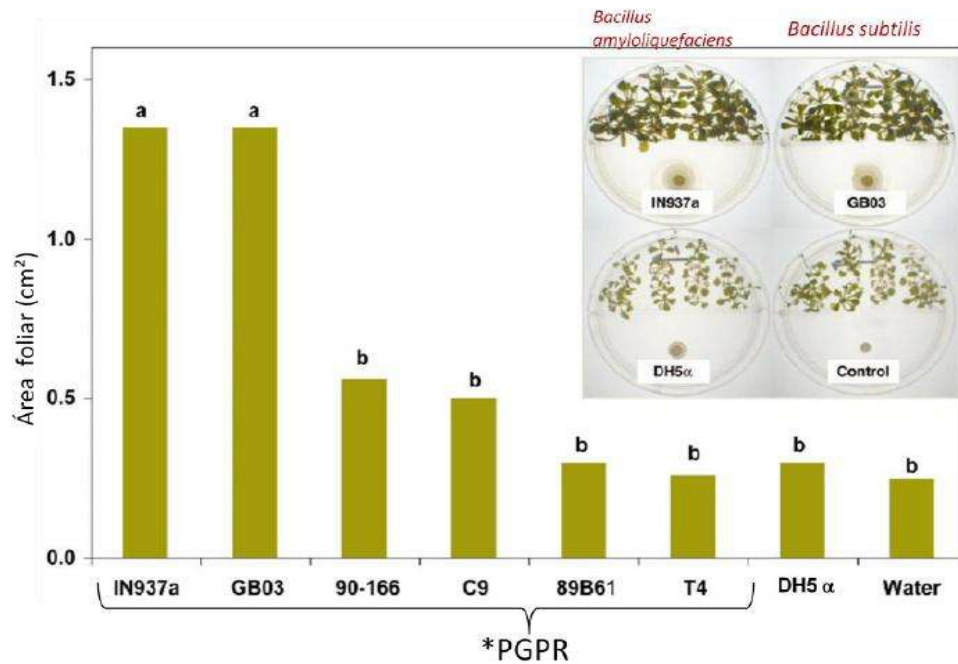
Las plantas emiten de forma constitutiva o inducible una amplia cantidad de VOCs diariamente; al menos una quinta parte del CO<sub>2</sub> atmosférico que es fijado se libera como VOCs (Baldwin, 2010). Dichos compuestos le sirven a la planta para atraer polinizadores, dispersadores de semillas o enemigos naturales de herbívoros. Además algunos VOCs pueden funcionar como barrera química en contra de insectos y microorganismos patógenos, así como para enviar señales de alerta a plantas vecinas para que estas activen sus propios mecanismos de defensa (Dicke *et al.*, 2003; Gershenzon, 2007).

Por otra parte, los microorganismos también tienen la capacidad de producir VOCs, de ahí que una gran cantidad de especies bacterianas sean empleadas para producir estos compuestos a nivel industrial, debido a su utilidad como aromatizantes y a sus propiedades repelentes (Schulz y Dickschat, 2007). Sin embargo, diversos reportes en la literatura mencionan que las posibles funciones biológicas de estos compuestos liberados por las bacterias sean para la comunicación y en la defensa como antimicrobianos (Schulz y Dickschat, 2007).

En lo que respecta a la comunicación planta-rizobacteria mediada por VOCs, se ha reportado que los volátiles bacterianos promueven el crecimiento vegetal e inducen la resistencia sistémica (ISR) contra fitopatógenos (Ryu *et al.*, 2003; 2004; Schulz y Dickschat, 2007). Lo antes mencionado estaría indicando que hay una estrecha relación entre las plantas y las rizobacterias (van Loon, 2007 y Zhang *et al.*, 2007).

Durante un análisis realizado por Ryu *et al.* (2003), sobre el efecto de los VOCs microbianos en la promoción del crecimiento de *Arabidopsis*, ellos observaron que

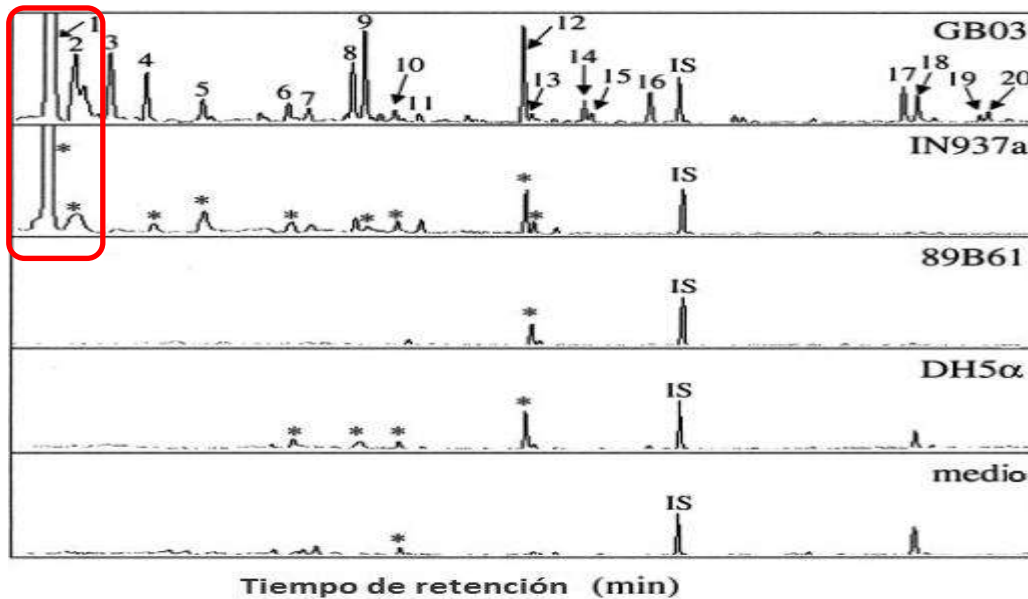
los volátiles de dos rizobacterias *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a, promovieron aproximadamente al doble la producción de la biomasa área de las plantas respecto a los controles sin inóculo e inoculados con la bacteria control *E.coli* DH5α (Fig. 9).



**Figura 9. Efecto de los VOCs emitidos por las PGPR sobre el crecimiento foliar de *A. thaliana*.** Efecto promotor de *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a sobre el desarrollo del área foliar de plantas de *A. thaliana*, comparado con otras PGPR como son *Serratia marcescens* 90-166, *B. pasteurii* C-9, *Pseudomonas fluorescens* 89B61 y *B. pumilus* T4, así como un control negativo *E. coli* DH5α y el control sin inocular (Ryu *et al.*, 2003).

Al observar la estimulación del crecimiento vegetal por ambas rizobacterias, los autores decidieron analizar el perfil de VOCs que emite cada PGPR, así como el de la bacteria no promotora *E.coli* DH5α y del medio de crecimiento solo. Ellos encontraron que las bacterias GB03 e IN937a presentaban variaciones en sus

perfiles. Sin embargo, ambas PGPR sintetizaron dos compuestos en mayor abundancia que correspondieron a la 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol; ambos producto de la ruta de fermentación del género *Bacillus*, en el que el 2,3-butanediol se considera como el producto final (Fig. 10).



**Figura 10. Perfiles cromatográficos de *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a.** En los rectángulos rojos se observa la presencia de acetoína y 2,3-butanediol, los cuales son abundantes y se sintetizan en ambas rizobacterias. 89B61 (rizobacteria no promotora por emisión de volátiles), DH5α (*E. coli* bacteria no promotora) y el medio de cultivo sin inocular son los controles (Ryu *et al.*, 2003).

De acuerdo con el estudio de Ryu *et al.* (2003), tanto la acetoína como el 2,3-butanediol pudieran ser los responsables de los efectos promotores en la biomasa aérea de *Arabidopsis thaliana* y para demostrarlo realizaron bioensayos utilizando gradientes de concentraciones de 2,3-butanediol como compuesto puro, donde observaron un efecto promotor dosis dependiente sobre la biomasa área (Fig. 11).

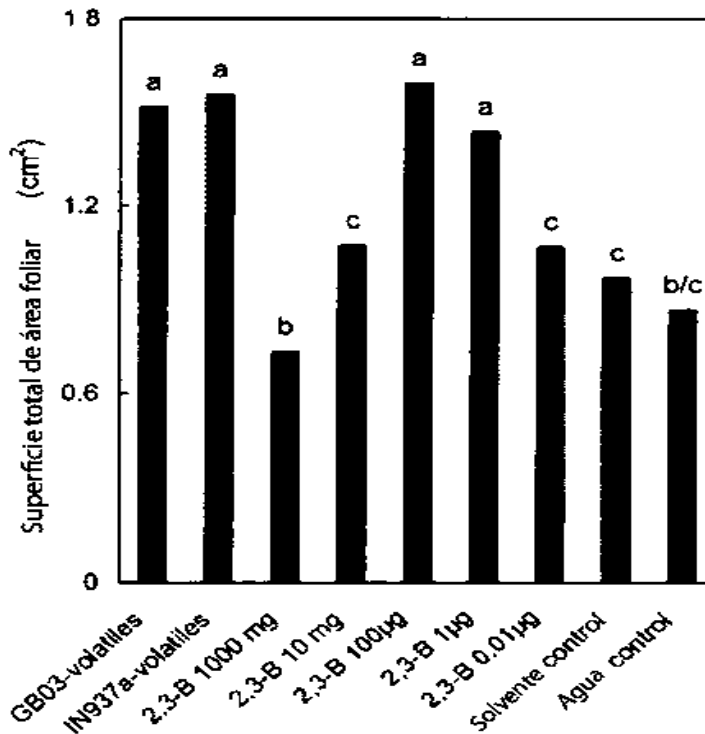
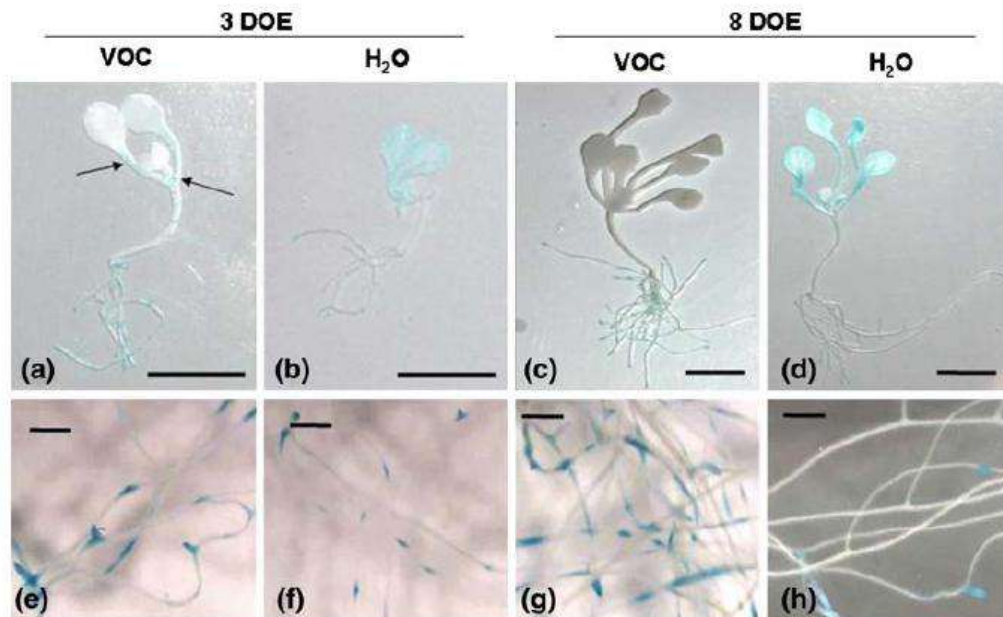


Figura 11. Efecto promotor dosis dependiente del 2,3-butanediol sobre el crecimiento foliar de *A. thaliana*. Promoción del crecimiento de *A. thaliana* Col-0 control, expuesta a los volátiles de GB03 y a varias concentraciones de 2,3-butanediol (Ryu *et al.*, 2003).

Posteriormente los autores llevaron a cabo un análisis para evaluar el efecto de los volátiles de las rizobacterias promotoras sobre plantas mutantes insensibles y/o deficientes en diferentes vías hormonales. Los autores observaron que dichos compuestos activaban vías de señalización dependientes de las citocininas para el caso de *B. subtilis* GB03 mientras que para *B. amyloliquefaciens* IN937a no observaron efectos aparentes en ninguna de las rutas hormonales analizadas. A partir de entonces, este grupo de investigadores se consideraron los pioneros al aportar información de que las rizobacterias pueden afectar el desarrollo de las plantas a través de la emisión de VOCs.

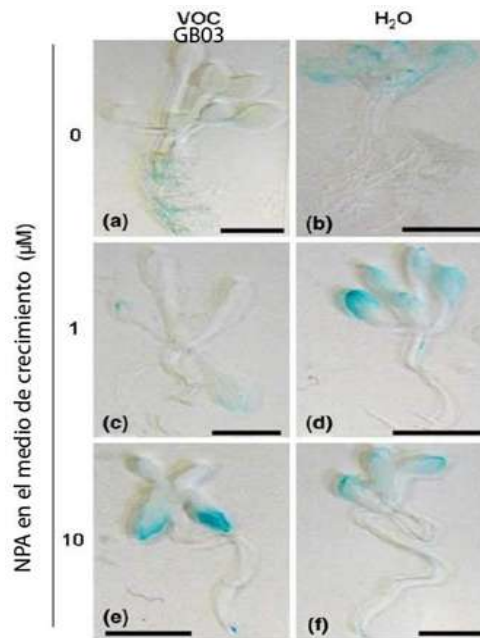
Continuando con la misma línea de investigación Zhang *et al.* (2007), plantearon que el efecto promotor de los volátiles de GB03 involucraba la modulación de la vía auxínica; por lo que analizaron el efecto de los VOCs de GB03 en las líneas transgénicas de *Arabidopsis DR5::GUS*. A los 3 y 8 días después de la inoculación (ddi), los autores observaron que las plantas sin inóculo presentaban una tinción azul en una parte del follaje y escasa tinción en la raíz que correspondió a la expresión del marcador en respuesta a auxinas, mientras que las plantas que habían sido expuestas a los volátiles de GB03 presentaban una pérdida de la expresión del marcador en la parte aérea y un incremento en la raíz, así como un aumento en la biomasa aérea (Fig. 12).



**Figura 12. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en plántulas expuestas a los VOCs de *B. subtilis* GB03.** Expresión en follaje y raíz de las plantas control a los 3 días (b y f) y después de la exposición a los volátiles (a y e). Expresión del marcador en follaje y raíz a 8 días en plantas control (d y h) y expuestas a los volátiles de GB03 (c y g). Los follajes de las plantas control (b y d) presentan una fuerte expresión en comparación a las plantas expuestas a los volátiles de GB03 después de 3 y 8 días de exposición (Zhang *et al.*, 2007).

Este resultado les permitió a dichos autores sugerir que los volátiles emitidos por GB03 durante la interacción con *Arabidopsis*, está activando el transporte de auxinas llevándolas de la parte aérea a la radicular y con esto promoviendo un incremento en la biomasa aérea. Posteriormente para corroborar que el efecto observado efectivamente se debía a la activación del transporte de auxinas, los investigadores utilizaron el inhibidor específico del transporte de eflujo, NPA, analizaron la expresión del marcador de DR5::*GUS* en presencia del NPA y después de la exposición de los VOCs de GB03. Los resultados mostraron un

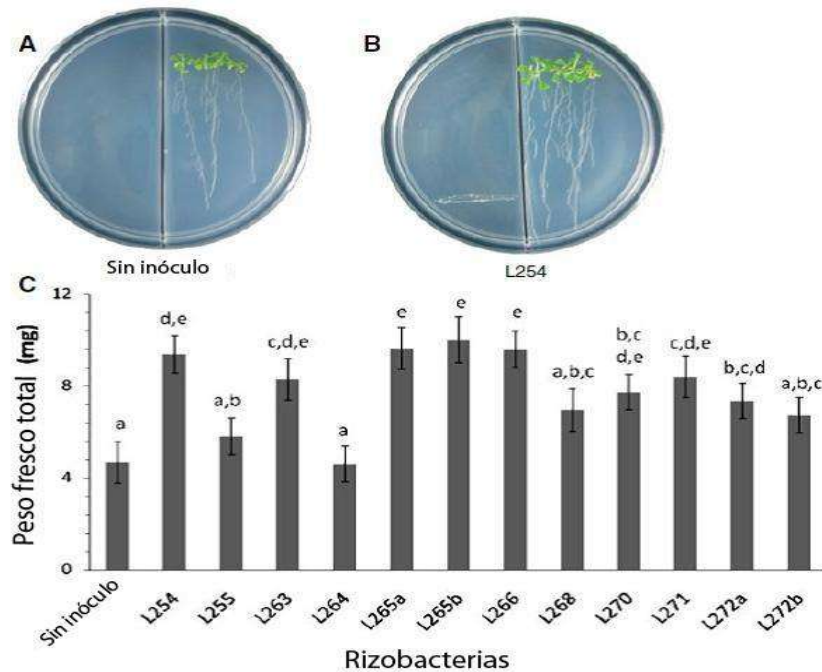
cambio en el patrón de expresión del marcador en las plantas expuestas a los volátiles de GB03, observando una disminución de la expresión en la raíz y un incremento en el follaje. Además, de una disminución en la promoción del crecimiento de las plantas tratadas tanto a 1 como 10  $\mu\text{M}$  de NPA, pero dichos efectos fueron más evidentes a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de NPA, posiblemente debido a que la inhibición del transporte fue mayor a esta concentración y como consecuencia se acumularon las auxinas en los sitios de síntesis. Lo anterior, correlaciona con el efecto conocido que concentraciones elevadas de auxinas inhiban el crecimiento de la planta. Con estos efectos los autores concluyeron que los compuestos volátiles liberados por *B. subtilis* GB03 durante la interacción con *Arabidopsis thaliana* promueven el crecimiento foliar de la planta mediante la activación del transporte de auxinas (Fig. 13).



**Figura 13. Efecto del NPA sobre la expresión del marcador de respuesta a auxinas y el crecimiento de la plántula expuesta a los VOCs de *B. subtilis* GB03.** Planta inoculada con *B. subtilis* GB03 (a) y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  NPA (c) y 10  $\mu\text{M}$  (e); control sin inóculo (b) y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  NPA (d) y 10  $\mu\text{M}$  (f) (Zhang *et al.*, 2007).

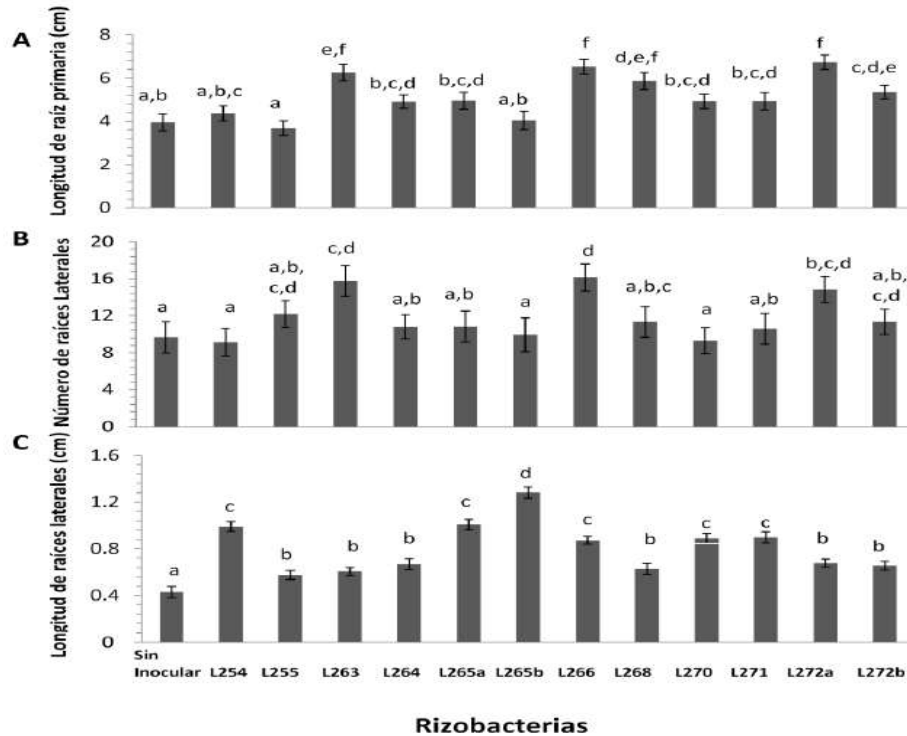
En un estudio reciente, Gutiérrez-Luna *et al.* (2010), analizaron el efecto de los VOCs de doce rizobacterias aisladas de la rizósfera de limón sobre la promoción del crecimiento vegetal. Los autores observaron que las rizobacterias L254, L263, L265a, L265b y L266 estimularon el crecimiento en *Arabidopsis*; al incrementar dos veces la biomasa comparadas con la plantas sin inocular.

Por otra parte, no observaron un incremento significativo en la biomasa de las plantas expuestas a los volátiles de las rizobacterias L255, L264, L268, L272a y L272b en comparación a las plantas sin inóculo (control) (Fig. 14).



**Figura 14. Efecto de los compuestos volátiles de diferentes rizobacterias sobre la biomasa de *A. thaliana*.** (A- B) Fotografías representativas que muestran el efecto de la rizobacteria L254 sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. (C) Peso fresco total de *A. thaliana* sin inóculo e inoculada con distintas rizobacteria (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010).

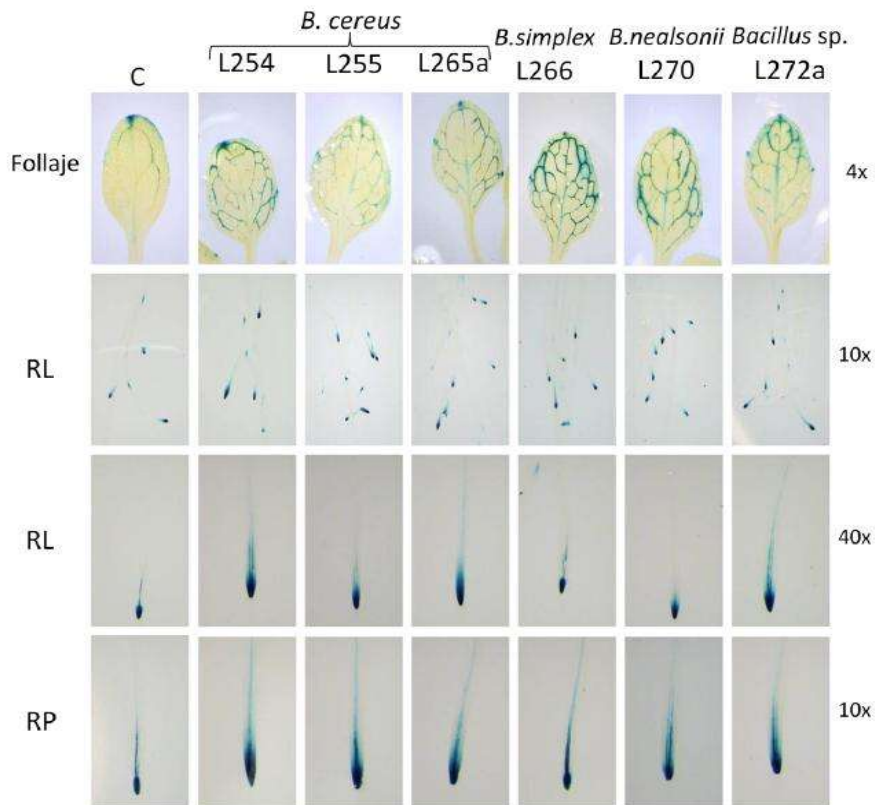
Además, los autores observaron que las rizobacterias modularon la arquitectura radicular de *Arabidopsis* diferencialmente (Fig. 15). Como se observó en la figura 13 los VOCs de nueve de las doce rizobacterias estimularon la longitud de la raíz primaria (LRP), de las cuales L263, L266 y L272a fueron las que presentaron un mayor efecto (Fig. 15A). Respecto al parámetro de número de raíces laterales (NRL), L263, L266 y L272a fueron las que estimularon el número de raíces laterales (Fig. 15B). En lo referente a la longitud de raíces laterales (LRL) la rizobacteria L265b fue la que incremento en mayor medida el crecimiento de las raíces laterales (Fig.15C).



**Figura 15. Efecto de los volátiles de las rizobacterias sobre la morfogénesis de la raíz.** (A) Longitud de raíz primaria LRP, (B) Número de raíces laterales NRL, (C) Longitud de raíces laterales LRL (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010).

Además, en el mismo estudio, los autores decidieron caracterizar a las rizobacterias representantes de cada uno de los parámetros involucrados en crecimiento y desarrollo de la planta, determinaron que los aislados L254, L255 y L265a son pertenecientes a *Bacillus cereus*, L266 a *Bacillus simplex*, L270 a *Bacillus nealsonii* mientras que L272a tuvo un 100% de identidad con *B. cereus/thuringensis/anthracis*. Una vez caracterizadas dichas rizobacterias, se analizó la expresión del marcador de respuesta a auxinas de las líneas DR5:GUS, debido a que las auxinas regulan los procesos de crecimiento y desarrollo y a que estas rizobacterias promovieron ambos procesos, los autores sugieren una posible

interacción de esta vía hormonal. Posteriormente, Gutiérrez-Luna (2010) realizó el análisis del gen reportero *GUS* y encontró un aumento en la expresión del marcador en la punta de la raíz, en los haces vasculares de las raíces y en las nervaduras de las hojas de las plantas expuestas a los volátiles de las rizobacterias analizadas comparadas con el control sin inocular (Fig. 16), siendo este efecto más notable en el follaje de las plantas expuestas a los compuestos volátiles de *B. simplex* L266.



**Figura 16. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por las PGPR sobre la expresión del marcador de genes regulados por auxinas.** Fotografías representativas de plántulas de cuatro días después de la germinación expuestas a los volátiles de seis diferentes rizobacterias, Gutiérrez-Luna, (2010).

Gutiérrez-Luna *et al.* (2010), también analizaron el perfil de VOCs emitido por las PGPR, la planta y durante la interacción planta-rizobacteria, encontrando diferencias cualitativas y cuantitativas. Se encontraron compuestos que únicamente estuvieron presentes en la planta como el ácido octanoico y presentes en las rizobacterias como el benzaldehído. Además, también se identificaron compuestos únicamente durante la interacción como el limoneno. El eucaliptol se observó en la planta sin inocular y se incrementó durante la interacción; la acetofenona se detectó en los perfiles cromatográficos de la planta, la rizobacteria y durante la interacción, aunque en diferente abundancia en cada perfil. El efecto promotor que se observó en el estudio, no fue atribuido a un solo compuesto, sino a la “huella” de VOCs que emitió cada rizobacteria.

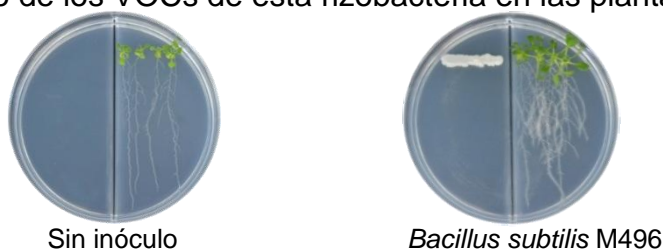
Aunque se han descrito diversos estudios del efecto de los VOCs microbianos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la activación de la vía auxínica, aún no se han reportado datos cuantitativos del incremento del AIA durante el desarrollo vegetal por efecto de estos compuestos, lo cual sería interesante demostrar.

## **2.8. *Bacillus subtilis* M496, un caso de estudio.**

El género *Bacillus* está constituido por bacterias formadoras de esporas, Gram + con forma de bastón y algunas especies pueden ser patógenas de humanos. Sin embargo, existen especies que pueden actuar como promotoras del crecimiento y desarrollo vegetal como es el caso de *B. megaterium* UMCV1 que promueve el

crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2007), mediante la síntesis de antibióticos o compuestos con efecto contra organismos patógenos de la rizósfera, o por la síntesis y excreción de fitohormonas a la rizósfera. Otra característica del género *Bacillus* es su habilidad para inducir la resistencia sistema inducida (ISR) en las plantas, el cual es un mecanismo de defensa. Algunas especies de este género son candidatos ideales para ser agentes de biocontrol (Santoyo *et al.*, 2012).

*Bacillus subtilis* es una bacteria autóctona de suelo que puede crecer en un amplio rango de temperaturas, su velocidad de crecimiento es alta. En específico la rizobacteria *Bacillus subtilis* M496 fue aislada de la rizósfera de maíz a partir de un suelo proveniente de un campo agrícola de la localidad de El Lometón, (101°8', 19°42') municipio de Tarímbaro, Michoacán a una profundidad de 0 y 20 cm. Posterior a su aislamiento e identificación, Cortés-Sánchez *et al.* (2010), determinó que esta rizobacteria promueve el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* mediante la emisión de VOCs, con efectos muy evidentes sobre la arquitectura de la raíz (Fig. 17). Este resultado, permitió continuar con un estudio más detallado sobre el efecto de los VOCs de esta rizobacteria en las plantas.



**Figura 17. Efecto de los VOCs emitidos por *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento de *A. thaliana*.** *B. subtilis* M496 promueve el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en comparación a plantas sin inóculo (Cortés-Sánchez *et al.*, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos sugieren que los VOCs bacterianos promueven el crecimiento vegetal. En el caso particular de los compuestos volátiles que emite *Bacillus subtilis* M496 se observó que incrementan el área foliar y radicular con cambios evidentes en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis*, por lo que resulta interesante estudiar si esta rizobacteria en particular induce el crecimiento y el desarrollo de la planta mediante un mecanismo dependiente de auxinas.

## 4. HIPÓTESIS

*Bacillus subtilis* M496 produce compuestos volátiles que modulan el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

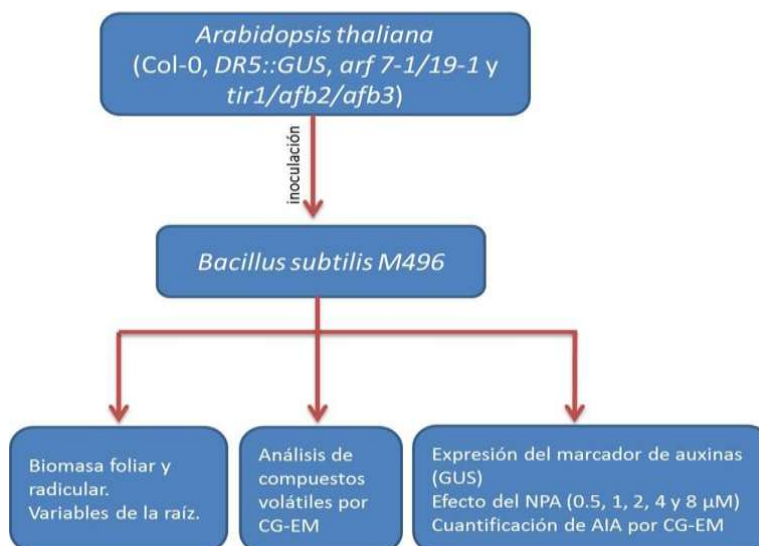
Determinar si los compuestos volátiles que emite *Bacillus subtilis* M496 influyen en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de auxinas.

#### 5.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* M496 a distintas densidades celulares sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*
- Analizar el efecto de los volátiles emitidos por la rizobacteria en la línea transgénica *DR5::GUS*.
- Determinar si los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 modulan la síntesis y distribución de auxinas en la planta.
- Analizar el perfil de compuestos volátiles durante la interacción *A. thaliana*-*B. subtilis* M496.

## 6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este estudio se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, la línea transgénica *DR5::GUS* y la doble y triple mutante de algunos elementos de la vía de señalización de auxinas (*arf 7-1/19-1* y *tir1/afb2/afb3*, respectivamente). Las plantas fueron crecidas en cajas de Petri con división y a los 2 días después de la germinación, se inoculó la rizobacteria *Bacillus subtilis* M496. Al cabo de 10 días después de la interacción (ddi) se analizaron la biomasa foliar y radicular, así como la longitud de la raíz primaria, número y longitud de raíces laterales. Además se analizó el efecto del inhibidor específico de transporte de eflujo de auxinas NPA y se cuantificó el contenido de la auxina ácido indol-3-acético (AIA) en las plantas después de la interacción. A su vez se determinó el perfil de VOCs emitidos por la rizobacteria y durante su interacción con la planta mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). A continuación se muestra el esquema general de trabajo.



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Material biológico.**

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, de la línea transgénica *DR5::GUS* y de la doble mutante *arf 7-1/19-1* (Ulmasov *et al.*, 1997) y triple mutante *tir1/afb2/afb3* (Dharmasiri *et al.*, 2005), las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Fisiología del Desarrollo Vegetal del IIQB-UMSNH.

La rizobacteria *Bacillus subtilis* M496, fue donada por el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIQB-UMSNH.

### **7.2. Desinfección de las semillas.**

Las semillas requieren de una esterilización superficial que se realizó colocando las semillas en un tubo Eppendorf con 1mL de etanol al 70 % durante 5 minutos, posteriormente se descarta el etanol y se agrega 1mL de hipoclorito de sodio comercial al 20 % durante 7 minutos. Posteriormente, se decantó el cloro y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Finalmente se incubaron las semillas a 4°C al menos 48 h previas a la siembra con el objetivo de homogenizar la germinación.

### **7.3. Condiciones de crecimiento.**

Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con una división con 15 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 0.2X, con el fin de permitir la interacción únicamente por medio de compuestos volátiles. Posterior a la siembra, las cajas se incubaron en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, intensidad de luz de  $200 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , temperatura de 22°C y una humedad del 80 %. Las cajas fueron colocadas en un ángulo de 65° de inclinación para permitir el crecimiento de la raíz sobre la superficie del agar.

### **7.4. Reactivación de *Bacillus subtilis* M496.**

Al iniciar el trabajo, la cepa se encontraba almacenada en caldo nutritivo y glicerol a -20°C, por lo que para su reactivación se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (CFU), las cuales fueron inoculadas en una caja de Petri con medio agar soya tripticaseína y se crecieron durante 24 hr a 30°C. Posteriormente se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU y se sembraron en medio MS (igual al descrito para el crecimiento de las plántulas) para su interacción con la planta por medio de la emisión de volátiles. La densidad bacteriana obtenida en una estría al final de nuestros análisis correspondió a  $7.3 \times 10^8$  CFU/mL, este dato fue obtenido después de realizar un conteo celular de la siguiente manera: en una caja de Petri con medio MS se sembraron 5 estriados independientes de *B. subtilis* M496 y a los 10 días de crecimiento se retiraron por completo las células y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril.

Posteriormente, se agitó y se realizaron diluciones tomando del primer tubo 100  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana que se homogenizaron con 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril en otro tubo; este proceso se repitió por 7 veces más. De las tres últimas diluciones se tomaron 100  $\mu\text{L}$ , los cuales fueron plaqueados en cajas de Petri con medio nutritivo, y se incubaron a 30 °C por 12 hr. Finalmente se realizó un conteo de CFU, obteniendo en una estría  $7.3 \times 10^8$ , dos estrías  $14.6 \times 10^8$  y en tres estrías  $21.9 \times 10^8$  CFU/mL.

#### **7.5. Establecimiento del sistema de interacción y análisis de las variables del crecimiento.**

Para evaluar el efecto de los compuestos volátiles emitidos por *B. subtilis* M496 sobre la arquitectura de la raíz de Arabidopsis, se utilizaron cajas de Petri con una división y con medio MS. En un extremo de la caja, se colocaron cuatro semillas de Arabidopsis a 1 cm de distancia del borde superior de la caja y con un espacio de 8 mm entre cada semilla. Cuatro días después de la siembra, equivalentes a dos días de germinación, la rizobacteria fue inoculada con aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU en el lado contrario a las semillas a 1 cm de distancia del borde superior de la caja; se realizaron 4 réplicas. Las cajas fueron incubadas durante diez días en una cámara de crecimiento bajo las condiciones antes mencionadas. Después de 10 días se midieron los parámetros de longitud de raíz primaria (LRP), número de raíces laterales (NRL) realizando un conteo de las raíces presentes en cada planta, longitud de raíces laterales (LRL) y biomasa foliar y radicular

separando los tejidos y realizando un pesaje por planta. La longitud de la raíz primaria así como de las laterales se midió con una regla.

## **7.6. Análisis de los compuestos volátiles.**

Los VOCs fueron analizados en la planta, la bacteria y durante la interacción planta-bacteria. Para el análisis de los VOCs de la planta, se colocaron cuatro semillas de *Arabidopsis thaliana Col-0* en uno de los extremos de la caja de Petri con división, a 1 cm del borde superior de la caja con medio MS. Las cajas fueron incubadas durante 14 días en la cámara de crecimiento y finalizado este tiempo se analizó la composición de los VOCs.

Por otra parte, las bacterias fueron crecidas en medio MS en una caja de Petri con división y se incubaron en la cámara de crecimiento por 10 días, que fue el tiempo en el que se realizó la captura de VOCs. Los VOCs que resultaron de la interacción planta-rizobacteria se analizaron a los 10 ddi; el sistema de interacción que se empleó fue el mencionado en la sección 7.5.

El análisis de VOCs se realizó mediante la técnica de SPME y CG-EM. En este estudio se empleó una fibra azul (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), la cual se activó por 30 minutos en el puerto de inyección del CG. Una vez activada, dicha fibra se expuso por 1h en la muestra y posteriormente, los compuestos fueron desorbidos en el puerto de inyección del GC a 180 °C por 30 segundos. Se realizaron 4 réplicas. Las condiciones de análisis en el cromatógrafo fueron las siguientes: se empleó un GC Agilent 6850 serie II acoplado a un detector de MS

Agilent modelo 5973. La presión durante los análisis cromatográficos fue de 7 Pa, con un voltaje de 70 eV, y se utilizó una columna HP-FFAP (30 m x 250 μm x 0.25 μm) con un flujo de He de 1 mL/min. Las condiciones de separación fueron:

Inyector	Detector	Horno
180 °C	250 °C	T <sub>i</sub> : 50 °C, t <sub>1</sub> : 3 min, R <sub>1</sub> : 3 °C/min, T <sub>f</sub> : 180 °C, t <sub>2</sub> : 5 min.
Splitless		

Los compuestos fueron identificados comparando los patrones de fragmentaciones de los espectros de masa con la base de datos NIST/EPA/NIH 2002.

La identidad del compuesto más abundante en las muestras fue confirmada por comparación del tiempo de retención con el del estándar que se adquirió comercialmente. Debido a que la técnica de SPME es semicuantitativa, se analizó una concentración conocida del estándar empleando una jeringa tipo gas-tight que son herméticas para gases y se inyectó la muestra en el CG, en el cual se obtuvo un área bajo la curva. Con la fórmula de los gases ideales ( $P \times V = n \times R \times T$ ) se realizó la cuantificación del compuesto en las muestras.

### **7.7. Análisis de la expresión del marcador de respuesta a auxinas *DR5::GUS*.**

Para el análisis de la expresión del marcador de genes regulados por auxinas, se sembraron 4 semillas de la línea transgénica *DR5::GUS* en uno de los lados de las cajas de Petri con división, como en el caso de Col-0. Después, al cuarto día se realizó la inoculación de *B. subtilis* M496. A los 10 ddi se llevaron a cabo los análisis histoquímicos de la actividad de GUS para plantas inoculada y sin inóculo. Para lo cual las plántulas se colocaron en buffer de reacción de GUS (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido en 100 mM de NaHPO<sub>4</sub>, pH 7;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; N-lauril-sarcosina 0.1 %; Tritón X-100 0.1 %, que también contiene el catalizador de la oxidación ferri y ferrocianuro de potasio 5 mM) (Jefferson *et al.*, 1987) y se incubaron a 37 °C toda la noche. Posteriormente se expusieron a un proceso de clareo, que consiste en eliminar el buffer de tinción de GUS y agregar un volumen de HCl 0.24 N en metanol al 20 % colocando la muestra a 57 °C durante 1 h. Posteriormente la solución fue decantada y se agregó un volumen de NaOH al 7 % en etanol al 60 % por 20 minutos a temperatura ambiente y para finalizar se elimina esta solución y se añade etanol al 40, 20 y 10 % sucesivamente por 15 minutos cada uno, este último se decanta y se agrega glicerol al 50 % en donde las muestras pueden ser almacenadas (Malamy y Benfey, 1997).

### **7.8. Análisis del efecto del inhibidor específico de transporte de eflujo de auxinas (NPA).**

Se analizó el efecto de 0.5, 1, 2, 4 y 8  $\mu$ M del NPA sobre el transporte de auxinas en las plantas Col-0 y *DR5::GUS*, sin inóculo e inoculadas. El NPA se adicionó al medio MS donde fueron crecidas las plantas. A los 10 días se analizaron los parámetros de la arquitectura radicular: LRP, NRL, LRL así como el número de hojas de roseta, biomasa foliar y radicular además, así como la expresión del marcador de auxinas por la técnica mencionada en la sección 7.7.

### **7.9. Efecto de los VOCs de *B. subtilis* M496 sobre la morfología de las mutantes *arf 7-1/19-1* y *tir1/afb2/afb3* de Arabidopsis.**

Se analizó el efecto de los VOCs bacterianos sobre el crecimiento y desarrollo de las mutantes de Arabidopsis, *arf 7-1/19-1* (Okushima *et al.*, 2007) y *tir1/afb2/afb3* (Dharmasiri *et al.*, 2005) insensibles a las auxinas. Para este análisis se empleó el sistema de cajas divididas antes descrito, donde en un extremo de las cajas de Petri se sembraron 4 semillas de la mutante y a los cuatro días de la siembra se inocularon con *B. subtilis* M496. A los 10 ddi se determinó el número de hojas de roseta, la biomasa foliar y radicular así como el análisis de las variables de la arquitectura radicular como LRP, NRL y LRL.

### **7.10. Análisis del contenido del AIA.**

Para el análisis del contenido de AIA se sembraron 20 semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 en uno de los lados de las cajas de Petri con división, al cuarto día se realizó la inoculación y a los 10 ddi se realizó la cuantificación de AIA. Para llevar a cabo dicho análisis, las plantas fueron seccionadas en los tejidos aéreo y radicular y se pesaron. Los tejidos se trituraron con nitrógeno líquido, se colocaron en tubos eppendorf y se agregó 1 mL de solución de extracción (2-propanol:agua:HCl concentrado en una proporción 2:1:0.002, respectivamente) que se mantuvo en agitación toda la noche. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm y el sobrenadante se retiró; a la pastilla se le agregó nuevamente 1 mL de solución de extracción y se mantuvo en agitación por 1 hr y después se centrifugaron. Los sobrenadantes se juntaron y se agregó 1 mL de diclorometano, las muestras se colocaron nuevamente en agitación por 30 minutos, se centrifugaron y se recuperó la fase orgánica, donde se encuentra el AIA libre. Esta fase se llevó a sequedad total con nitrógeno gaseoso en reactivales de 5 mL para su derivatización a metil éster con una solución de metanol anhidro y cloruro de acilo. Las muestras se sonicaron por 20 minutos y se incubaron a 75 °C por 1 hr, posteriormente los viales se enfriaron, abrieron y se llevaron a sequedad total con nitrógeno gaseoso en viales ámbar para su conservación. Para realizar la determinación del contenido de AIA metil esterificado, las muestras anteriores fueron disueltas con 20 µL de acetato de etilo, se agitaron por 1 minuto en un vortex, se tomó 2 µL de la muestra, la cual se inyectó en el CG-EM empleando una columna capilar HP-5 MS 5 % (fenilmetil

silicona) de 30 m x 0.2 mm x 0.25 mm. El análisis del AIA metil éster, se realizó mediante un monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones 130 y 189 m/z. Para estimar la cantidad de AIA presente en los tejidos de la planta se obtuvo una curva de calibración con un estándar de AIA metil esterificado (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Las condiciones de separación en el CG-EM fueron las siguientes:

Inyector	Detector	Horno
180 °C Split 1:20	300 °C	1ª rampa: T <sub>i</sub> : 150 °C, t <sub>1</sub> : 3 min, R <sub>1</sub> : 5 °C/min, T <sub>f</sub> : 210 °C, t <sub>2</sub> : 0 min.
		2ª rampa: T <sub>i</sub> : 10 °C, t <sub>1</sub> : 1 min, R <sub>1</sub> : 280 °C /2min

### 7.11. Análisis estadísticos.

La validación estadística de los resultados, se realizó de la siguiente manera: Los experimentos con tratamientos múltiples se llevaron a cabo con un diseño totalmente al azar. El tratamiento estadístico se efectuó mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y una posterior comparación de medias por la prueba de Fisher LSD con un alfa de 0.05. Cuando se realizaron comparaciones entre dos tratamientos, se empleó la prueba t-Student para variables independientes con un alfa de 0.05. Todos los análisis estadísticos fueron hechos

utilizando el software Statistica 7.0. Los experimentos fueron realizados con una  $n=16$  (4 plantas por caja x cuatro repeticiones) a excepción de la cuantificación de AIA en la cual la  $n=6$  (6 cajas).

## 8. RESULTADOS

Las plantas modulan su crecimiento y desarrollo mediante la producción de fitohormonas o reguladores del crecimiento, dentro de estos las auxinas son uno de los más importantes para la modulación de dichos procesos. Los niveles de fitohormonas en las plantas pueden ser modificados por la presencia de microorganismos en el suelo. Las PGPR son rizobacterias que pueden estimular el crecimiento vegetal por medio de la emisión de VOCs, que según reportes en la literatura activan vías de señalización de las fitohormonas como lo es la vía auxínica (Zhang *et al.*, 2007). En este trabajo se estudió el efecto de los VOCs que emite la rizobacteria *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* y se determinó que estos compuestos modulan la homeóstasis de auxinas, estimulando programas de desarrollo en la planta. A continuación se describen a detalle los resultados obtenidos.

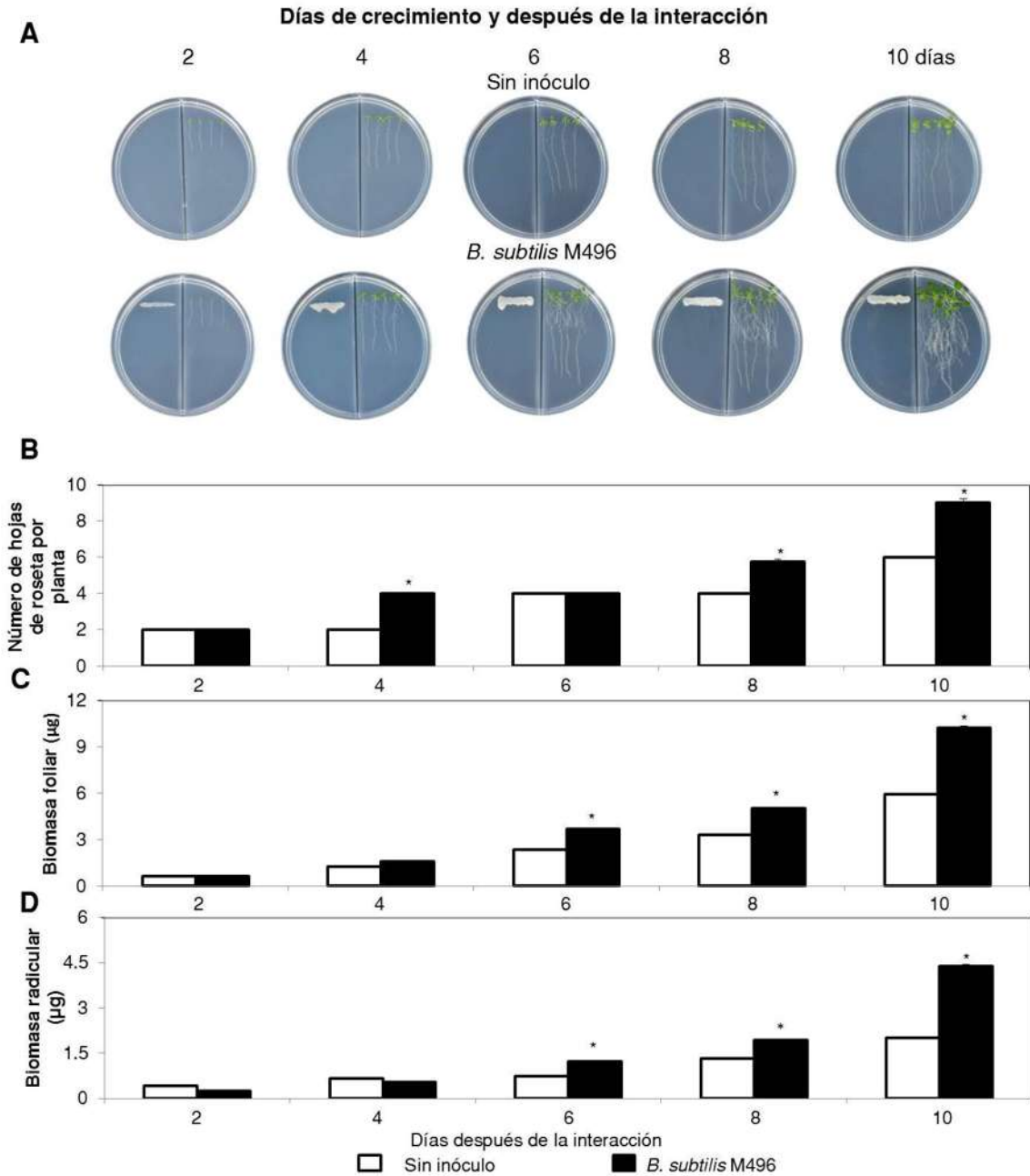
### 8.1. Efecto de los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 sobre la acumulación de biomasa en *A. thaliana*.

En primera instancia, se realizó una cinética de crecimiento de la planta a los 2, 4, 6, 8 y 10 días para caracterizar su desarrollo en función del tiempo (Fig. 18A). Los parámetros registrados fueron: número de hojas de roseta, biomasa foliar y radicular por planta. Se observó que el número de hojas de roseta incrementó 2 hojas a los 2 y 4 días, 4 hojas a los 6 y 8 días y al final 10 hojas de roseta a los 10 días. La biomasa foliar de 0.625  $\mu\text{g}$  al día 2, la cual se incrementó a 5.9  $\mu\text{g}$  al día

10, en cuanto a la biomasa radicular a los 10 días las plantas presentaron un peso de 0.425 µg que aumentó a 2.015 µg al finalizar la cinética (Fig. 18B).

Posteriormente, una vez que se conoció como era el crecimiento y desarrollo de la planta en función del tiempo, se realizó la cinética de la planta en interacción con la rizobacteria a los 2, 4, 6 ,8 y 10 ddi de crecimiento con la finalidad de determinar en qué tiempo se iniciaba la promoción del crecimiento. En la Fig. 18A se muestran fotografías representativas de las plántulas y como se estimuló su crecimiento conforme transcurre el tiempo de la interacción con la rizobacteria. En las plántulas expuestas a los volátiles de la rizobacteria se promovió la formación de hojas de roseta a partir del día 4 ddi, no así en las plantas sin inóculo. La estimulación en el desarrollo del follaje continuó hasta el último día del análisis donde se observaron 10 hojas de roseta en las inoculadas, mientras que en las plantas sin inóculo únicamente se formaron 6 hojas de roseta (Fig. 18B). En cuanto a la acumulación de las biomásas se observó que a partir del día 6 ddi, se incrementó tanto la biomasa foliar como la radicular en las plántulas expuestas a los volátiles de la rizobacteria (Fig. 18C-D). En el último día del análisis (día 10), se hicieron más evidentes las diferencias entre las plántulas inoculadas y no inoculadas.

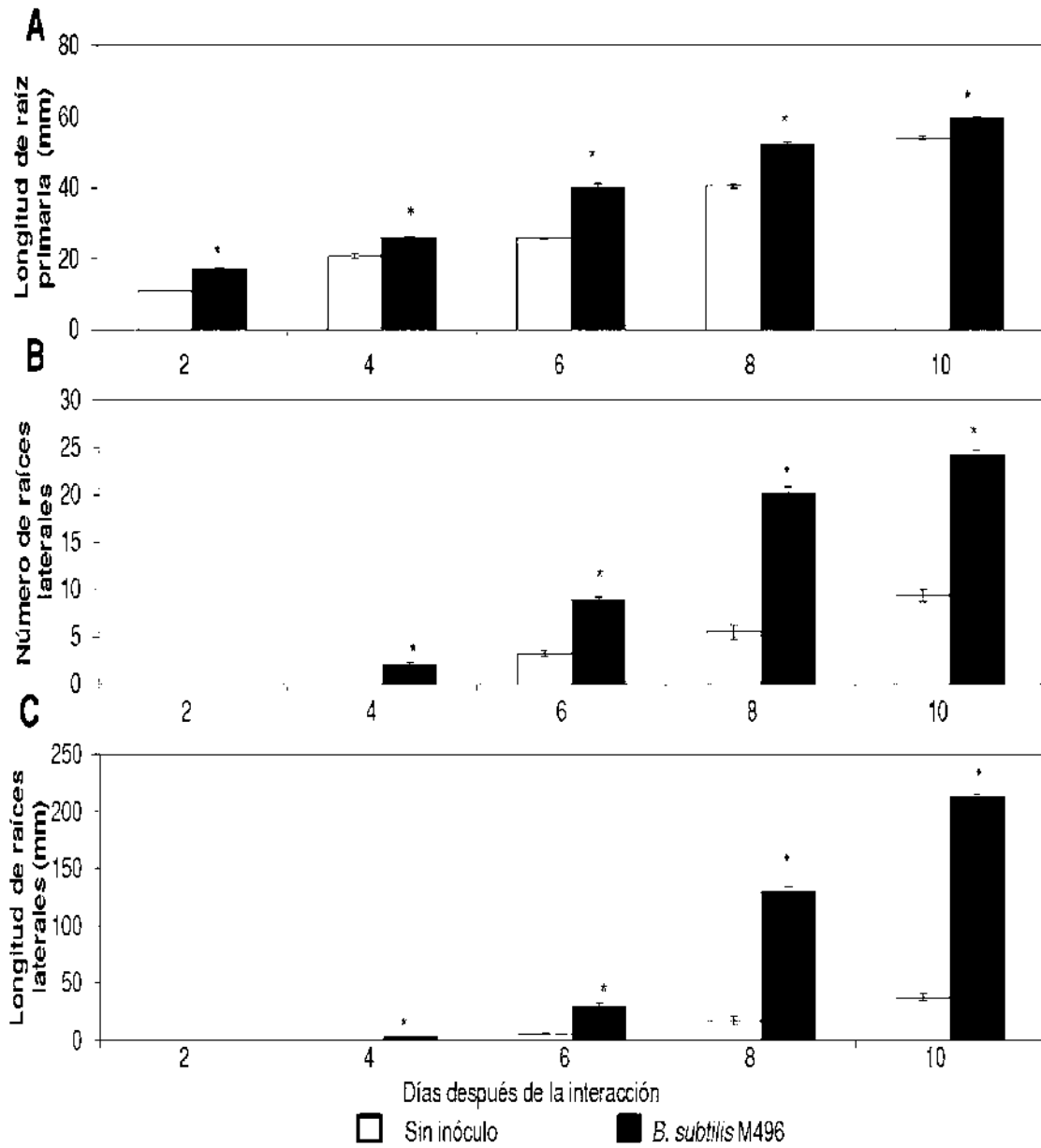
Estos resultados demuestran que *B. subtilis* M496, promueve el crecimiento de *Arabidopsis* mediante la emisión de VOCs, y además activa programas de desarrollo en la planta como el incremento en el número de hojas de roseta por planta y la rizogénesis.



**Figura 18. Efecto de los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.** (A) Cinética de crecimiento, se aprecia un incremento en biomasa foliar y cambios en la arquitectura radicular. (B) Efecto de los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 sobre la promoción de hojas de roseta, así como (C) en la biomasa foliar y (D) radicular. Los datos están reportados en  $\mu\text{g}$  de peso fresco por plántula. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre pares de tratamientos. (t-Student  $\alpha=0.05$ ;  $n=16$ ).

## **8.2. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por *B. subtilis* M496 sobre las variables de la arquitectura radicular de *A. thaliana*.**

Debido a que la raíz es el órgano que participa en el establecimiento de la interacción planta-rizobacteria y que los resultados de la cinética de crecimiento durante la interacción mostraron que los VOCs promueven cambios en la arquitectura radicular, se realizó un análisis del efecto de los VOCs emitidos por *B. subtilis* M496 sobre la arquitectura radicular. Para lo cual, se midió la longitud de la raíz primaria (LRP), número y longitud de raíces laterales (NRL y LRL respectivamente) (Fig. 19). Los resultados obtenidos mostraron que los VOCs de la rizobacteria estimularon significativamente la LRP a partir del día 2 y hasta el día 10 ddi en el que finalizó el experimento (Fig. 19A). En cuanto al NRL, el efecto promotor de los volátiles de la rizobacteria se vio reflejado a partir del día 4 ddi, tiempo en el cual las plántulas inoculadas presentaban la formación de 2 raíces laterales, mientras que en las plántulas sin inóculo la formación de estos órganos se observó hasta el día 6 ddi. Al final del análisis, se encontró un incremento del doble en la formación de estos órganos en las plantas expuestas a los VOCs de la rizobacteria (Fig. 19B). El efecto sobre la promoción de la LRL fue evidente a partir del día 4 ddi en las plántulas inoculadas, las cuales respecto a las plántulas sin inóculo presentaron una promoción en LRL causada por los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 (Fig. 19C). Dicha estimulación continuó hasta el último día del análisis, donde se observó que las plantas expuestas a los volátiles de la rizobacteria presentaron una LRL 5 veces mayor que la observada en las plantas sin inóculo.

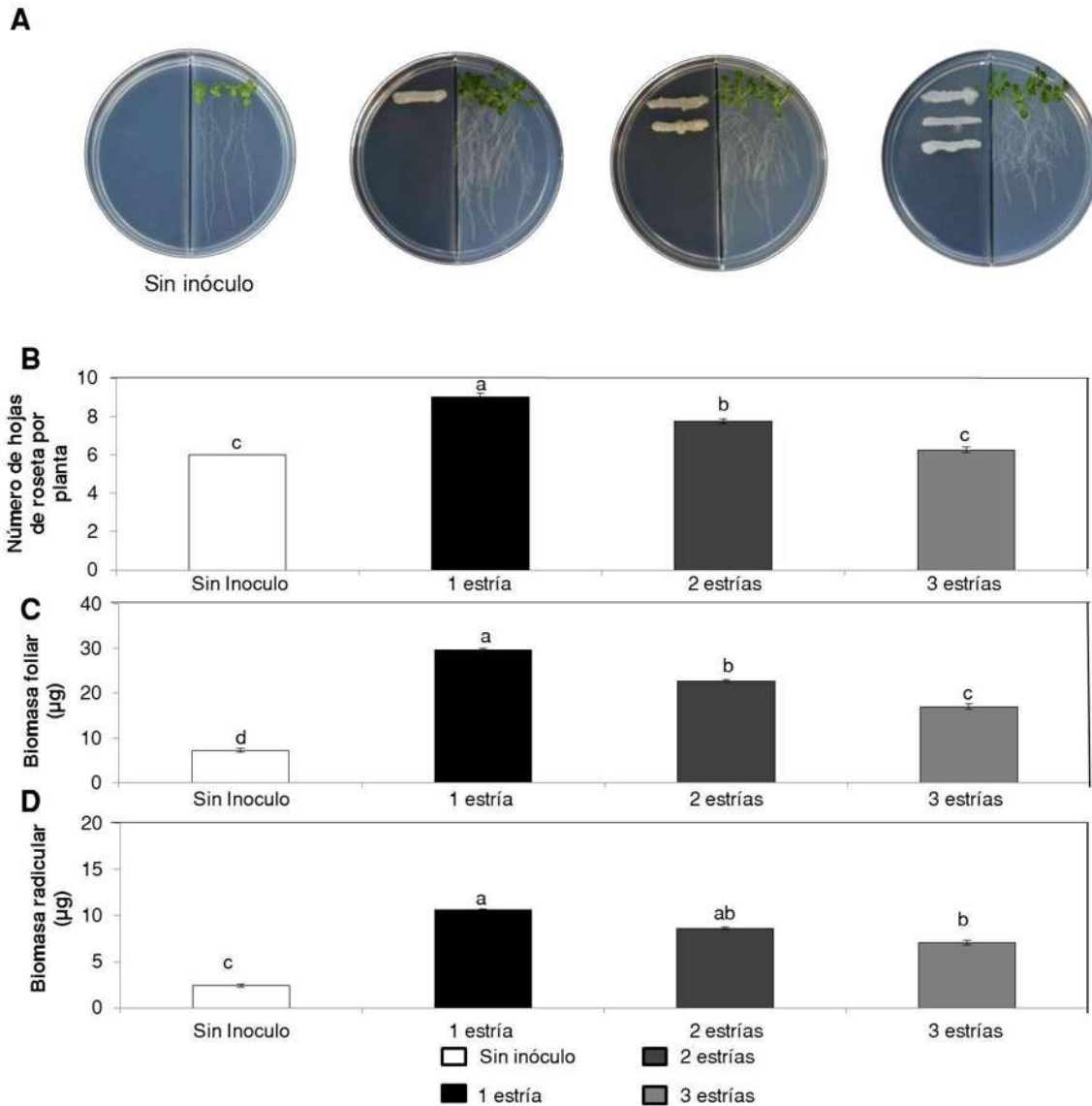


**Figura 19. Efecto de los volátiles de *B. subtilis* M496 sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*.** Las gráficas muestran el efecto de los volátiles de la rizobacteria en los diferentes parámetros de la arquitectura de la raíz como (A) Longitud de raíz primaria LRP, (B) Número de raíces laterales NRL, (C) Longitud de raíces laterales LRL. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre pares de tratamientos (t-Student,  $p=0.05$ ;  $n=16$ ).

### **8.3. Efecto de la densidad celular de *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.**

El efecto promotor en el crecimiento y desarrollo del área foliar y radicular de *Arabidopsis* por la presencia de los VOCs de *B. subtilis* M496 se observó a la densidad celular de una estría ( $7.3 \times 10^8$  CFU/mL). Se decidió determinar si la biomasa de la planta incrementa al aumentar la densidad bacteriana, para lo cual se sembraron dos y tres estrías de la rizobacteria con  $14.6 \times 10^8$  CFU/mL y  $21.9 \times 10^8$  CFU/mL, respectivamente, en el sistema de cajas divididas y se registraron las variables antes mencionadas. Los resultados de este ensayo indicaron que al incrementar la densidad bacteriana a 2 y 3 estrías los efectos promotores disminuyeron en comparación a la densidad bacteriana correspondiente a 1 estría (Fig. 20A).

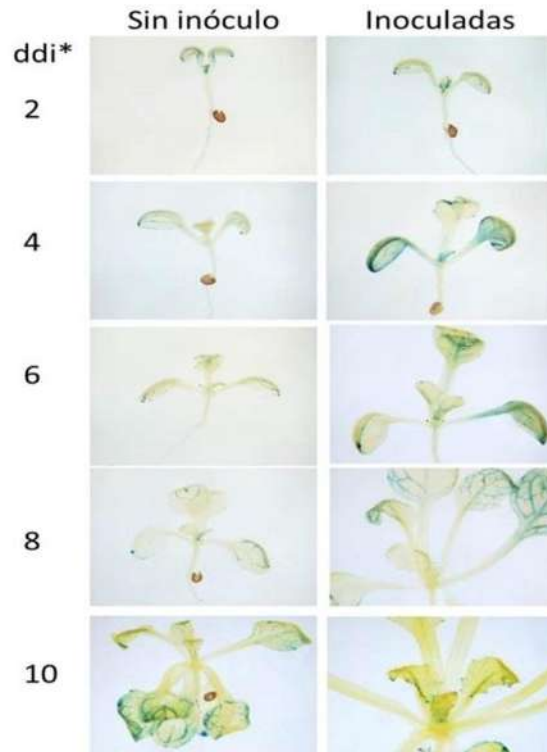
En la Fig. 20B se puede observar que al incrementar la densidad celular de nuestra rizobacteria a 2 y 3 estrías, el número de hojas de roseta disminuyó e interesantemente a la densidad mayor se obtuvo el mismo número de hojas que las plantas sin inóculo. Respecto a la biomasa foliar y radicular esta continuó siendo promovida aunque en menor medida que a la densidad celular de 1 estría (Fig. 20C-D).



**Figura 20. Efecto de la densidad celular bacteriana de *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*.** (A) Imágenes representativas del efecto de las densidades celulares de 1, 2 y 3 estrías. (B) Efecto de la densidad celular de *B. subtilis* M496 en la promoción de la formación de hojas de roseta y (C) en la biomasa foliar y (D) radicular de *A. thaliana* después de 10 días de interacción. Las diferentes letras indican diferencia estadística (Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=16$ ).

#### **8.4. Análisis de la expresión de *DR5::GUS*, en plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496.**

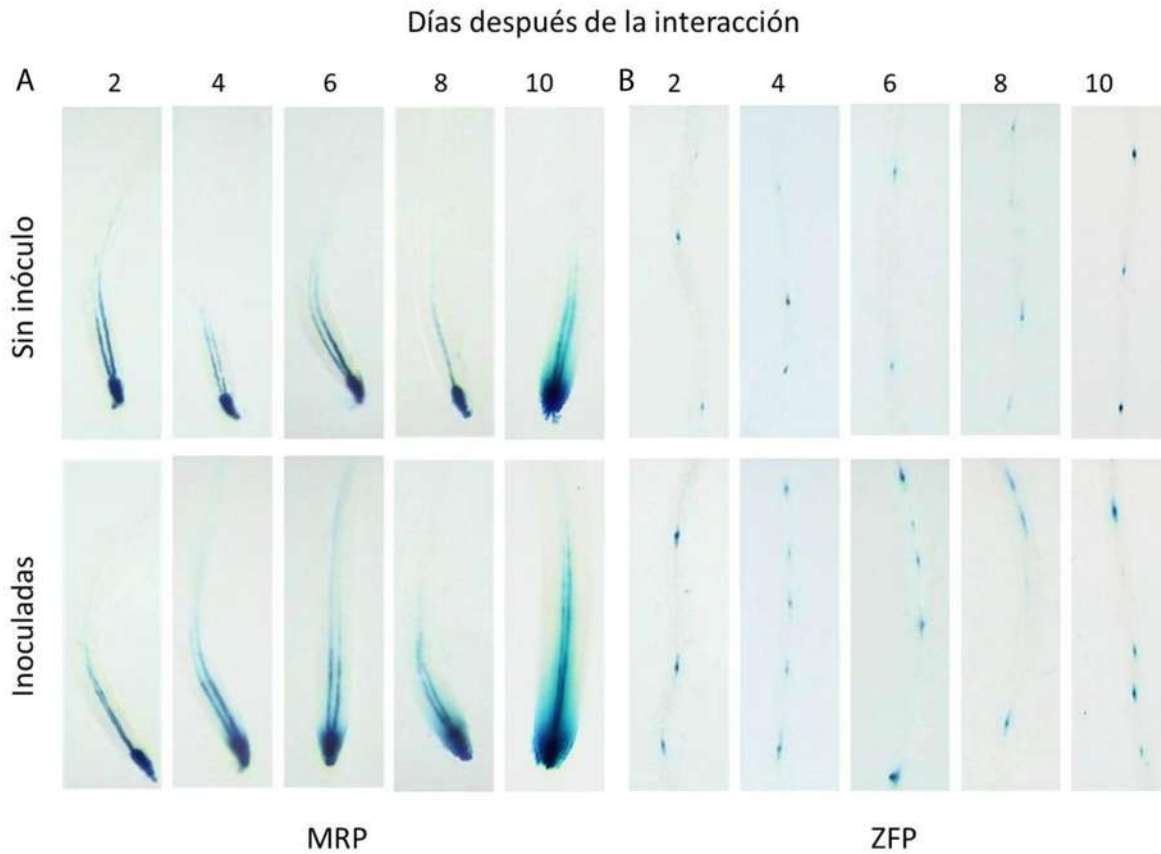
Con los resultados previos donde se muestra como la densidad celular de una estría de *B. subtilis* M496 estimuló fuertemente el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* y debido que ambos procesos (crecimiento y desarrollo), están fuertemente regulados por las auxinas, se analizó si los compuestos volátiles emitidos por la rizobacteria activarían la ruta de señalización de las auxinas. Para demostrar lo anterior, se decidió utilizar la línea transgénica *DR5::GUS* y se registró la cinética de la interacción a los mismo días en que fueron sometidas las plantas Col-0. Los resultados mostraron que la expresión del marcador (color azul), en la parte aérea se incrementó en las plantas expuestas a los volátiles de la rizobacteria a partir del cuarto ddi en comparación a las plantas sin inóculo (Fig. 21), apreciándose una expresión aumentada en los sitios de síntesis de auxinas de las hojas así como sobre las nervaduras de las mismas.



**Figura 21. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496.** Plantas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 durante 2, 4, 6, 8 y 10 ddi\*. Se observa una expresión aumentada en los sitios de síntesis y en las nervaduras de las hojas en plantas inoculadas en comparación a las plantas sin inóculo. Imágenes tomadas al microscopio estereoscópico con un objetivo de 0.63x.

En cuanto a la expresión del marcador en los meristemas de la raíz primaria (MRP) y en la zona de formación de primordios (ZFP), se observó que el patrón de expresión en la punta de la raíz fue similar en las plantas sin inóculo e inoculadas. No obstante, la coloración azul en las plantas inoculadas fue mayor debido quizá a que la raíz primaria es más gruesa en comparación a las plantas sin inóculo (Fig. 22A). Además, en las plantas expuestas a los volátiles de la rizobacteria se

presentó un mayor número de primordios dentro la zona de formación de los mismos (ZFP) en comparación a las plantas sin inocular (Fig. 22B).



**Figura 22. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria (MRP) y en la zona de formación de primordios (ZFP).** Las plantas inoculas presentan una mayor expresión del marcador en el MRP (A) y un mayor número de primordios marcados en comparación a las plantas in inóculo (B), durante una cinética de crecimiento y de interacción con los volátiles bacterianos. Imágenes tomadas a 2x.

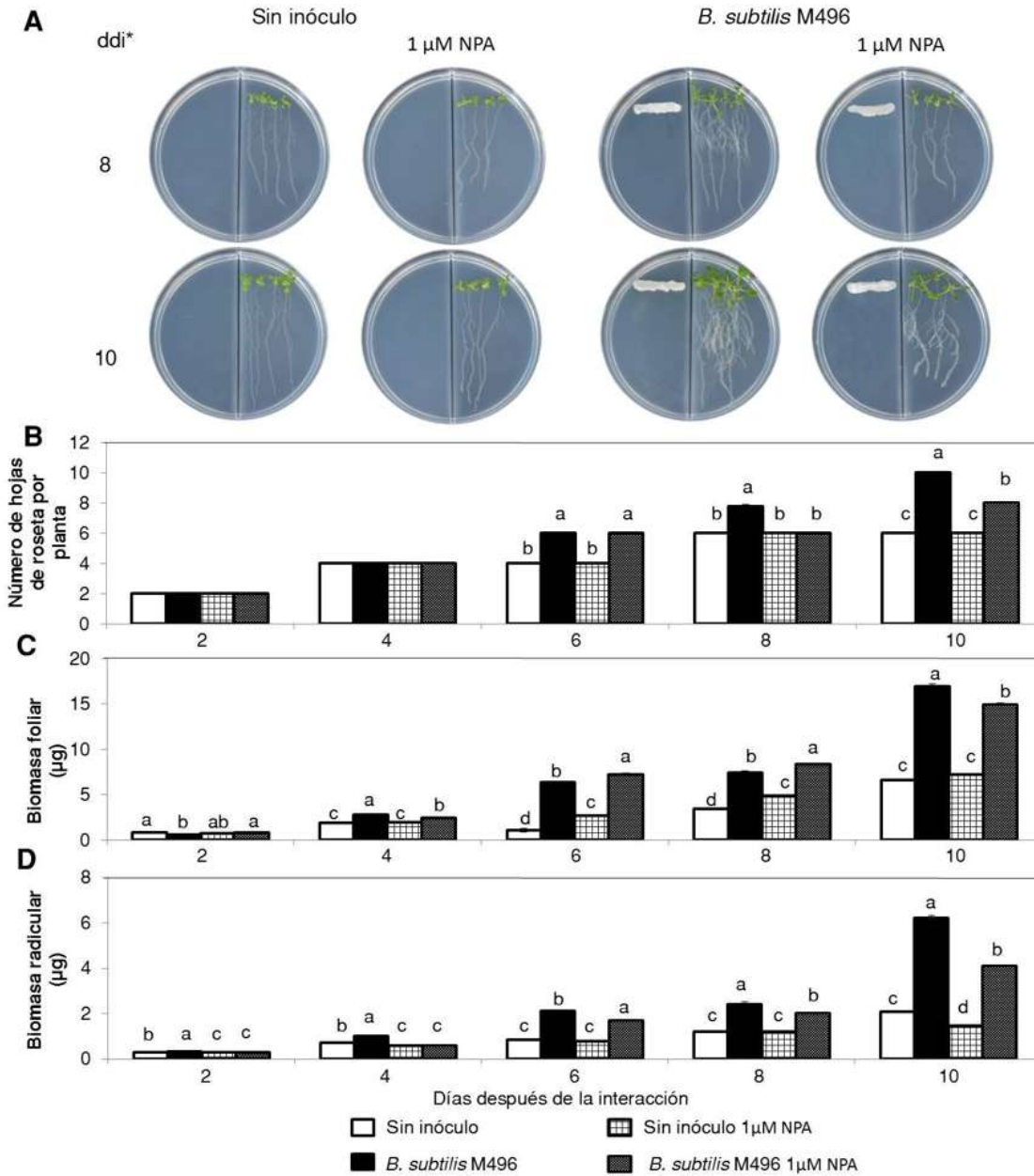
### **8.5. Análisis del efecto del inhibidor del transporte de auxinas NPA, sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* en presencia o ausencia de los volátiles de *B. subtilis* M496.**

Debido a que los volátiles de *B. subtilis* M496 incrementan la expresión del marcador de respuesta a auxinas, decidimos utilizar un inhibidor del transporte de eflujo como el NPA, utilizando una concentración de 1  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento MS debido a que esta concentración no altera los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Zhang *et al.*, 2007). En la figura 23A se puede observar el efecto sobre el crecimiento de *Arabidopsis* en presencia y ausencia de NPA, sin inóculo e inoculada, a los 8 y 10 ddi, los días en los cuales se observaron diferencias en la morfología de la planta en presencia y ausencia de NPA como disminución en la formación de raíces laterales.

En la biomasa foliar de las plántulas sin inóculo, se aprecia que el NPA no promovió ninguna diferencia en comparación a las plántulas sin inhibidor a los 10 ddi, además el número de hojas de roseta por planta no se afectó con el tratamiento de NPA durante toda la cinética (Fig. 23B-C). En cuanto a la biomasa radicular, ésta disminuyó en presencia del NPA en comparación a las plantas sin inhibidor (Fig. 23D). Por otra parte, las plántulas sin inóculo crecidas en presencia de NPA a los 8 y 10 días no presentaron diferencia en la longitud de la raíz primaria (Fig. 23A), sin embargo se observó una inhibición en la formación de raíces laterales lo cual es un efecto característico del inhibidor. Además, las pocas raíces laterales formadas presentaron una disminución en su longitud en comparación a las plántulas sin tratamiento de NPA (Fig. 23A).

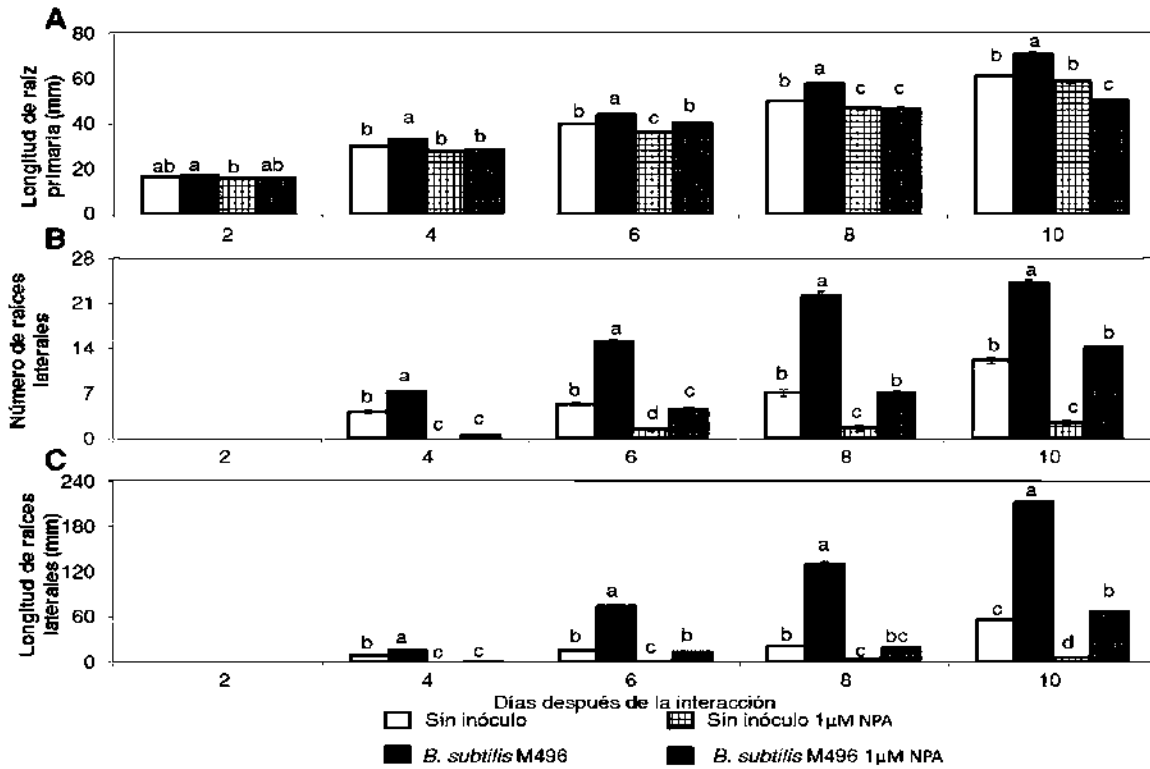
La presencia del NPA también afectó el crecimiento y desarrollo de las plántulas inoculadas con *B. subtilis* M496; se observó que a partir del sexto ddi el número de hojas de roseta fue de 6, y se incrementó a 8 hojas a los 10 ddi; este número de hojas estuvo presente en las plántulas inoculadas y en ausencia del NPA a partir de los 6 ddi mientras que al finalizar el tratamiento las plántulas presentaron 10 hojas (Fig. 23B).

A los 10 ddi, también se pudo observar que el NPA afectó la acumulación de biomasa en las plántulas inoculadas, ya que la biomasa foliar y radicular fueron menores a los 10 ddi, siendo este efecto más evidente en la biomasa radicular que fue inferior desde el día 8 ddi, en comparación a las plántulas inoculadas y sin inhibidor (Fig. 23C-D).



**Figura 23. Efecto del NPA sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* sin inóculo e inoculadas con *B. subtilis* M496.** (A) Plántulas sin inóculo e inoculadas con *B. subtilis* M496 a los 8 y 10 ddi\*. (B) Efecto del NPA sobre el número de hojas de roseta y (C) la biomasa foliar y (D) radicular de las plántulas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496. Las barras blancas representan las plántulas sin inóculo, barras con cuadros las plántulas sin inóculo en presencia de NPA, barras negras las plántulas inoculadas y barras grises inoculadas en presencia de NPA. Las diferentes letras indican diferencia estadística (Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=16$ ).

El efecto del inhibidor en las variables de la arquitectura radicular mostró que la LRP al final del análisis incrementó en un 50 % en comparación a los 2 y 4 ddi pasando de 20 a 40 mm de longitud, mientras que en las plantas inoculadas y en ausencia del inhibidor este incremento fue mayor obteniéndose al final de la cinética una LRP de 60 mm (Fig. 24A). El NRL en las plántulas inoculadas en presencia de NPA al final fue de 14, y la LRL incrementó de una manera dependiente del tiempo de interacción. Respecto a la formación de raíces laterales y su longitud en las plántulas inoculadas y en ausencia de NPA, la formación de estos órganos también se presentó a los 4 ddi, esta promoción se observó durante toda la cinética, obteniéndose a los 10 ddi un 40 % y 60 % más de raíces laterales y de LRL, respectivamente en comparación a las plántulas inoculadas en presencia de NPA (Fig. 24B-C).



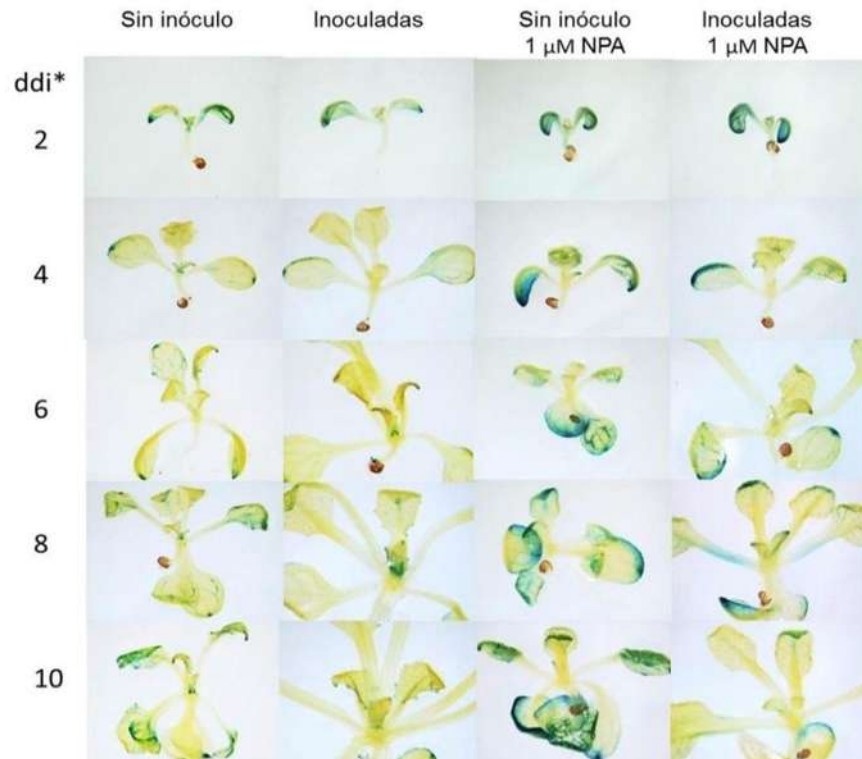
**Figura 24. Efecto del NPA y los VOCs de *B. subtilis* M496, sobre la rizogénesis.** Longitud de la raíz primaria (A), número y longitud de raíces laterales (B-C) en plántulas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en una cinética de interacción y crecimiento. Las barras blancas representan plantas sin inóculo, barras con cuadros plantas sin inóculo en presencia de NPA, barras negras plantas inoculadas y barras grises plantas inoculadas en presencia de NPA. Las diferentes letras indican diferencia estadística (Fisher LSD  $\alpha=0.05$ ,  $n=16$ ).

### **8.6. Análisis de la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas *DR5::GUS*, en plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia del NPA.**

Al observar el efecto del NPA sobre el desarrollo de las plántulas inoculadas: el acortamiento de la raíz primaria y la disminución en la promoción de la formación de raíces laterales así como de la longitud de éstas, se decidió analizar la expresión del marcador de respuesta a auxinas en follaje y raíz utilizando la línea transgénica *DR5::GUS* en presencia del inhibidor. Tal efecto, se determinó durante una cinética de interacción y crecimiento con la finalidad de observar la expresión del marcador en los sitios de síntesis de las plántulas inoculadas y con NPA y de las plántulas control (sin inóculo, sin inóculo y con NPA y plántulas inoculadas) (Fig. 25).

La expresión en la parte foliar de las plántulas sin inóculo se localizó en los sitios de síntesis de las hojas durante los primeros días de la cinética. Al paso del tiempo esta expresión se extendió por los bordes de la hoja. Respecto a la expresión de las plántulas sin inóculo en presencia de NPA se observó un incremento de la expresión del marcador sobre los sitios de síntesis así como sobre los bordes de las hojas desde el día 2 ddi en comparación a las plántulas sin inocular y en ausencia del inhibidor (Fig. 25). Al analizar la expresión del marcador en plántulas inoculadas se observó una expresión aumentada sobre los sitios de síntesis de las hojas y en las nervaduras. Cuando las plántulas fueron inoculadas y tratadas con NPA se observó una menor expresión sobre las hojas, pero se destaca que las plántulas presentaron un mayor número de hojas y su tamaño fue

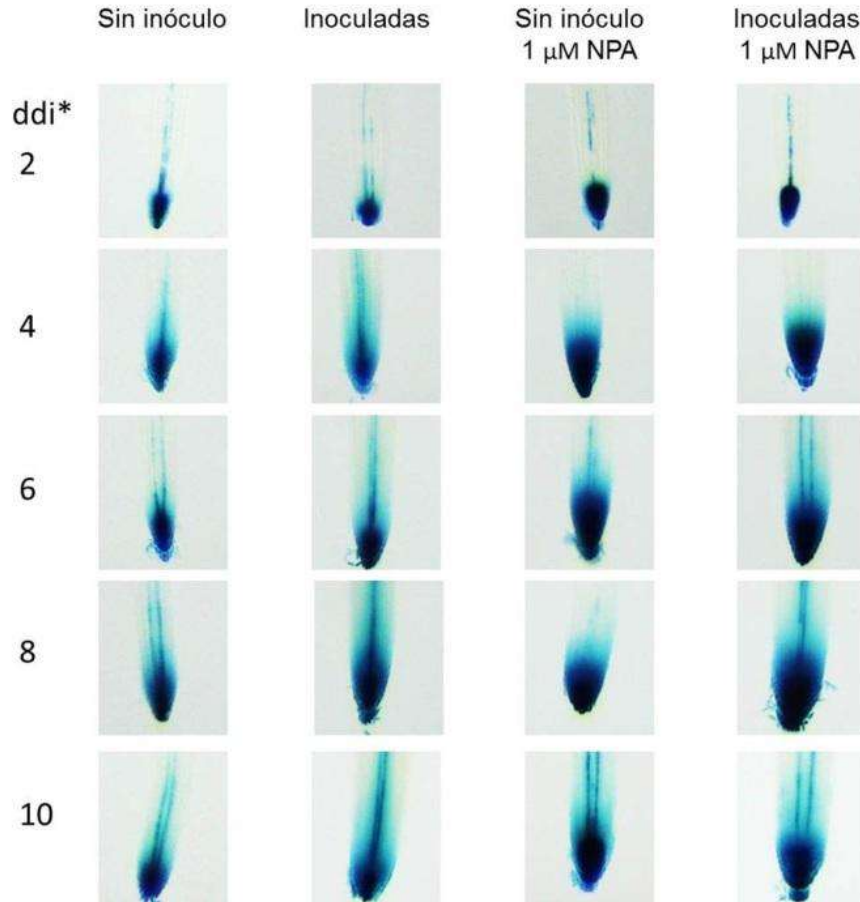
más grande que las hojas de las plántulas sin inóculo y con NPA. Además se observó que las plántulas inoculadas y con NPA, presentaron expresión del marcador en los peciolos (Fig. 25).



**Figura 25. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en follaje de plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de NPA.** Plántulas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia y ausencia del inhibidor de transporte de auxinas NPA, durante 2, 4, 6, 8 y 10 ddi\*. Se observa una expresión aumentada en los sitios de síntesis y peciolos de las hojas en plantas en presencia del NPA en comparación a las plantas sin el inhibidor. Imágenes tomadas a 0.63x.

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión del marcador de respuesta a auxinas en la raíz primaria de las plántulas sin inocular mostraron que sobre el meristemo de la raíz se incrementaba de manera dependiente del tiempo, lo

anterior, debido probablemente al tamaño de la raíz, conservando el mismo patrón de expresión. Al analizar a las plántulas sin inocular y en presencia de NPA se observó un incremento de la expresión del marcador sobre la zona meristemática, además también se observó un incremento en el grosor de la raíz en comparación a la raíz de las plántulas sin inóculo y en ausencia de NPA (Fig. 26). La expresión del marcador en las plántulas inoculadas mostró un incremento de dicha expresión en el meristemo de la raíz así como en el grosor de la misma dependiente del tiempo de interacción. En relación a la expresión en las raíces de las plántulas inoculadas en presencia de NPA se observó una mayor expresión sobre el meristemo de la raíz, la cual se apreció a partir de 4 ddi y una estimulación en el grosor de la raíz mayor al observado en las plántulas inoculadas en ausencia de NPA así como en las plántulas sin inocular en presencia del inhibidor (Fig. 26).

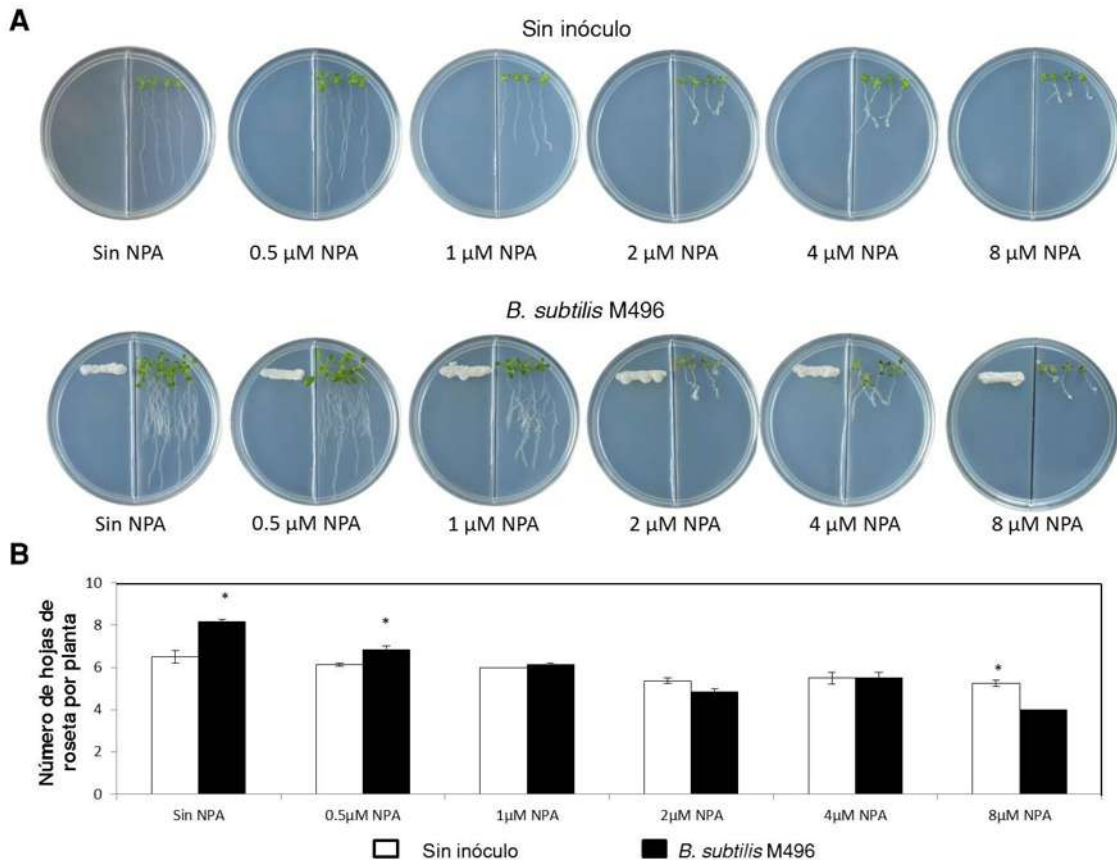


**Figura 26. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria (MRP) en plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de NPA.** Plántulas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia y ausencia del inhibidor de transporte de auxinas NPA, durante 2, 4, 6, 8 y 10 ddi\*. Se observa una expresión aumentada en los meristemos de las raíces así como un incremento en el grosor de este órgano de las plantas inoculadas y en las plantas con el tratamiento de NPA. Imágenes tomadas a 0.63x.

### **8.7. Análisis del efecto de 0.5, 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{M}$ del NPA, sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* a 10 ddi con los volátiles de *B. subtilis* M496.**

Un aspecto interesante de los experimentos anteriores fue que a los 10 ddi, las plántulas inoculadas y con NPA continuaron su crecimiento y desarrollo (Fig. 23A-B), lo que indicó que  $1\mu\text{M}$  de NPA no fue la más adecuada para bloquear el transporte de auxinas en las plantas expuestas a los VOCs de la rizobacteria. De ahí que se decidió realizar un experimento dosis-respuesta de NPA a las concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y  $8\mu\text{M}$  en las plántulas inoculadas (Fig. 27A).

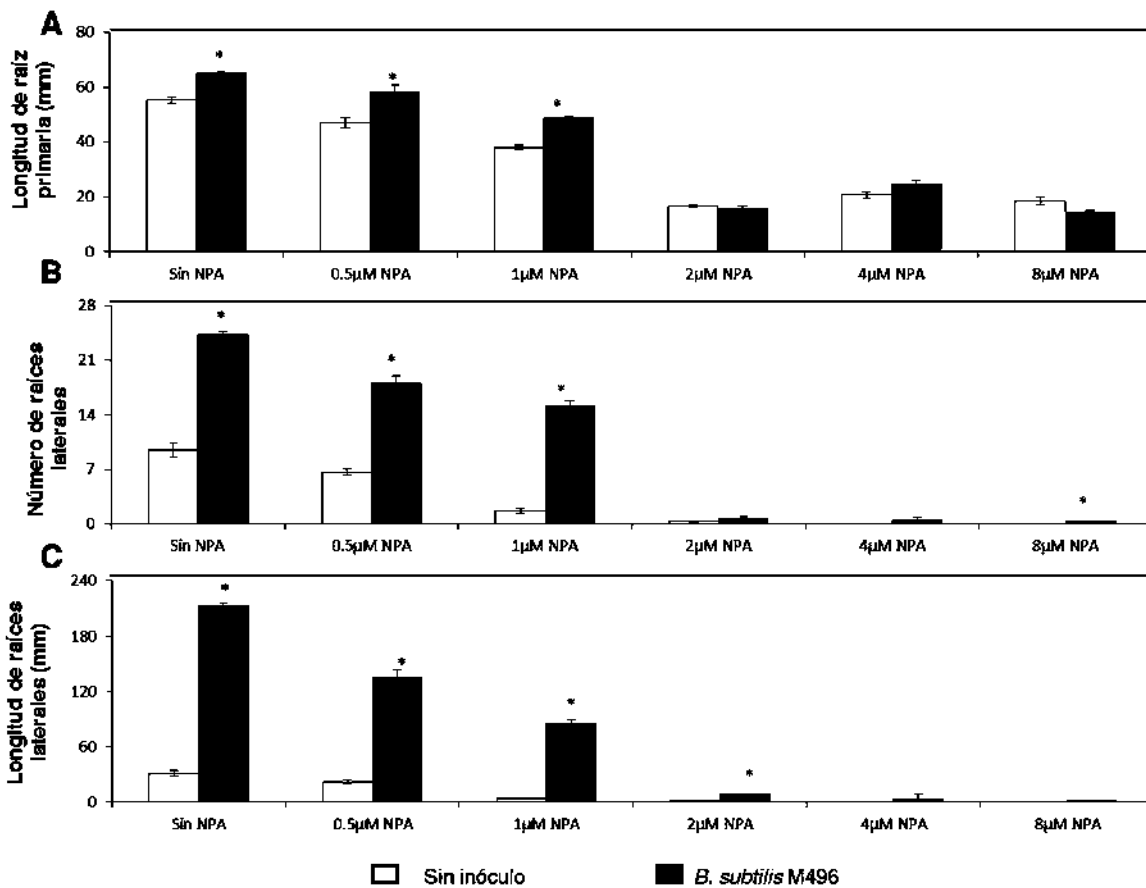
Los resultados mostraron una notable disminución del área foliar y radicular dependiente de la concentración del inhibidor (Fig. 27A). Sin embargo, la dosis inferior a  $1\mu\text{M}$  de NPA no fue suficiente para restringir la formación de hojas nuevas, mientras que a  $10\mu\text{M}$ , se alteró el desarrollo de las plántulas aún en presencia de los VOCs emitidos por la rizobacteria (Fig. 27B).



**Figura 27. Efecto de diferentes concentraciones de NPA sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* expuesta a los VOCs de *B. subtilis* M496.** (A) Imágenes representativas de plántulas de 10 ddi con los VOCs de *B. subtilis* M496 en presencia y ausencia de NPA. (B) Efecto de diferentes concentraciones del NPA en el número de hojas de roseta en plantas sin inóculo y expuestas a los VOCs de *B. subtilis* M496 a 10 ddi\*. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre pares de tratamientos (t-Student,  $p=0.05$ ;  $n=16$ ).

La raíz fue el órgano más afectado en las plántulas sin inocular e inoculadas cuando fueron crecidas en presencia de NPA. La LRP de las plantas disminuyó en un 50 % a partir de la concentración de 2  $\mu$ M. Concentraciones mayores de 2  $\mu$ M, mostraron que la LRP se mantuvo constante (Fig. 28A).

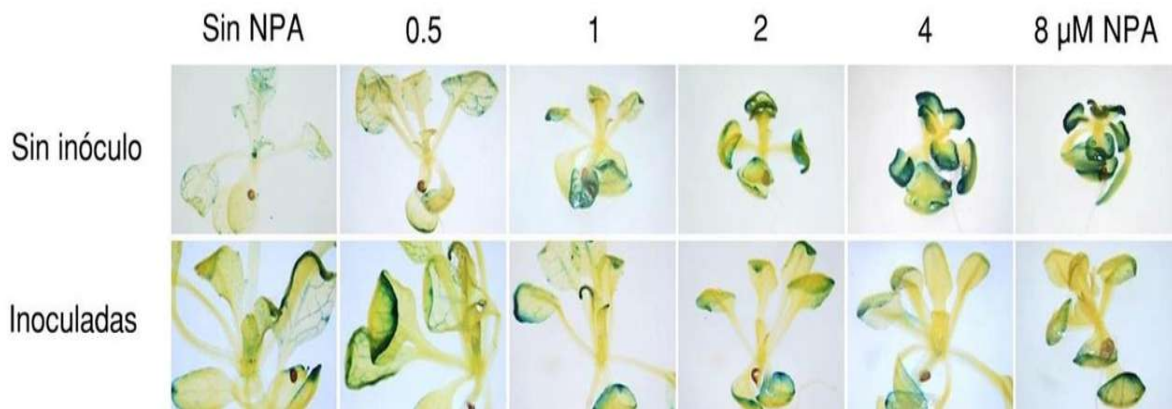
Un comportamiento similar se observó en cuanto al NRL y LRL, debido a que a partir de 2  $\mu\text{M}$  se inhibe casi por completo la formación de raíces laterales. Un aspecto muy interesante es que las plántulas sin inóculo a las dosis de 4 y 8  $\mu\text{M}$  ya no presentan raíces laterales, mientras que en las plántulas inoculadas se observó una raíz pequeña (Fig. 28B-C).



**Figura 28. Efecto de diferentes concentraciones del NPA y los VOCs de *B. subtilis* M496 sobre la arquitectura radicular. LRP (A), NRL (B) y LRL (C) en plantas sin inóculo y expuestas a los VOCs de *B. subtilis* M496 a 10 ddi\*. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre pares de tratamientos (t-Student,  $p=0.05$ ;  $n=16$ ).**

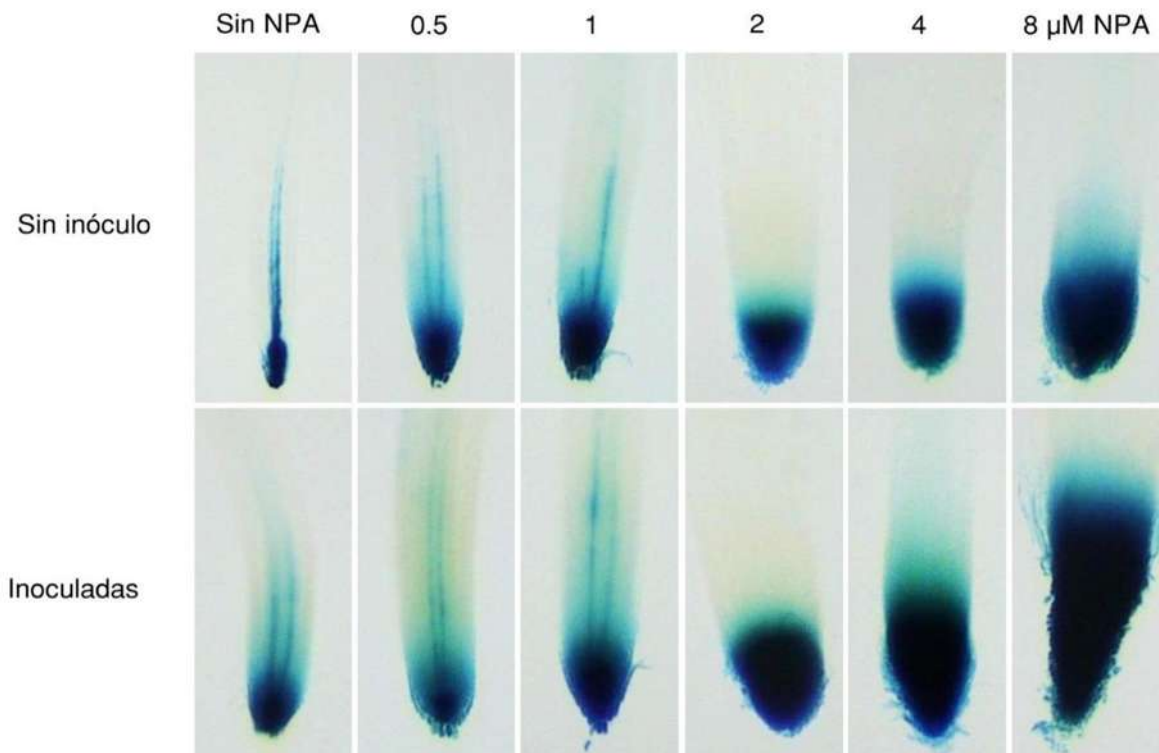
**8.8. Análisis de la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas DR5::GUS, en plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de diferentes concentraciones del NPA.**

El análisis de la expresión del marcador de plantas expuestas a las diferentes concentraciones de NPA mostró que las plantas sin inóculo presentaban una mayor expresión del marcador sobre los sitios de síntesis y bordes de las hojas de una manera dependiente de la concentración del inhibidor. Lo anterior sugiere una mayor acumulación de auxina en la parte aérea de la plántula, mientras que en las plántulas inoculadas a partir de la concentración de 1  $\mu$ M no se observaron diferencias en la expresión del marcador en las hojas de las plántulas crecidas en las dosis más altas y además la expresión fue menor a la observada en las plántulas sin inocular, aunque se destaca que en las plántulas inoculadas las hojas fueron más grandes (Fig. 29).



**Figura 29. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en follaje de plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de diferentes concentraciones de NPA.** Plántulas sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de diferentes concentraciones del NPA, a 10 ddi\*. Imágenes tomadas a 0.63x.

Al analizar la expresión del marcador en la raíz primaria de las plántulas sin inocular observamos un incremento de la expresión en el meristemo de la raíz dependiente de la concentración de NPA. En este caso la raíz primaria fue más pequeña debido a la acumulación de auxina, pero se incrementó su grosor. Las plántulas inoculadas mostraron un comportamiento similar, es decir la raíz primaria también fue pequeña a dosis altas de NPA, pero fueron aún más gruesas que la de las plántulas no inoculadas (Fig. 30).

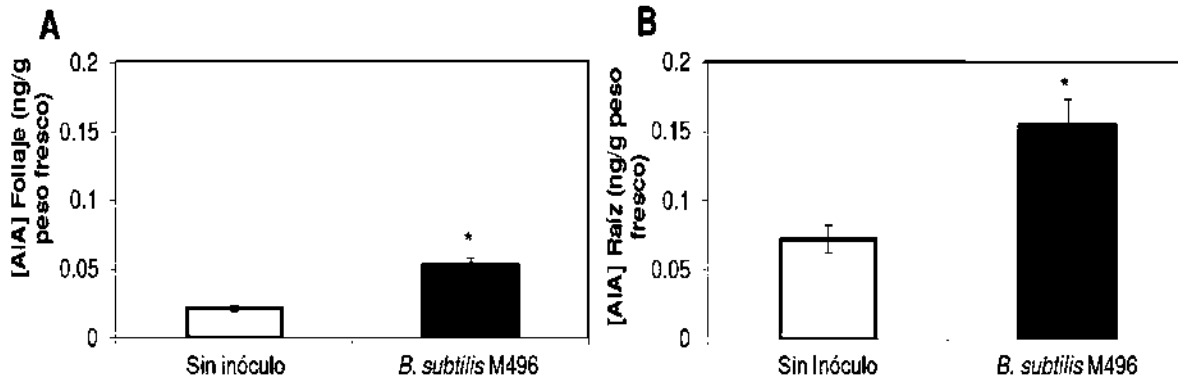


**Figura 30. Expresión del marcador de respuesta a auxinas en el meristemo de la raíz primaria (MRP) de plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de diferentes concentraciones de NPA. Plántulas sin inocular y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 en presencia de diferentes concentraciones del NPA, a 10 ddi\*. Imágenes tomadas a 0.63x.**

### **8.9. Cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) en plántulas de *A. thaliana* expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496.**

Como se mencionó anteriormente, el AIA es el miembro principal de las auxinas y se encuentra presente en las plantas modulando procesos del desarrollo como la formación de hojas nuevas y la arquitectura radicular en forma dependiente de su concentración. Debido a que los volátiles de la rizobacteria promueven dichos efectos se decidió cuantificar el contenido de esta hormona presente en los tejidos de follaje y raíz en plántulas silvestres sin inocular y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 a los 10 ddi por medio de la técnica de GC-MS.

Los resultados de la cuantificación mostraron que las plántulas sin inocular presentaron cantidades pequeñas de la hormona en el follaje y raíz en comparación al contenido encontrado en las plántulas expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 (Fig. 31). El contenido de AIA en el follaje de las plántulas sin inóculo fue inferior al encontrado en las plántulas expuestas a los volátiles de la rizobacteria, estas últimas incrementaron al doble el contenido de AIA (Fig. 31A). En cuanto al tejido radicular, se observó que los niveles de esta hormona eran tres veces más en las plántulas expuestas a los volátiles de la rizobacteria en comparación a las plántulas sin inocular (Fig. 31B).



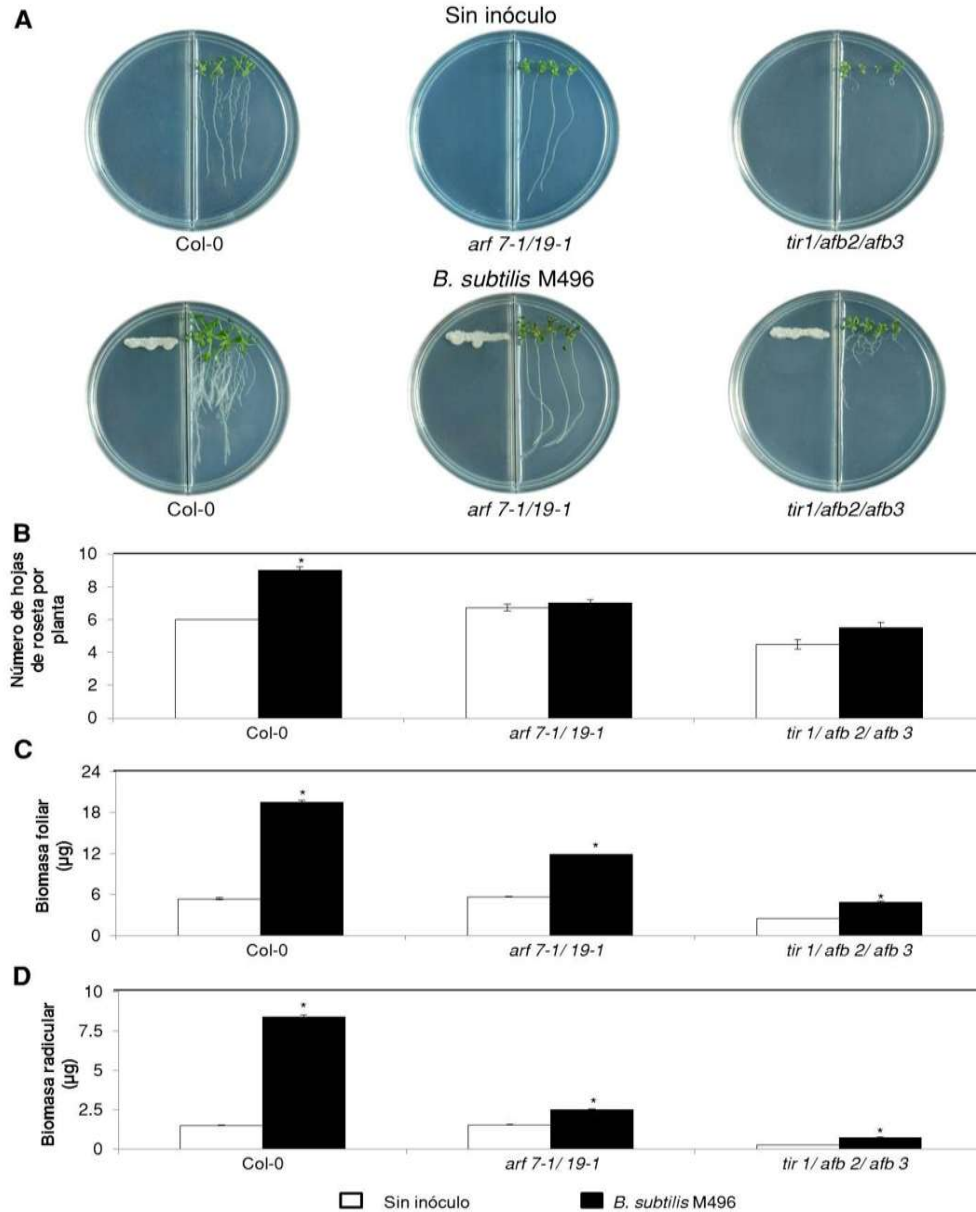
**Figura 31. Cuantificación de AIA en plántulas de *A. thaliana* sin inóculo y expuestas a los volátiles de *B. subtilis* M496 después de 10 ddi. Se observó un incremento en el contenido de la hormona en los tejidos de follaje (A) y raíz (B) de las plantas expuestas a los volátiles bacterianos. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos. (t-Student  $\alpha=0.05$ ,  $n=6$ ).**

### **8.10. Análisis del efecto de los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de mutantes en la vía de señalización de auxinas.**

Debido a que los resultados observados anteriormente sugieren que los VOCs de *B. subtilis* M496 promueven el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica, se analizó el crecimiento y desarrollo de mutantes de *A. thaliana* en los factores de respuesta y receptores de auxinas (*arf 7-1/19-1* y *tir1/afb2/afb3*) para evaluar a que nivel estaría participando dicha fitohormona (Fig. 32). En la Fig. 32A, se observa el fenotipo de Col-0 y de las plántulas mutantes. En el caso de la doble mutante, el número de hojas de roseta

por planta que es de 6, es igual al de las plantas Col-0, mientras que en la triple mutante el número de hojas de roseta es de 4 (Fig. 32B).

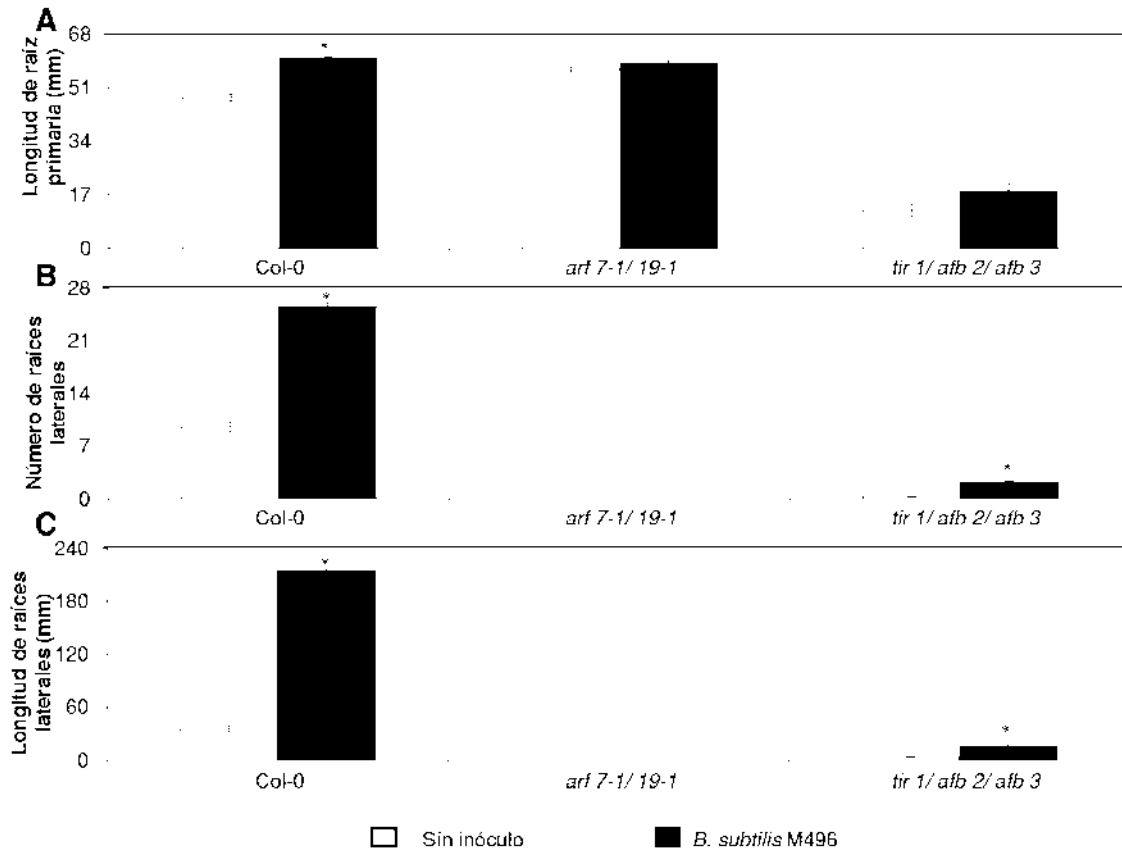
Lo que se observó cuando las plántulas fueron inoculadas fue que los VOCs indujeron la formación de hojas nuevas en Col-0 y la biomasa foliar (Fig. 32C) y radicular (Fig. 32D), fueron superiores respecto a las plántulas no inoculadas. En la doble mutante no se indujo la formación de hojas nuevas (Fig. 32A), pero la biomasa foliar y radicular (Fig. 32C-D) se incrementaron respecto a su control sin inóculo. En la triple mutante sucedió algo similar, es decir, no se incrementó el número de hojas por planta (Fig. 32A), pero la biomasa foliar y radicular (Fig. 32C-D), fueron superiores a su control sin inóculo.



**Figura 32. Efecto de los compuestos volátiles emitidos por *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de mutantes de *A. thaliana*.** (A) Imágenes representativas de plántulas después de 10 días de interacción. (B) Efecto de los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 en la promoción de hojas de roseta, así como de (C) la biomasa foliar y (D) radicular en plántulas Col-0, doble y triple mutante de la vía de señalización de auxinas. Las biomásas están establecida en ( $\mu\text{g}$ ) por planta. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre pares de tratamientos. (t-Student  $\alpha=0.05$ ;  $n=16$ ).

El análisis de la arquitectura radicular en las plántulas sin inóculo mostró que la doble mutante presentó la raíz primaria más larga y no formó raíces laterales, en cuanto a la triple mutante, ésta presentó una raíz primaria agravitrópica y escasa formación de raíces laterales (Fig. 33A-B).

Cuando las plántulas fueron expuestas a los VOCs bacterianos, Col-0 incrementó la LRP pero ni en la doble ni triple mutante se observó una diferencia significativa en el tamaño en comparación a sus controles respectivos sin inóculo (Fig. 33A). Además los VOCs indujeron la formación de raíces laterales y su longitud en Col-0 e interesantemente estos compuestos también promovieron el NRL y la LRL en la triple mutante (Fig. 33B-C).



**Figura 33. Efecto de los volátiles de *B. subtilis* M496 sobre la morfogénesis radicular de mutantes de *A. thaliana*.** Las gráficas muestran el efecto de los volátiles de la rizobacteria en los diferentes parámetros de la arquitectura de la raíz como (A) Longitud de raíz primaria LRP, (B) Número de raíces laterales NRL, (C) Longitud de raíces laterales LRL, en plantas Col-0, doble y triple mutante en la vía de señalización de auxinas. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre pares de tratamientos (t-Student,  $p=0.05$ ;  $n=16$ ).

### **8.11. Determinación del perfil de compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 durante su interacción con *A. thaliana* por SPME.**

Los resultados anteriores proporcionaron evidencia de que los compuestos volátiles emitidos por la rizobacteria *B. subtilis* M496 promueven el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, por lo cual decidimos analizar el perfil de VOCs que son liberados por dicha rizobacteria en cultivo axénico y durante su interacción con la plántula después de 10 días. En total, se identificaron 16 compuestos que son producidos por la bacteria en cultivo axénico, dentro de ellos se encontraron compuestos con actividad antimicrobiana como el 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. Además, se observó la presencia de un compuesto con la mayor abundancia que correspondió a la 3-hidroxi-2-butanona conocida como acetoína con un porcentaje de área de 74.03, así como la 2,3-butanediona con un porcentaje de área de 0.77, cabe mencionar su presencia debido a que es un producto de la acetoína (Tabla 1).

En cuanto al perfil de los VOCs obtenido durante la interacción planta-rizobacteria, se observó que de los compuestos que son emitidos por la bacteria, únicamente se detectó la presencia de 2-nonanona con un porcentaje de área pequeño correspondiente al 0.59 % y acetoína, la cual se incrementó durante la interacción a un porcentaje de área de 90.05 % (Tabla 1). El porcentaje de área restante de 9.36 corresponde a VOCs que son emitidos básicamente por la plántula. Debido a que los antecedentes mencionaban que la acetoína podría tener un papel importante en la promoción del crecimiento foliar en plantas de *A. thaliana*, y además fue el compuesto más abundante emitido por la rizobacteria, decidimos

realizar una cuantificación más exacta de este compuesto, (técnica de SPME es semicuantitativa). Para ello se obtuvo una curva patrón con el estándar acetoína y se utilizó una jeringa gas-tight para tomar directamente de las cajas un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de gas, mismo que fue inyectado directamente en el GC. Los resultados obtenidos reforzaron los datos obtenidos por la técnica de SPME, donde se observó que la rizobacteria emite 2.32  $\mu\text{g/mL}$  de acetoína y esta concentración se incrementó cuando la rizobacteria se encontraba en interacción con la planta a 2.62  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 1.** Compuestos volátiles de *A. thaliana*, *B. subtilis* M496 y de la interacción planta-bacteria identificados por SPME empleando GC-MS.

<b>Compuestos volátiles identificados por SPME</b>			
Compuestos	<i>A. thaliana</i>	<i>B. subtilis</i> M496	Interacción
	Área %		
Etanol	52.52	-	-
3-Metil-2-butanona	-	0.38	-
2,3-Butanediona	-	0.77	-
1-Butanol	-	0.41	-
Eucaliptol	2.98	-	-
Acetoína	-	74.03	90.05
6-Metil-2-heptanol	4.70	0.66	0.08
2-Nonanona	-	0.70	0.59
Ácido acético	1.43	-	0.17
1-Heptanol	-	0.71	-
1-Octanol	-	2.96	-
2-Undecanona	-	-	2.54
Acetofenona	18.30	5.10	4.24
1-Nonanol	0	-	-
$\alpha$ -Terpineol	11.97	-	1.23
1-Decanol	-	1.54	-
Alcohol bencílico	-	0.66	-

<b>Continuación tabla 1. Compuestos volátiles identificados por SPME</b>			
Tetradecanal	-	0.73	-
4-Decanona	-	0.67	-
6-Undecanona	-	0.56	-
5-Tridecanona	-	0.66	-
1-Dodecanol	-	-	-
Ciclodecano	-	2.16	-
3-Tetradecanona	-	0.50	-
E-2-Tetradecen-1-ol	8.11	-	1.09
2-Pentadecanona	-	0.52	-
1-Tridecanol	-	0.74	-
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	-	3.57	-
9-Octadecanona	-	1.27	-
Ciclododecano	-	0.33	-
2-Morfolinometil-1,2-difenil-2-propanol	-	0.37	-

## 9. DISCUSIÓN

Las plantas son organismos multicelulares sésiles, cuya estructura se divide principalmente en área foliar y radicular; esta última es la encargada de capturar agua y nutrientes del suelo, lo cual permite el crecimiento y desarrollo del área foliar. Además el sistema radicular se encuentra en estrecha relación con los microorganismos que habitan en el suelo. El crecimiento y desarrollo de las plantas se ve influenciado por factores internos como son la producción de hormonas y externos. Las plantas son capaces de generar un gran número de mecanismos para asegurar su sobrevivencia, uno de los cuales es el establecimiento de una comunicación con diferentes organismos a través de la emisión de compuestos difusibles o por la emisión de compuestos volátiles (Kumar *et al.*, 2006). Se ha reportado que estos últimos pueden atraer polinizadores y dispersadores de semillas, atracción de predadores en contra de herbívoros y establecer comunicación con microorganismos del suelo como las PGPR. El primer estudio donde se planteó la posibilidad de que los VOCs emitidos por las PGPR participan en la promoción del crecimiento vegetal fueron los realizados por Ryu *et al.* (2003), donde ellos demostraron que la rizobacteria *B. subtilis* GB03 emite dos compuestos, acetoína y 2,3-butanediol, los cuales mostraron efectos promotores sobre el crecimiento de la biomasa aérea de plantas de *A. thaliana*. A partir de este estudio se abrió el campo del análisis del efecto de los compuestos volátiles emitidos por PGPR sobre la estimulación del crecimiento y desarrollo de plantas.

En nuestro grupo de trabajo se cuenta con una colección de aproximadamente 3000 aislados rizosféricos y a partir de éstos se seleccionó al azar uno, el cual fue identificado como *B. subtilis* M496. En experimentos previos, se observó que esta rizobacteria fue capaz de promover el crecimiento de *A. thaliana* mediante la emisión de VOCs (Cortés-Sánchez *et al.*, 2010). Debido a lo antes mencionado, se decidió realizar en este trabajo un estudio más detallado sobre el efecto de estos compuestos en la planta. En primera instancia se realizó una cinética de crecimiento de las plántulas a los 2, 4, 6, 8 y 10 días en presencia y ausencia de la rizobacteria *Bacillus subtilis* M496 en cajas de Petri con una división para evitar el contacto físico entre ambos individuos y que el efecto observado se debiera únicamente a los VOCs de la bacteria dentro del sistema. Las variables que se midieron fueron, formación de hojas de roseta, biomasa foliar y radicular así como efecto sobre las variables de la arquitectura radicular como longitud de raíz primaria (LRP), número de raíces laterales (NRL) y longitud de raíces laterales (LRL). Los resultados obtenidos indicaron que las plántulas que interactuaban con los VOCs emitidos por la rizobacteria promovieron la formación de hojas de roseta a partir del cuarto ddi y al sexto día era evidente la acumulación de la biomasa foliar y radicular (Fig. 18). Al analizar la arquitectura radicular observamos que las plántulas presentaron una promoción en la LRP, NRL y LRL a partir del segundo ddi en comparación a las plántulas sin inóculo. Dicha estimulación se mantuvo hasta el último día de la cinética (día 10 ddi), de tal manera que las plántulas inoculadas presentaron un mayor número de hojas de roseta y el NRL y LRL fueron de 3 y 5 veces, respectivamente superiores a las plántulas sin inocular (Fig. 18 y 19). Con estos resultados se demostró que los VOCs emitidos por *B. subtilis*

M496 promueven fuertemente el crecimiento y modulan la rizogénesis de una manera dependiente del tiempo de interacción. Las ventajas ecológicas que podrían tener las bacterias al inducir un cambio en la estructura de la raíz no se han definido con claridad, sin embargo, estos resultados permiten especular que el incremento de la longitud de la LRP así como el NRL y LRL, promovería a su vez la colonización y establecimiento de la interacción simbiótica de una manera más eficaz. En el estudio de Gutiérrez-Luna *et al.* (2010), donde se evaluó el efecto de los VOCs de doce aislados rizosféricos sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis* se determinó que las plantas responden en forma específica ante los VOCs que emite cada rizobacteria, debido a que la LRP, NRL y LRL fueron diferentes entre sí, y es de resaltar que ninguna de las respuestas de esas plantas fue similar a las que se obtuvieron cuando *Arabidopsis* interactúa con *B. subtilis* M496. Esto sugiere que la planta es capaz de percibir a un compuesto en particular o a la mezcla de compuestos mediante un mecanismo totalmente desconocido y que estos compuestos a su vez pueden desencadenar diferentes señales de tipo hormonal alterando la morfología de la planta. El estudio de Zhang *et al.* (2007), mencionaron que *B. subtilis* GB03, promueve el crecimiento de *Arabidopsis* mediante una activación de la vía auxínica, mientras que Ortiz-Castro *et al.* (2008), publicaron que *B. megaterium* UMCV1 lo hace mediante la activación de la vía de las citocininas.

En un estudio reciente realizado por Velázquez-Becerra *et al.* (2011), donde investigaron el efecto de los VOCs de *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de *Medicago sativa*, observaron que el efecto promotor se registró a

una baja densidad celular, mientras que a altas densidades se presentó un efecto represor. Debido a lo anterior, los autores comentaron que *A. agilis* altera el crecimiento de *M. sativa*, en función de la población bacteriana. Con este estudio en mente, se decidió determinar el efecto de la densidad celular de *B. subtilis* M496 sobre el crecimiento y desarrollo de Arabidopsis. Los resultados revelaron que al igual que lo reportado por Velázquez-Becerra *et al.* (2011), al incrementar la densidad celular de *B. subtilis* M496 en dos ( $14.6 \times 10^8$  CFU/mL) y tres estrías ( $21.9 \times 10^8$  CFU/mL), se observó un efecto represor del crecimiento en comparación a la densidad celular de una estría. El incremento en la densidad celular a tres estrías sugiere una mayor acumulación de VOCs dentro del sistema, por consiguiente el efecto represor puede ser debido al aumento en la concentración de los VOCs bacterianos.

Otro aspecto que vale la pena resaltar es que al final del experimento (10 ddi), se compararon las plántulas sin inóculo con aquellas inoculadas con tres estrías y se notó que a pesar del incremento en la densidad celular, las plántulas incrementaron su biomasa y presentaron un mayor número de hojas de roseta y de raíces laterales que las plántulas sin inocular, lo que sugiere que los VOCs que emite *B. subtilis* M496 podrían estar modulando directamente alguna vía de señalización hormonal de tal manera que aún cuando existe un mayor contenido de VOCs bacterianos dentro del sistema, la planta fue superior en tamaño y en el número de órganos producidos (Fig. 20). Los antecedentes han mencionado que los efectos promotores en el crecimiento y desarrollo vegetal por medio de la emisión de VOCs bacterianos se deben a que los VOCs modulan una o varias

vías hormonales en las plantas. Para elucidar el mecanismo mediante el cual *B. subtilis* M496 modula el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*, se determinó el efecto de los VOCs de la rizobacteria en la expresión de genes de respuesta a auxinas, utilizando la línea transgénica *DR5::GUS*, debido a que las auxinas están involucradas en la regulación de los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal. El análisis de la línea *DR5* indicó que las plantas expuestas a los volátiles de la rizobacteria presentaron una mayor expresión del marcador sobre las hojas y en las nervaduras de las mismas (Fig. 21), además se observó un incremento en la expresión sobre los meristemas de las raíces primarias en comparación a las plantas sin inóculo (Fig. 22A). Este resultado indicó un posible incremento en la síntesis de auxinas, o quizá solamente la activación del transporte de auxinas en la planta (Fig. 22B).

Para determinar si los VOCs de *B. subtilis* M496 afectan el transporte de auxinas se utilizó NPA a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  para inhibir el transporte de eflujo del AIA. Esta concentración de NPA, es suficiente para inactivar el transporte de AIA sin alterar el crecimiento y desarrollo de la planta (Zhang *et al.*, 2007). Lo que se observó en este experimento fue una considerable reducción en el NRL en las plántulas sin inocular, esto confirma que se requiere del transporte de auxinas para la formación de nuevas raíces laterales según ha reportado (Zhang *et al.*, 2007). De igual forma las plántulas inoculadas presentaron reducción en la formación de raíces laterales, lo que muestra igualmente que el transporte de auxinas es requerido para que los VOCs bacterianos disparen la formación de nuevas raíces laterales y por tanto sugiere que los VOCs activan el transporte de

auxinas, sin embargo en estas plantas expuestas a los VOCs bacterianos y crecidas en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de NPA sigue habiendo una cantidad considerable de raíces laterales. Otro resultado no esperado fue que la biomasa foliar de las plántulas inoculadas no se inhibió como lo observado por Zhang *et al.* (2007). Lo anterior sugiere que 1  $\mu\text{M}$  no es la concentración adecuada para inhibir el transporte de auxinas inducido por los VOCs de la rizobacteria por lo que continúa el incremento de la biomasa foliar (Fig. 23).

El análisis de expresión del marcador de respuesta a auxinas (*DR5::GUS*) en presencia de NPA indicó un incremento en la expresión del marcador en la parte aérea de las plantas inoculadas (Fig. 25 y 26), así como en el meristemo de la raíz primaria. Esto último indica que cuando se inhibe el transporte de eflujo de auxinas, las hormonas tienden a acumularse en los sitios de síntesis y el incremento en la expresión se debe a una sobreacumulación de auxinas en esos sitios (Zhang *et al.*, 2007). Un aspecto interesante fue que las raíces de las plantas expuestas a los volátiles bacterianos, incrementaron su grosor, quizá debido a una mayor acumulación de auxinas por acción del NPA y por lo tanto las plántulas inoculadas presentaron una mayor expresión que las no inoculadas. (Fig. 26).

Un barrido de concentraciones de NPA desde 0.5, 1, 2, 4 y 8  $\mu\text{M}$  fue empleado para esclarecer el nivel de participación del transporte de auxinas mediado por los VOCs de *B. subtilis* M496 en la promoción del crecimiento de *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos mostraron que el órgano que se afectó más al incrementar la dosis de NPA fue la raíz y la LRP se disminuyó casi en un 50 % en comparación a las plántulas sin inocular. Por otro lado, el NRL en las plantas con 2  $\mu\text{M}$  o más de

NPA fue entre 13 y 26 veces menor que las plantas sin NPA crecidas en contacto con los VOCs bacterianos. Esto confirma de manera muy clara que el transporte de auxinas es necesario para que los VOCs de *B. subtilis* M496 disparen la formación de nuevas raíces laterales. En este mismo sentido vemos que la expresión del marcador de respuesta a auxinas en las plantas inoculadas mostró un incremento en el grosor de la raíz dependiente de la concentración de NPA, lo cual confirma que los VOCs de *B. subtilis* M496 incrementan la síntesis y activan el transporte de auxinas en la planta (Fig. 29 y 30). Fue muy interesante notar que en este aspecto existió un paralelismo entre la parte aérea y la parte radicular de las plantas, ya que las plantas crecidas en presencia de los VOCs y sin NPA tuvieron un mayor número de hojas de roseta que sus controles no inoculados, pero las plantas crecidas en presencia de los VOCs y una concentración de 1  $\mu\text{M}$  o mayor de NPA tuvieron igual o menos hojas que sus respectivos controles. Esto último se correlaciona con una menor expresión del marcador *DR5::GUS* en plantas inoculadas con altas concentraciones de NPA.

El análisis del contenido de AIA confirmó que los VOCs emitidos por *B. subtilis* M496 inducen la síntesis de esta hormona debido a que se observó un incremento en el contenido tanto en la parte aérea como en la parte radicular de las plantas inoculadas en comparación a las plantas sin inóculo siendo de gran interés observar el incremento en la parte radicular el cual fue mayor al observado en la parte aérea (Fig. 31), siendo este el primer estudio donde dan evidencias cuantitativas de que los VOCs microbianos inducen la síntesis de AIA en las plantas.

Cuando la doble y triple mutante en la vía de señalización de auxinas se inocularon con *B. subtilis* M496 se observó que los VOCs permitieron una mayor acumulación de biomasa foliar y radicular en ambas mutantes en comparación a las mutantes sin inocular (Fig. 32 y 33). Este resultado sugiere que los VOCs actúan sobre la raíz en forma dependiente de la vía auxínica, ya que en el caso específico de la triple mutante en los receptores de auxinas, los VOCs estimularon (aunque en forma muy limitada), la formación de raíces laterales así como su longitud (Fig. 33), cosa que no se observó en las plantas con la doble mutación en los factores de transcripción, lo que puede interpretarse de dos formas: 1) que los VOCs activan a la vía auxínica a nivel de los receptores, 2) que los VOCs activan la vía auxínica a nivel de los factores de transcripción. En cuanto al área foliar de las mutantes, VOCs no promovieron la formación de hojas de roseta, pero si estimularon la acumulación de biomasa que bien podría deberse por una estimulación de la vía auxínica (Fig. 21), sin embargo, esto no es apoyado por los marcadores de expresión auxínica *DR5::GUS* en presencia de NPA (Fig. 25 y 29), independientemente de esto, no se descarta que el aumento de biomasa foliar se debe a un mejor suministro de nutrimentos debido a un mayor sistema radicular estimulado por la vía auxínica.

Interesantemente, el análisis del perfil de VOCs que emite la rizobacteria indicó la presencia de acetoína, que es un compuesto que fue reportado previamente por Ruy *et al.* (2003). La abundancia de la acetoína en el cultivo axénico de la rizobacteria fue aproximadamente del 70 % (2.32 µg/mL), la cual se incrementó durante la interacción con la planta a un 90 % (2.62 µg/mL). El hecho de que sea

un compuesto abundante dentro del sistema de estudio del presente trabajo y de que ya ha sido reportado previamente como un posible candidato de su efecto promotor en plantas (Ryu *et al.*, 2003), sugiere que este compuesto también podría ser el responsable del efecto observado en las plantas expuestas a los VOCs de *B. subtilis* M496.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar si el estándar acetoina promueve el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* y si activa la vía de señalización de las auxinas.
- Analizar el perfil de compuestos volátiles que emite la rizobacteria a la densidad de dos y tres estrías.
- Cuantificar el contenido de AIA en etapas tempranas de la interacción con la rizobacteria.
- Determinar si los compuestos volátiles de *B. subtilis* M496 estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta por una activación de la elongación y/o división celular en los meristemas radiculares.

## **11. CONCLUSIÓN.**

Los compuestos volátiles emitidos por *Bacillus subtilis* M496 inducen el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo dependiente de la vía auxínica.

## 12. REFERENCIAS

**Bailly A., Sovero V., Vincenzetti V., Santelia D., Bartnik D., Koenig B. W., Mancuso S., Martinoina E., Geisler M.** (2008). Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J. Biol. Chem.* 283: 21817-21826.

**Baldwin I. T.** (2010). Plant volatiles. *Curr. Biol.* 20: R392-R396.

**Banchio E., Xie X., Zhang H., Paré P.W.** (2009). Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 653-657.

**Benjamins R., Scheres B.** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443-465.

**Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schulz B., Feldmann K. A.** (1996). *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science.* 273: 948-950.

**Bennetzen J. L.** (2001). "Arabidopsis arrives". *Nat. gene.* 27: 3-5.

**Bishopp A., Mähönen A.P., Helariutta Y.** (2006). Signs of change hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133: 1857-1869.

**Bohn-Courseau I.** (2010). Auxin: a major regulator of organogenesis. *C. R. Biol.* 333: 290-296.

**Clark L. G., Fisher J. B.** (1986). Vegetative morphology of grasses: Shoots and roots. *Int. Grass Symp.:* 37-45.

**Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J.** (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579-1592.

**Delker C., Raschke A., Quint M.** (2008). Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta.* 227: 929-941.

**Depta H., Rubery P. H.** (1984). A comparative study of carrier participation in the transport of 2, 3, 5-triiodobenzoic acid, indole-3-acetic acid, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cucurbita pepo* L. hypocotyl segments. *J. Plant Physiol.* 115: 371-387.

**Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J. S., Jürgens G., Estelle M.** (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell.* 9: 109-119.

**Dicke M. A., Agrawal A., Bruin J.** (2003). Plants talk, but are they deaf? *Trends Plant Sci.* 8: 403–405.

**Dicke M., van Loon J. J. A., Soler R.** (2009). Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat. Chem. Biol.* 5: 317-324.

**Dinenny J. R., Benfey P. N.** (2009). Studying root development using a genomic approach. *Annu. Plant Rev.* 37: 325-351.

**Dolan L., Janmant K., Willemsen V., Linstead P., Poethig J., Roberts K., Scheres B.** (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.

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

**Eckardt N.** (2005). MicroRNAs regulate auxin homeostasis and plant development. *Arabidopsis book*.17: 1335–1338.

**Friml J., Benková E., Mayer U., Palme K., Muster G.** (2003). Automated whole mount localization techniques for plant seedlings. *Plant J.* 34: 115-124.

**Fujita H., Syono K.** (1996). Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 37: 1094-1101.

**Gaither D. H.** (1975). Auxin and the response of pea roots to auxin transport inhibitors: morphactin. *Planta.* 55: 1082-1086.

**Gershenzon J.** (2007). Plant volatiles carry both public and private messages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 5257-5258.

**Glick B. R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.

**Glick B. R., Patten C. L., Holguin G., Penrose D. M.** (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, UK.

**Gray W.M.** (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2: 1270-1273.

**Gutiérrez-Luna F. M., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Valencia-Cantero E., Reyes de la Cruz H., Macías-Rodríguez L.** (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis.* 51: 75-83.

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

**Himanen K., Boucheron E., Vaneste S., de Almedida-Engler J., Inzé D., Beeckman T.** (2002). Auxin mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* 14: 2339-2351.

**Holopainen J. K., Gershenzon J.** (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15: 176-184.

**Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W.** (1987). GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

**Jordán M., Casaretto J.** (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal.* 15

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

**Klopper, J.W., Schroth M.N.** (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on Radishes. *Photopathol*. 24: 879-882.

**Koornneef M., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 141-172.

**Kumar R., Pandey S., Pandey A.** (2006). Plant roots and carbon sequestration. *Curr. Sci.* 91:885-890.

**Li Y., Liu Z-B., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T.J.** (1994). An Auxin-inducible element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol.* 106: 37-43.

**Lincoln T., Eduardo Z.** (2002). Plant physiology. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

**López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres E., Herrera-Estrella L.** (2006). Novel signals for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.

**Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.

**Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J., Sandberg G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. 17: 1090-1104.

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

**Malamy J. E., Benfey P. N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral root of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.

**Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrasek J., Skupa P., Chand S., Bencoba E., Zazimalova E., Friml J.** (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution dependent development. *Development* 135: 3345-3354.

**Michniewicz M., Brewer P.B., Friml J.** (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *American Society of Plant Biologists: The Arabidopsis Book*. DOI:10.1199/tab.0108. 1-28 pp.

**Morquecho-Contreras A., López-Bucio J.** (2007). Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plant. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1: 34-41.

**Muller A., Guan Ch., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K.** (1998). AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-6911.

**Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G.** (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. acad. Sci.* 101: 8039-8044.

**Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M.** (2007). ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19: 118-130.

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

**Pérez V.J., García E.G. y Esparza G.F.** (2002). Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. 21: 297-300.

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

**Ryu C. M., Farag M. A., Hu Ch. H., Reddy M. S., Wei H. X., Paré P. W., Kloepper J. W.** (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4927-4932.

**Ryu C. M., Farag M. A., Hu Ch. H., Reddy M. S., Paré P. W., Kloepper J. W.** (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1017-1026.

**Salisbury F.B., Ross C.W.** (1992). Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A, Thomson learning. España. 987 pp.

**Santner A., Calderon-Villalobos L.I.A., Estelle M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5: 301-307.

**Santoyo G., Orozco-Mosqueda Ma. C., 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.

**Scheres B., Wolkenfelt H.** (1998). The Arabidopsis root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 21-32.

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

**Simon S., Petrusek J.** (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci.* 180: 454-460.

**Sinha N.** (1999). Leaf development in angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 419-446.

**Steeghs M., Bais HP., de Gouw J., Goldan P., Kuster W., Northway M., Fall R., Vivanco JM.** (2004) Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 135: 47–58

**Takahashi H., Suge H.** (1991). Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, ageotropum. *Physiol. Plant.* 82: 24-31.

**Teale W.D., Paponov I.A. y Palme K.** (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.

**Tromas A., Perrot-Rechenmann C.** (2010). Recent progress in auxin biology. *C. R. Biol.* 333: 297-306.

**Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J.** (1997). ARF, a transcription factor that binds auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868.

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

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

**Vickers C. E., Gershenzon J., Lerdau M. T., Loreto F.** (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* 5: 283-291.

**Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Flores-Cortez I., Valencia-Cantero E.** (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant Soil.* 339: 329-340.

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

**Woodward A.W., Bartel B.** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707-735.

**Zhang H., Kim M. S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M. A., Ryu C. M., Allen R., Melo I. S., Paré P. W.** (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. 226: 839-851.