



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Facultad de Ciencias de la Tierra

MAESTRÍA EN BIOCENCIAS

N-acil homoserina lactonas producidas por *Pseudomonas*
aeruginosa como promotoras del crecimiento radicular de
Solanum lycopersicum L.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

PRESENTA:

Médico Cirujano David Galeana Cadena

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Jeiry Toribio Jiménez

CODIRECTORA: Dra. Gloria Soberón Chávez

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GRO., MAYO DEL 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA

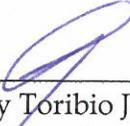
Maestría en Biociencias

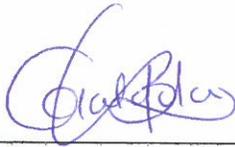
Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 12 días del mes de diciembre de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "N-acil homoserina lactonas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* como promotoras del crecimiento radicular de *Solanum lycopersicum* L.", presentada por el alumno **David Galeana Cadena**, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

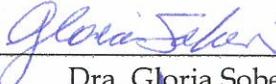
El Comité Tutorial


Dra. Jeiry Toribio Jiménez
Dirección de tesis


Dr. Gerardo Huerta Beristain


Dra. Yanet Romero Ramírez


Dra. Patricia Álvarez Fitz


Dra. Gloria Soberón Chávez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro

Vo. Bo

Coordinación del
Posgrado de la FCQB

Coordinación 2014-2018

Dra. Isela Parra Rojas

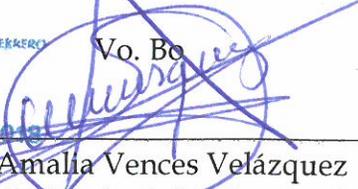
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Vo. Bo

DIRECCIÓN 2014 - 2018


Dra. Amalia Vences Velázquez

Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero, el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, campus experimental Zacatepec, Morelos del INIFAP. Bajo la asesoría de

DIRECTORA DE TESIS

DRA. JEIRY TORIBIO JIMÉNEZ

CODIRECTORA DE TESIS Y ASESORA EXTERNA

DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ

COMITÉ TUTORAL

DRA. YANET ROMERO RAMÍREZ

DRA. PATRICIA ÁLVAREZ FITZ

DR. GERARDO HUERTA BERISTÁIN

ASESORA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

DRA. SANDRA E. RANGEL ESTRADA

Durante el periodo en que el Médico Cirujano David Galeana Cadena curso la Maestría en Biociencias recibió la beca CONACYT número 745735. El proyecto se desarrolló con apoyo financiero mediante el Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa (PFCE).

AGRADECIMIENTOS

Vivir la vida con gratitud, es un sentido de respeto a uno mismo y a los demás. Por esta razón me permito en este apartado expresar mi agradecimiento a:

Dra. Jeiry Toribio Jiménez. Por la confianza, paciencia, experiencia y conocimientos brindados, impulsando mi formación como investigador.

Dra. Gloria Soberón Chávez. Por compartirme su invaluable experiencia y conocimientos al abrirme las puertas de su laboratorio, facilitándome toda la asesoría técnica, metodológica y las cepas de *P. aeruginosa* PAO1-UW y la mutante de PAO1 $\Delta lasI/\Delta rhII$;

Dra. Sandra E. Rangel Estrada. Por mostrarme el increíble mundo vegetal. Fue una experiencia de vida el poder ver a una planta moverse en tiempo real.

Dr. Carlos Ortuño Pineda. Permítame expresarle mi admiración y respeto. Usted me mostro lo útil que es el pensamiento científico. Pero sobre todo me enseñó lo valioso que es tener valores y principios en mi vida diaria.

Dra. Abigail González Valdez. Por el tiempo que me dedico hasta que logre comprender la técnica y sus fundamentos, motivándome a creer en mi potencial como investigador.

Dra. Patricia Álvarez Fitz. Por su paciencia, motivación, y apoyo en el análisis estadístico. Aún recuerdo su frase motivadora: ¡Eso ya deberías saberlo!

Dra. Yanet Romero Ramírez. Por enseñarme que la biología molecular es fascinante y haberme tenido la paciencia para explicármelo de una forma clara y sencilla.

Dr. Gerardo Huerta Beristáin. Por enseñarme que cuando una ruta no está disponible, siempre hay rutas alternas, tanto en el metabolismo de los microorganismos como en la vida diaria.

M. C. Lic. Ing. Fernando Astudillo Melgar. Por ser mi coach académico, admiro la facilidad y pasión que tienes al compartir tus conocimientos y experiencia.

Biol. Guadalupe Espíndola García. Por el apoyo administrativo.

Biol. Paola Ramírez Macedo. Por compartirme soluciones cuando las cosas se complicaban.

DEDICATORIA

A mi madre por brindarme la vida y acompañarme con amor durante todas las etapas de mi vida

A mi esposa por tenerme paciencia, brindándome su comprensión y valiosos consejos durante todo este proyecto ¡Te amo!

A mis hijos por el amor que me comparten incondicionalmente. ¡Los amo!

Y a todos mis amigos y familiares.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Materiales y métodos.....	7
Resultados.....	10
Discusión.....	12
Conclusión.....	13
Tablas y figuras.....	14
Bibliografía.....	20
Anexos.....	25

3-oxo-C₁₂-homoserina lactona y C₄-homoserina lactona de *Pseudomonas aeruginosa* como modeladores de la arquitectura del sistema radicular de *Solanum lycopersicum L.* de forma post-embriónica

3-oxo-C₁₂-homoserine lactone y C₄-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa* as post-embryonic modelers of root system architecture on *Solanum lycopersicum L.*

David Galeana-Cadena¹, Gloria Soberón-Chávez², Abigail González-Valdez², Sandra E. Rangel³-Estrada, Patricia Álvarez-Fitz¹, Carlos Ortuño-Pineda¹, Yanet Romero-Ramírez¹, Cecilia G. Nava-Faustino¹, Jeiry Toribio-Jimenez^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas s/n, La Haciendita, Ciudad Universitaria 39090, Chilpancingo Guerrero México.

²Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, México. ³ Campo experimental Zacatepec-INIFAP, Carretera Zacatepec-Galeana, Km 0.5, 62780, Zacatepec, Morelos México.

*Autor de correspondencia (jeiryjimenez2014@gmail.com)

RESUMEN

Las acil-homoserina lactonas son las moléculas utilizadas en el proceso de comunicación célula-a-célula llamado *quorum sensing*, el cual permite a los microorganismos, modificar su comportamiento colectivo en respuesta a la densidad celular y estímulos externos. Estudios en *Arabidopsis thaliana* reportan que la exposición a las acil-homoserina lactonas tiene efectos sobre el tamaño y desarrollo de sus raíces. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad modeladora de los extractos de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en acetato de etilo y acil-homoserina lactonas sintéticas sobre las raíces de *Solanum lycopersicum* de forma post embrionica *in vitro*.

Los resultados indican que la arquitectura del sistema radicular se modificó incrementando la longitud de la raíz primaria utilizando C₄-homoserina lactona de origen sintético en concentraciones 10, 12, 24 y 48μM; y 3-O-C₁₂-homoserina lactona de origen sintético a 10 y 12μM. Esta última molécula además incrementa la longitud y la densidad de los pelos radiculares, en concentraciones de 48 a 192 μM.

Al tratarse de un estudio *in vitro* para el modelamiento de la arquitectura del sistema radicular aún se necesitan más estudios *in vitro e in vivo* para verificar su efecto en el rendimiento y calidad de la cosecha del tomate. La información aquí presentada abre la posibilidad de diseñar y modelar arquitecturas de los sistemas radiculares a base del uso de autoinductores de origen bacteriano y sintéticos, que permitan una mejor adaptación de la planta a los diferentes ambientes y condiciones de cultivo.

PALABRAS CLAVE: Acil homoserina lactonas, *Pseudomonas aeruginosa*, modeladores, arquitectura del sistema radicular, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

Acyl-homoserine lactones are molecules known as used, in the cell-to-cell communication process called *quorum sensing*, which allows microorganisms, modifies their collective behavior in response to cell density and external stimuli. Studies in *Arabidopsis thaliana* has report that exposure to acyl-homoserine lactones has effects on the size and development of their roots. In this work, the aim was to evaluate the modeling capacity of the acetate extracts of *Pseudomonas aeruginosa* strains and synthetic acyl-homoserine lactones was evaluated *in vitro* on the roots of *Solanum lycopersicum* in a post-embryonic manner. The results indicate that the architecture of the root system was modified by increasing the length of the primary root using synthetic C₄-homoserine lactone in concentrations 10, 12, 24 and 48 μM ; and 3OC₁₂-homoserine lactone at 10 and 12 μM produces an increase in the length of the primary root. This last molecule also increases the length and density of root hairs, in concentrations of 48 to 192 μM .

Being an *in vitro* study for the modeling of the architecture of the root system, more *in vivo* and *in vitro* studies are still needed to verify its effect on the yield and quality of the tomato crop. The information presented here, opens the possibility of design and model architectures of root systems based on the use of bacterial autoinductors, which allow a better adaptation of the plant to different environments and growing conditions.

INDEX WORDS

Acil Homoserine Lactones, *Pseudomonas aeruginosa*, modelers, root architecture system, *Solanum lycopersicum*

INTRODUCCIÓN

La arquitectura del sistema radicular (RSA por sus siglas en inglés *Root System Architecture*), describe la forma y el arreglo espacial del sistema de raíces dentro del suelo (Rogers y Benfey, 2015). Permitiendo una alta plasticidad para poder adaptarse a los diferentes estímulos ambientales (Kong *et al.*, 2014). Por lo tanto, definiremos como modeladores de la RSA, a las moléculas y factores ambientales que tengan un efecto sobre la forma y arreglo espacial del sistema de raíces y pelos radiculares.

En las plantas como *Arabidopsis thaliana* o *Solanum lycopersicum*, la RSA muestra una estructura jerárquica; iniciando con una raíz primaria, a la que le crecen las raíces secundarias (Kellermeier *et al.*, 2014). Ambos tipos de raíces tienen la función de fijar a la planta al sustrato y establecer estratégicamente la disposición espacial para facilitar la adquisición de nutrientes y agua (Lopez-Bucio, 2003).

A nivel microscópico la RSA está conformado por los pelos radiculares (Smith y Smet, 2012) cuya función es la absorción de agua y nutrientes (Comas *et al.*, 2013), uno de los mecanismos para lograrlo, es a través de la secreción de mucílago, el cual permite mantener microambientes en las raíces favorables a largo plazo para la planta, además de servir de protección y fuente de nutrientes para los microorganismos benéficos, que a su vez promoverán el crecimiento de la planta en condiciones ambientales adversas (Ahmed *et al.*, 2018).

Las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal son conocidas como PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*), estos microorganismos tienen efectos sobre la división y diferenciación celular; cuya etiología son los cambios en las vías de señalización, logrando

transformaciones de la RSA (Figura 1), de modo que favorece el crecimiento de toda la planta (Verbon y Liberman, 2016).

Espinosa *et al.* (2017) y Almagharabi *et al.* (2013) reportaron que la inoculación de PGPR incrementa el rendimiento y la calidad nutracéutica de los frutos de plantas producidas bajo condiciones de invernadero.

Pseudomonas aeruginosa ha sido clasificada como PGPR (Molina-Romero *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2014), y se ha publicado que promueve el crecimiento del tomate (Hariprasad *et al.* 2013 y Adesemoye *et al.* 2008). Este microorganismo es ubicuo, estando presente de forma natural en las raíces del tomate y el suelo cercano a la planta (Ge *et al.*, 2017; Green *et al.*, 1975). Usando su versatilidad fenotípica que le permite adaptarse a diversos ambientes, con la presencia o ausencia de diferentes nutrientes. Esto es posible mediante la expresión de los genes necesarios en el momento y situación correctas, y para lograrlo hace uso de una compleja red de sistemas de regulación, siendo uno de los más importantes el sistema *quorum sensing* (QS) (Santos-Medellín *et al.*, 2014).

El QS es un proceso de comunicación célula-a-célula de las bacterias, se basa en la detección y respuesta a señales extracelulares llamadas autoinductores, lo que permite al microorganismo modificar su comportamiento colectivo en respuesta a la densidad celular y la composición de especies de la comunidad microbiana (Papenfort y Bassler, 2016). Entre las especies más estudiadas en lo referente al sistema de QS se encuentran *Vibrio fischeri*, *P. aeruginosa* y *Agrobacterium tumefaciens* (Moghaddam y Mirhosseini, 2014).

El circuito de QS de *P. aeruginosa* consiste de dos pares de proteínas canónicas: LasI/R y RhII/R. La sintasa LasI produce N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona (3OC₁₂-HSL,

Figura 2A), la unión de 3OC₁₂-HSL a su receptor LasR, activa la transcripción de muchos genes, incluyendo a *rhlR*, permitiendo la expresión génica del receptor RhlR, este reconoce al autoinductor N-butanoil-L-homoserina lactona (C₄-HSL, Figura 2B), el cual es producido por la sintasa RhlI. Este circuito actúa en varios regulones que codifican para factores como piocianina, elastasas y ramnolípidos (Mukherjee *et al.*, 2017).

Los autoinductores producidos por las bacterias tienen un rol fundamental al darle forma y mantener la estabilidad de la comunidad de microorganismos pertenecientes a la rizosfera, lo cual tiene efecto sobre el desarrollo de la planta (Venturi y Keel, 2016, Schikora *et al* 2016).

En 2008 Von Rad y Ortiz-Castro, publicaron que la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* incrementa la proporción auxina/citoquinina, aumentando el tamaño de las raíces al exponerse a tratamientos con las acil homoserina lactonas (AHSLs).

La dicotiledónea conocida como tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es la hortaliza más importante a nivel mundial (FAOSTAT 2013). Su trascendencia en el contexto económico reside en su aportación de divisas y generación de empleos en todas y cada una de las fases de la cadena agroalimentaria, ocupando en 2016 el tercer lugar por valor comercial en los productos agroalimentarios de exportación mundial (SIAP 2017). Esto ha impulsado a que los productores de hortalizas muestren mayor interés en innovaciones que mejoren los rendimientos y generen productos de gran calidad (Santiago-López *et al.*, 2016). Dentro de los factores más importantes para obtener altos rendimientos de la cosecha de tomate, está la retención de agua (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2017) y la nutrición de la planta (Sánchez-Del Castillo *et al.*, 2014); los cuales están muy relacionados con la RSA (Villordon *et al.*, 2014).

Por todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar *in vitro* el efecto de los extractos de acetato de etilo de las cepas de *P. aeruginosa* y los autoinductores sintéticos C4-HSL y 3OC₁₂-HSL en la arquitectura del sistema radicular de *Solanum lycopersicum* L. de forma post-embriónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas en el presente estudio. Las cepas empleadas en este estudio, así como sus características están descritas en la (Tabla 1). Para la confirmación de género y especie de las cepas fue usado el equipo automatizado para la identificación microbiológica VITEK de Biomerix®. (Tabla 1).

Extracción de autoinductores AHLs. Se realizó un pre-inoculo de las cepas de interés en medio LB (15g/L Agar, 10g/L peptona de caseína, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl), dejándose crecer durante toda la noche a 37° C en agitación a 225rpm, posteriormente se inoculo 30 mL de caldo PPGAS (NH₄Cl 0.02M 1.069g/L, KCl 0.02M 1.49g/L, TRIS-HCL 0.12M 18.91g/L, Peptona 1% 10g/L, Glucosa 0.5% 25mL/L, MgSO₄ 0.0016M 3.2mL/L) con la cantidad de pre-inoculo apropiado para alcanzar una absorbancia inicial de 0.05 a 600 nm, incubándose a 37° C por 24 h. en agitación a 225 rpm. Se procedió a centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4° C, el sobrenadante se transfirió a un tubo de polipropileno limpio de 50 mL, se tomaron 5 mL de sobrenadante y se agregó 5 mL de acetato de etilo acidificado (1000mL acetato de etilo+100µL ácido acético) en un tubo de 15 mL de polipropileno, de forma manual se agito el tubo vigorosamente por 15 minutos, posterior al periodo citado, se realizó la centrifugación a 3500 rpm a 4° C. Una vez separadas las fases se extrajo la fase orgánica superior, y a la fase inferior se agregó nuevamente 5 mL de acetato de etilo acidificado repitiéndose el procedimiento para obtener el extracto de la fase orgánica superior, se unieron las fracciones de las capas superiores y se evaporaron en campana de extracción hasta alcanzar un volumen de 1 mL, vertiéndose en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se dejó evaporar completamente en la campana, después del proceso anterior se añadió

50 μL de metanol para recuperar el extracto y se guardó a -20°C hasta su utilización (Grosso-Becerra *et al.* 2014). Para la confirmación de C₄-HSL se utilizaron placas de cromatografía en capa fina TLC silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK® 105554). Con la ayuda de una micropipeta de 1 μL se colocaron 5 μL de la muestra en el punto de aplicación, se utilizó C₄-HSL (SIGMA® 09945) y N-hexanoil-L-homoserina lactona (SIGMA® 56395) sintéticas como estándares. Para la fase móvil se utilizó metanol-agua 60:40. El revelado se realizó mediante el uso del biosensor CV026, incubándose a 30°C por 16 h (Grosso-Becerra *et al.* 2014). Para la medición cuantitativa de las placas de TLC se utilizó el software Image J (Phattanawasin *et al.* 2016). Respecto a la 3OC₁₂-HSL, se realizó el ensayo β -galactosidasa (Miller 1972).

Materiales vegetales y condiciones de crecimiento. El experimento se efectuó en un cuarto de incubación de cultivos *in vitro* con un fotoperiodo de 16 h de luz a una concentración de $200 \pm 50 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad 50-60 %, con 8 h de obscuridad a 25°C (Schwarz *et al.* 2014). Se usaron semillas de *Solanum lycopersicum* variedad Saladette (Rancho los molinos®). El proceso de desinfección de las semillas se realizó con detergente líquido (ROMA®), hipoclorito de sodio al 10 %, agua corriente y captan al 0.4% (Rangel-Estrada *et al.*, 2015). Después del tratamiento de desinfección se colocaron en cajas de Petri con agar bacteriológico al 1.5 % y se dejaron germinar en la obscuridad a 25°C . A las 72 h se seleccionaron las semillas con datos de germinación, que mostraban crecimiento de la radícula. Estas se trasplantaron a cajas de Petri con agar bacteriológico al 1.5 % el cual ya contenía los tratamientos correspondientes (Tabla 2). Los tratamientos fueron añadidos antes de la gelificación del agar bacteriológico, cuando el medio se encontraba aproximadamente a una temperatura de 50°C (Ortiz-Castro *et al.* 2008).

Medición del crecimiento de raíz primaria y pelos radiculares. El crecimiento de la raíz primaria se midió con una regla. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital D5200 Nikon®. Los pelos radiculares fueron medidos a 1mm de la punta de la raíz. El promedio de la longitud de los pelos radiculares fue determinada contando 10 pelos tomando la base del pelo en la célula epidermal (Ortíz-Castro *et al.* 2008). La densidad fue calculada utilizando un área de 1 mm² superior a 1 mm de distancia de la punta de la raíz, contabilizando el número de pelos radiculares que estuvieran en un ángulo de 90° respecto a la raíz primaria dentro de esa área.(Foehse y Jungk 1983).

Las raíces de *S. lycopersicum L.* fueron analizadas con un microscopio estereoscópico SMZ 10 (NIKON®). Los pelos radiculares fueron contados en una magnificación de 3X, las micrografías fueron tomadas con la cámara Motic Cam 5 5.0MP (MOTIC®).

Análisis estadístico. Para la estimación de concentraciones de las principales AHSLs producidas por las cepas de *P. aeruginosa*, la significancia fue determinada por ANOVA de una vía, con post prueba Tukey.. El análisis estadístico del crecimiento de la raíz primaria y pelos radiculares fue determinado por ANOVA de una vía, con post prueba de Dunnett. Las tablas de cálculo y las pruebas estadísticas se realizaron con el software Sigma Plot

RESULTADOS

Presencia de las AHLs en los extractos de las cepas.

La concentración de 3OC₁₂-HSL para el extracto de la cepa PAO1 fue de 11.32μM, representando la mayor parte de la producción de AHLs, debido a que solo produjo 0.70 μM de C₄-HSL. Lo cual difiere del resto de las cepas de este estudio, en lo referente a las proporciones de las AHLs.

El extracto de TIX03 presenta la mayor concentración aunada de AHLs respecto a las demás cepas, al tener una concentración de 18.9 μM para C₄-HSL y de 7.8 μM para 3OC₁₂-HSL. En la cepa MCD se observaron concentraciones de 22.8 μM para C₄-HSL y de 4.6 μM para 3OC₁₂. Y en el extracto de la cepa MAZ0105 se observó una concentración de 8.9 μM para C₄-HSL y de 1.7 μM para 3OC₁₂, siendo esta última cepa la que menor producción de ambas AHLs tuvo (Figura3).

Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento y desarrollo de la RSA.

Desarrollo y crecimiento de la raíz primaria.

En la figura 4 se observa el efecto de los extractos de acetato de etilo de las cepas silvestres de *P. aeruginosa* sobre las raíces primarias de *S. lycopersicum*, de forma post-embriónica. Las cepas TIX 0303, MCD y la doble mutante no difieren de forma estadísticamente significativa ($p > 0.05$), del control. La cepa MAZ 0105 presento una disminución de la elongación de la raíz primaria en un 32% con una significancia estadística de ($p \leq 0.001$). En cambio, la estimulación con AHLs sintéticas a una concentración de 10μM produce un aumento de 17% para C₄-HSL y de 11% para 3OC₁₂-HSL los cuales con estadísticamente significativos ($p < 0.05$), respecto al control. Este hallazgo condujo a exponer a las plantas a

diferentes concentraciones de AHSLs sintéticas. En las figuras 5 y 6 se muestra un incremento de la longitud de la raíz primaria en concentraciones 12, 24 y 48 μM para C₄-HSL y 12 μM para 3OC₁₂-HSL con significancia estadística ($p < 0.05$); y una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$), al exponer las raíces a 3OC₁₂-HSL con una concentración de 192 μM .

Crecimiento y desarrollo de pelos radiculares.

El efecto de los extractos de acetato de etilo de las cepas silvestres de *P. aeruginosa* (Figura 7) muestra una clara disminución tanto en longitud como en densidad de pelos radiculares de las plantas al someterse al extracto de la cepa MAZ 0105, con una significancia estadística de ($p < 0.001$) respecto al control. La cepa MCD también presenta una disminución de la densidad de los pelos radiculares con una significancia estadística ($p < 0.05$).

Las plantas tratadas con 3O-C₁₂-HSL a concentraciones de 24 μM , presentan un aumento solo de la longitud de los pelos radiculares y a concentraciones de 48 a 192 μM incrementan la longitud y la densidad de los pelos radiculares con una significancia estadística de ($p < 0.001$). Para C₄-HSL el incremento de la longitud solo se aprecia en la concentración de 24 μM y un aumento de la densidad en las concentraciones 96 μM y 192 μM respecto al control con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Figura 8).

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos que C₄-HSL y 3OC₁₂-HSL de síntesis química, tienen la capacidad de modelar la arquitectura del sistema radicular de forma post-embriónica. Los autoinductores C₄-HSL a concentraciones de 10 μM, 12 μM, 24 μM y 48 μM; y 3OC₁₂-HSL a concentración de 12 μM; favorecen el crecimiento longitudinal de la raíz primaria de *S. lycopersicum*. En contraste, la concentración de 192 μM de 3OC₁₂-HSL disminuye el crecimiento de la raíz primaria, pero favorece el desarrollo de pelos radiculares en longitud y densidad (Figuras 5-6), concordando con VonRad *et al.* 2008 y Ortiz Castro *et al.* 2008 en *A. thaliana*. Esto abre la posibilidad de diseñar y modelar las raíces de plantas hortalizas, mejorando la adaptación a las condiciones ambientales y del suelo donde se cultiven (Tron *et al.*, 2015). Lo cual toma relevancia al momento de hablar de una planta de importancia agroeconómica como es el tomate, ya que un buen diseño y modelamiento de la RSA es capaz de lograr el mayor beneficio del contacto con agua y nutrientes, favoreciendo el crecimiento y producción de la planta (Comas *et al.* 2013, Gregory *et al.* 2013).

Las cepas aisladas para este estudio provienen de diferentes fuentes, lo que implica que estuvieron expuestas a distintos estímulos ambientales y la disponibilidad de nutrientes fue diversa. Sus extractos de acetato de etilo presentaron diferentes concentraciones de AHLs, coincidiendo con Ortori *et al.* 2011 quienes reportan que las concentraciones de AHLs pueden ser modificadas por la disponibilidad de los diferentes nutrientes.

Estos extractos se utilizaron en *S. lycopersicum L.* sin purificar (Figuras 3-4). Por lo que podrían contener otras moléculas en diferentes concentraciones (Xu L.Q. *et al.* 2017), alterando los efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta a pesar de la presencia de las AHLs.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el experimento, C₄-HSL y 3OC₁₂-HSL modelan la RSA en *S. lycopersicum L.* y aunque los autoinductores estudiados comparten algunos efectos en algunas concentraciones; C₄-HSL tiende a impulsar el crecimiento longitudinal de la raíz primaria; mientras que 3OC₁₂-HSL fortalece el crecimiento y desarrollo de los pelos radiculares. Lo que representa una gama de posibilidades para el diseño de raíces que faciliten la adaptación de la planta a diferentes condiciones ambientales, lo cual podría favorecer la producción de frutos.

La presente investigación al haber sido realizada *in vitro*, requiere de futuros trabajos para conocer si las AHSLs tienen el mismo efecto modelador en la RSA al cultivar en campo, y determinar su impacto en la biota del suelo y en la producción de frutos.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Cepas utilizadas para la extracción con acetato de etilo.

Fuente	Origen de la muestra	Especie	Cepa
Cultivos de tomate	Rizósfera	<i>P. aeruginosa</i>	MAZ 0105
Cultivos de maíz	Rizósfera	<i>P. aeruginosa</i>	TIX 0303
Aislamiento clínico	Paciente	<i>P. aeruginosa</i>	MCD
Control	Herida	<i>P. aeruginosa</i>	PAO1-UW
Control	Mutante experimental	<i>P. aeruginosa</i>	PAO1- $\Delta rhII/\Delta lasI$

Tabla 2. Tratamientos empleados el ensayo con *S. Lycopersicum*.

Tratamiento	Especificación
Control	Solvente en igual cantidad que la más grande utilizada en los demás tratamientos
CM	Extracto del medio PPGAS sin cultivo con acetato de etilo
Extractos de cepas	Extractos de acetato de etilo de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>
AHSLs sintéticas	C ₄ -HSL (SIGMA 09945) y 3OC ₁₂ -HSL (SIGMA 56395) sintéticas, a concentraciones de 10, 12, 24, 48, 96 y 192 μ M

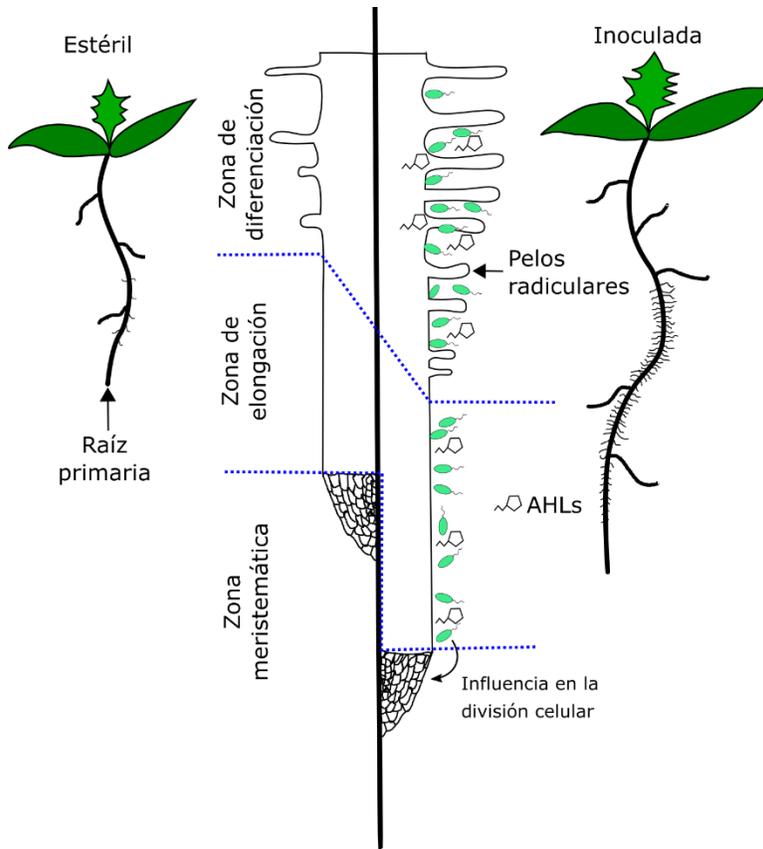
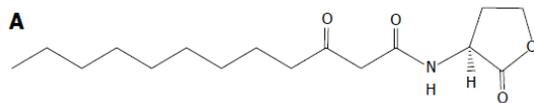
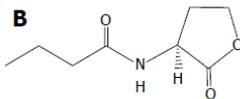


Figura 1. Influencia de las PGPR en el crecimiento y desarrollo de la raíz (Modificado de Verbon, y Liberman, 2016)



N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona
(3OC₁₂-HSL)



N-butiril-L-homoserina lactona
(C₄-HSL)

Figura 2. Principales autoinductores N-acil homoserina lactonas producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.* 2015)

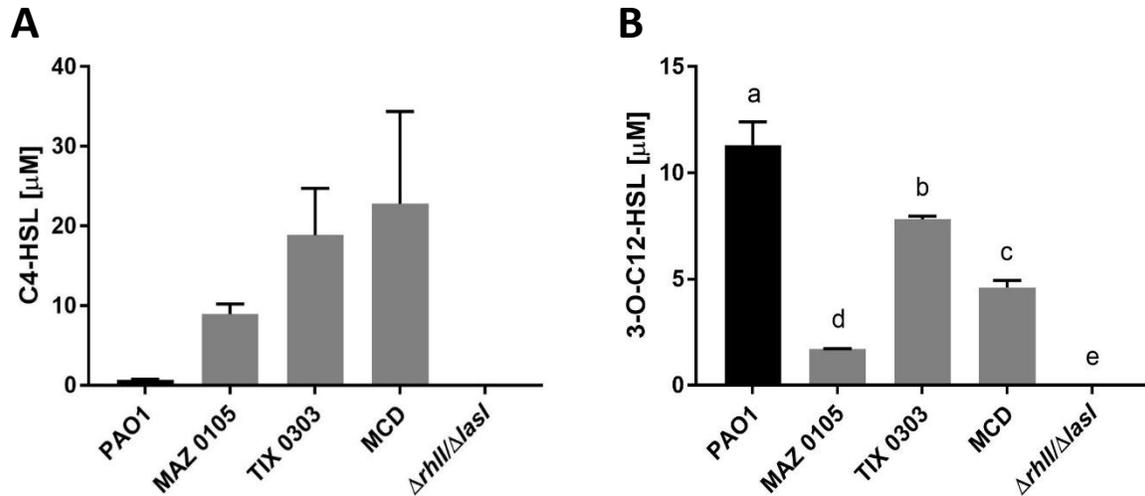


Figura 3. Estimación de concentraciones de las principales AHSL producidas por las cepas de *P. aeruginosa*. (A) Concentración de C4-HSL calculada tomando como base las placas de TLC de los extractos de acetato de etilo de las cepas. Las barras representan las medias \pm DE(n=2) (B) Concentración de 3O-C12-HSL calculado usando como base las unidades Miller obtenidas por el bioensayo β -galactosidasa de las cepas incubadas por 24 h a 37°C en medio PPGAS. Las barras representan la media \pm DE(n=3), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p < 0.05$

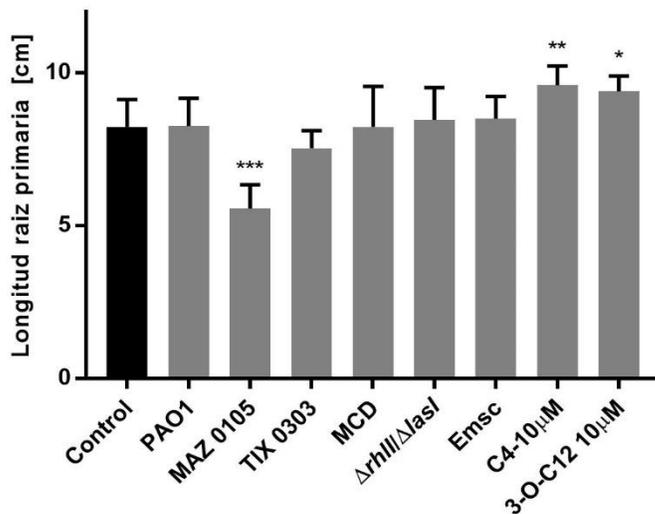


Figura 4. Efecto post embrionario de los extractos de acetato de etilo de las cepas de *P. aeruginosa* y AHSL sintéticas sobre el crecimiento y desarrollo de las raíces. Crecimiento longitudinal de las raíces primarias de *Solanum lycopersicum L.*. Las barras representan la media \pm DE (n=15), diferencia estadística significativa: *= $p < 0.05$, **= $p \leq 0.01$, ***= $p \leq 0.001$.

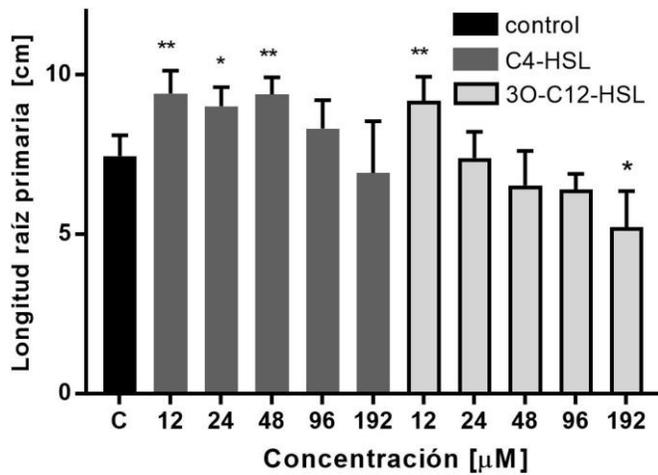


Figura 5. Efecto post embrionario de C₄-HSL y 3OC₁₂-HSL sintéticas a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y desarrollo de las raíces. (A) Crecimiento longitudinal de las raíces primarias de *S. lycopersicum L.* Las plántulas fueron crecidas en agar bacteriológico al 1.5% por 7 días. Las barras representan la media ±DE (n=15), con diferencia estadística significativa: *= $p < 0.05$, **= $p \leq 0.01$.

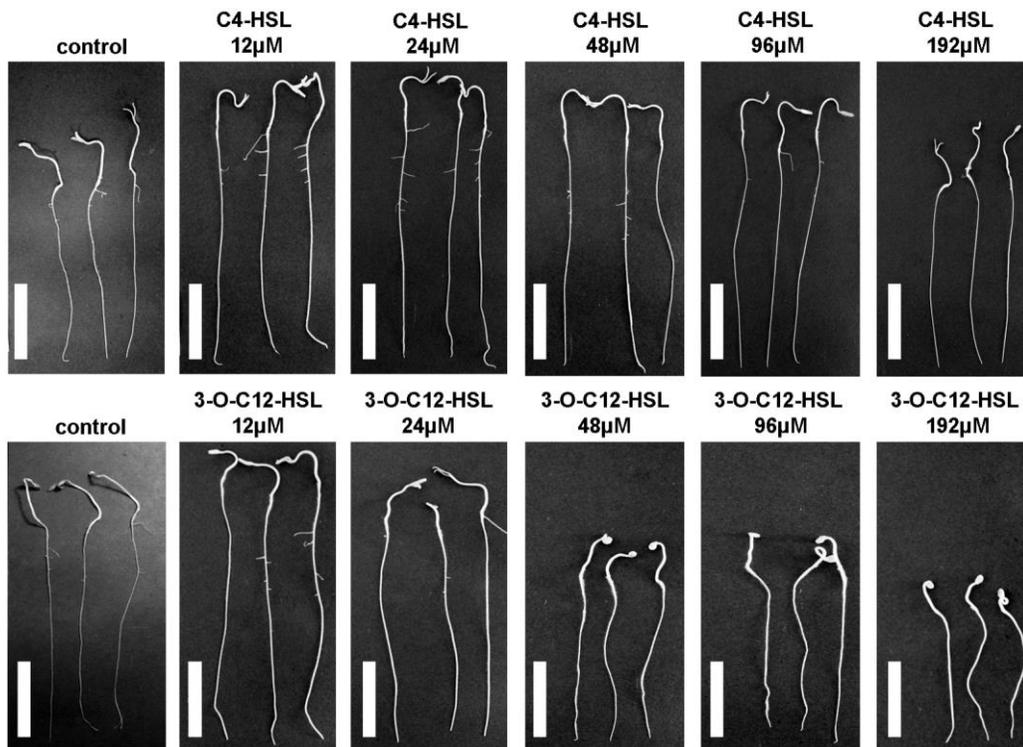


Figura 6. Fotografías de las plantas crecidas con las AHSL sintéticas a diferentes concentraciones. Barras blancas equivalentes a 3cm.

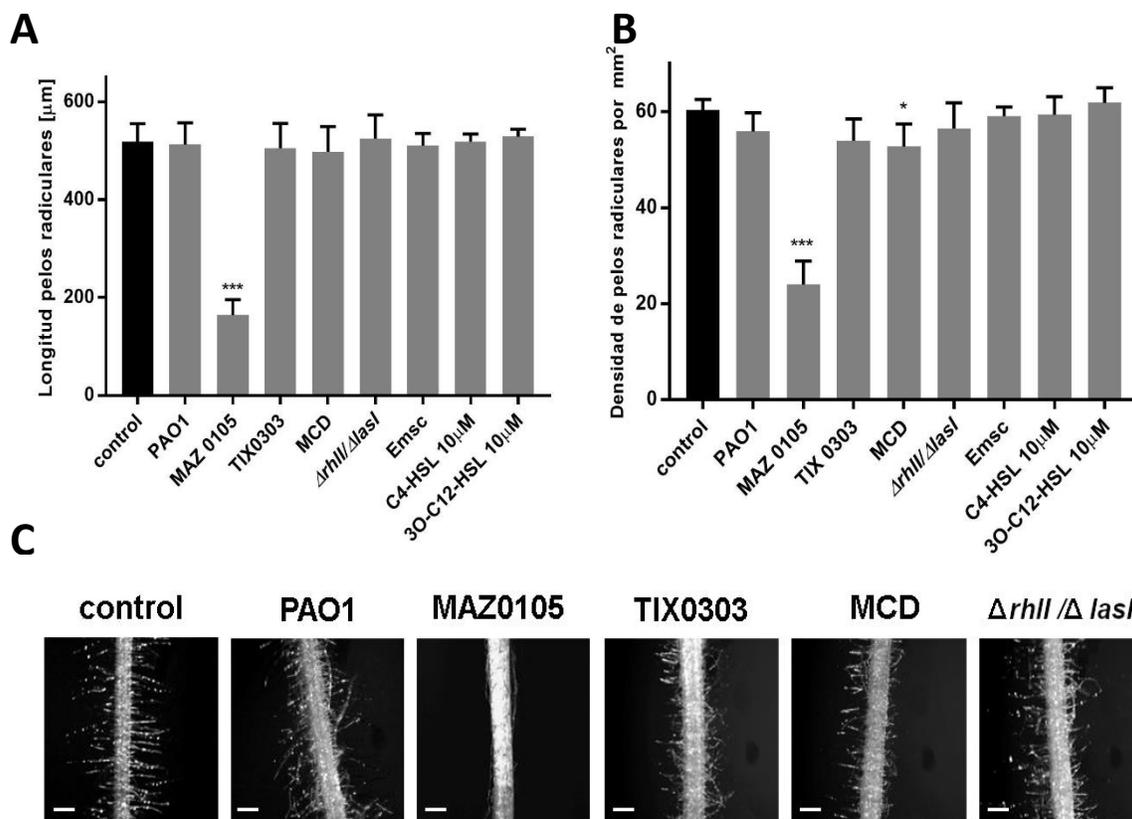


Figura 7. Desarrollo de los pelos radiculares de *S. lycopersicum* con exposición post embrionaria a los extractos de acetato de etilo de cepas de *P. aeruginosa*. (A) Longitud de los pelos radiculares de *S. lycopersicum* L. Las plántulas fueron crecidas en agar bacteriológico al 1.5% por 7 d. Las barras representan la media \pm DE (n=30), con diferencia estadística significativa: ***= $p \leq 0.001$. (B) Densidad de pelos radiculares en un mm^2 . Las barras representan la media \pm DE (n=9), con diferencia estadística significativa: *= $p < 0.05$, ***= $p \leq 0.001$. (C) Micrografías a 3X de las plantas crecidas en presencia de los extractos de acetato de etilo de las cepas de *P. aeruginosa*. Barras blancas equivalentes a 200 μm .

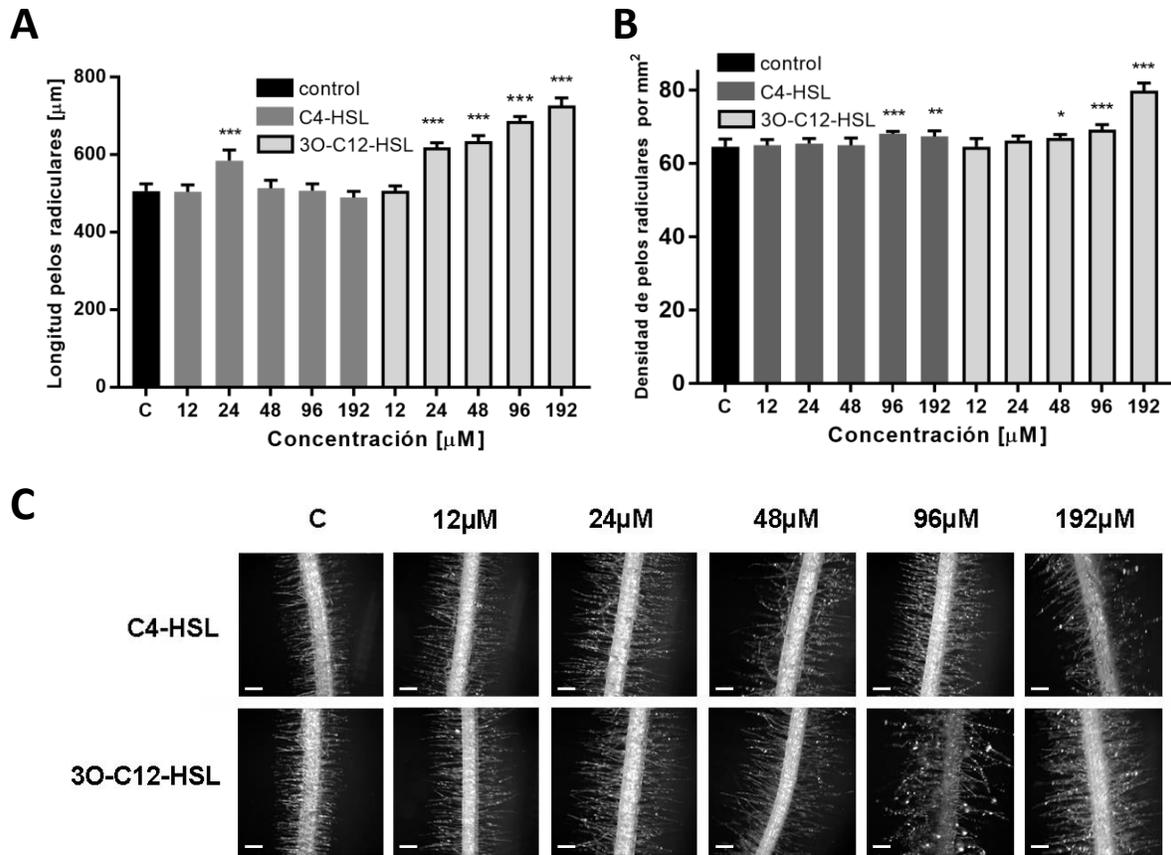


Figura 8. Desarrollo de los pelos radiculares de *S. lycopersicum L.* con exposición post embrionaria a C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sintéticas en diferentes concentraciones. (A) Longitud de los pelos radiculares de *S. lycopersicum*. Las plántulas fueron crecidas en agar al 1.5% por 7 d. Las barras representan la media \pm DE (n=30), con diferencia estadística significativa: ***= $p \leq 0.001$. **(B)** Densidad de pelos radiculares en un mm². Las barras representan la media \pm DE (n=9), con diferencia estadística significativa: *= $p < 0.05$, **= $p \leq 0.01$, ***= $p \leq 0.001$. **(C)** Micrografías a 3X de las plantas crecidas con las AHSL sintéticas a diferentes concentraciones. Barras blancas equivalentes a 200μm.

BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A.O., Obini, M., Ugoji, E.O. (2008). Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*; 39, 423–426.
- Ahmed, M. A., Sanaullah, M. B., Mason-Jones, E., Jawad, K., Husnain, K., Yakov D. *et al.* (2018) Soil microorganisms exhibit enzymatic and priming response to root mucilage under drought, *Biology and Biochemistry*. Elsevier; 116, 410–418.
- Almaghrabi, O.A., Massoud, S., Abdelmoneim, T. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*; 20(1), 57–61
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M., Byrne, P. F., Dierig, D. A. (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought, *Frontiers in Plant Science*; 4, 1–16.
- Espinosa, P.B., Moreno-Reséndez A., Cano-Ríos R., De Paul, V., Álvarez, R., Sáenz, J. M., *et al.* (2017). Inoculación de Rizobacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal En Tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *Afrodita En Invernadero. TERRA Latinoamericana*; 35 (2): 169–78
- Foehse, D., and Jungk, A. (1983). Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. *Plant and Soil*; (74)368, 359–368.
- Ge, X., Wei, W., Gen Li, Mingming, S., Huixin, L., Jun, Wu, and Feng Hu. (2017). Isolated *Pseudomonas Aeruginosa* Strain VIH2 and Antagonistic Properties against *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Pathogenesis*; 111: 519–26.
- Green, S., Schroth, M., Cho, J. (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied microbiology*, 28(6), 987–91.

- Gregory, P. J., Atkinson, C. J., Bengough, A., Glyn, E., Mark, A., Fernández-Fernández, *et al.* (2013) Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production, *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1209–1222
- Grosso-Becerra, M., Croda-García, G., Merino, E., Servín-Gonzalez, L., Mojica-Espinosa, R., Soberón Chávez G. (2014) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 111(43), 15562–15567.
- Hariprasad, P., Chandrashekar, S., Singh, S., Niranjana, S. (2014) Mechanisms of plant growth promotion and disease suppression by *Pseudomonas aeruginosa* strain 2apa, *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 792–801.
- Hartmann, A., Gantner, S., Schuhegger, R., Steidle, A., Dürr, C., Schmid, M., *et al.* (2004). N-acyl homoserine lactones of rhizosphere bacteria trigger systemic resistance in tomato plants. *Biology of plant-microbe interactions*, Vol. 4, eds B. Lugtenberg, I. Tikhonovich, and N. Provorov (St. Paul, Minnesota:MPMI-Press), 554–556
- Kellermeier, F., Arengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E., Amtmann, A. (2014). Analysis of the Root System Architecture of *Arabidopsis* Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *The plant cell*, 26(4), 1480–1496.
- Kong, X., Zhang, M., De Smet, I., Ding, Z. (2014). Designer crops : optimal root system architecture for nutrient acquisition. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 597-8.
- Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Plant biology*; 6(3), 280–287.
- Martínez-Rodríguez, O.G., Can-Chulim A., Cruz-Crespo, E., Garcia-Paredes J.D. (2017). Influence of irrigation and substrate on yield and quality of tomato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*; (8)1, pp.53–65.

- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY 433:352–5
- Moghaddam, M., Mirhosseini, A., Hhodi, S. (2014). Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology* 3(4).
- Muñoz-Rojas, J., Molina-Romero, D., Bustillo-Cristales M.R., Rodriguez-Andrade O., Morales-García, Y.E., Santiago-Saenz, Y. Castañeda-Lucio, M. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*; 17(2), pp.24–34.
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C.D., Goldberg, J.B., Bassler, B.L. (2017) The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer, *PLoS Pathogens*, 13(7), pp. 1–25.
- Ortiz-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 and Environment*, 31(10), pp.1497–1509.
- Otori, C.A., Dubern, J.F., Chhabra, S.R., Cámara, M., Hardie, K., Williams, P., *et al.* (2011) Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*; 399(2), 839-50.
- Papenfors, K. and Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Microbiology*, 14(9), 576–588.
- Phattanawasin, P., Burana-Osot, J., Sotanaphun, U., Kusum A. (2016). Stability-Indicating TLC – Image Analysis Method for Determination of Andrographolide in Bulk Drug and *Andrographis paniculata* Formulations. *Acta Chromatographica*, 28(4), 525–540.

- Rangel-Estrada, S. E., Canul-Ku, J., Osuna-Canizalez, F.J., García-Perez, F., Rosario-Montes, P., Hernández-Meneses, E., *et al.* (2015). *In vitro* regeneration of poinsettia hybrids via organogénesis, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (7), 1571–1585.
- Rogers, E.D. and Benfey, P.N. (2015). Regulation of plant root system architecture : implications for crop advancement. *Current Opinion in Biotechnology*, 32(4), pp.93–98.
- Sánchez-Castillo, F., Moreno, E., Pineda, J., Osuna, J. (2014). Producción hidropónica de jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) con y sin recirculación de la solución nutritiva, *Agrociencia*; 48, 185–197.
- Santiago-López, G., Preciado-Rangel, P., Sanchez-Chavez, E., Esparza-Rivera, J., Fortis-Hernandez, M., Moreno-Resendez, A. (2016). Organic nutrient solutions in production and antioxidant capacity of cucumber fruits. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(7); 518–521.
- Santos-Medellín, C., Grosso-Becerra, M.V.,González-Valdez, A., Mendez, J.L., Delgado, G., Morales-Espinoza, R., Servin –Gonzalez, L., Alcaraz, L.D., Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*, 15(318).
- Schwarz, D., Thompson, A. J., Klaring, H. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment, *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–16
- Schikora, A., Schenk, S.T., Hartmann, A. (2016). Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N -acyl homoserine lactone group. *Plant Molecular Biology*. 90(6), 605-12
- Smith, S. and Smet, I. D. (2012). Root system architecture : insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical transactions of royal society*, 367,(1595),1441–1452.

- Tron, S., Bodner, G., Laio, F., Ridolfi, L., Leitner, D. (2015) Can diversity in root architecture explain water use efficiency, *Ecological Modelling*; (312), 200–210.
- Venturi, V. and Keel, C. (2016) Signaling in the Rhizosphere, *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 21(3), 187–198.
- Verbon, E. H. and Liberman, L. M. (2016) Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development, *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 21(3), 218–229.
- Villordon, A. Q., Ginzberg, I. and Firon, N. (2014) Root architecture and root and tuber crop productivity, *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 19(7), 419–427
- Von Rad, U., Klein, I., Doprev, P.I., Zazimalova, E., Fekete, A., *et al.* (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta*, 229(1), 73–85.
- Xu, L.Q., Zeng, J.W., Jiang, C.H., Wang, H., Li Y.Z., Wen W.H. (2017) Isolation and determination of four potential antimicrobial components from *Pseudomonas aeruginosa* extracts. *Int J Med Sci*, 14(13), 1368-1374.

ANEXO 1

Recolección de muestras

Se recolectaron muestras mediante hisopado de superficies y toma de muestras representativas de tierra en cultivos de jitomate y maíz de los municipios de Chilpancingo (17.440061,-99.470162) y Tixtla (17.559718, -99397156) del estado de Guerrero, México, durante el periodo comprendido de junio a agosto considerado como temporada de lluvias. La muestra clínica se recolectó del cultivo microbiológico de la secreción de herida quirúrgica de un paciente internado en un hospital perteneciente al estado de Guerrero. Para la recolección y transporte de las muestras ambientales hisopadas, los hisopos se inocularon en medio agar cetrimida (Devnath *et al.*, 2017) gelificado en pico de flauta, en tubos de ensayo de 75x12mm con taparrosca. Se procedió a incubar las muestras recolectadas a 37° C por 24 h, posterior a este periodo se seleccionaron las colonias que mostraban datos de producción de pioverdina, para sembrarse en cajas de Petri de 100x15mm mediante estría abierta, incubándose a 42° C por 24 h. para el aislamiento e identificación de cepas compatibles con *Pseudomonas aeruginosa*. La confirmación de género, especie y la sensibilidad a antibióticos, se realizó por el sistema automatizado para la identificación microbiológica por micro diluciones VITEK de Biomerux (Augusto y Aldana 2017).

Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1-UW y la mutante de PAO1 $\Delta lasI/\Delta rhII$; fueron proporcionadas por el laboratorio 7 de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a cargo de la Dra. Gloria Soberón Chávez.

ANEXO 2

Caracterización fenotípica de las cepas

La cepa PAO1-UW fue utilizada como control (Klockgether *et al.* 2010) durante la caracterización de las cepas aisladas.

Para la extracción y cuantificación de la piocianina, se realizó un pre-inoculo de las cepas en medio LB (15g/L Agar, 10g/L peptona de caseína, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl) dejándose crecer en overnight a 37° C con agitación a 225rpm, posteriormente se inoculó 30mL de caldo PPGAS (NH₄Cl 0.02M 1.069g/L, KCl 0.02M 1.49g/L, TRIS-HCL 0.12M 18.91g/L, Peptona 1% 10g/L, Glucosa 0.5% 25mL/L, MgSO₄ 0.0016M 3.2L /L) con la cantidad de pre-inoculo apropiado para alcanzar una absorbancia inicial de 0.1 a 600nm, incubándose a 37° C por 24 h en agitación a 225rpm. Después del tiempo indicado se procedió a centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4° C., se tomó 5mL de sobrenadante libre de células, colocándose en un matraz de 125mL y se adicionó 3mL de cloroformo, mezclando con movimiento circular por 30 segundos, se dejó reposar la mezcla algunos minutos permitiendo que se separen las fases, la fase inferior se colocó en un tubo de ensaye limpio y se le agregó a esta fase 1mL de HCl 0.2N, mezclando mediante vortex hasta lograr una coloración rosa-roja, la mezcla se separó en dos fases , la fase rosa se pasó a un tubo limpio y se cuantificó midiendo la absorbancia a 520nm. Para obtener los µg/mL se utilizó el coeficiente de extinción de la piocianina que es de 17.072 y se multiplicó por la absorbancia obtenida (El-fouly *et al.* 2014).

La extracción y TLC de ramnolípidos se obtuvo mediante un pre-inoculo de la cepa de interés en medio LB dejándose crecer en overnight a 37° C con agitación a 225rpm, posteriormente

se inoculó 30mL de caldo PPGAS con la cantidad de pre-inoculo apropiado para alcanzar una absorbancia inicial de 0.1 a 600nm, incubándose a 37° C por 24 h en agitación a 225rpm. Después del tiempo indicado se procedió a centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4° C., el sobrenadante se ajustó a un pH de 2 con HCl concentrado, se tomaron 5mL del sobrenadante ya ajustado y se agregaron 5mL de la mezcla Cloroformo-metanol (2:1), se agitó la mezcla vigorosamente por 15 minutos en un tubo de 15mL de polipropileno con taparroscas. Pasando el tiempo citado se procedió a centrifugar a 4000rpm por 10 minutos a 4° C y con la ayuda de una pipeta de vidrio se extrajo la fase orgánica inferior y se pasó a un tubo nuevo. La fase superior se mezcló nuevamente con 5 mL cloroformo-metanol (2:1) y se repitió el proceso de centrifugación y extracción de la fase orgánica inferior, esta última fase se combinó con la fase obtenida anteriormente para su posterior evaporación del solvente en la campana de extracción hasta quedar 1mL, el cual se vació en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se dejó evaporar completamente en la campana. A los tubos ya secos se les agregó 100µL de metanol para disolver el extracto. Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de TLC silica gel (60 F₂₅₄), con la ayuda de una micropipeta de 1µL se colocaron 5µL de la muestra en el punto de aplicación, se utilizó mono y diramnolipido como referencia, para el corrimiento de la placa se utilizó la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético 65:15:2, el revelado se realizó con α naftol en un horno a 80° C (Abdel-Mawgoud *et al.* 2011).

La determinación de la producción de proteasas se efectuó preparando las muestras en tubos de ensayo diferentes para cada cepa con medio LB e inoculo incubado en overnight, la mezcla se realizó para obtener una absorbancia de 0.4 a 600nm en 1mL. En cajas de Petri con triple división se inoculó en el centro de una división 3µL de las cepas de interés, evitando moverla antes de que seque la muestra aplicada, en la segunda división se aplicó

3µL de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 como control positivo y en la tercera división se inoculo 3µL de la cepa *P. aeruginosa* 144 como control negativo. Una vez inoculadas las tres divisiones se incubaron a 37° C por 24 h y se midió el área desde el centro hasta el límite del halo (Gurjot *et al.* 2017).

Para la medición de la elastasa se ocupó el ensayo elastasa rojo-congo, para lo cual posterior al crecimiento en overnight del caldo LB inoculado con las cepas de interés a 37° C en agitación a 225rpm, se realizó la centrifugación a 14000rpm por 10 minutos a 4° C, colocando el sobrenadante en un tubo limpio y nuevo. Se colocaron 5mg de elastina rojo-congo y 0.85mL de amortiguador de fosfatos de sodio 10mM pH 7.5 y 0.15mL del sobrenadante de nuestra muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Como control negativo se usó caldo LB sin inocular. Los tubos se incubaron a 37° C durante 3 horas y después de este periodo se centrifugaron a 14000 rpm a 4° C, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se medirá la absorbancia a 495nm (Kida *et al.* 2017).

ANEXO 3

Expresión de factores fenotípicos de las cepas

Piocianina

En la Figura 9A se observa que la cepa MAZ 0105 produjo mayor cantidad de piocianina, superando incluso a la cepa PAO1. La cepa doble mutante de las sintasas LasI/RhII, mostró una mínima producción de este pigmento

Proteasas

En la Figura 9B se aprecia que la cepa PAO1 produjo el mayor tamaño de área de halo, en contraste las cepas MAZ0105 y la cepa doble mutante de sintasas presentaron el menor tamaño de halos.

Elastasas

En la Figura 9C se estima que la cepa MCD produjo la mayor cantidad de elastasas de las cepas estudiadas, mientras que la cepa de la rizósfera de tomate MAZ 0105 reflejo una cantidad mínima y la cepa doble mutantes de las sintasas *RhII/LasI* no muestra producción de elastasas.

Ramrólpidos

En la Figura 9D se observa que la cepa de rizósfera de tomate MAZ 0105 es la que presento mayor cantidad de monoramrólpidos, en contraste, esta misma cepa no produjo diramrólpidos, siendo las cepas PAO1 y MCD las que mejor producción de diramrólpidos presentaron.

ANEXO 4

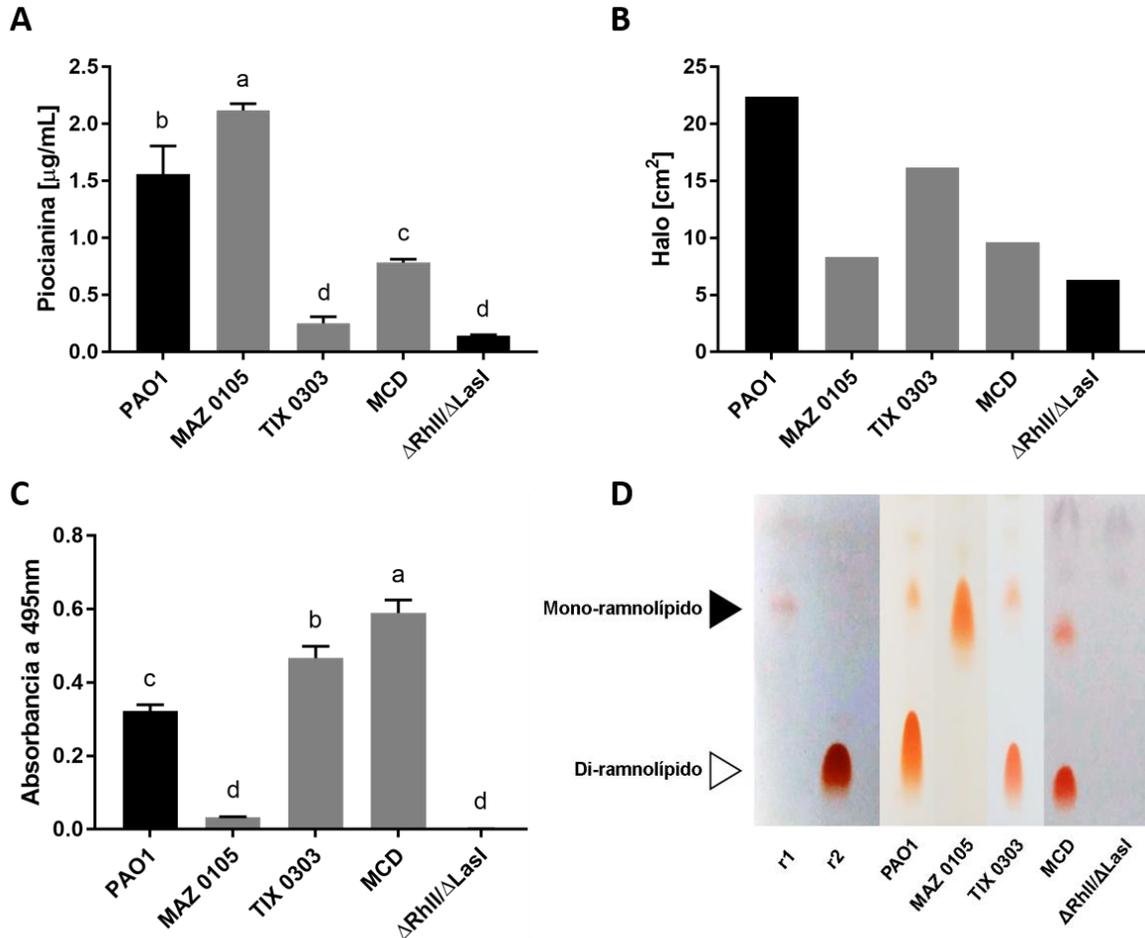


Figura 9. Expresión de factores dependientes de los complejos RhIR/I LasR/I del QS. (A) Concentración de picrocianina después de 24 h de incubación a 37°C en medio PPGAS. Las barras representan la media \pm DE (n=3), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$ con la postprueba Tukey. (B) Área de halo producido por proteasas después de 16 h de incubación a 37°C en medio agar LB-leche. (C) Ensayo elastina-rojo congo de las cepas crecidas en medio LB a 37°C en *overnight*. Las barras representan la media \pm DE (n=3), letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$ con la postprueba Tukey. (D) Placas de TLC de extractos de las cepas incubadas a 37°C en medio PPGAS en overnight usando un sistema de elución compuesta por cloroformo-metanol-ácido acético 65:15:2 (v/v/v). El triángulo negro muestra la línea de los mono-ramnolípidos, el triángulo blanco la línea de los di-ramnolípidos.