

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROPLASTICULTURA

“Evaluación de la colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante un marcador fluorescente en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta*”

TESIS

Presentada por:

MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

Asesores:

Dr. José Humberto Valenzuela Soto.

Dr. Eduardo Manuel Arias Marín.

Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2019.



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Saltillo, Coahuila a 25 de noviembre de 2019

Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

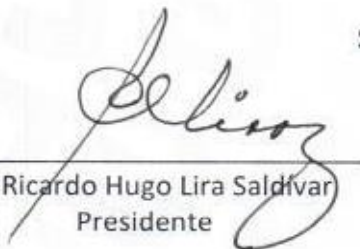
Coordinación de Posgrado

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ titulado "Evaluación de la colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante un marcador fluorescente en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta*" el cual fue presentado el día 22 de noviembre de 2019, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

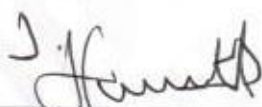
SINODALES


Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar
Presidente


Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario


Dr. Jorge Romero García
Vocal

Vo. Bo. de los Asesores


Dr. José Humberto Valenzuela Soto


Dr. Eduardo Manuel Arias Marín



TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

FIRMA

TITULO: Evaluación de la colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante un marcador fluorescente en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta*.

ASESORES: Dr. José Humberto Valenzuela Soto

FIRMA

Dr. Eduardo Manuel Arias Marín

FIRMA

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 22 de Noviembre de 2019

Sello de la Institución




Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Evaluación de la colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante un marcador
fluorescente en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)
a nivel *in vitro* e *in planta***

Presentada por:

MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

Asesorada por:

Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Dr. Eduardo Manuel Arias Marín

SINODALES


Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar
Presidente


Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario


Dr. Jorge Romero García
Secretario



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

I.TESIS

**Evaluación de la colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante un
marcador fluorescente en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-
Tom) a nivel *in vitro* e *in planta***

Presentada por:

MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

II.Maestro en Ciencia en Agroplasticultura

Asesorada por:

Dr. José Humberto Valenzuela Soto
Dr. Eduardo Manuel Arias Marín

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 22 de noviembre de 2019



MÓNICA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Nombre y Firma

DEDICATORIAS.

Este trabajo está dedicado a mis padres **Hilsen Rodriguez Isla** y **Donato Hernández Espinoza** por una vez más apoyarme a concluir un grado mayor en mis estudios, sus consejos, amor, comprensión y apoyo incondicional día a día fueron pieza fundamental en esta nueva etapa.

A mis hermanos **Angel Hernandez Rodriguez** y **Eduardo Hernandez Rodriguez**, que con sus actos me enseñaron cosas importantes en la vida, a mi hermana **Mariana Hernandez Rodriguez** por sus sabias palabras, amor y apoyo incondicional, gracias ustedes tengo un logro más en esta vida.

A mi sobrino **Dominic Gael Hernández Ortega** por ser un príncipe azul para mí y llenar mis días con su inocencia y amor.

A mis padrinos **Raquel Cuenca Delgado**, **Arturo Guillermo Sanchez Márquez**, **Mónica Sanchez Cuenca** y **Mauricio Sanchez Cuenca** que me apoyaron y motivaron a seguir y alcanzar mis sueños a lo largo de mi vida. A **Constanza Sanchez Cuenca** por su amor, inteligencia y persistencia a perseguir los sueños deseados que en su corta edad me ha enseñado.

A **mí**, por la dedicación, amor, confianza y pasión para el cumplimiento de un logro más en esta vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que apoyó este proyecto mediante la Convocatoria de Proyectos de Ciencia básica CB-2015 a través del Proyecto No. 256716

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por brindarme nuevamente la oportunidad de conocer nuevas aplicaciones de la investigación y el medio para continuar con mis estudios.

Al Dr. José Humberto Valenzuela Soto, por una vez más brindarme su confianza, dedicación y apoyo al desarrollar este trabajo, así como sus enseñanzas aportadas para concluir este estudio.

Al Dr. Eduardo Manuel Arias Marín y Dra. Ivana Moggio por su dedicación, tiempo, esmero y paciencia que tuvieron conmigo para mi aprendizaje en nuevos temas, así como la confianza en mí hacia este proyecto.

Al M.C. Edgar Rodríguez Vázquez por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación, por sus consejos, amor, paciencia, sabiduría e inteligencia aportados día a día, sin su apoyo y compañía en las desveladas con experimentos pasadas en este trabajo, no se habría logrado.

A los investigadores del Laboratorio Central de Instrumentación Analítica por el apoyo con sus conocimientos y experiencia durante el desarrollo de mi experimento: Dra. Mildred Flores Guerrero, M.C. Lourdes Guillen Cisneros y Dra. Geraldina Rodríguez.

A los investigadores del Cluster Científico y Tecnológico BioMimic del INECOL por su apoyo y dedicación en el desarrollo de pruebas complementarias a este trabajo: Dra. Ofelia Ferrera Rodríguez y Dr. Randy Ortiz Castro.

A los investigadores del CIQA que formaron parte de mi comité evaluador de tesis: Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar, Dr. Jorge Romero García y Dr. Antonio Sergei Ledezma Pérez.

A los compañeros y amigos que conocí en esta nueva etapa y también contribuyeron con su experiencia y conocimientos en mi trabajo: Adela, Carolina, Gaby, Marlene, Daniel, Luis, Rolando, Carlos, y Jean.

Y al concluir este trabajo nuevamente agradezco a **la vida** por darme la oportunidad de día a día conocer, vivir, disfrutar, soñar, amar y sentir nuevas experiencias que han llenado de plenitud mi alma y mi ser, regalándome a los mejores seres que han marcado mi vida y se encuentran mencionados con anterioridad.

RESUMEN.

Hay muchos reportes de investigaciones que han comprobado que existe una relación de sinergismo entre plantas y microorganismos. Estos organismos asociados al rizoplasma son comúnmente identificados como (PGPR), del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* y se encuentran presentes en la rizósfera; en las áreas internas de la raíz y el cuerpo de la planta. Para evaluar los patrones de colonización por PGPR en las raíces, se han realizado diferentes estudios que han involucrado transformaciones genéticas con gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) o sondas mediante la técnica de FISH y CARD-FISH (*Fluorescent In situ Hybridization*), la desventaja de estas técnicas en algunos casos es la baja intensidad de fluorescencia, así como la inversión de tiempo en la transformación. Otra técnica para evaluar colonización bacteriana se basa en el análisis en tiempo real (qPCR), sin embargo, ésta no es capaz de determinar los patrones espaciales de colonización, solo la presencia y/o abundancia. El presente estudio se enfocó en evaluar una molécula fluorescente que permitiera la detección de bacterias mediante fluorescencia por tinción, el cual, es un método novedoso que representa una estrategia factible y de diagnóstico rápido, lo que constituye a su vez una herramienta valiosa para la detección precisa de patrones de colonización en la rizósfera. A este respecto, se sintetizó una serie de sales de sodio de pírenos partiendo de la molécula 8-hidroxipireno1-3-6-trisulfonato de sodio, portadores de cadenas alifáticas con terminaciones alquílicas, con ácido carboxílico, ácido málico, etileno como marcadores fluorescentes para estudiar e identificar los patrones de colonización de la bacteria *Bacillus subtilis* LPM1 en raíces de plantas de 3 variedades de tomate (Floradade, Micro-Tom y Silvestre), tanto a nivel *in planta* en una variedad (Micro-Tom), como a nivel *in vitro* mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia como UV-Vis, fluorescencia y microscopia de barrido láser confocal. Adicionalmente se logró comprobar la promoción de crecimiento por parte de la cepa *Bacillus subtilis* LPM1 en los parámetros biométricos evaluados en las variedades Micro-Tom y Silvestre.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN	23
I.1. Antecedentes	25
I.1.1. Problemáticas actuales agrícolas.	25
I.1.2. La hidroponía como un sistema para la producción agrícola.	26
I.1.3. <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.	27
I.1.4. Principales factores relacionados a la planta.	27
I.1.4.1. Respuestas fisiológicas de la planta.	27
I.1.4.2. Rizósfera.	28
I.1.4.3. Roles de la interacción planta–rizósfera.....	29
I.1.4.4. Exudados radiculares.	30
I.1.4.4.1. Patrones de colonización a partir de exudados radiculares.	31
I.1.4.5. Interacción de microorganismos en la rizósfera.	32
I.1.4.5.1. Comunicación bacteriana.	33
I.1.4.6. Respuesta defensiva de la planta.	33
I.1.4.6.1. Respuesta defensiva de la planta ante patógenos.....	35
I.1.4.6.2. Respuesta defensiva de la planta ante patógenos y PGPR.....	37
I.1.4.6.2.1. Resistencia inducida.	37
I.1.4.6.2.2. Resistencia sistémica inducida (ISR).	37
I.1.4.6.2.3. Resistencia sistémica adquirida (SAR).	37
I.1.4.6.2.4. Tolerancia sistémica inducida.	38
I.1.4.7. Vías de señalización producidas para la promoción de crecimiento en plantas por PGPR.....	38
I.1.4.7.1. Hormonas.....	38
I.1.4.7.1.1. Ácido abscísico (ABA).....	38
I.1.4.7.1.2. Giberelinas (GA).	39
I.1.4.7.1.3. Auxinas.	40
I.1.4.7.1.4. Citoquininas.	41
I.1.4.7.1.5. Etileno.	42
I.1.4.7.1.5.1. Inhibición de biosíntesis de etileno por la producción de ACC desaminasa.....	43
I.1.5. PGPR en la agricultura.	44



I.1.5.1.	Clasificación de las PGPR.....	46
I.1.5.2.	Géneros bacterianos clasificados como PGPR.....	47
I.1.6.	<i>Bacillus subtilis</i> como PGPR.....	48
I.1.6.1.	Colonización bacteriana de <i>Bacillus subtilis</i>	50
I.1.7.	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1.	52
I.1.8.	Uso y aplicación de elicitores.....	52
I.1.8.1.	Ácido jasmónico (JA).....	54
I.1.8.2.	Benzotiadiazol (BTH).	55
I.1.9.	Materiales orgánicos conjugados, síntesis, propiedades y perspectivas de interacción con materiales en la biología molecular.....	55
II.	HIPÓTESIS.....	57
III.	OBJETIVOS.....	57
III.1.	Objetivo general.	57
III.2.	Objetivos específicos.	57
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
IV.1.	Cepa bacteriana <i>Bacillus subtilis</i> LPM1 visualizada mediante tinción Gram.	59
IV.2.	Caracterización de 5 moléculas fluorescentes en solución.....	59
IV.2.1.	Espectroscopía de fluorescencia.....	59
IV.2.2.	Tiempo de vida.	60
IV.3.	Interacción entre marcadores fluorescentes y cepas bacterianas.....	60
IV.3.1.	Ensayo preliminar.....	60
IV.3.1.1.	Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.....	62
IV.3.1.1.1.	Microscopía de barrido láser confocal (LSCM).	62
IV.3.2.	Interacción entre 5 marcadores fluorescentes y 6 cepas bacterianas. ...	62
IV.3.2.1.	Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.....	64
IV.3.2.1.1.	Microscopía de barrido láser confocal.	64
IV.3.2.1.1.	Espectroscopía de fluorescencia.	64
IV.3.2.2.	Cuantificación de UFC de 6 cepas bacterianas.	64
IV.4.	Promoción de crecimiento en 3 variedades de tomate.	65
IV.4.1.	Patrones de colonización a nivel <i>in planta</i>	66
IV.5.	Germinación y crecimiento <i>in vitro</i> de plantas de tomate.....	67
IV.5.1.	Aplicación foliar de elicitores químicos a plántulas.....	67

IV.5.1.1. Análisis de ácidos orgánicos presentes en exudados radiculares por LC-MS.....	68
IV.5.2. Patrones de colonización a nivel <i>in vitro</i>	69
IV.6. Quimiotaxis bacteriana.....	70
IV.6.1. Quimiotaxis en medio de cultivo sólido.....	70
IV.6.1.1. Medio mínimo M9 con cepa <i>B. subtilis</i> LPM1.....	70
IV.6.1.2. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.....	71
IV.6.2. Quimiotaxis en medio de cultivo líquido.....	71
IV.6.2.1. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.....	71
IV.7. Motilidad.....	72
IV.7.1. Medio LB diluido con 3 cepas bacterianas.....	72
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	73
V.1. Cepa bacteriana <i>B. subtilis</i> LPM1 visualizada mediante tinción Gram.....	73
V.2. Propiedades ópticas de los marcadores del tipo pireno sulfonato de sodio.	74
V.3. Interacción entre marcadores fluorescentes y cepas bacterianas.....	78
V.3.1. Ensayo preliminar.....	78
V.3.1.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.....	78
V.3.1.1.1. Microscopía de barrido láser confocal.....	78
V.3.1.1.2. Espectroscopía de fluorescencia.....	81
V.3.1. Interacción entre 5 marcadores fluorescentes y 6 cepas bacterianas.....	84
V.3.1.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas.....	84
V.3.1.1.1. Microscopía de barrido láser confocal.....	84
V.3.1.1.1. Espectroscopía de fluorescencia.....	99
V.3.1.1. Cuantificación de UFC de 6 cepas bacterianas.....	108
V.4. Promoción de crecimiento en 3 variedades de tomate.....	109
V.4.1. Patrones de colonización a nivel <i>in planta</i>	114
V.5. Germinación y crecimiento <i>in vitro</i> en plantas de tomate.....	117
V.5.1. Aplicación foliar de elicitores químicos a plántulas.....	117
V.5.1.1. Análisis de ácidos orgánicos presentes en exudados radiculares por LC-MS.....	117
V.5.2. Patrones de colonización a nivel <i>in vitro</i>	119
V.6. Quimiotaxis bacteriana.....	126
V.6.1. Quimiotaxis en medio de cultivo sólido.....	126

V.6.1.1. Medio mínimo M9 con <i>B. subtilis</i> LPM1.	126
V.6.1.2. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.	129
V.6.2. Quimiotaxis en medio de cultivo líquido.	136
V.6.2.1. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.	136
V.7. Motilidad.	139
V.7.1. Medio LB diluido con 3 cepas bacterianas.	139
VI. CONCLUSIONES.	145
VI.1. Conclusión final.	146
VII. PERSPECTIVAS.	148
VIII. ANEXO A.	148
IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.	159

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Factores que influyen en el proceso de producción de exudados radiculares y su colonización por PGPR (adaptado de Nihorimbere-Venat <i>et al.</i> , 2011).....	31
Figura 2. Efecto del estrés biótico y abiótico favorecido en la simbiosis o acumulación de microorganismos benéficos para la planta, PGPF: hongos promotores de crecimiento, PGPB: bacterias promotoras de crecimiento (adaptado de Compant <i>et al.</i> , 2010).	35
Figura 3. Primera y segunda línea de defensa de la planta ante el ataque de patógenos.	36
Figura 4. Vías de transducción de señales para ISR y SAR, donde SA, JA y ET son las moléculas señales para la activación de genes de defensa (adaptado de Jha y Saraf, 2012; Schultz <i>et al.</i> , 2013).	38
Figura 5. Estructura química de la molécula ácido abscísico (ABA), fitohormona involucrada en procesos de desarrollo y crecimiento en plantas y semillas.	39
Figura 6. Estructura química de la molécula de ácido giberélico, hormona involucrada en la regulación de funciones en la planta.	40
Figura 7. Biosíntesis de hormona auxina a partir de triptófano en plantas y microorganismos asociados a la rizósfera (adaptado de Jha y Saraf, 2012).....	41
Figura 8. Estructura química de la molécula de citoquinina, hormonas esenciales en el desarrollo y crecimiento de plantas.	42
Figura 9. Modelo esquemático de como las PGPR realizan la función de promover el crecimiento en plantas a partir de la producción de ACC desaminasa y la síntesis de IAA. Proceso en el cual interviene la S-adenosil metionina (SAM) convirtiéndose en ACC por la enzima ACC sintasa, dicho ACC se convierte en etileno por la acción de la ACC oxidasa en la planta, mientras que en la bacteria pasa a α -cetobutirato y amoníaco por acción de la ACC desamina (adaptado de Glick, 2014).....	43
Figura 10. Modelo esquemático referente a crecimiento en planta sometida a estrés, mostrando la capacidad de PGPR productora de ACC desaminasa que disminuye niveles de etileno por estrés evitando la inhibición de crecimiento en la panta (adaptado de Glick, 2014).	44
Figura 11. Efectos positivos reportados para las PGPR involucrados con la promoción de crecimiento en plantas (adaptado de Maheshwari <i>et al.</i> , 2012).....	45
Figura 12. Péptidos antimicrobianos (AMPs) recientemente identificados producidos por diferentes cepas de especies <i>Bacillus</i> (Sumi <i>et al.</i> , 2015).....	49
Figura 13. Esquema hipotético de las regiones radiculares posibles para la colonización y formación de “biofilm” (adaptado de Rudrappa <i>et al.</i> , 2008).....	51
Figura 14. Estructura química de la molécula de ácido málico. Ácido comúnmente reportado como quimiotrayente para bacterias del género <i>Bacillus</i>	52
Figura 15. Esquema de posibles reacciones de defensa en plantas inducidas por elicitores de manera secuencial dependientes del tipo y variedad de planta (adaptado de Zhao <i>et al.</i> , 2005).	53
Figura 16. Estructura química de la molécula de ácido jasmónico (JA), utilizado como elicitador en plantas.....	54

Figura 17. Estructura química de la molécula de ácido benzo 1, 2, 3 tiadiazol-7-carboxílico (BTH).....	55
Figura 18. Estructura química de los pentámeros evaluados para la tinción de <i>B. subtilis</i> , donde A) pentámero con cadenas colesteril, B) pentámero con cadenas glicolicas y C) pentámero con cadenas alquílicas de 12 carbonos (García et al., 2019).....	61
Figura 19. Estructura química de marcadores fluorescentes utilizados para la evaluación del comportamiento de 6 cepas bacterianas donde A) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido carboxílico (M1), B) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido málico (M2), C) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación alquílica de 11 carbonos (M3), D) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación hidroxí (M4) y E) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación triple enlace (M5).	63
Figura 20. Metodología utilizada para conteo de UFC aplicado en cada ensayo independiente para las 6 cepas bacterianas.	65
Figura 21. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de promoción de crecimiento en tres variedades de tomate, donde MT= Micro-Tom, S= Silvestre y F= Floradade.....	66
Figura 22. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de aplicación de elicitors adecuado para cuarto <i>in vitro</i> donde T1= Planta + JA, T2= Planta + AA y T3= Planta + BTH.	68
Figura 23. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de patrones de colonización adecuado para cámara de cuarto <i>in vitro</i> (lámpara) e incubadora (ventilador) donde T1= Planta control, T2= Planta + <i>B. subtilis</i> LPM1 y T3= Planta + <i>B. subtilis</i> LPM1 + M1 y T4= Planta + M1.	70
Figura 24. Bacteria <i>B. subtilis</i> LPM1, visualizada mediante técnica de tinción Gram, mostrando bacilos alargados teñidos de violeta; color característico de las bacterias Gram-positivo.	73
Figura 25. Espectros de fluorescencia de 5 pirenos sulfonatos de sodios de sodio: A) espectro de emisión en solución, B) espectro de excitación en solución, C) espectro de emisión en portaobjetos, M1) marcador pireno con terminación ácido carboxílico, M2) marcador pireno con terminación ácido málico, M3) marcador pireno con terminación alquílica de 11 carbonos, M4) marcador pireno con terminación hidroxí y M5) marcador pireno con terminación triple enlace.	75
Figura 26. Cepas bacterianas teñidas con pentámero donde A) <i>B. subtilis</i> LPM1 en canal de fluorescencia, B) <i>B. subtilis</i> LPM1 en canal de reflexión, C) <i>E. coli</i> DH5α en canal de fluorescencia y D) <i>E. coli</i> en canal de reflexión (García et al., 2019).	80
Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia presentados por muestras de frotis donde:) <i>B. subtilis</i> LPM1 + pentámero,) <i>B. subtilis</i> LPM1,) <i>E. coli</i> DH5α + pentámero,)) <i>E. coli</i> DH5α y) pentámero (García et al., 2019).	81
Figura 28. Análisis Raman de la bacteria <i>B. subtilis</i> LPM1 aislada y teñida con el marcador pentámero, donde a) <i>B. subtilis</i> LPM1 aislado interaccionando con el marcador, b y c) mapeo espectral de X y Y, d) espectro Raman (-C≡C- área de la señal) en las regiones a y b del inciso c (García et al., 2019).....	83

Figura 29. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>B. subtilis</i> LPM1 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.	101
Figura 30. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>B. subtilis</i> PY79 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.	103
Figura 31. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>E. coli</i> DH5α interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.	105
Figura 32. Captura de zona radicular de ensayo montado en invernadero, donde se observa que las plantas que fueron tratadas con la bacteria <i>B. subtilis</i> LPM1 muestran un incremento en las raíces laterales y pelos radiculares en comparación con el control que presenta una mayor longitud en la raíz principal.	111
Figura 33. Comportamiento de variable biomasa seca de raíz evaluada de tres variedades de tomate en parámetros biométricos, sometidas a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), donde F C= Floradade Control, F+B= Floradade + LPM1, S C= Silvestre Control, S+B= Silvestre + LPM1, MT C= Micro-Tom Control y MT+B= Micro-Tom + LPM1.	112
Figura 34. Visualización de variabilidad en el crecimiento de las 3 variedades de tomate, <i>S. lycopersicum</i> cv. Micro-Tom, <i>S. lycopersicum</i> cv. Silvestre y <i>S. lycopersicum</i> cv. Floradade.	112
Figura 35. Cajas petri representativas a la prueba con medio mínimo M9, donde se aprecia el crecimiento de la cepa bacteriana sometida a las mejores concentraciones de ácidos orgánicos y su respectivo control, donde A) control, B) ácido oxálico 50 μM, C) ácido málico 75 μM y D) ácido succínico 50 μM.	128
Figura 36. Comportamiento de cepa <i>B. subtilis</i> LPM1 en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.	131
Figura 37. Comportamiento de cepa <i>B. subtilis</i> PY79 en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.	133
Figura 38. Comportamiento de cepa <i>E. coli</i> DH5α en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.	135
Figura 39. Comportamiento de cepa <i>B. subtilis</i> LPM1 en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada día con una duración de 6 días de crecimiento en contacto	

con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.....	142
Figura 40. Comportamiento de cepa <i>B. subtilis</i> PY79 en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada día con una duración de 4 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.....	143
Figura 41. Comportamiento de cepa <i>E. coli</i> DH5α en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.....	144
Figura 42. Tiempo de vida de moléculas fluorescentes donde A) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida (M1), B) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico (M2), C) marcador pireno con undecanoxy (M3), D) marcador hidroxi pireno sulfonato de sodio (M4), E) marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace (M5), Decay= decaimiento y Fit= ajuste.....	149
Figura 43. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.	151
Figura 44. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>Pectobacterium cacticidum</i> interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.....	152
Figura 45. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa <i>Agrobacterium sp.</i> interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.	153
Figura 46. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido fumárico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 μM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.	154
Figura 47. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido málico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 μM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.	155
Figura 48. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido oxálico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 μM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.	156
Figura 49. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido succínico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 μM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.	157
Figura 50. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido cítrico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 μM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.	158

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Caracterización de marcadores fluorescentes en solución, donde λ_{abs} = máxima longitud de onda, ε = coeficiente de extinción molar, λ_{em} = longitud máxima de emisión, $\Delta\nu$ = desplazamiento de Stoke, Φ = rendimiento cuántico y τ = tiempo de vida.....	76
Tabla 2. Comportamiento de <i>B. subtilis</i> LPM1 de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.....	85
Tabla 3. Comportamiento de <i>B. subtilis</i> PY79 de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.....	87
Tabla 4. Comportamiento de <i>E. coli</i> DH5 α de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.....	90
Tabla 5. Comportamiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC300 de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.	92
Tabla 6. Comportamiento de <i>Pectobacterium cacticidum</i> de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.	94
Tabla 7. Comportamiento de <i>Agrobacterium</i> sp. de ensayo <i>in vitro</i> sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.....	97
Tabla 8. Resumen de comportamiento presentado en la interacción bacteria-marcador fluorescente en las pruebas de LSCM y espectroscopía de fluorescencia, así como la morfología característica del género bacteriano de las 6 cepas probadas (imágenes ilustrativas).	106
Tabla 9. Cajas petri inoculadas con bacteria <i>B. subtilis</i> LPM1 a una $D_{0600nm} = 0.1$ para cuantificación de UFC $\cdot$ mL ⁻¹ . Imágenes representativas de un ensayo independiente.	108
Tabla 10. Datos analizados para cuantificación de UFC $\cdot$ mL ⁻¹ de 6 cepas bacterianas representativos de un ensayo independiente mostrando el conteo en la dilución 10 ⁶	109
Tabla 11. Influencia de la cepa bacteriana <i>B. subtilis</i> LPM1 en los parámetros biométricos evaluados de 3 variedades de tomate sometidas a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).	114
Tabla 12. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de 3 variedades de tomate tratadas con M1, imágenes representativas de un ensayo independiente.	115
Tabla 13. Análisis de mg presentes correspondientes a tres ácidos orgánicos distintos en muestras de exudados radiculares de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom. determinados por LC-MS.....	118
Tabla 14. Patrones de zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 1, imágenes representativas de un ensayo independiente.	120
Tabla 15. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 2, imágenes representativas de un ensayo independiente.	121

Tabla 16. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 3, imágenes representativas de un ensayo independiente.	123
Tabla 17. Patrones de zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 4, imágenes representativas de un ensayo independiente.	124
Tabla 18. Datos respectivos a crecimiento de bacteria <i>B. subtilis</i> LPM1, sometida a 5 ácidos orgánicos y 5 concentraciones distintas para determinar efecto de quimiotaxis presente por la bacteria hacia dichos ácidos.	127
Tabla 19. Cuantificación de UFC · mL ⁻¹ de la cepa <i>B. subtilis</i> LPM1 en cinética evaluada.	137
Tabla 20. Cuantificación de UFC · mL ⁻¹ de la cepa <i>B. subtilis</i> PY79 en cinética evaluada.	138
Tabla 21. Cuantificación de UFC · mL ⁻¹ de la cepa <i>E. coli</i> DH5α en cinética evaluada.	139

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y CONTRACCIONES.

λ_{abs}	Máxima longitud de onda
λ_{em}	Longitud máxima de emisión
1Lvd	1 lavado
AA	Ácido azelaíco
ABA	Ácido abscísico
AC	Ácido cítrico
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fumárico
AM	Ácido málico
AMPs	Péptidos antimicrobianos
AO	Ácido oxálico
AS	Ácido succínico
BTH	Benzotiadiazol
C	Citosina
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenilindol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Exopolisacaridos
ET	Etileno
F	Floradade
FISH	Fluorescent In situ Hybridization
G	Guanina
GA	Giberelinas
GFP	Green Fluorescent Protein
HPLC	Cromatografía líquida
IAA	Ácido-3-acético

IBA	Ácido indol-3-butírico
ISR	Resistencia sistémica inducida
ITS	Tolerancia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
K	Potasio
LB	Luria Bertani
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LSCM	Microscopía de barrido láser confocal
M1	Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido carboxílico
M2	Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido málico
M3	Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación alquílica de 11 carbonos
M4	Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación hidroxil
M5	Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación triple enlace
M9	Medio mínimo M9
MAMP	Patrones moleculares asociados a microbios
MeJA	Metil jasmonato
MS	Medio Murashige-Skoog
MT	Micro-Tom
N	Nitrógeno
P	Fósforo
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PC	Polímeros conjugados
PCR	Polimerase chain reaction
PE	Fenileniletinileno
PGPB	Bacterias promotoras de crecimiento
PGPF	Hongos promotores de crecimiento
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
RPSL	Resonancia de plasmón superficial localizado
S ⁽¹⁾	Silvestre

S ⁽²⁾	Azufre
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosil metionina
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SII	Sistema inmune innato
SLvd	Sin lavado
TCSPC	Técnica de conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visible
Zn	Zinc
$\Delta\nu$	Desplazamiento de Stoke
Φ	Rendimiento cuántico
ε	Coeficiente de extinción molar
τ	Tiempo de vida

S⁽¹⁾= Silvestre, utilizado en el contenido completo de escrito refiriéndose a la variedad de *S. lycopersicum* cv. Silvestre,
S⁽²⁾ = azufre, únicamente presente en antecedentes representado un elemento de la tabla periódica

III. INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los años investigaciones han comprobado que existe una relación de sinergismo entre plantas y microorganismos en la rizósfera, donde, dicha zona favorece el desarrollo y crecimiento de las plantas, por acción de microorganismos que cumplen funciones básicas para ambos, donde interviene el intercambio de nutrientes que en algunos casos mejora la asimilación de éstos por la planta (Venturi y Keel, 2016; Brencic y Winans, 2005). Estos organismos asociados a la rizósfera son conocidos como microorganismos benéficos no infectivos, entre los más destacados y estudiados se encuentran las rizobacterias, mismas que han demostrado dentro de sus principales funciones la promoción de crecimiento en los cultivos (Liu *et al.*, 2014; Prashar *et al.*, 2014; Hernández-Suárez *et al.*, 2010).

Comúnmente identificadas como PGPR, estas bacterias se encuentran asociadas a la rizósfera, áreas internas del tejido radicular y el cuerpo de la planta, se manifiestan en estas zonas debido a que la raíz presenta la característica principal de generar exudados con altos niveles de nutrientes, entre los más producidos comúnmente se pueden hallar los aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos aromáticos, metabolitos secundarios de bajo y alto peso molecular, entre los cuales se han identificado polisacáridos y proteínas (Van y Bouwmeester, 2016; Bowen y Rovira, 1999).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas, son recursos únicos, los cuales en la actualidad presentan actividades prometedoras a nivel industrial, ya que en algunos casos fungen como productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, saborizantes, entre otros; la extracción directa de las plantas o la síntesis química de éstos ha surgido como una alternativa prometedora, ya que enfocada en el ámbito agrícola los metabolitos secundarios tienen como principal función la protección de las plantas ante ataques de insectos, herbívoros, patógenos, así como para su sobrevivencia al estar sometidas bajo estrés biótico o abiótico (Zhao *et al.*, 2005).

Dichos metabolitos secundarios son biosintetizados a partir del reconocimiento de señales extracelulares e intracelulares percibidas mediante un receptor en la superficie de la membrana plasmática que inducen una red de transducción que está encargada en

regular los genes involucrados en dicho proceso (Zhao *et al.*, 2005).

La cantidad y calidad de la liberación de exudados por la planta depende de la especie, de la etapa fenológica y de factores externos tales como estrés biótico y abiótico (Bais *et al.*, 2006); debido a los factores externos mencionados, se ha demostrado que en algunas plantas, tras sufrir ataques por parte de patógenos ocurre una estimulación en la liberación de exudados en la raíz. Se ha reportado que plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 incrementa la síntesis de ácido málico en exudados, el cual actúa como quimioatrayente de la cepa PGPR *Bacillus subtilis* FB17 (Rudrappa *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que la presencia de ácido cítrico, fumárico, málico y succínico son necesarios para la colonización de *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 en raíces de tomate, los cuales promueven la quimiotaxis y formación de biofilm (Tan *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios recientes llevados a cabo con plantas de *A. thaliana* tratadas con ácido salicílico (AS), se encontró que la activación de las respuestas mediadas por AS modula la colonización en raíces por familias bacterianas específicas (Lebeis *et al.*, 2015).

Para evaluar los patrones de colonización por PGPR en sitios de las raíces, se han realizado diferentes estudios. Uno de ellos involucró la transformación genética de la rizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 con el gen *GFP* del inglés *Green Fluorescent Protein*, en el cual se demostró que FZB42 *gfp*⁺ colonizó una pequeña parte del rizoplasma en *A. thaliana* (Fan *et al.*, 2011). Sin embargo, los autores argumentaron que existe una desventaja en la expresión de una sola copia de *gfp*⁺ en el genoma bacteriano, debido a la baja intensidad de la fluorescencia ocasionada por las múltiples capas de peptidoglicano en esta cepa Gram-positiva. Otra de las técnicas utilizadas para evaluar colonización bacteriana se basa en el análisis en tiempo real (qPCR), el cual permite cuantificar la presencia bacteriana en la interacción con la raíz a nivel molecular. Sin embargo, ésta no es capaz de determinar los patrones espaciales de colonización en el rizoplasma (Fan *et al.*, 2011), por lo cual, recientemente, en otras áreas de estudio se han desarrollado moléculas que emiten fluorescencia, las cuales representan una herramienta para evaluar los patrones de colonización de PGPR, estos marcadores fluorescentes permiten el reconocimiento molecular con la pared celular de la bacteria

(Chen *et al.*, 2012).

Debido a lo anterior mencionado, el presente estudio se enfocó en evaluar nuevas moléculas marcadoras que permitieron la detección de bacterias mediante fluorescencia, lo cual es un método novedoso que representa una estrategia factible y de diagnóstico rápido, lo que constituye a la vez, una herramienta valiosa para la detección precisa de patrones de colonización en la rizósfera. Pensamos que el uso de un marcador molecular fluorescente permitirá estudiar la colonización de la bacteria *Bacillus subtilis* LPM1 en raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta* mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas fluorescentes.

III.1. Antecedentes

III.1.1. Problemáticas actuales agrícolas.

La dependencia alimenticia para una poblacional con más de 7 mil millones de personas y los pronósticos sobre el aumento en la demanda de 10 mil millones en los próximos 50 años y hasta un 60% para futuras generaciones ha llevado a buscar y contrarrestar daños que se han generado en la productividad de plantas y suelos con el paso de los años (Glick, 2014; De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014; Sarma *et al.*, 2012; Selvakumar *et al.*, 2012). Existen daños generados a plantas y suelos ocasionados en algunos casos por patógenos, los cuales afectan los cultivos de una forma importante, a causa de enfermedades en plantas se pierde de \$ 30 a 50 mil millones, lo que representa el 20% de la producción total anual (Chernin y Glick, 2012). Cuando las plantas están sometidas a daños, mejor conocidos como estrés biótico y abiótico se presentan diversos fenómenos de respuesta en la fisiología de la planta como es la alteración en la germinación, vigor, crecimiento y productividad, al estar bajo dichas condiciones éstas presentan senescencia y retraso en el crecimiento como algunos de los problemas más comunes (Saravanakumar, 2012).

Para contrarrestar estos daños en los cultivos, la sociedad ha realizado un uso excesivo de productos químicos para la desinfección tanto del suelo, como de plantas con la finalidad de liberarse de plagas y enfermedades, sin embargo, estos compuestos han

generado un daño tanto en la salud de los ecosistemas como en la humanidad. Por lo cual se han desarrollado distintas investigaciones, donde se ha identificado que más del 80% de la actividad biológica que se realiza en el suelo es debido a los microorganismos que se encuentran presentes, éstos se encargan de transformar al menos un tercio de los elementos que se encuentran presentes en la tabla periódica incluyendo los 16 elementos esenciales beneficiando en la mejora del desarrollo y crecimiento en plantas (Shilev *et al.*, 2012).

La utilización de productos de base biotecnológica para estas problemáticas se ha enfocado en la aplicación de fertilizantes biológicos, en específico bacterianos, con la finalidad de sustituir o reducir el uso de fertilizantes químicos y pesticidas (Tan *et al.*, 2013). Por lo cual se han desarrollado 20 productos que actualmente ya están en el mercado buscando fungir como biocontroladores a partir de cepas bacterianas del género: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Agrobacterium*, los cuales a pesar de estar disponibles para su comercialización se busca mejorar su eficacia, así como la identificación de nuevas cepas potentes para dicha utilización (Egamberdieva, 2012; Miransari, 2012).

III.1.2. La hidroponía como un sistema para la producción agrícola.

La hidroponía es una técnica aplicada desde décadas atrás en el ámbito de la investigación para el estudio fisiológico de las plantas, de igual forma es utilizada como una estrategia prometedora para la producción comercial de cultivos de gran importancia. Dicha técnica permite el crecimiento y desarrollo de plantas a partir del aporte de nutrientes mediante soluciones en conjunto con un medio de soporte inerte (Mommer *et al.*, 2016). Entre las ventajas más notorias que presenta esta técnica se encuentra la producción de plántula en menor tiempo, buena calidad, precisión en aporte de nutrientes, control de enfermedades, entre otras (Nhut, Nguyen, y Thuy, 2006).

La aplicación de esta técnica ha sido muy prometedora, ya que diversos estudios han demostrado que al utilizarla a nivel invernadero por unidad de superficie, mejora la producción hasta un 100% más, que la producción obtenida de 20 a 30 t ha⁻¹ en campo

abierto (Vázquez, 2012).

III.1.3. *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

El tomate *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom es considerada una variedad de tomate autocompatible o autofértil, es decir, que tiene la capacidad de reproducirse sexualmente consigo mismo; es considerada como la variedad más pequeña de la familia de los tomates, mide de 6 a 8 pulgadas (15.24 y 20.32 cm) de altura. Produce frutos del tamaño de una cereza, los cuales maduran aproximadamente entre los 75 y 85 días. Las 3 etapas vegetativas más caracterizadas de la planta se encuentran a los 25 días con la etapa vegetativa, 50 días etapa de floración y 75 días etapa de fructificación (Paudel *et al.*, 2014).

El cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* está clasificado como plantas C3, ya que se identifican como plantas que durante el día mantienen los estomas abiertos, y por la noche permanecen cerrados; así como el CO₂ es incorporado primero al carbono 3 para iniciar su proceso. Entre otra de sus características de importancia se sabe que los compuestos orgánicos exudados por dicha planta tienen la capacidad de ser recolectados hasta en un 70% de ellos para su análisis, ya sea cuantitativo o cualitativo, mientras que las C4 solo se puede obtener un 10% para dicho estudio. Sin embargo, la recolección de los exudados radiculares presentan diversas ventajas y desventajas dependiendo de su uso, lo importante es imitar las condiciones de la rizósfera para inducir su biosíntesis y poder obtener buenos resultados (Vranova *et al.*, 2013). Por tal motivo, el cultivar Micro-Tom ha sido buen modelo de estudio en la interacción planta-insecto y planta-patógeno, ya que cuenta con mutantes y transgénicas afectadas en diferentes rutas de señalización, además, por su tamaño pequeño representa una ventaja en trabajos con sistemas *in vitro*.

III.1.4. Principales factores relacionados a la planta.

III.1.4.1. Respuestas fisiológicas de la planta.

El desarrollo y crecimiento de las plantas puede describirse como una estrecha y coordinada organización en la división, expansión y diferenciación celular (Jha y Saraf, 2012); las plantas con el paso del tiempo, y al estar en continuas modificaciones relacionadas a su crecimiento y desarrollo, han enfocado sus actividades en generar mecanismos sofisticados de respuesta, que les permite controlar y vigilar la presencia y/o daños que se pueden desencadenar al estar en contacto con microorganismos (Zgad Zaj *et al.*, 2015). Estas modificaciones han resultado costosas para la plantas, por lo tanto, han cambiado su mecanismo de asignación de recursos a la defensa y al crecimiento, ya que estudios sobre este tema, han determinado que las poblaciones de microorganismos presentes en la rizósfera están ampliamente relacionados en este proceso (Carvalhais *et al.*, 2013).

III.1.4.2. Rizósfera.

El ambiente que se tiene en los suelos, es un ambiente complejo y altamente heterogéneo referente a sus características químicas, físicas y biológicas, las cuales son variantes debido a su ubicación y tiempo (Jha y Saraf, 2012).

La raíz es un órgano primordial para la vida de la planta, a medida que la raíz comienza su desarrollo en los suelos, se forma la rizósfera, debido a que ésta altera la estructura del suelo proporcionándole aireación (Micallef *et al.*, 2009); dicho tejido está encargado principalmente de las funciones de absorción de nutrientes y agua mediante acceso subterráneo, rendimiento, capacidad competitiva e interacción planta-planta, al igual que brinda anclaje al suelo (Mommer *et al.*, 2016).

El término de rizósfera fue utilizado y publicado por Hiltner en el año de 1904 donde definía: “la rizósfera incluye las raíces de las plantas y el suelo circundante, donde se producen interacciones importantes e intensas entre la planta, el suelo y la microfauna (Gaiero *et al.*, 2013; Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011).

La rizósfera juega un papel importante en el desarrollo y crecimiento de la planta, el microbioma en la raíz y el entorno abiótico del suelo conforman un complejo multifacético

de compuestos que intervienen en dichos procesos (Shilev *et al.*, 2012; Bais *et al.*, 2004). Esta zona puede contener hasta 10^{11} células microbianas presentes en un solo gramo de raíz, es decir, más de 30,000 especies presentes (De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014).

La rizósfera está conformada por tres distintos compuestos (Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011):

1. La rizósfera *per se* (suelo): la cual es identificada como la “zona de impacto del suelo por sustratos que afectan la actividad microbiana”.
2. El rizoplano: esta es la “superficie de la raíz incluidas las partículas de la raíz fuertemente adheridas”.
3. La raíz misma: “es parte del sistema, en el cual microorganismos endófitos son capaces de colonizar los tejidos de la raíz interna”.

La población que se presenta en esta zona, depende de la especie de planta, tipo de suelo, diferencias entre las etapas de desarrollo de la planta y compuestos exudados de la raíz, es decir, moléculas excretadas por la misma, los cuales comparados con la materia orgánica, juegan un papel importante, ya que son nutrientes fácilmente degradables por los microorganismos; la deposición de estos compuestos por las raíces es denominado como rizodeposición, en el cual aproximadamente 200 compuestos posibles a producirse contienen carbono (Vranova *et al.*, 2013).

III.1.4.3. Roles de la interacción planta–rizósfera.

Existen microorganismos que tienen la capacidad de colonizar tejidos de la planta debido a la atracción de compuestos fabricados por la misma a partir del follaje y raíz. En el caso de la zona radicular, las plantas liberan una gran gama de compuestos de los cuales dependiendo de la cantidad y composición influyen en la comunidad de microorganismos presentes, ya que son un objetivo de ataque que genera una microflora, la cual les permite colonizar, propagarse, sobrevivir y dispersarse (Piccoli, 2013; Carvalhais *et al.*, 2013). Esta colonización puede consistir en dos tipos, ya sea para beneficio del microorganismo ocasionando daño a la planta hospedadora, funcionando como patógeno

o como benéfico para ambos, generando simbiosis en este proceso (Venturi y Keel, 2016; Biedrzycki y Bais, 2013; Brencic y Winans, 2005). Esta actividad se ve relacionada principalmente con las diferencias fisiológicas que presentan los microorganismos, así como por su capacidad de poder establecer relaciones microorganismo-rizósfera-planta (Zgadzaj *et al.*, 2015; Carvalhais *et al.*, 2013) a partir de moléculas responsables en dicha comunicación (De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014).

III.1.4.4. Exudados radiculares.

Los exudados funcionan como compuestos quimiotácticos o quimioatrayentes para los microorganismos debido a su densidad, composición y diversidad, dependiendo del tipo de exudado generado por la raíz, se tiene un factor para la activación y presencia del microbioma en dicha zona (Figura 1) (Maheshwari *et al.*, 2012; Fan, 2011); de igual forma dichos microorganismos también son capaces de producir metabolitos que pueden beneficiar o afectar el proceso, desencadenando la función o daño de la interacción raíz-suelo (Mommer *et al.*, 2016; Badri *et al.*, 2009). Tales interacciones o interferencias en la rizósfera de los microorganismos es esencial para la salud, función, estabilidad y sostenibilidad de este ecosistema, incluyendo su propio entorno (De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014).

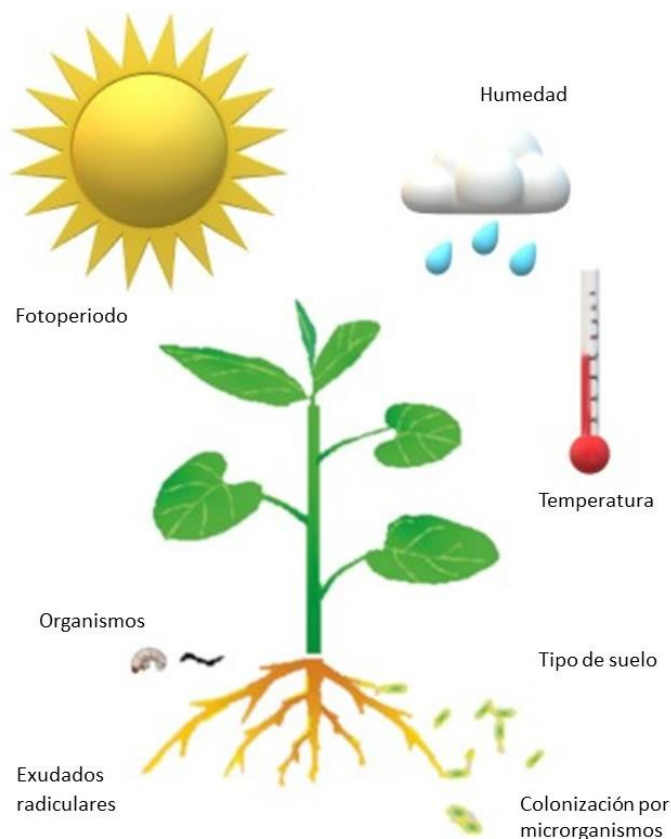


Figura 1. Factores que influyen en el proceso de producción de exudados radiculares y su colonización por PGPR (adaptado de Nihorimbere-Venat *et al.*, 2011).

III.1.4.4.1. Patrones de colonización a partir de exudados radiculares.

La cantidad y la composición de los exudados radiculares, como ya se mencionó con anterioridad, influyen en la colonización de determinados microorganismos, el estudio de estos patrones espaciales de colonización, están enfocados en conocer diversos procesos que se encuentran involucrados en los comportamientos o estímulos que presentan determinadas bacterias hacia cultivos en específico (Carvalhais *et al.*, 2013).

Para el estudio de estos, se aplican técnicas de biología molecular, las cuales implican modificaciones en los organismos de interés; en algunos casos se aplican procesos frecuentes como es la transformación, la cual, busca incorporar al genoma bacteriano genes que emitan fluorescencia y con esto producir bacterias capaces de replicarse bajo

esta variación en su material genético, dentro de los genes más utilizados en estos métodos se tiene GFP, YFP, DsRed, por mencionar algunos (Allard-Massicotte *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2018; Zgadza *et al.*, 2015); También se utilizan sondas de hibridación *in situ* fluorescente FISH y CARD-FISH, las cuales permiten detectar cambios cromosómicos mediante fluorescencia aun cuando los rangos de señal son muy bajos para su detección, sin embargo, estas técnicas también implican tratamientos complicados para la visualización de los patrones en las raíces (Gamez *et al.*, 2019; Posada *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2013).

Mediante la aplicación de estas técnicas, se busca conocer los patrones de colonización y los procesos involucrados, debido a que este fenómeno ocurrido en las zonas radiculares está influenciado por factores que involucran comunicación bacteriana, atracción hacia la raíz, así como el establecimiento y colonización de la bacteria para la utilización de los derivados de la planta con la finalidad de ocasionar cambios en el entorno, buscando una relación de sinergismo para el caso de las PGPR (Posada *et al.*, 2018).

III.1.4.5. Interacción de microorganismos en la rizósfera.

La rizósfera es una zona rica en nutrientes, en esta región cercana a la raíz se encuentran presentes entre 12 y 40% de los fotosintatos que produce y pierde la planta (Shilev *et al.*, 2012; Nihorombere-Venant *et al.*, 2011). Debido a la alta demanda de colonización de esta zona por microorganismos, su señalización se encuentra clasificada de 4 formas: entre plantas, entre microorganismos, de planta a microorganismo y de microorganismo a planta.

De las 4 categorías presentes en la señalización de la rizósfera una de las más estudiadas es aquella dada entre microorganismos, principalmente en las rizobacterias debido a que interfieren en la modulación de metabolitos primarios y secundarios de las plantas (Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011). Los exudados son mezclas complejas de moléculas orgánicas e inorgánicas, los cuales son dependientes de la especie de la planta (Bais *et al.*, 2006), se clasifican de la siguiente forma: compuestos de bajo peso

molecular tales como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos fenólicos o terpenoides, vitaminas y hormonas, los cuales están parcialmente regulados por la permeabilidad de la membrana plasmática, así como por los compuestos de alto peso molecular, en los que se encuentran proteínas y mucilago (Soares *et al.*, 2018; Van Dam y Bouwmeester, 2016; Vranova *et al.*, 2013; Fan, 2011; Woo *et al.*, 1999).

III.1.4.5.1. Comunicación bacteriana.

Uno de los principales mecanismos que utilizan las bacterias para su comunicación de manera interespecie e intraespecie es el quórum, mediante el cual a partir de una amplia gama de moléculas señal ocurre el proceso (Rudrappa *et al.*, 2008). El *quorum sensing* (detección de quórum) se encuentra involucrado en la regulación de diversos procesos bacterianos como es el caso de formación de biopelículas, producción de compuestos antimicrobianos con la función de biocontrol y virulencia en bacterias patógenas, debido a la comunicación química mediante señales ya sea por difusión o por un transporte activo (Mommer *et al.*, 2016, Jha y Saraf, 2012).

La comunicación entre las comunidades bacterianas no se encuentra distribuida de una manera uniforme, estas se encuentran presentes principalmente en las zonas radiculares como las raíces emergentes, puntas radiculares, raíces alargadas, sitios de aparición de raíces laterales y en las raíces más antiguas, pero conforme pasa el tiempo al agotarse los nutrientes y con la muerte celular de algunas, ocurre un movimiento en los pelos radiculares más jóvenes (Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011).

III.1.4.6. Respuesta defensiva de la planta.

Una de las principales amenazas que se presentan en los cultivos son estrés abiótico y biótico, el estrés abiótico se ve influenciado por factores como la escasez de recurso hídrico, salinidad y alcalinidad en suelos y aguas, así como temperaturas extremas, entre otros (Ramírez-Puebla *et al.*, 2013), mientras que el estrés biótico se ve influenciado por la presencia de microorganismos patógenos, parásitos, plagas e insectos (véase en la

Figura 2), los cuales afectan el rendimiento de los cultivos agrícolas a nivel mundial (Carvalhais *et al.*, 2013, Vrchotová *et al.*, 2013; Jha y Saraf, 2012, Andrés *et al.*, 2012). Para contrarrestar estos daños presentes en los cultivos, se han estudiado y utilizado microorganismos del género bacteriano denominados PGPR (Angulo *et al.*, 2014; Maheshwari *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2012). Estos microorganismos asociados a la rizósfera son conocidos como microorganismos benéficos no infectivos, entre los más destacados y estudiados se encuentran numerosos géneros bacterianos, los cuales mediante diversos estudios moleculares se han identificado y demostrado que una de las principales funciones que ejercen es promover el crecimiento en las plantas (Liu *et al.*, 2014, Prashar *et al.*, 2014, Bowen y Rovira, 1999).

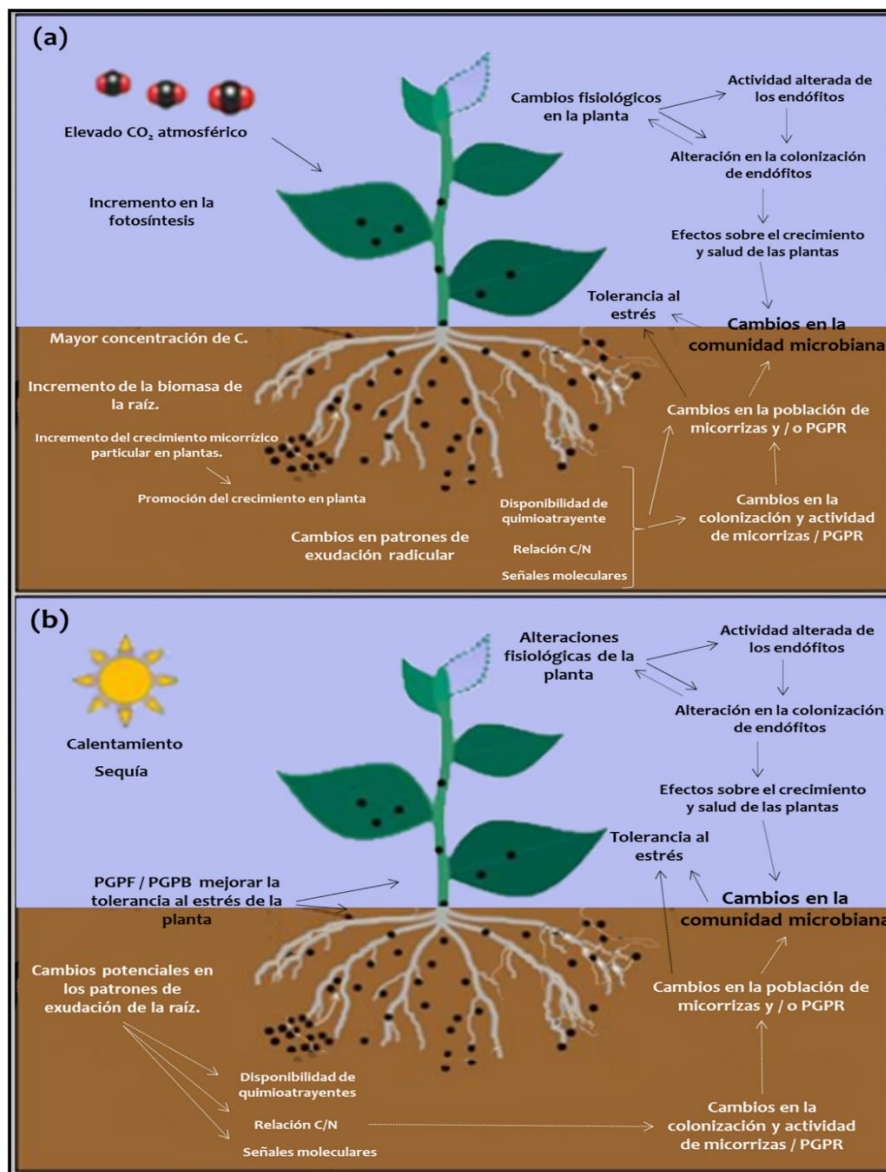


Figura 2. Efecto del estrés biótico y abiótico favorecido en la simbiosis o acumulación de microorganismos benéficos para la planta, PGPF: hongos promotores de crecimiento, PGPB: bacterias promotoras de crecimiento (adaptado de Compant *et al.*, 2010).

III.1.4.6.1. Respuesta defensiva de la planta ante patógenos.

Las plantas se encuentran protegidas ante patógenos mediante barreras conformadas por proteínas, carbohidratos, entre otros compuestos, así como por la producción de

metabolitos que le brindan la capacidad de responder a ataques; las respuestas activadas se clasifican en líneas de defensa, la cuales se presentan a continuación (Figura 3) (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012):

Defensa constitutiva (primera línea de defensa): Esta se encuentra asociada a la presencia de compuestos como la lignina y callosa que son polímeros resistentes que refuerzan las paredes celulares impidiendo la entrada de microorganismos presentes en el ambiente como MAMP (Patrones Moleculares Asociados a Microbios), PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) y DAMP (Patrones Moleculares Asociados a Daño).

Segunda línea de defensa: Está conformada por proteínas hidrolíticas o inhibitorias que se encuentran en las células o en espacios intracelulares, donde dichas proteínas tienen la capacidad de inducir la biosíntesis de otras proteínas capaces de activar la defensa, así como fitoalexinas y otros metabolitos de protección. Una vez ocurridas activan rutas de señalización de defensa específicas al daño ocasionado por el patógeno (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012).

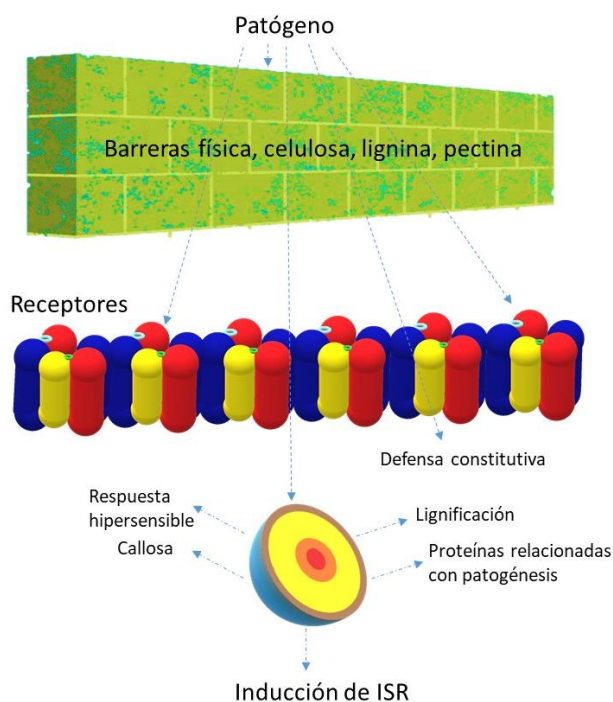


Figura 3. Primera y segunda línea de defensa de la planta ante el ataque de patógenos.

III.1.4.6.2. Respuesta defensiva de la planta ante patógenos y PGPR.

III.1.4.6.2.1. Resistencia inducida.

La resistencia inducida ha sido definida como “estado de capacidad defensiva mejorada” debido a que es una resistencia provocada a partir de estímulos específicos, lo que genera que la defensa innata sea potencializada contra el estrés biótico futuro, esta respuesta se encuentra dividida en dos formas, las cuales se diferencian en función de la naturaleza que la activa (Figura 4) (Jha y Saraf, 2012).

III.1.4.6.2.2. Resistencia sistémica inducida (ISR).

La ISR es activada en la planta mediante la inoculación previa de cepas PGPR que no presentan patogenicidad, la mayor parte de esta respuesta es mediada por el ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), generados posterior a la agresión de patógenos e insectos. La ISR es eficaz y de amplio espectro contra patógenos (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012, Jha y Saraf, 2012), se ve potenciada durante las etapas vegetativas en donde activan un mecanismo defensivo conocido como “priming”, que corresponde a un estado fisiológico de defensa promovido por PGPR (Krzyzanowska *et al.*, 2012; Compant *et al.*, 2005).

III.1.4.6.2.3. Resistencia sistémica adquirida (SAR).

La SAR es activada siempre y cuando ocurra primeramente una infección por un patógeno avirulento, esta ruta involucrada en defensa, es dependiente del ácido salicílico generado a partir de la agresión del patógeno (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012, Jha y Saraf, 2012). La proliferación del patógeno se limita por la activación de la respuesta hipersensible, la cual involucra la acumulación de especies reactivas de oxígeno, muerte celular, entre otros, ya que el AS se acumula de manera inmediata en el sitio de infección durante el daño; es la respuesta hipersensible y está directamente relacionada a la SAR (Zhao *et al.*, 2005).

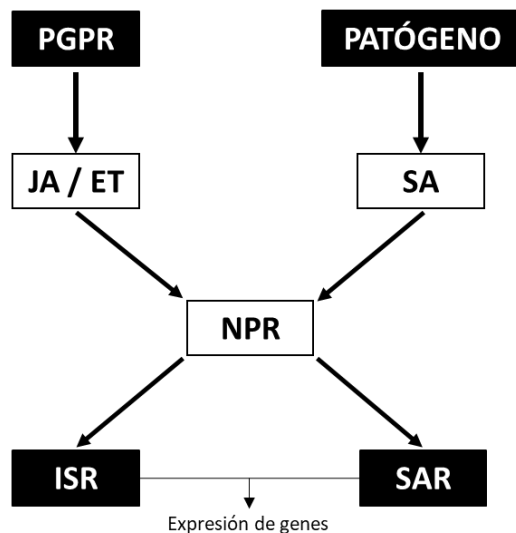


Figura 4. Vías de transducción de señales para ISR y SAR, donde SA, JA y ET son las moléculas señales para la activación de genes de defensa (adaptado de Jha y Saraf, 2012; Schultz *et al.*, 2013).

III.1.4.6.2.4. Tolerancia sistémica inducida.

Por otro lado, diversas investigaciones han propuesto el término de “tolerancia sistémica inducida (ITS)” a plantas, debido a los diversos cambios físicos y químicos que han presentado ante la interacción con PGPR, ya que se ha producido una mayor y mejor tolerancia ante el estrés abiótico (Jha y Saraf, 2012).

III.1.4.7. Vías de señalización producidas para la promoción de crecimiento en plantas por PGPR.

III.1.4.7.1. Hormonas

III.1.4.7.1.1. Ácido abscísico (ABA).

El ABA es una fitohormona similar al etileno, es una hormona vegetal que desencadena la senescencia, desempeña funciones como la respuesta hipersensible de la planta, afecta la germinación de las semillas, el crecimiento de la planta de manera específica al

encontrarse bajo algún estrés como híper o hipo-osmótico, sal, frío y/o sequía. El ABA actúa como un regulador de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005).

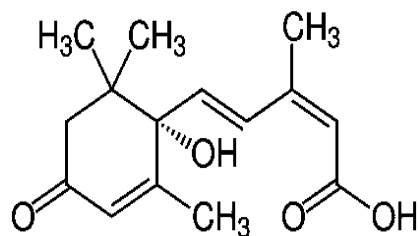


Figura 5. Estructura química de la molécula ácido abscísico (ABA), fitohormona involucrada en procesos de desarrollo y crecimiento en plantas y semillas.

ABA es producido al estar sometidas las raíces a un estrés hídrico, su producción sirve como aviso en la zona foliar sobre dicha situación ya que se mueve a través del xilema, con lo cual surge una modificación para generar un cierre estomático previniendo a la planta de una pérdida de agua y preparándola para afrontar cualquier otra situación (Jha y Saraf, 2012); de igual forma, bajas concentraciones de esta hormona en las células guarda y apoplasto están involucradas en la apertura de estomas por las mañanas, lo que favorece la fotosíntesis de la planta (Nováková *et al.*, 2005).

La producción de ABA no solo está relacionada a estos procesos, ya que su producción es un mecanismo para el cuidado de la planta; está presente en la producción de polifenoles que tienen la capacidad de filtrar la luz UV-B, la cual es dañina para la epidermis de la planta desencadenando modificaciones que permiten aclimatación y tolerancia a condiciones similares (Piccoli, 2013).

III.1.4.7.1.2. Giberelinas (GA).

Las GA son hormonas encargadas de regular funciones en la planta, en las cuales se encuentran más de 100 moléculas diferentes con distintos grados de actividad biológica, la estructura de estos compuestos va de 19 a 20 átomos de carbono (Jha y Saraf, 2012).

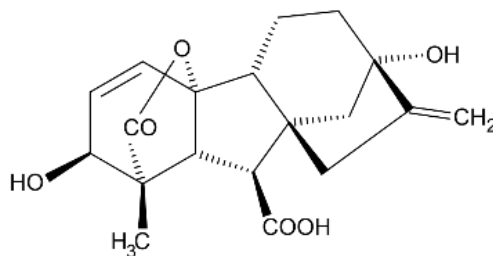


Figura 6. Estructura química de la molécula de ácido giberélico, hormona involucrada en la regulación de funciones en la planta.

La producción de estas hormonas a partir de microorganismos no es un tema muy común, debido a que en PGPR solo se han identificado dos bacterias capaces de producir altas concentraciones de estas hormonas, tal es el caso de *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Jha y Saraf, 2012).

III.1.4.7.1.3. Auxinas.

La producción de auxinas a partir del metabolismo de diversas bacterias incluyendo el ácido-3-acético (IAA) en un rango de 17 a 719 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014), el ácido indol-3-butírico (IBA) y algunos de sus precursores son compuestos conocidos y estudiados debido a que han evidenciado que son reguladores positivos en el crecimiento de las plantas interviniendo en los procesos fisiológicos de elongación y división celular al igual que la diferenciación tisular, dichos procesos han sido probados mediante mutantes, de igual, forma son responsables en la estimulación del enraizamiento (Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011). Estas hormonas producidas por la planta o los microorganismos solo difieren en ruta de síntesis ya que se obtienen a partir del triptófano como se observa en la Figura 7 (Jha y Saraf, 2012, Egamberdieva, 2012).

El 80% de las bacterias que se encuentran presentes en el suelo son capaces de sintetizar dichos compuestos. En el caso de las auxinas liberadas por las PGPR tienen la función de aumentar el crecimiento, densidad y peso radicular, el número de ramificaciones generando mayor área de contacto para la absorción de nutrientes, así

como la producción de raíces adventicias ocasionando que ciertas zonas establecidas como tallo se re-diferencien como tejido de raíz (Jha y Saraf, 2012; Shilev *et al.*, 2012).

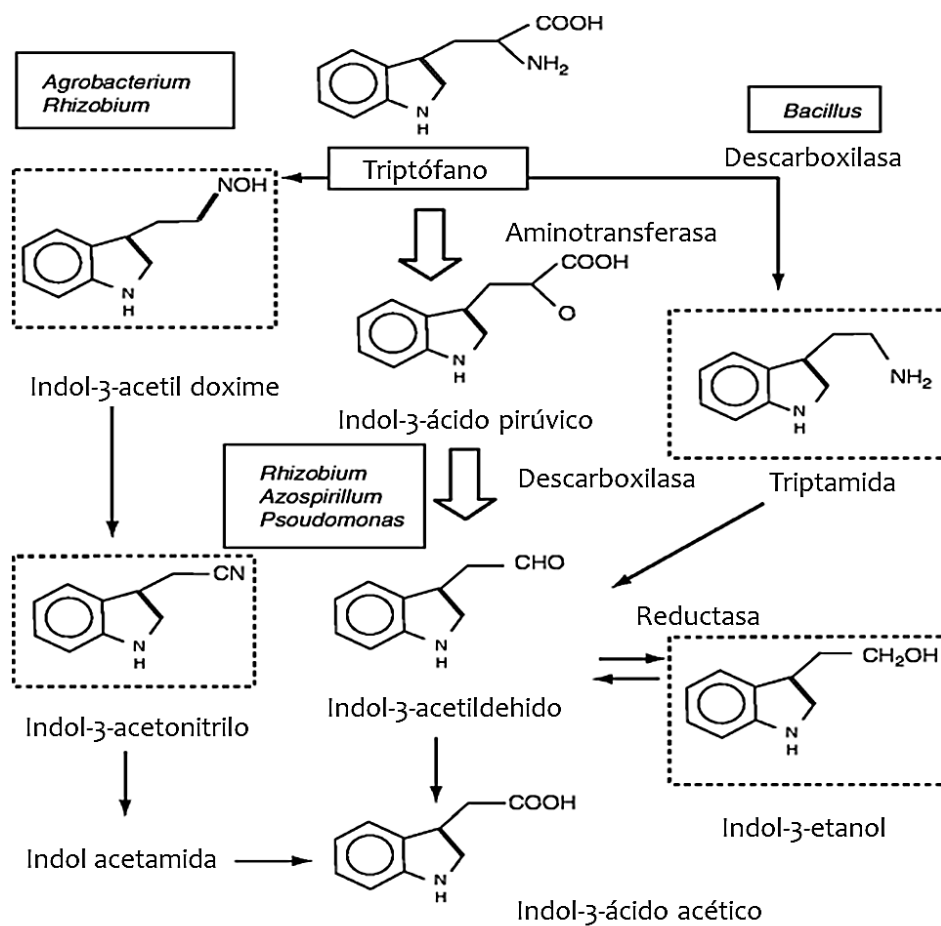


Figura 7. Biosíntesis de hormona auxina a partir de triptófano en plantas y microorganismos asociados a la rizósfera (adaptado de Jha y Saraf, 2012).

III.1.4.7.1.4. Citoquininas.

Las citoquininas son hormonas esenciales en el desarrollo y crecimiento de la planta, son derivados de purina, las cuales están encargadas de promover y mantener la división y diferenciación celular de los tejidos, de igual forma intervienen en el crecimiento de raíces primarias, formación de brotes, yemas, callos y cloroplastos, así como en la expansión de hojas y promoción en la germinación de semillas; estas hormonas

intervienen particularmente en el dominio apical (Jha y Saraf, 2012; Santa *et al.*, 1998).

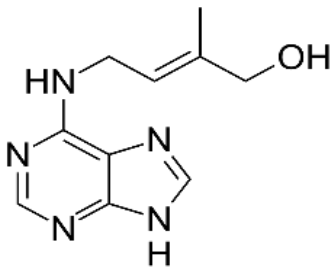


Figura 8. Estructura química de la molécula de citoquinina, hormonas esenciales en el desarrollo y crecimiento de plantas.

La citoquininas son hormonas que se encuentran involucradas con algunos géneros y especies de PGPR mediante la promoción directa de crecimiento en la planta, ya que al estar presentes se altera la producción de los niveles de dicha hormona por la planta ocasionando respuestas específicas en el crecimiento (Glick, 2014).

III.1.4.7.1.5. Etileno.

El ET es una hormona encargada de distintos procesos fisiológicos en la planta como la germinación de las semillas, senescencia, alargamiento de raíz y la maduración de la fruta; diversos estudios han determinado que el exceso de éste tiene efectos drásticos en la planta involucrados en el desequilibrio nutricional y hormonal, así como la reducción en el crecimiento y desarrollo, debido a que la biosíntesis de este compuesto es obtenida a partir de tensiones ambientales presenciadas por las plantas (Sarma *et al.*, 2012).

La interacción entre la vía de señalización del JA y ET están en algunos casos relacionados con la producción de metabolitos secundarios, los cuales influyen en aspectos de desarrollo en la planta, donde intervienen interacciones de planta-microorganismo benéfico (PGPR), planta-insecto o planta-patógeno (Zhao *et al.*, 2005).

III.1.4.7.1.5.1. Inhibición de biosíntesis de etileno por la producción de ACC desaminasa.

La planta al estar en contacto con una PGPR produce la inhibición de la biosíntesis del ET mediante la acción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC), la cual es responsable de producirlo en α -cetobutirato y amoníaco; al disminuir estos niveles de ACC en las plantas. Los organismos que están encargados de producir la ACC desaminasa generan la disminución de los niveles de etileno de las plantas, en la Figura 9 se aprecia dicho proceso esquematizado con la finalidad de poder visualizar el método que utilizan las PGPR para la promoción de crecimiento (Glick, 2014).

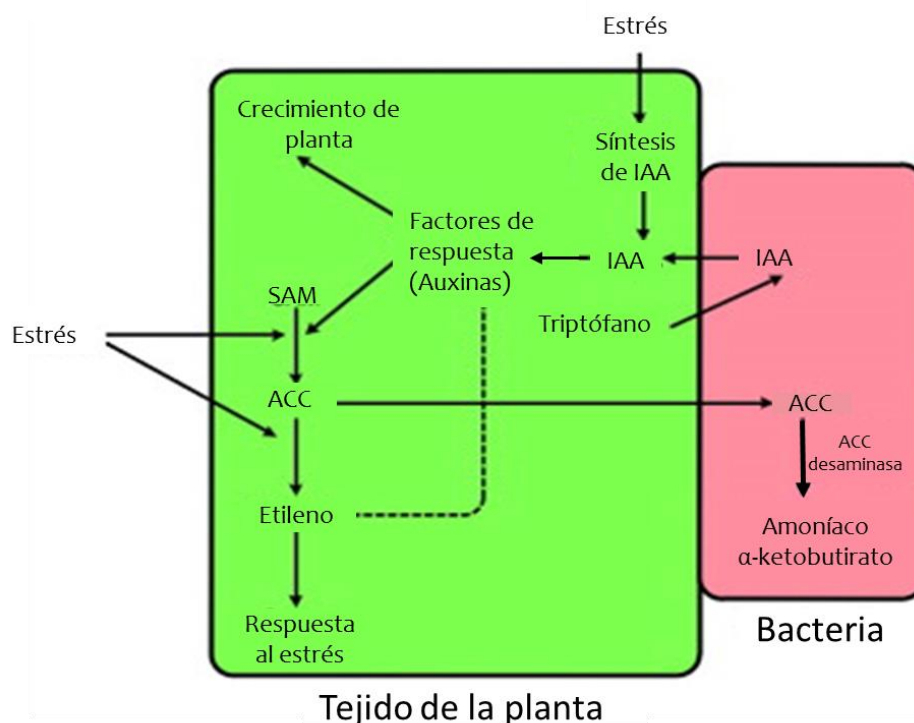


Figura 9. Modelo esquemático de como las PGPR realizan la función de promover el crecimiento en plantas a partir de la producción de ACC desaminasa y la síntesis de IAA. Proceso en el cual interviene la S-adenosil metionina (SAM) convirtiéndose en ACC por la enzima ACC sintasa, dicho ACC se convierte en etileno por la acción de la ACC oxidasa en la planta, mientras que en la bacteria pasa a α -cetobutirato y amoníaco por acción de la ACC desamina (adaptado de Glick, 2014).

Existen reportes donde se hace mención que las bacterias contienen en su genoma un gen (AcdS) que codifica para una desaminasa ACC, así el ACC producido por las plantas mediante exudados presenta interacción con la bacteria generando la disminución de ACC en la raíz, conllevando a disminuir la biosíntesis de etileno y teniendo como consecuencia, la limitación del crecimiento de la raíz principal debido a las altas concentraciones, generando con esto el desarrollo de raíces secundarias que permiten una mayor área de contacto con los nutrientes presentes en la rizósfera (Jha y Saraf, 2012, Egamberdieva, 2012). Las bacterias que son capaces de expresar ACC desaminasa tienen la capacidad de reducir el impacto de estrés abiótico y biótico, generando a la planta una mayor tolerancia a éstos como se muestra en la Figura 10.

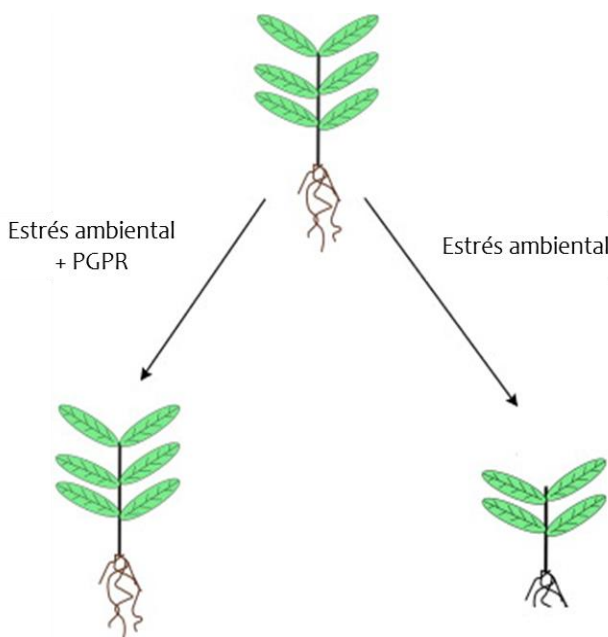


Figura 10. Modelo esquemático referente a crecimiento en planta sometida a estrés, mostrando la capacidad de PGPR productora de ACC desaminasa que disminuye niveles de etileno por estrés evitando la inhibición de crecimiento en la planta (adaptado de Glick, 2014).

III.1.5. PGPR en la agricultura.

Numerosas investigaciones han reportado y determinado que las PGPR se refieren a un

conjunto de bacterias de vida libre presentes en la rizósfera que generan efectos positivos en el desarrollo y crecimiento de las plantas; al estar presentes se pueden asociar a los cambios químicos que puedan presentarse en el suelo, así como a la producción de exudados cuya liberación está regulada genéticamente por la planta (Jha y Saraf, 2012; Sarma *et al.*, 2012; Biedrzycki y Bais, 2013).

Entre los efectos positivos que se han reportado debido a la aplicación de éstas, se tiene que son capaces de producir e inhibir ciertas fitohormonas generando efectos en la fisiología de la planta, al igual que disminuye la susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos patógenos, otro dato reportado, es el aumento en la absorción y/o solubilización de nutrientes reduciendo el aporte excesivo de éstos, debido a que se ve estimulada la captación de iones minerales, incluyendo N, P, K y otros microelementos (Figura 11) (Egamberdieva, 2012).

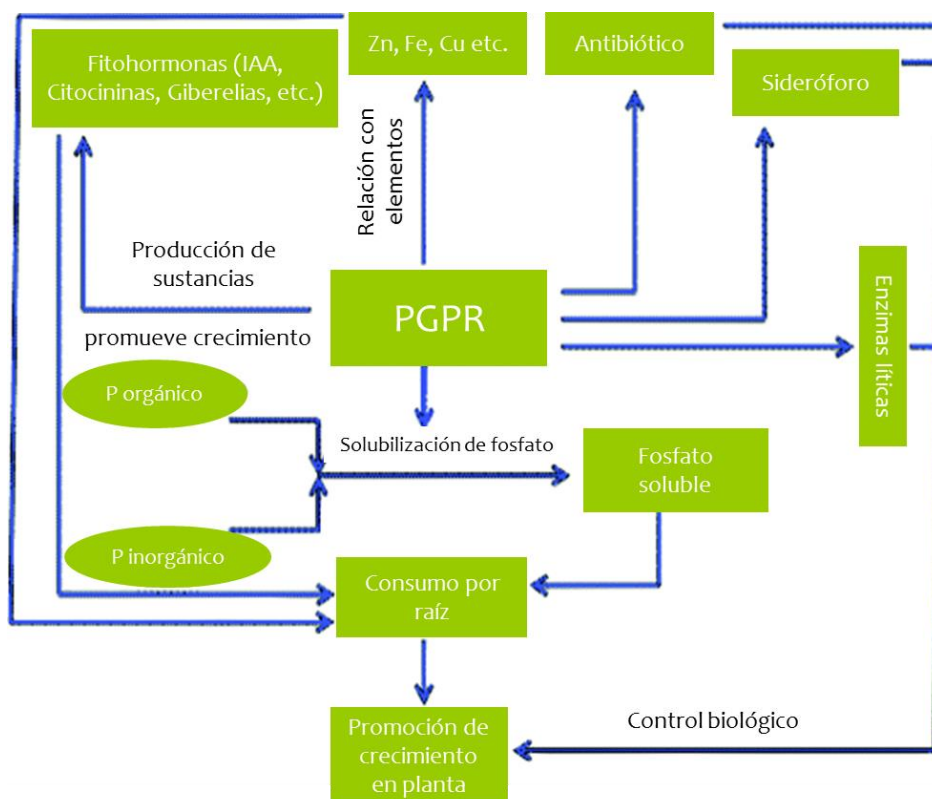


Figura 11. Efectos positivos reportados para las PGPR involucrados con la promoción de crecimiento en plantas (adaptado de Maheshwari *et al.*, 2012).

La forma en la que interactúan las PGPR es generando la promoción de crecimiento en los cultivos mediante dos métodos de promoción: i) la promoción indirecta se presenta cuando la bacteria logra controlar, disminuir y/o prevenir los daños ocasionados por un patógeno en la rizósfera, ii) mientras que en la promoción directa implica aportar a la planta compuestos que la bacteria es capaz de sintetizar o metabolizar para su fácil absorción como son algunos nutrientes y/o fitohormonas (Saravanakumar, 2012; Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011).

Los microorganismos benéficos en general para las plantas comenzaron a utilizarse desde hace aproximadamente 60 años (Egamberdieva, 2012), mientras que las PGPR se han utilizado en la agricultura desde hace 35 años generando con su aporte una elevación en los rendimientos de la producción agrícola mediante la inoculación y colonización de éstas en la zona de la rizósfera y la filósfera (Piccoli, 2013; Turan *et al.*, 2012). Esta utilización de PGPR se ha explotado en su mayoría en bacterias de género Gram-negativo, pero actualmente se busca estudiar mayormente el género de Gram-positivo debido a obvias ventajas como la capacidad de producir endosporas resistentes a desecación y calor (Fan *et al.*, 2011); tales características le permiten permanecer en el ambiente.

III.1.5.1. Clasificación de las PGPR.

Las PGPR se han utilizado en la agricultura como inoculantes para la biofertilización, fitoestimulación y el control biológico, colonizan la raíz debido a la capacidad que tienen de reconocer ácidos orgánicos, los cuales, sirven como moléculas de señales quimioatrayentes (Dayakar *et al.*, 2013; Jha y Saraf, 2012). En varios trabajos se ha demostrado que la presencia de aminoácidos y ácidos orgánicos en la rizósfera altera los fenotipos clave relacionados con el crecimiento de la raíz y su colonización microbiana al igual que la interacción simbiótica y la patogénesis (Moe, 2013). Actualmente las PGPR se han clasificado de 4 formas debido a sus efectos beneficiosos (Maheshwari *et al.*, 2012):

1. Biofertilizantes: Los cuales tienen la capacidad de fijar el N principalmente para

después ser utilizado por la planta, brindándole una mejora en el desarrollo y crecimiento.

2. Fitoestimuladores: En este caso tienen la capacidad de promover directamente el crecimiento vegetal, debido a la producción de fitohormonas.
3. Cicladore de nutrientes: Aquí ocurre la solubilización y movilización de nutrientes debido a la falta de movilidad o la presencia de compuestos insolubles encontrados en los suelos para la planta como es el caso de P, Zn, S, etc.
4. Biocontroladores: Funcionando en la protección de la planta ante infecciones por patógenos o plagas perjudiciales, tanto en la rizósfera como en la filósfera.

Existen reportes donde mencionan que al inocular plantas con PGPR y PGPF (hongos promotores de crecimiento) tienen un efecto en reducir y prevenir enfermedades, debido a que activa el sistema inmune innato (SII) y posteriormente potencian la respuesta de JA-ISR, esto se ha probado con diversos estudios, donde la aplicación realizada en la raíz o la zona foliar, o en ambos se presenta una respuesta defensiva (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012).

La comunicación que se presenta entre planta y microorganismos tiene involucrado en su proceso una amplia gama de moléculas de señalización que son producidas por el microorganismo en simbiosis, las cuales implican la quimiotaxis de bacterias hacia raíces, (Mommer *et al.*, 2016; Andrés *et al.*, 2012). Entre los compuestos identificados para la comunicación de planta-bacteria PGPR, así como activadores de la promoción de crecimiento se han encontrado la acetoina y el 2,3-butanodiol, dos volátiles bacterianos (Jha y Saraf, 2012).

III.1.5.2. Géneros bacterianos clasificados como PGPR.

En los géneros encontrados e identificados como PGPR, se presentan: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Herbaspirillum*, *Thiobacillus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Paunibacillus*, *Rizobium*, *Gluconacetobacter*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Klebsiella* (De-la-Pena y Loyola-Vargas, 2014; Sarma *et al.*, 2012; Shilev *et al.*, 2012; Arora *et al.*, 2012), es importante

mentar que no todas las cepas bacterianas pertenecientes a un mismo género y especie tienen las mismas capacidades metabólicas y de interacciones con las plantas (Saravanakumar, 2012).

Dentro de las fitohormonas que se reportan en estudios, se ha identificado que los géneros mencionados con anterioridad tienen la capacidad de producir principalmente la auxina IAA, GA y citoquininas, debido a la producción y/o el aumento de éstas se les ha atribuido el papel de promotoras de crecimiento. Estas hormonas, al igual que la producción de hormonas relacionadas con el estrés como ABA, SA y JA también han indicado que juegan un papel importante para atribuirles el nombre, debido a que existen múltiples interacciones entre las diferentes vías de señalización de la hormona en la planta, ocasionando diversas modificaciones morfológicas. Las bacterias al no generar solo un cambio en las vías hormonales, sino varios, podrían explicar el cambio morfológico que se presenta, como la elongación de raíces laterales y la producción de pelos radiculares (Piccoli, 2013).

III.1.6. *Bacillus subtilis* como PGPR.

Bacillus subtilis es un microorganismo muy estudiado, las bacterias que conforman el género de *Bacillus* sp. son clasificadas como bacterias Gram-positivas debido a su conformación en la pared celular, formadoras de endosporas altamente resistentes con la capacidad de sobrevivir a la desecación, calor, radiación UV y a disolventes orgánicos (Arrebola *et al.*, 2010), formadoras de biopelículas, su morfología característica estructural se identifica mediante bastones cortos y/o alargados, se encuentran en gran abundancia en diversos tipos de suelo (Overkamp *et al.*, 2013; Sumi *et al.*, 2015).

Existen reportes sobre actividades prometedoras sobre el género *Bacillus* sp. debido a que producen una gran cantidad de compuestos con diferentes estructuras químicas, como son metabolitos secundarios que fungen como compuestos antimicrobianos de amplio espectro, en los cuales se encuentran bacteriocinas, glicopéptidos, lipopéptidos, péptidos cíclicos (Sumi *et al.*, 2015); entre los péptidos encontrados se han identificado compuestos como la surfactina, fengicina, iturina y plipastatina (Chan *et al.*, 2009) (Figura

12); de igual forma se ha identificado el compuesto AiiA que pertenece a una lactona que cumple la función de inactivar moléculas de acil-homoserina-lactona encargada de activar genes de virulencia en algunos patógenos (Beauregard *et al.*, 2013).

<i>Bacillus</i> species	Strain	AMPs	Special features	Source	Reference
<i>B. subtilis</i>	JM4	Subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B	Active against a broad spectrum of bacteria, including <i>Salmonella</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Soil	Wu et al. 2005
	B11	Two AMPs	Effective biocontrol agent against watermelon wilt and rice sheath blight	Rhizosphere of watermelon	Li et al. 2006
		Bacitracin	Neutral, water soluble, and nontoxic antibiotic that is active against Gram-positive bacteria	Soil	Awais et al. 2007
	fmbj B-916	Surfactin and fengycin	Antagonistic to <i>B. cereus</i>		Huang et al. 2007
		Bacisubin	Antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities		Liu et al. 2007
	B29	Antifungal protein B29I	Inhibitory activity on mycelial growth in <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> and other fungi	Soil	Li et al. 2009
	LFB112	Bacteriocin-like substances	Effective against both Gram-positive and Gram-negative bacteria that are involved in domestic animal diseases	Chinese herbs	Xie et al. 2009
	CMB32	Iturin A, fengycin, and surfactin A	Potential to control the anthracnose disease caused by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Soil	Kim et al. 2010
	EDR4	Antifungal protein E2	High activity against numerous fungal species	Wheat	Liu et al. 2010
	Subsp. <i>spizizenii</i> DSM 15029 ^T	Entianin	Subtilin-like lantibiotic active against Gram-positive pathogens		Fuchs et al. 2011
<i>B. licheniformis</i>	SCK-2	AMP IC-1	Antagonistic to <i>B. cereus</i>	Kyeopjang	Yeo et al. 2011
	14B	Bac 14B	Useful for seed disinfection	Bitter almond	Hammami et al. 2012
	NT6	AMPNT-6	Active against marine foodborne pathogen <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , which is commonly found in shrimp	Natto	Xu et al. 2013
	H1	Bacteriocin-like substance	Antagonistic activity against various species of Gram-positive but not Gram-negative, bacteria	Cow dung	Abdel-Mohsein et al. 2011
	Kurstaki BUPM4	Bacthuricin F4	Possesses unique N-terminal sequence, DWTXWSXL	Soil	Kamoun et al. 2005
	SM1	Fengycin	Antifungal activity against <i>Candida albicans</i>	Soil	Roy et al. 2013
	Kurstaki Bn-1	Thuricin Bn1	Active against <i>B. cereus</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , and many other <i>B. thuringiensis</i> strains	Pest of hazelnut	Ugras et al. 2013
	LBM 5006	Iturin and fengycin	Antagonistic against pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi, including <i>Aspergillus</i> spp.	Soil	Benitez et al. 2010
	GA1	Amylolysin	Antilisterial activity against <i>L. monocytogenes</i>	Strawberry	Halimi et al. 2010
	FZB42	Plantazolicin	Thiazole/oxazole modified microcin (TOMM)		Scholz et al. 2011
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (formerly <i>B. polymyxa</i>)		Subtilisin	Active against <i>L. monocytogenes</i>		van Kuijk et al. 2011
	VLB16	Antifungal protein	Inhibits the growth of <i>Pyricularia grisea</i> and <i>Rhizoctonia solani</i>	Soil	Kavitha et al. 2005
		Bacitracin	Active against <i>Micrococcus luteus</i> and <i>S. aureus</i>	Soil	Awais et al. 2007
	<i>B. pumilus</i>	Bacillomycin D	Active against phytopathogens	Stems of plant	Zhao et al. 2010
	<i>B. vallismortis</i>	Haloduracin	Broad-spectrum 2-peptide lantibiotic	Soil	Lawton et al. 2007
	<i>B. halodurans</i>	Fengycin, surfactin and pumilacidin	Strong activity against <i>M. luteus</i> and <i>S. aureus</i>	Marine water	Ayed et al. 2014
	<i>B. mojavensis</i>				
	A21				
	MT39	Sonorensin	Antimicrobial activity against <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i>	Marine soil	Chopra et al. 2014
	<i>B. sonorensis</i>				
<i>B. coagulans</i>	ATCC 7050	Lactosporin	Strong activity against <i>M. luteus</i> and <i>L. monocytogenes</i>	Probiotic dietary supplement	Riazi et al. 2009

Figura 12. Péptidos antimicrobianos (AMPs) recientemente identificados producidos por diferentes cepas de especies *Bacillus* (Sumi *et al.*, 2015).

Esta cepa bacteriana esta descrita como PGPR debido a los beneficios que trae consigo al ser aplicada a plantas como fertilizante, entre estos se encuentra la capacidad que tienen de incrementar la producción de fitohormonas encargadas de regular el crecimiento y desarrollo de las plantas (Beauregard *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2011).

Bacillus subtilis frecuentemente está asociada a la zona radicular de las plantas, ya que juega el papel de proteger a la misma mediante la producción de una matriz que le

permite mantener unidas muchas bacterias generando comunidades, conocido como biopelícula. Estas biopelículas o “biofilm” son ensamblajes de conjuntos bacterianos unidos por una matriz constituida por exopolisacaridos (EPS), proteínas, componentes de la pared celular como lipopolisacáridos y en algunos casos ADN, la unión de estas forman estructuras complejas de dicho material permitiendo con esto estrategias adaptativas en las condiciones ambientales para la interacción y colonización (Beauregard *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2011; Bais *et al.*, 2004).

III.1.6.1. Colonización bacteriana de *Bacillus subtilis*.

Para que ocurra una colonización bacteriana se deben cumplir los siguientes parámetros: atracción, reconocimiento, adherencia, colonización y crecimiento (Nihorimbere-Venant *et al.*, 2011). Un compuesto importante en dichos procesos es la producción de surfactina por la misma cepa, este compuesto tiene función antimicrobiana pero a su vez es un componente importante en la colonización de las raíces debido a que se encuentra en el “biofilm” (Beauregard *et al.*, 2013).

La quimiotaxis y la formación de “biofilm” son identificados como parte fundamental para la colonización bacteriana. La quimiotaxis es conocida como el proceso mediante el cual las bacterias dependiendo su entorno y compuestos químicos presentes en este, dirigen su movimiento hacia dicha zona como respuesta para la satisfacción de sus necesidades referentes a crecimiento y colonización (Tan *et al.*, 2013).

La colonización bacteriana para la rizósfera, se ha documentado que no ocurre en sitios específicos de la raíz, ya que existe una variación entre el gradiente de pH, la secreción de compuestos orgánicos y la disponibilidad de los nutrientes ya que no están presentes homogéneamente de la punta de la raíz a las regiones más maduras por lo que la producción del “biofilm” está asociada a estos factores. En la Figura 13 se puede observar un esquema hipotético de la colonización y acumulación de “biofilm” en ciertas zonas de la raíz (Rudrappa *et al.*, 2008).

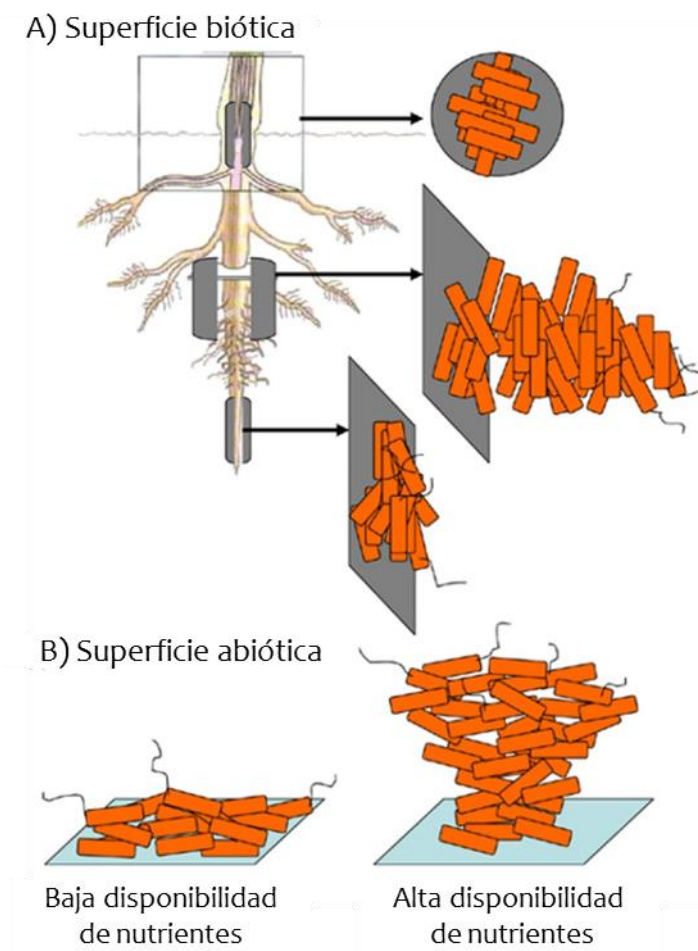


Figura 13. Esquema hipotético de las regiones radicales posibles para la colonización y formación de "biofilm" (adaptado de Rudrappa *et al.*, 2008).

El ácido málico que es secretado por la raíz participa como un reclutador para el género de *Bacillus subtilis*, es decir, es un compuesto fuertemente quimioatrayente (Badri *et al.*, 2013). En el año 2008 reportado por Rudrappa y colaboradores se demostró que el ácido L-málico está completamente involucrado en la atracción de bacterias de este género, en este caso el estudio se desarrolló con la cepa *Bacillus subtilis* FB17 (Fan, 2011).

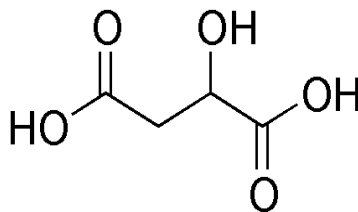


Figura 14. Estructura química de la molécula de ácido málico. Ácido comúnmente reportado como quimiotrayente para bacterias del género *Bacillus*.

III.1.7. *Bacillus subtilis* LPM1.

B. subtilis LPM1 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal previamente aislada de un cultivo de manzano, fue caracterizada e identificada en los Laboratorios de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el Dr. Alberto Flores Olivas (Chávez-Betancourt *et al.*, 2006). La cepa *B. subtilis* LPM1 ha promovido el crecimiento de diferentes plantas cultivables a nivel cámaras de crecimiento, invernadero y a cielo abierto. En este caso, se ha manifestado la promoción de crecimiento significativamente en la biomasa radicular de tomate (*S. lycopersicum* cv. Floradade) (Ibañez, 2019 tesis de licenciatura en proceso), en cultivo de pimiento bajo condiciones de malla sombra se logró incrementar el rendimiento de manera significativa (Ruíz, 2019 tesis MAP en proceso). Además, en diferentes trabajos se ha demostrado que LPM1 le brinda protección contra plagas (Rojas, 2019 tesis de licenciatura en proceso) y enfermedades.

III.1.8. Uso y aplicación de elicitores.

Regularmente las plantas se encuentran en el trascurso de su ciclo de vida expuestas a ataques provenientes de distintas variedades de insectos, herbívoros y patógenos, por consecuencia, han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa para su protección; entre éstos se han implementado la producción de compuestos volátiles y toxinas específicas con la finalidad de defenderse (Paudel *et al.*, 2014).

La ciencia ha desarrollado compuestos químicos obtenidos de manera natural o sintética

que imitan el daño que se presenta en las plantas, existen elicitores que asemejan el estrés abiótico como son iones metálicos y compuestos orgánicos; mientras que para el caso de estrés biótico, se suplen sustancias químicas que son liberadas por hongos, bacterias, virus, herbívoros, patógenos que son reconocidos por sitios específicos de la pared celular de las plantas, buscando observar y estudiar las respuestas que presenta la planta (Zhao *et al.*, 2005).

Estos compuestos han sido estudiados y determinados como compuestos seguros para su aplicación, debido a que no generan daño al medio ambiente, a la humanidad y son compatibles con controles biológicos (Paudel *et al.*, 2014). Estos elicitores representan una herramienta para inducir respuestas en la planta y poder estudiar ciertos eventos biológicos en interacción con otros organismos, ya que es bien sabido que la aplicación de estos elicitores a plantas desencadena reacciones de defensa en la planta (Zhao *et al.*, 2005), algunos de los eventos reportados mediante la investigación de distintos elicitores se pueden observar en la Figura 15.

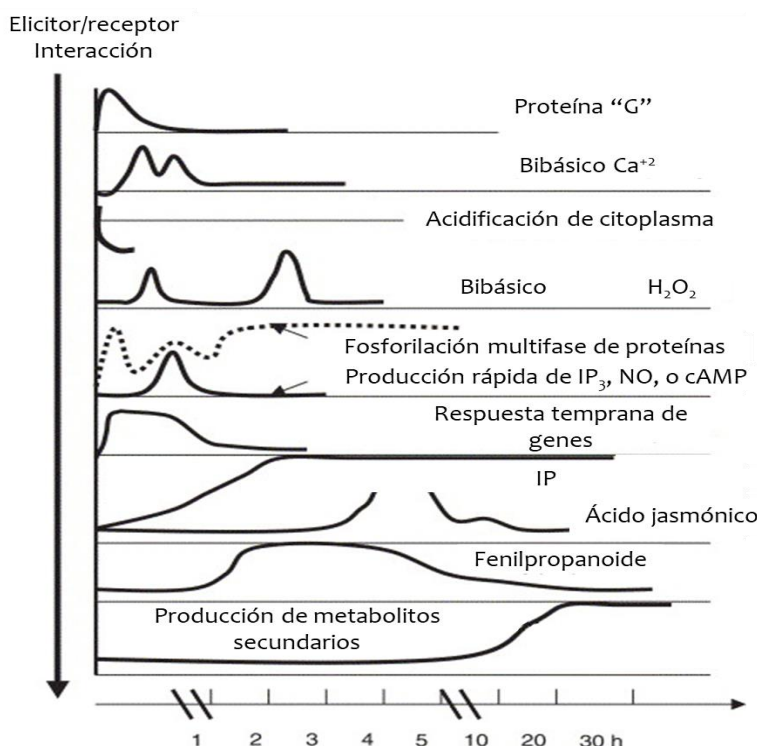


Figura 15. Esquema de posibles reacciones de defensa en plantas inducidas por elicitores de manera secuencial dependientes del tipo y variedad de planta (adaptado de Zhao *et al.*, 2005).

III.1.8.1. Ácido jasmónico (JA).

El JA o metil jasmonato (MeJA), mediante su señalización se involucra en la línea de defensa de la planta contra insectos herbívoros mejor conocidos como artrópodos y patógenos del genero necrotrófico, los cuales se encargan principalmente de afectar la zona radicular y los brotes, de igual forma dicha vía de señalización es activada al ser expuesta a microorganismos benéficos que favorecen la ISR. Para la activación de la vía de señalización de JA es necesario la aplicación de MeJA debido a que tiene la función de alterar los compuestos que se liberan en la raíz, generando con esto un cambio en la comunidad microbiana presente en la rizósfera, el JA es detectado por receptores que a su vez activan una vía de transducción de señal para la expresión de genes sensibles a éste, formando una barrera química y física contra los organismos dañinos (Carvalhais *et al.*, 2013).

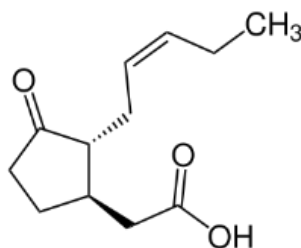


Figura 16. Estructura química de la molécula de ácido jasmónico (JA), utilizado como elicitador en platas.

La vía de señalización de JA son señales que inducen la producción de metabolitos secundarios, la acumulación y producción de éstos no se limita a ciertos tipos de metabolitos, ya que se generan una amplia gama que incluye terpenoides, flavonoides, alcaloides y ácidos orgánicos (Zhao *et al.*, 2005).

La utilización del JA o MeJA en plantas de tomate aplicado de forma exógena genera diferentes compuestos relacionados con la defensa de la planta, ya que esta aplicación, la planta la reconoce como el ataque de insectos como escarabajos, pulgones, orugas y trips por lo que activa compuestos que le favorecen en la resistencia ante éstos (Paudel *et al.*, 2014).

III.1.8.2. Benzotiadiazol (BTH).

El ácido benzo 1, 2, 3 tiadiazol-7-carboxílico (BTH) se encuentra reportado en la literatura, como un inductor de las respuestas mediadas por SA e inductor de SAR, identificado dentro de los elicitores químicos capaces de generar esta respuesta en la planta al ser inducida debido a que es un imitador de SA (Cassells y Rafferty-McArdle, 2012).

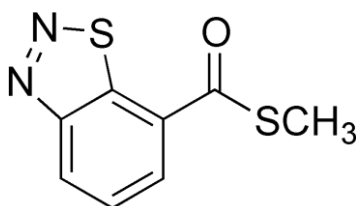


Figura 17. Estructura química de la molécula de ácido benzo 1, 2, 3 tiadiazol-7-carboxílico (BTH).

III.1.9. Materiales orgánicos conjugados, síntesis, propiedades y perspectivas de interacción con materiales en la biología molecular.

En la actualidad, el uso de polímeros conjugados (PC) ha presentado una extensiva investigación, ya que son materiales con una alta fluorescencia y tienen la versatilidad de poderse funcionalizar con biomoléculas para la identificación y cuantificación de células, anabolitos u otras moléculas biológicamente activas (Thomas *et al.*, 2007).

Estos compuestos, regularmente son utilizados en su estado sólido fungiendo como recubrimientos sensoriales en electrodos y en algunos casos como marcadores en soluciones que al estar expuestos a determinados analitos ocasionan cambios en su espectro de absorción y/o emisión (Phillips, 2008), lo que ha generado que sean materiales con alta sensibilidad y selectividad (Tanhuanpää, Virtanen y Somerharju, 2000).

En particular, los derivados del fenileniletileno (PE) son moléculas rígidas estructuralmente caracterizados por la simetría de la unidad de etileno. Los oligómeros y polímeros PE sustituidos con cadenas laterales del tipo alcoxi, han sido ampliamente estudiados debido a su fácil síntesis, alta procesabilidad y estabilidad fotoquímica-térmica

que abrió sus aplicaciones como membranas permeables a los gases (Sakaguchi *et al.*, 2011), materiales ópticos no lineales (Wedert *et al.*, 1996) diodos electroluminiscentes, dispositivos fotovoltaicos orgánicos y sensores químicos (Ayuk *et al.*, 2003), así como biosensores fluorescentes y en bioimagen (Cox, Müller y Swager, 2011) En estas últimas áreas, Disney *et al.* (2004) y Arias *et al.* (2017) reportaron excelentes propiedades de los fenilnetinilenos sustituidos con azúcar como marcadores fluorescentes de bacterias. Recientemente, también se reportó que la funcionalización de un trímero de PE con manosa, permite la detección específica por microscopía confocal de fluorescencia y resonancia de plasmón superficial localizado (RPSL) del patógeno *Escherichia coli*.

A pesar del progreso en la detección de bacterias patógenas humanas a través de la fluorescencia de las moléculas conjugadas con PE, no hay ejemplos en la literatura para el uso de este tipo de pigmentos en la detección o incluso la tinción de microorganismos con interés agrícola. En este ámbito, los PE son buenos candidatos debido a que sus propiedades de fluorescencia son estables y no se ven afectadas por aspectos ambientales de origen abiótico como pH, sales, temperatura, etc., en comparación con otros colorantes comerciales, como la rodamina o fluoresceína. Además, los PE presentan triples enlaces $C\equiv C$ altamente polarizables, los cuales pueden ser transductores de detección mediante espectroscopía Raman lo que permitirá visualizar la interacción del oligómero con la bacteria. A partir de estos antecedentes, en este trabajo nos centramos en la evaluación preliminar de un pigmento del tipo PE con la finalidad de teñir PGPR en disolventes polares, permitiendo su detección cualitativa a través de técnicas microscópicas y espectroscópicas (García *et al.*, 2019), los resultados obtenidos, nos permitieron diseñar una serie de pigmentos con diversos grupos funcionales, pero con la condición de ser solubles en agua, a fin de tener una mayor interacción con los microorganismos.

IV. HIPÓTESIS.

Moléculas fluorescentes permiten estudiar los patrones de colonización de la bacteria *Bacillus subtilis* LPM1 en raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta* mediante técnicas microscópicas y espectroscópicas de fluorescencia.

V. OBJETIVOS

V.1.Objetivo general.

Evaluar los patrones de colonización de la rizobacteria promotora de crecimiento *B. subtilis* LPM1 en raíces de tomate (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) a nivel *in vitro* e *in planta*, mediante su tinción con un marcador fluorescente por técnicas microscópicas y espectroscópicas de fluorescencia.

V.2.Objetivos específicos.

Evaluar la viabilidad de un pigmento altamente conjugado, no-polar, fluorescente en la tinción de la bacteria *Bacillus subtilis* LPM1. Determinar, la transducción mediante: 1) microscopia fluorescente confocal, 2) la absorción y emisión de fluorescencia mediante espectroscopia UV-Vis y fluorescencia y 3) por espectroscopia Raman, de forma que los resultados permitan diseñar y evaluar otros pigmentos con carácter polar que los haga solubles en agua.

Evaluar el comportamiento de tinción de 5 marcadores fluorescentes a base de píreno sulfonato de sodio (solubles en agua) portadores de diversos grupos funcionales en 6 cepas bacterianas mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia seleccionando el más eficiente para su utilización en las pruebas *in vitro* e *in planta*.

Inducir la síntesis de exudados radiculares en tomate a nivel *in vitro* mediante la aplicación de elicitores químicos para determinar su composición de manera cualitativa y cuantitativa.

Determinar los patrones de colonización de *Bacillus subtilis* LPM1 mediante bioensayos *in vitro* e *in planta* con uno de los cinco marcadores fluorescentes, en raíces de plantas de tomate con técnicas microscópicas de fluorescencia.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Cepa bacteriana *Bacillus subtilis* LPM1 visualizada mediante tinción Gram.

La cepa PGPR evaluada corresponde a *Bacillus subtilis* LPM1 aislada previamente y proporcionada por el Dr. Alberto Flores Olivas del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

Se aplicó para dicha cepa la técnica de tinción Gram descubierta por el bacteriólogo danés Chistian Gram en 1844 (García, 1995) mediante la utilización de Gram Staining Kit for microscopy (Sigma-Aldrich) con la finalidad de comprobar a partir de esta prueba si pertenecía a Gram-positivo. Los medios de cultivo para esta prueba, fueron suplementados con antibiótico dicloxacilina en una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con la finalidad de reducir riesgos por contaminación. El equipo utilizado para dicha prueba fue un microscopio binocular Axiolab.A1; Estos procesos se realizaron en el laboratorio de Agromicrobiología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

VI.2. Caracterización de 5 moléculas fluorescentes en solución.

VI.2.1. Espectroscopía de fluorescencia.

Se realizaron estudios espectroscópicos en solución y en laminillas por absorción UV-Vis mediante un espectrofotómetro Agilent 8453^a y de fluorescencia mediante espectrofluorímetro Horiba PTI Quantamaster QM-8450-22-c. Los espectros fueron corregidos por la respuesta del detector. Las rendijas de excitación y emisión se optimizaron para tener una intensidad por debajo de 10^6 cuentas para el espectro no corregido y para realizar las mediciones en el rango de respuesta lineal del detector.

VI.2.2. Tiempo de vida.

Los tiempos de vida de fluorescencia se obtuvieron a temperatura ambiente, empleando la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados con el tiempo (TCSPC), en un instrumento Horiba Jobin Yvon TempPro con un láser NANOLED de 370 nm de excitación y se utilizó una dispersión en agua ultrapura 0.01% de Ludox AS40 (Sigma-Aldrich) para la señal del instrumento. El ajuste (fit) se realizó con el software DAS6 del equipo.

VI.3. Interacción entre marcadores fluorescentes y cepas bacterianas.

VI.3.1. Ensayo preliminar.

Previo al desarrollo experimental de la interacción entre los 5 marcadores fluorescentes y las 6 cepas bacterianas, se realizaron pruebas preliminares con pentámeros con la finalidad de familiarizarse con la técnica utilizada para el desarrollo del experimento de interés.

Con este fin, se evaluaron para las pruebas de tinción bacteriana 3 pentámeros previamente sintetizados en el grupo de optoelectrónica supramolecular de Materiales Avanzados del CIQA. Los tres pentámeros son del tipo (benzoato) etileno, difieren entre ellos que uno porta grupos esteroideos; en este caso colesterol, otro con cadenas hidrosolubles, en este caso glicoles y el tercero porta cadenas no-polares, alifáticas de 12 carbonos.

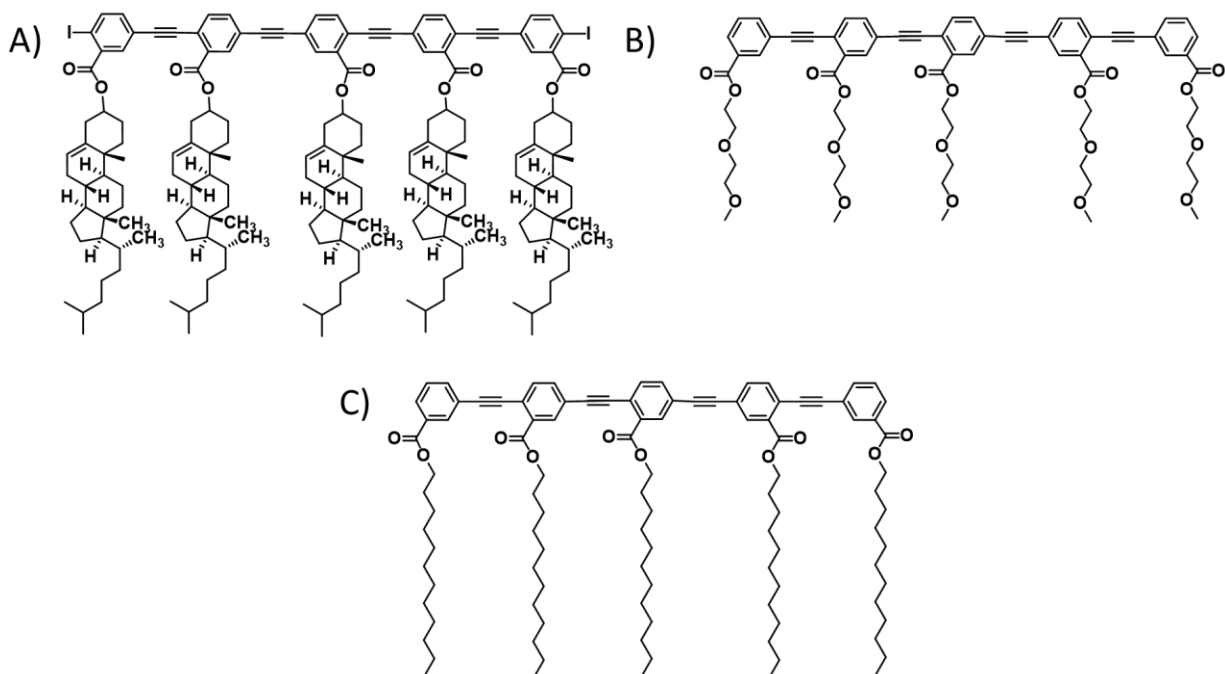


Figura 18. Estructura química de los pentámeros evaluados para la tinción de *B. subtilis*, donde A) pentámero con cadenas colesteril, B) pentámero con cadenas glicolicas y C) pentámero con cadenas alquílicas de 12 carbonos (García *et al.*, 2019).

Las cepas bacterianas fueron cultivadas e incubadas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) a 150 rpm hasta presentar una $DO_{600nm} = 0.2$ a 30°C para *B. subtilis* LPM1 y 37°C para *Escherichia coli* DH5 α , la cual fue donada por el Dr. José Luis Hernández Flores (Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV Unidad Irapuato, México).

Se tomaron alícuotas de 1 mL para la obtención del paquete celular por centrifugación; se resuspendieron nuevamente en 1 mL de H₂O y se adicionaron 50 μ L del oligómero mostrado en la Figura 18 correspondiente al C), (molécula pentámero con terminación de cadena alquílica de 12 carbonos) y se mantuvieron en contacto durante 3 h, posterior a esto se realizaron 2 lavados del excedente repitiendo el proceso de centrifugación y resuspension en H₂O; para la preparación de los frotis se utilizó un volumen de 20 μ L dejando secar en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar las muestras tomadas. Los controles negativos se realizaron bajo las mismas condiciones mencionadas sin el oligómero.

VI.3.1.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.

VI.3.1.1.1. Microscopía de barrido láser confocal (LSCM).

Los frotis preparados para el ensayo preliminar en la interacción de marcador pentámero y las 2 cepas bacterianas fueron evaluados mediante LSCM con un instrumento Pascal 5 de Carl Zeiss en modo dos canales (fluorescencia y reflexión). La excitación se obtuvo con un láser Ar (458 nm, 200 mW).

VI.3.2. Interacción entre 5 marcadores fluorescentes y 6 cepas bacterianas.

Se realizaron ensayos con *B. subtilis* LPM1 (30°C) como promotora de crecimiento y 5 cepas bacterianas no promotoras de crecimiento: *B. subtilis* PY79 (30°C) donada por el Dr. Juan Campos Guillén (Universidad Autónoma de Querétaro), *E. coli* DH5α (37°C), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (28°C), *Pectobacterium cacticidum* (28°C) y *Agrobacterium* sp. (37°C), con el propósito de visualizar el comportamiento ante la presencia de 5 diferentes marcadores fluorescentes, los cuales se muestran en la Figura 19, estos marcadores fueron sintetizados y proporcionados por el Dr. Eduardo M. Arias Marín del Departamento de Materiales Avanzados del CIQA.

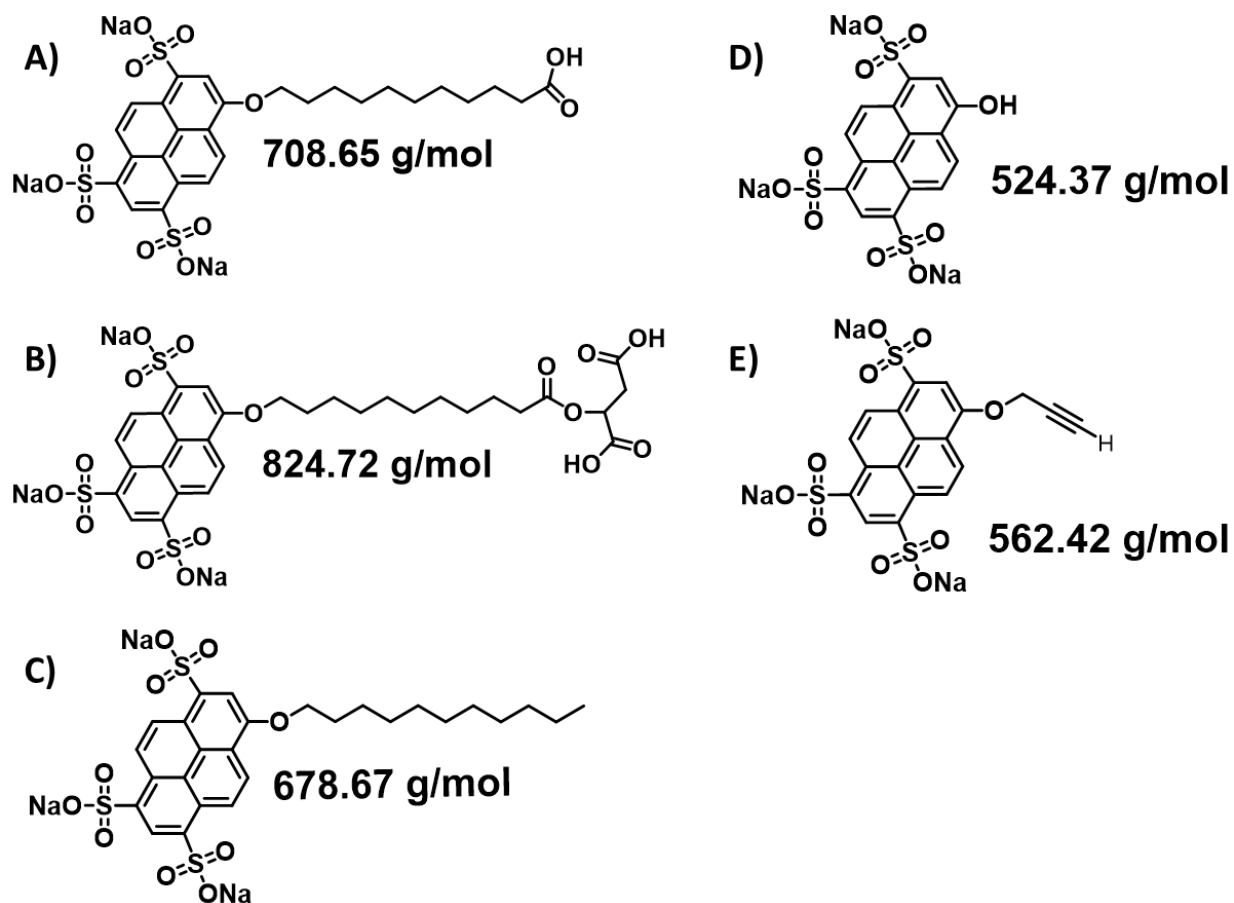


Figura 19. Estructura química de marcadores fluorescentes utilizados para la evaluación del comportamiento de 6 cepas bacterianas donde A) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido carboxílico (M1), B) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido málico (M2), C) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación alquílica de 11 carbonos (M3), D) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación hidroxí (M4) y E) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación triple enlace (M5).

Las cepas bacterianas fueron cultivadas e incubadas a 30°C en medio de cultivo LB a 150 rpm hasta presentar una $DO_{600nm} = 0.1$, se tomaron alícuotas de 1 mL para la obtención del paquete celular obtenido por centrifugación; se resuspendieron en 1 mL H_2O , adicionando 50 μL del marcador respectivo y se mantuvieron en contacto durante 40 min; posterior a esto se realizó un lavado del excedente repitiendo el proceso de centrifugación y resuspensión en H_2O para la preparación de los frotis, con la finalidad de realizar las pruebas espectroscópicas y microscópicas.

VI.3.2.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.

VI.3.2.1.1. Microscopía de barrido láser confocal.

Los frotis preparados para el ensayo en la interacción de los 5 marcadores y las 6 cepas bacterianas se utilizaron las mismas condiciones del LSCM aplicadas en ensayo preliminar, la única variación fue en la excitación, ya que ésta se obtuvo con un láser Ar (488 nm, 200 mW).

VI.3.2.1.1. Espectroscopía de fluorescencia.

Se realizaron pruebas de fluorescencia con la finalidad de determinar las longitudes de onda emitidas por el marcador y las cepas teñidas con éste. Condiciones previamente descritas en ensayo preliminar.

VI.3.2.2. Cuantificación de UFC de 6 cepas bacterianas.

De las alícuotas tomadas, respectivas a cada muestra ($DO_{600nm} = 0.1$), se realizaron diluciones seriadas para la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC), con la finalidad de reportar el número de colonias que se encontraban presentes en la dilución 10^6 , dicho procedimiento se muestra esquemáticamente en la Figura 20.

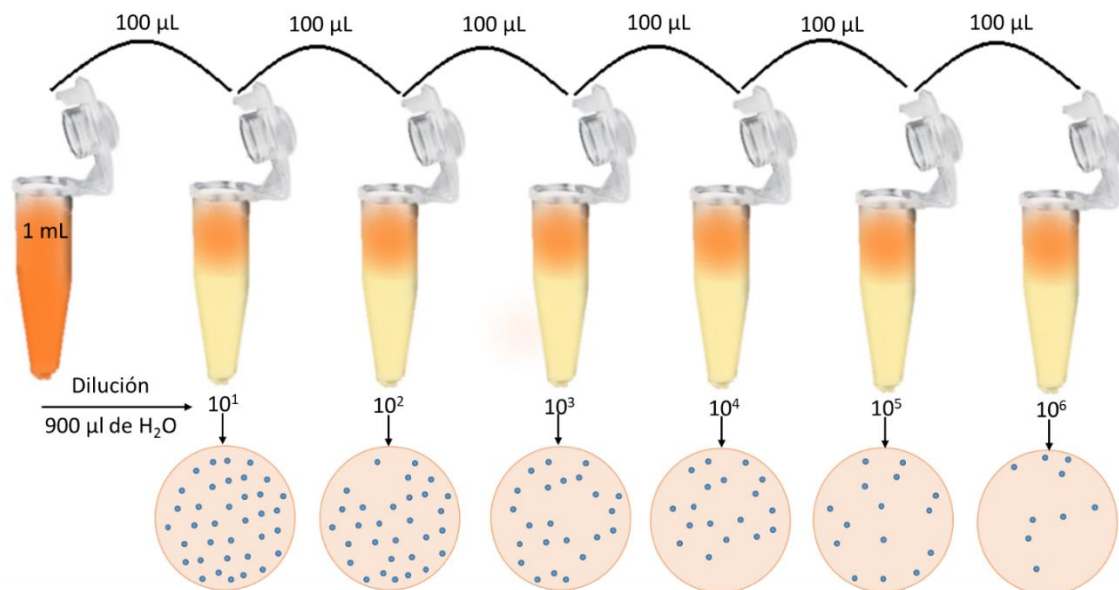


Figura 20. Metodología utilizada para conteo de UFC aplicado en cada ensayo independiente para las 6 cepas bacterianas.

VI.4. Promoción de crecimiento en 3 variedades de tomate.

La siembra de las semillas se realizó en charolas de 36 cavidades con sustrato peat moss de 3 variedades de tomate Micro-Tom, Silvestre y Floradade; el trasplante se efectuó 20 días después de siembra (dds) a macetas de 1 L con sustrato peat moss/perlita en una relación 70/30 (v/v), se aplicó un tratamiento con la bacteria *B. subtilis* LPM1 el cual consistió en someter los cepellones durante 1 h en solución con la bacteria a una concentración $1 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ con la finalidad de garantizar el contacto directo con dicho organismo para favorecer la colonización por la misma, la fertilización fue mediante la aplicación de FertiDrip 20–20–20 (N-P-K) más microelementos (AgroDelta) posterior a la semana de inoculación, las condiciones de temperatura en el invernadero oscilaron entre 25 y 30°C (Paudel *et al.*, 2014).

Se realizó un análisis destructivo para la medición de parámetros biométricos: altura, diámetro de tallo, biomasa fresca de vástago, biomasa fresca de raíz, biomasa seca de vástago, biomasa seca de raíz y longitud de raíz a los 28 días después de trasplante

(ddt). El diseño experimental utilizado fue bloques completamente al azar (Figura 21). El bioensayo fue desarrollado en el invernadero IBT002 de mediana–baja tecnología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

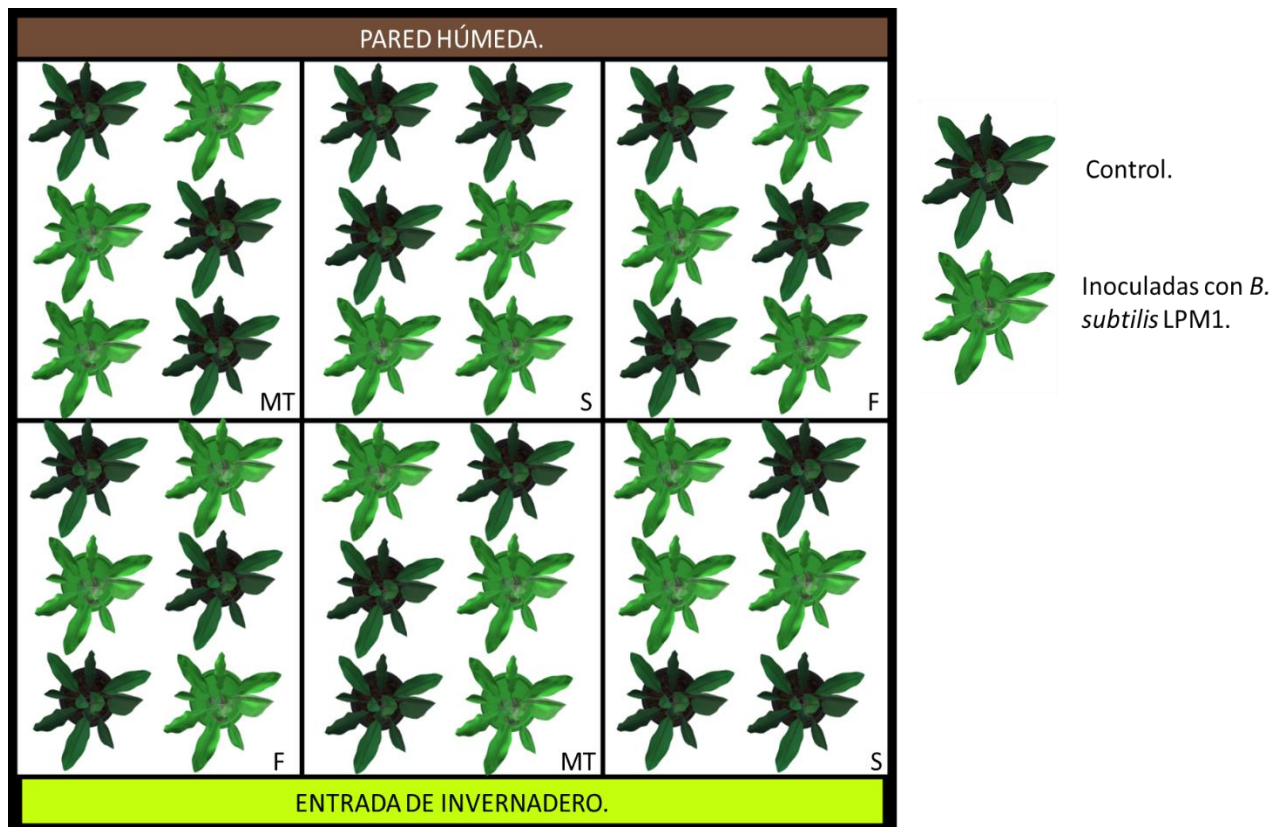


Figura 21. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de promoción de crecimiento en tres variedades de tomate, donde MT= Micro-Tom, S= Silvestre y F= Floradade.

VI.4.1. Patrones de colonización a nivel *in planta*.

Del ensayo previamente mencionado, se procedió a realizar la evaluación de los patrones de colonización de las tres variedades de tomate con ayuda de la molécula fluorescente M1, las raíces se mantuvieron en contacto con M1 a 30°C en agitación a 150 rpm durante 48 h. Transcurrido este tiempo las raíces fueron evaluaron mediante Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) cortadas en distintas zonas de crecimiento, buscando

igualar la misma zona en cada uno de los tratamientos, se colocaron en portaobjetos y fueron enfocadas con el objetivo 10x.

VI.5. Germinación y crecimiento *in vitro* de plantas de tomate.

La germinación de las semillas se realizó en cajas Petri con 30 mL medio Murashige-Skoog (MS) con 15 semillas por caja de la variedad Micro-Tom, se sometieron a esterilización superficial con etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 2% (v/v) y H₂O desionizada estéril (Badri *et al.*, 2009; Fan, 2011).

Se incubaron con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h obscuridad a 25°C (Steinkellner *et al.*, 2008), una vez emergidos los cotiledones, se procedió a moverlas a cajas Magenta (Sigma-Aldrich) con las mismas condiciones hasta la presencia de 3 a 4 hojas verdaderas para su utilización; estos procesos se realizaron en el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

VI.5.1. Aplicación foliar de elicitors químicos a plántulas.

Al presentarse 4 hojas verdaderas, se procedió a la aplicación foliar de 200 µL de los elicitors químicos a las siguientes concentraciones; JA 75 µM, BTH 500 µM y AA 100 µM, tomando muestras de los exudados radiculares a las 6, 12 y 24 h después de la aplicación, bajo estos tratamientos, las plantas se mantuvieron en 25 mL de solución acuosa, a partir de esto coleccionar la producción de los exudados. Los elicitors fueron disueltos inicialmente en etanol, para partir, de soluciones estándar, de las cuales se tomaron alícuotas correspondientes a concentraciones anteriores indicadas complementándolas con agua desionizada estéril, con la finalidad de evitar la volatilización de dichos compuestos (Paudel *et al.*, 2014). Esta prueba fue realizada en tres ensayos independientes. El diseño experimental utilizado fue bloques completamente al azar (Figura 22), desarrollado en el Laboratorio de Agromicrobiología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

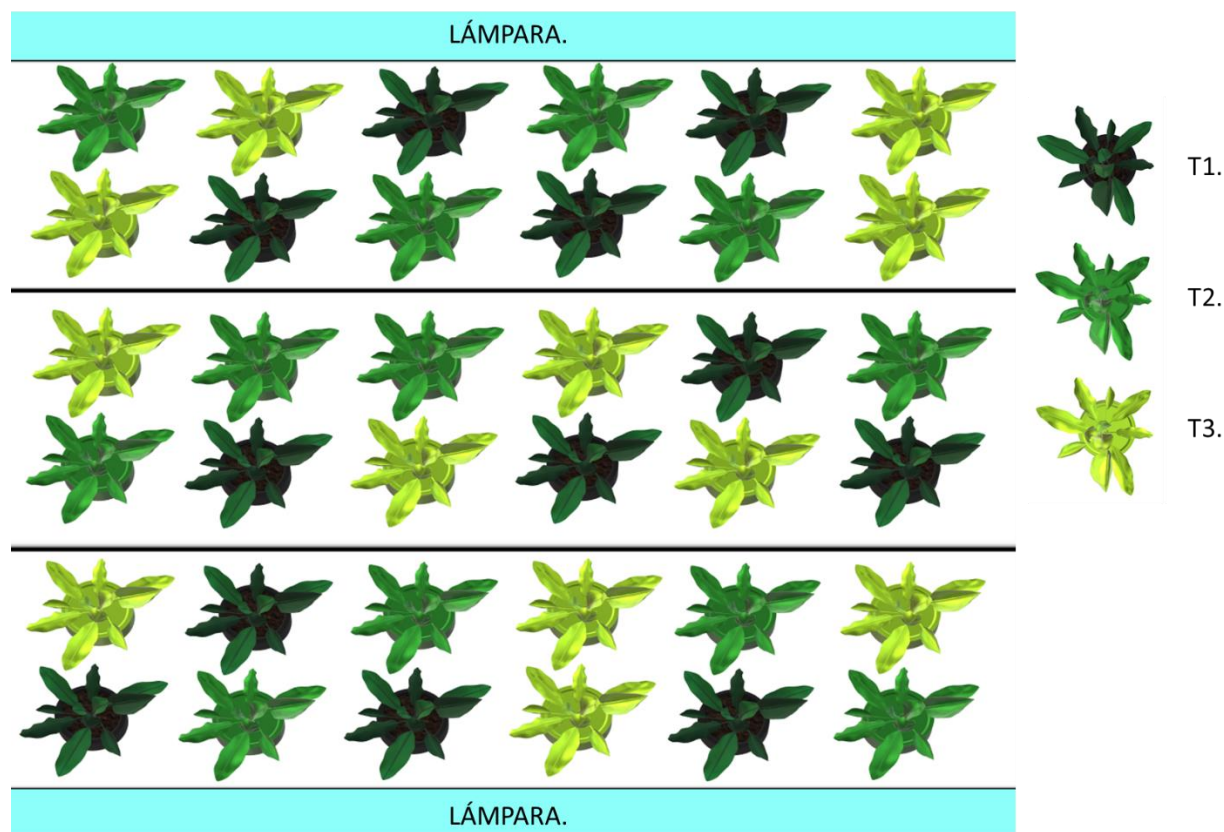


Figura 22. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de aplicación de elicitores adecuado para cuarto *in vitro* donde T1= Planta + JA, T2= Planta + AA y T3= Planta + BTH.

VI.5.1.1. Análisis de ácidos orgánicos presentes en exudados radiculares por LC-MS.

El volumen total de las muestras obtenidas de los exudados radiculares después de la aplicación foliar de elicitores químicos fue liofilizada y concentrada en agua desionizada estéril a 100x para su análisis por LC-MS (Badri *et al.*, 2013), fueron filtrados con una membrana PVDF de 22 μ m con la finalidad de mantener la muestras libres de cualquier microorganismo que pudiera interferir en la degradación de algún compuesto (Steinkellner *et al.*, 2008).

Para el análisis por LC-MS, los estándares utilizados como ácidos orgánicos fueron: fumárico, málico y succínico, mediante el equipo HPLC Agilent 1290 Infinity II/ Detector

de masas QQQ Agilent 6420A utilizando una columna Zorbax C18 a una temperatura de 30°C, empleando como fase móvil en gradiente agua 0.0% de ácido fórmico y acetonitrilo, de este último partiendo de una relación 90/10% hasta alcanzar el 100% al finalizar. Para el análisis de espectrometría de masas, se empleó un detector de masas de triple cuadrupolo con fuente de ionizaciones ESI, utilizando como gas Nitrógeno para lograr una nebulización de 15 psi a una temperatura de 300°C. Estos análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio Central de Instrumentación Analítica del CIQA.

VI.5.2. Patrones de colonización a nivel *in vitro*.

Plántulas entre 4 y 5 hojas verdaderas crecidas bajo las mismas condiciones previamente descritas, fueron elicitadas con BTH 500 µM, 12 h después de la aplicación se procedió a inocular los tratamientos correspondientes con 200 µL de la cepa *B. subtilis* LPM1 DO_{600nm} = 0.6, este tratamiento duro 48 h, posterior a esto, se adicionaron 20 µL del marcador fluorescente M1, dejando interactuar 40 min, las plántulas se mantuvieron a una temperatura de 30°C a 150 rpm. Transcurrido este tiempo las raíces fueron visualizadas mediante LSCM bajo las mismas condiciones sometidas en el ensayo de patrones de colonización a nivel *in planta*. Se realizaron dos ensayos independientes. El diseño experimental utilizado fue bloques completamente al azar (Figura 23), desarrollado en el Laboratorio de Agromicrobiología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

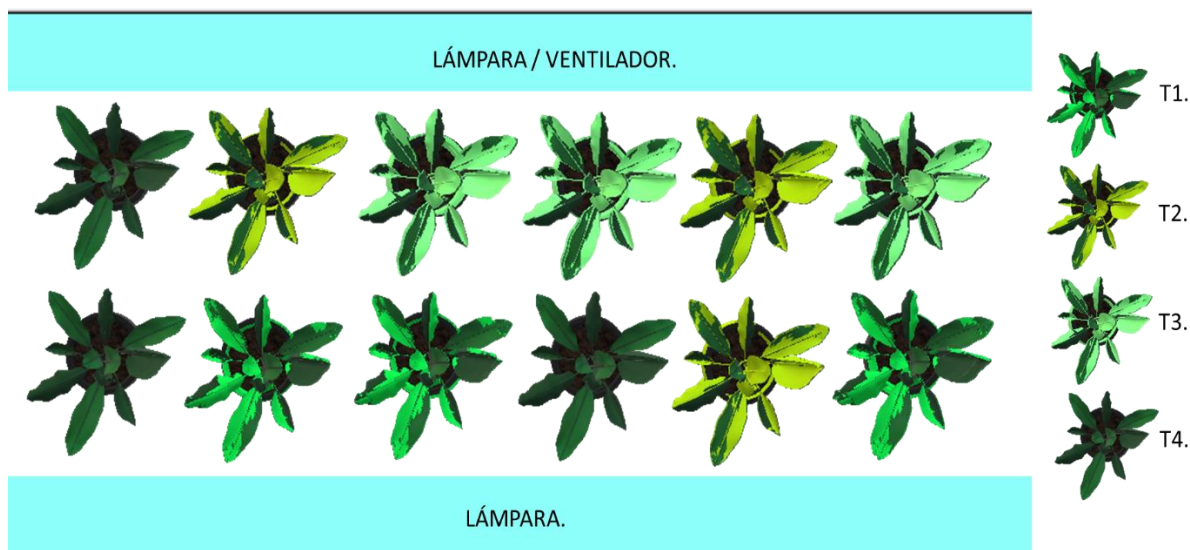


Figura 23. Diseño experimental de bloques completamente al azar para ensayo de patrones de colonización adecuado para cámara de cuarto *in vitro* (lámpara) e incubadora (ventilador) donde T1= Planta control, T2= Planta + *B. subtilis* LPM1 y T3= Planta + *B. subtilis* LPM1 + M1 y T4= Planta + M1.

VI.6. Quimiotaxis bacteriana.

VI.6.1. Quimiotaxis en medio de cultivo sólido.

VI.6.1.1. Medio mínimo M9 con cepa *B. subtilis* LPM1.

Como ensayo preliminar el crecimiento de la bacteria *B. subtilis* LPM1 se llevó a cabo en cajas petri de 5 cm de diámetro con medio mínimo M9, para visualizar el efecto quimioatrayente hacia los ácidos orgánicos utilizados (cítrico, fumárico, oxálico, málico y succínico), estos ácidos fueron aplicados en las siguientes concentraciones: 25, 50, 75, 100 y 200 μM .

La técnica consistió en colocar dos discos de papel filtro estériles (6 mm $\varnothing$) en polos opuestos sobre el medio de cultivo, inoculando en uno de estos 100 μL de la bacteria a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6$ y en el opuesto el mismo volumen del ácido orgánico correspondiente a cada concentración, esto realizado por triplicado. Se sometieron a incubación a temperatura de 30°C. Su evaluación se realizó 8 días después de la inoculación de la cepa bacteriana.

VI.6.1.2. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.

Posterior al análisis de dichos resultados se montó nuevamente un experimento similar, en cajas petri de 8.5 cm de diámetro, sometiendo en este ensayo tres cepas bacterianas *B. subtilis* LPM1, *B. subtilis* PY79 y *E. coli* DH5 α , utilizando las concentraciones de 50, 75 y 100 μ M, someténdolo en medio mínimo M9 (Weert *et al.*, 2002), para visualizar la tendencia que se presentaba al estar mayor tiempo en contacto el medio de cultivo con los ácidos orgánicos, el ensayo tuvo una duración de 45 días, realizando mediciones cada 3 días para el caso del medio M9.

En conjunto con este experimento, se evaluó el pH del medio mínimo M9 sometido a las mismas condiciones anteriormente mencionadas, el cual consistió en fragmentar en 4 bandas el medio de cultivo, colocando cada banda en 50 mL de H₂O desionizada para su medición, utilizando 3 réplicas por tratamiento, realizando muestreos semanales durante 1 mes. Este ensayo se desarrolló en el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

VI.6.2. Quimiotaxis en medio de cultivo líquido.

VI.6.2.1. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.

Esta prueba consistió en el crecimiento de las cepas bacterianas *B. subtilis* LPM1, *B. subtilis* PY79 y *E. coli* DH5 α en medio de cultivo LB hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.2, se procedió a la centrifugación de 2 mL de las bacterias en tubos Eppendorf, se adicionó 1.5 mL de medio mínimo M9 líquido y se homogenizaron.

Se siguió la metodología establecida por Ling *et al.*, (2011) con modificaciones. En tubos capilares se introdujeron 5 μ L de los siguientes ácidos orgánicos: málico (100 μ M), fumárico (100 μ M), cítrico (100 μ M), succínico (75 μ M) y oxálico (50 μ M), se les colocó un soporte al introducirlos a los tubos Eppendorf con la finalidad de evitar diferencias en cm introducidos en cada tratamiento, las colectas de la cinética fueron tomadas cada 30 min hasta alcanzar 3 h y dicho volumen fue alicuotado e inoculado en cajas petri con medio de cultivo LB e incubados a 30°C para el conteo de UFC.

VI.7. Motilidad

VI.7.1. Medio LB diluido con 3 cepas bacterianas.

El desarrollo de esta prueba se planteó bajo condiciones similares que el ensayo anteriormente descrito de quimiotaxis en medio mínimo M9, con el cambio del soporte utilizando, aplicando medio LB 20 veces diluido con pequeñas modificaciones (Weert *et al.*, 2002), teniendo una duración de 5 días realizando mediciones diarias. Este ensayo se desarrolló en el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

VII.1. Cepa bacteriana *B. subtilis* LPM1 visualizada mediante tinción Gram.

La técnica de tinción Gram es utilizada con la finalidad de visualizar mediante colorantes la estructura de la pared celular referente a bacterias Gram-positivo y Gram-negativo (Reyes *et al.*, 2002; Neyen y Lemaitre, 2016), esta prueba aplicada a la cepa de interés, mostró que efectivamente la morfología presentada por la tinción corresponde a la cepa *B. subtilis* LPM1 y siendo Gram-positivo. En la Figura 24 se aprecian teñidas de color violeta, tono característico de una cepa Gram-positivo, este efecto está relacionado con la conformación de la pared de peptidoglicano que se encuentra regularmente entre 80 y 90% en el género Gram-positivo. Al contener este % en la pared, ocasiona que el cristal violeta se adhiera a ésta en mayor superficie, por lo cual, aun aplicando el lavado con etanol no ocurre la pérdida de dicho colorante.

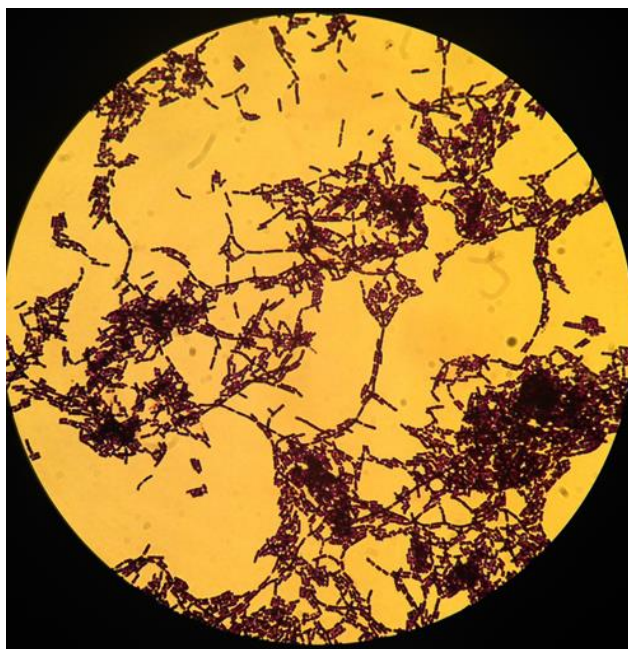


Figura 24. Bacteria *B. subtilis* LPM1, visualizada mediante técnica de tinción Gram, mostrando bacilos alargados teñidos de violeta; color característico de las bacterias Gram-positivo.

Las bacterias crecidas en el medio de cultivo analizados en la prueba anterior, fueron suplementadas con antibiótico, el cual fue utilizado para descartar la posible presencia de algún otro microorganismo, ya que la cepa LPM1 presenta resistencia a dicloxacilina (Chávez-Betancourt *et al.*, 2006), de igual forma, se encuentra reportado que las bacterias Gram-positivo con bajo contenido de guanina y citosina (G + C) presentan un mecanismo de resistencia ante determinados compuestos (Sumi *et al.*, 2015) lo cual se presentó al utilizar este antibiótico.

VII.2. Propiedades ópticas de los marcadores del tipo pireno sulfonato de sodio.

Las propiedades ópticas en solución y laminilla del marcador pentámero de tipo benzoatoetileno fueron evaluadas y reportadas previamente (García *et al.*, 2019). En esta tesis y de forma similar, se evaluaron los 5 marcadores, descritos en la Figura 19, a base de pireno. Las propiedades ópticas en agua se resumen en la Tabla 1.

La Figura 19 muestra los espectros de fluorescencia (A) y de excitación (B). Todos los marcadores son derivados del 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sodio en donde las moléculas M1, M2, M3 y M5, el grupo funcional en posición 8 presenta un espaciador alquílico de por lo menos un carbono para la terminación etileno (M5) o hasta 10 carbonos (M1, M2 y M3) entre el núcleo del pireno y el grupo terminal. Esta modificación se realizó para modular la propiedad de solubilidad en agua del marcador sin afectar las propiedades de emisión. Además, la idea de incluir un grupo etileno, se debe a la fácil polarización de este grupo por efecto de luz láser y su sensibilidad se señal en espectroscopía Raman, lo cual se discutirá más adelante de su importancia.

Se puede observar en la comparación de los espectros de emisión y de excitación de estos marcadores que la molécula M4 al portar el grupo hidroxilo directamente conjugado al pireno, da lugar a la presencia de una especie protonada y deprotonada, la cual en emisión genera un pico más desplazado hacia el rojo (515 nm), tal y como lo han observado también otros autores (Kumar *et al.*, 2018) (lo que lo hace sensible al pH). Sin embargo, este efecto se pierde en la laminilla donde la fluorescencia de M4 es prácticamente igual a la de los demás marcadores, debido a que en estado sólido el agua

ya no está presente y no es posible tener la protonación/deprotonación del OH (inciso C). Todos los marcadores presentan un alto rendimiento cuántico en agua, con tiempos de vida de entre 3-5 nanosegundos, situándolos en el rango de moléculas fluorescentes.

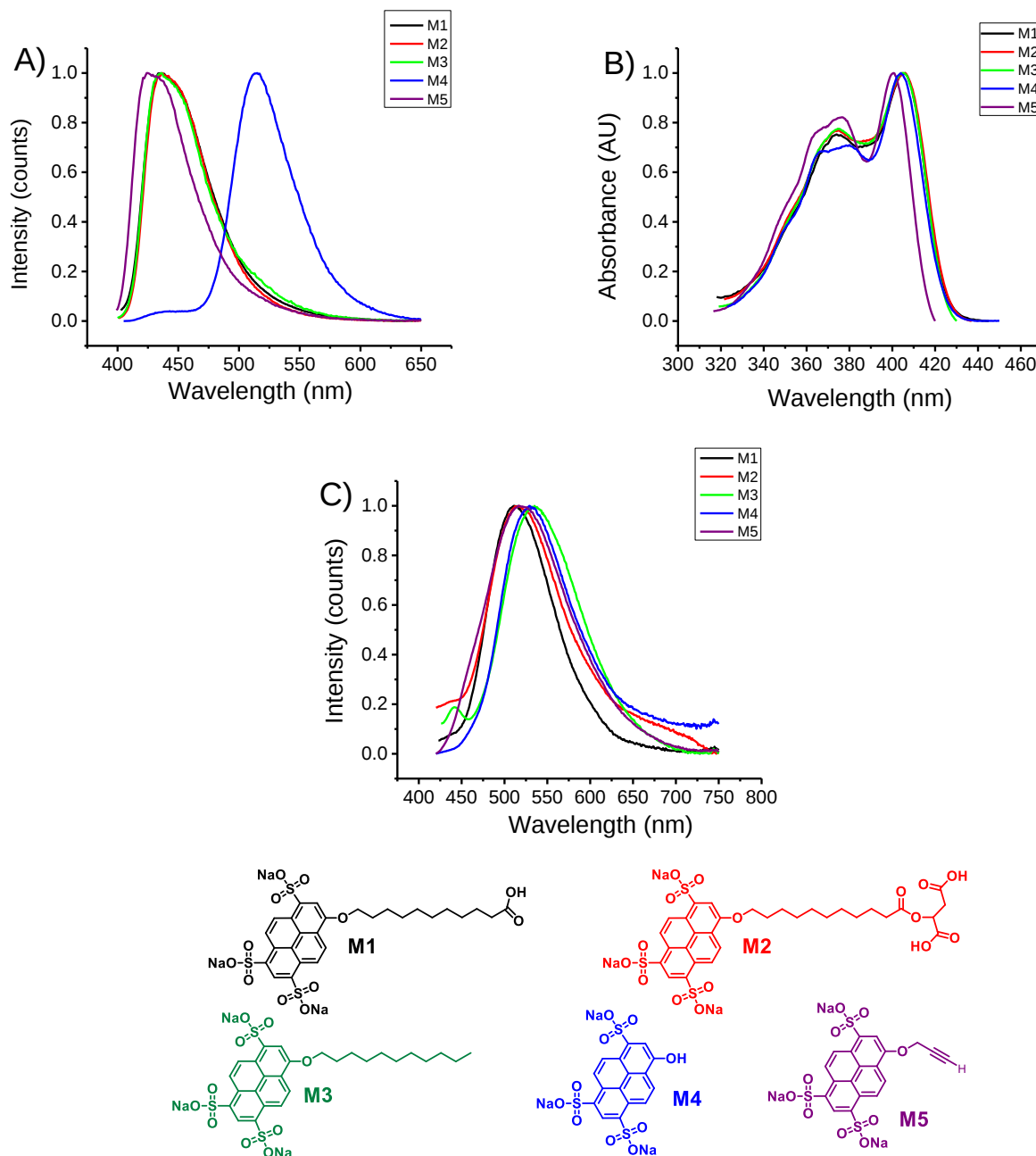


Figura 25. Espectros de fluorescencia de 5 pirenos sulfonatos de sodios de sodio: A) espectro de emisión en solución, B) espectro de excitación en solución, C) espectro de emisión en portaobjetos, M1) marcador pireno con terminación ácido carboxílico, M2) marcador pireno con terminación ácido málico, M3) marcador pireno con terminación

alquílica de 11 carbonos, M4) marcador pireno con terminación hidroxilo y M5) marcador pireno con terminación triple enlace.

Debido a que las muestras fueron evaluadas en portaobjetos para la prueba de LSCM, también se realizó la medición de éstas para conocer el comportamiento de la molécula disuelta en H₂O, pero ahora fijada al portaobjeto. En la Figura 25C se puede observar que el espectro de emisión en película se presenta de forma y posición muy similar en todos los marcadores, incluso para el M4 que en solución era diferente, lo anterior sugiere que la fluorescencia se debe principalmente al pireno sulfonato de sodio, mientras que las cadenas son solo grupos solubilizantes.

Otra característica distintiva entre los espectros de solución y los de película (laminillas) es la dispersión en los espectros, este factor se debe a que las laminillas utilizadas producen este efecto de dispersión de luz (García *et al.*, 2019) que en solución se evitó debido a la utilización de una celda de cuarzo especial (Deloya-Martínez, 2006). Estas pruebas realizadas fueron utilizadas como control para los ensayos evaluando la interacción entre los 5 marcadores fluorescentes y 6 las cepas bacterianas.

Tabla 1. Caracterización de marcadores fluorescentes en solución, donde λ_{abs} = máxima longitud de onda, ϵ = coeficiente de extinción molar, λ_{em} = longitud máxima de emisión, $\Delta\nu$ = desplazamiento de Stoke, Φ = rendimiento cuántico y τ = tiempo de vida.

Compuesto	λ_{abs} [nm]	ϵ [10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]*	$\Delta\nu$ [cm ⁻¹]	Φ [%]*	τ [ns]*
M1	245, 290, 374, 405	1.61	437	1747	81	3.84
M2	246, 290, 374, 405	1.99	437	1747	94	3.82
M3	246, 290, 375, 404	1.74	436	1817	87	3.91
M4	246, 290, 370, 403	1.54	515	5093	87	5.30
M5	244, 288, 376, 400	4.42	424	1415	74	3.92

Valor de λ_{abs} en negritas indica la longitud de onda del mayor pico de absorción respectivo a cada muestra.

En la caracterización de las moléculas fluorescentes, un parámetro también evaluado fue el tiempo de vida de fluorescencia de cada marcador, debido a que es un indicativo de la transición del estado excitado al estado basal en función el tiempo, cuando la intensidad de fluorescencia se reduce a τ/e del valor inicial (Reija, 2007), en el Anexo a. en la Figura 42 se puede observar el comportamiento que presentó cada molécula. El comportamiento de éstas a simple vista parecen muy similar, sin embargo, en la Tabla 1 se puede apreciar que existe una ligera variación para este parámetro en los casos de M1, M2, M3 y M5, mientras que el valor correspondiente a M4 se aleja un poco de la tendencia que presentaron las anteriores moléculas, los valores obtenidos en este parámetro son independientes de la concentración del fluoróforo y son obtenidos a partir del tiempo promedio que transcurre de estar excitado hasta el regreso a su estado basal (Lakowicz, 1999), por lo cual este dato es una propiedad específica de cada molécula.

Las moléculas orgánicas regularmente presentan tiempos de vida alrededor de 10^{-10} a 10^{-7} ns (Valeur y Berberan-Santos, 2013). La intensidad de fluorescencia en función del tiempo es un comportamiento característico de las moléculas después de haber sido sometidas a excitación mediante un pulso temporal, el cual busca regresar a su estado fundamental en ausencia de cualquier otro proceso de desactivación de esta energía (Atkins, Paula y Cwi, 2008).

En la Figura 25 se observan las estructuras químicas de cada molécula fluorescente utilizada, todas las moléculas tienen como base la estructura del pireno sulfonato de sodio (M4). Las síntesis de estas moléculas fueron desarrolladas para monitorear el comportamiento que presentaba el pireno al estar en contacto con las cepas bacterianas cambiando sustituyentes que deberían tener una mejor interacción con las bacterias. Dichas estructuras tienen la característica de ser hidrofílicos, es decir, afines al H_2O (Aréchiga, 1996), siendo M2 el más hidrofílico y M3 el que en menor medida presenta esta propiedad. La síntesis del M5 fue diseñado con la finalidad de poder analizarlo no solo por fluorescencia, sino además mediante espectroscopía Raman por la presencia de un triple enlace.

En resumen, la similitud en las propiedades de los marcadores, se debe a la molécula pireno 1-3-6-trisulfonato de sodio y hemos demostrado que la introducción de los sustituyentes no intervienen en la conjugación del cromóforo, es decir, no afectan de manera importante las características espectrales de fluorescencia (López-Jácome *et al.*, 2014).

Inicialmente se consideraba que el M3, el cual se sintetizó con la biomolécula ácido málico, tendría una especificidad hacia la cepa del género *Bacillus subtilis*, esto debido a que en la literatura se encuentra reportada esta biomolécula como una de las más utilizadas en el metabolismo y en la quimiotaxis de este género bacteriano (Liu *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2011), todas estas cepas probadas fueron propuestas debido a que se pretendía identificar la especificidad del marcador M3, ya que se encuentra reportado en la literatura que al sintetizar moléculas fluorescentes con biomoléculas podrían generarse la especificidad hacia cepas deseadas (Disney *et al.*, 2004), esto a partir de la conjugación correcta evitando alguna interacción en las zonas de reconocimiento hacia estas biomoléculas por los microorganismos deseados a probar (Schermann, 2008), estos trabajo se han desarrollado principalmente en el ámbito de la medicina donde se ha logrado una especificidad hasta de un 97% (Miranda *et al.*, 2007), lo cual nos indica la importancia de darle un giro y aplicar estas técnicas en beneficio del área de la agricultura. Sin embargo, como veremos adelante, los marcadores tiñen las bacterias completamente, con muy poca cantidad de fluoróforo lo que permitió determinar los patrones de colonización de forma muy sencilla en las plantas de tomate.

VII.3. Interacción entre marcadores fluorescentes y cepas bacterianas.

VII.3.1. Ensayo preliminar.

VII.3.1.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas de fluorescencia.

VII.3.1.1.1. Microscopía de barrido láser confocal.

Antes de evaluar los 6 marcadores de pireno sulfonato de sodio, se hicieron ensayos de tinción de bacterias con pigmentos altamente conjugados y portadores de diferentes

grupos solubilizantes como son colesterilos, glicoles y cadenas alquílicas. Los pigmentos usados son de la familia de los fenilenetilenos, el interés de usarlos, es porque son compuestos muy fluorescentes, estables y no les afecta parámetros ambientales como pH, sales, temperatura, etc., en comparación con otros pigmentos como la rodamina, fluorescenina, etc. Además, el triple enlace, es altamente polarizable y muy sensitivo al efecto Raman, lo cual es otra señal detectable a parte de la fluorescencia. Con este fin, se tomaron imágenes mediante LSCM, la configuración para la obtención de éstas fue a partir de dos canales, con la finalidad de identificar las regiones fluorescentes de la muestra, bajo las mismas condiciones se analizó un control para descartar la presencia de fluorescencia por la cepa y el portaobjeto.

Los tres pentámeros evaluados fueron seleccionados pensando en que su solubilidad debería de ser en solventes polares o acuosos a fin de evitar el efecto de lisis sobre las bacterias. En trabajos previos encontramos que los pentámeros son los oligómeros que tienen el rendimiento cuántico más alto. Entre ellos, el que posee las cadenas glicólicas es el más alto $\Phi = 97\%$. Sin embargo, intentos de usarlo para teñir las bacterias fue infructuoso, debido a que es tan polar, tan soluble en agua que, durante el proceso de lavado para retirar el exceso de pentámero después de estar en contacto con las bacterias, también se iba con el agua durante la centrifugación. En contraste, el pentámero altamente hidrofóbico (con grupos colesterilo), no solo presentó bajo rendimiento cuántico, $\Phi = 35\%$, sino que además es insoluble en solventes polares. A fin de obtener un balance de hidrofobicidad en los pentámeros, encontramos después de sintetizar toda una serie de oligómeros, que el pentámero con cadenas alquílicas de 12 carbonos presentaba un rendimiento cuántico del $\Phi = 77\%$. Además, este pentámero presentó buena solubilidad en solventes polares como la DMSO, DMF y en particular en la *N*-metilpirrolidona, lo cual permitió mezclarlo con el medio de cultivo de las bacterias.

Se seleccionó la bacteria *B. subtilis* LPM1 como representativa de genero Gram-positivo y la *Escherichia coli* DH5 α como Gram-negativo para la demostración no-selectiva de su tinción con el pentámero y su caracterización por microscopía de barrido láser confocal, espectroscopía de fluorescencia y Raman. Normalmente el estudio de colonización bacteriana requiere el marcaje de estas con una proteína verde fluorescente o pigmentos

como el DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol), lo cual implica transformación genética de la bacteria.

En la Figura 26 se confirma con imágenes de LSCM que el pentámero tiñe las bacterias. Para este análisis, se usó la configuración de dos canales con el objetivo de identificar las regiones teñidas: canal de fluorescencia, imágenes a la derecha y canal de reflexión, imágenes a la izquierda. Ambas cepas al estar en contacto con el pentámero emiten fluorescencia en toda la estructura de la bacteria, lo que confirma que el pentámero tiñe ambas cepas de forma no-selectiva, lo cual era de esperarse, ya que el pentámero no tiene grupos receptores específicos que pudieran dar lugar a una respuesta de censado específica hacia las bacterias. Además, no hay indicación de si se tiñen completamente o solo una parte de ellas. La UFC en este ensayo para *B. subtilis* LPM1 fue de 6.3×10^6 UFC $\cdot$ mL⁻¹ y para *E. coli* DH5 α de 5.4×10^8 UFC $\cdot$ mL⁻¹.

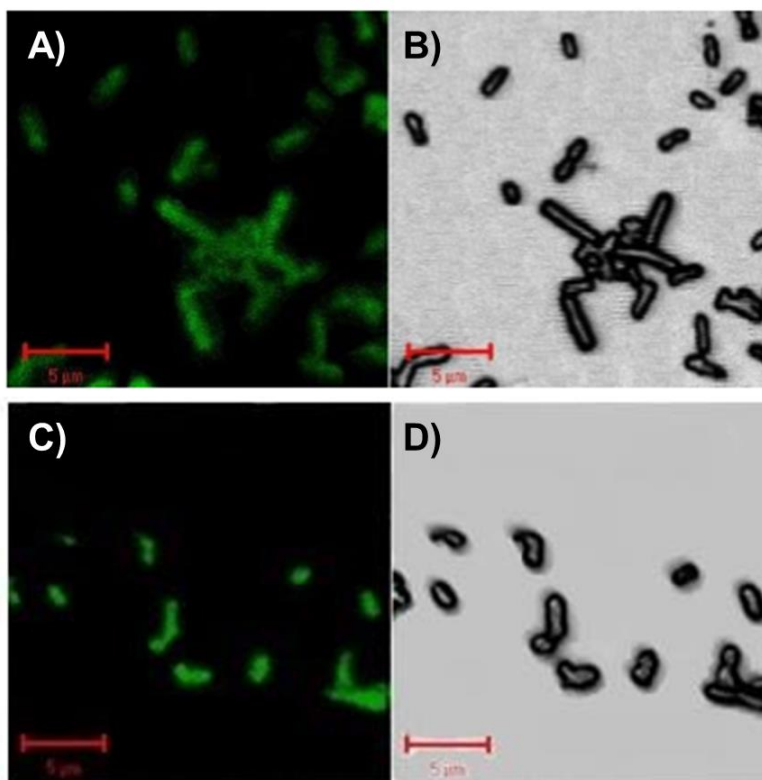


Figura 26. Cepas bacterianas teñidas con pentámero donde A) *B. subtilis* LPM1 en canal de fluorescencia, B) *B. subtilis* LPM1 en canal de reflexión, C) *E. coli* DH5 α en canal de fluorescencia y D) *E. coli* en canal de reflexión (García *et al.*, 2019).

VII.3.1.1.2. Espectroscopía de fluorescencia.

El espectro de UV-Vis para la muestra del pentámero presentó su máximo pico de absorción en 365 nm. Las bacterias no presentaron señal al UV-Vis, probablemente debido a que la cantidad de pentámero adsorbido en la superficie es muy bajo, generando solo reflexión en la línea base. Sin embargo, si presentaron emisión, así que todas las muestras se excitaron a esa longitud de onda. En la Figura 27 se puede apreciar que las muestras control referentes a *E. coli* DH5 α y *B. subtilis* LPM1 no exhiben emisión, mientras que, el pentámero solo y las muestras de bacterias teñidas exhiben una emisión alrededor de los 465 nm. Se logra visualizar que la presencia de las bacterias en las muestras reduce fuertemente la emisión con respecto al pentámero solo, esto debido a las pérdidas por dispersión de luz; pese a este comportamiento la emisión fue suficiente para ser detectable.

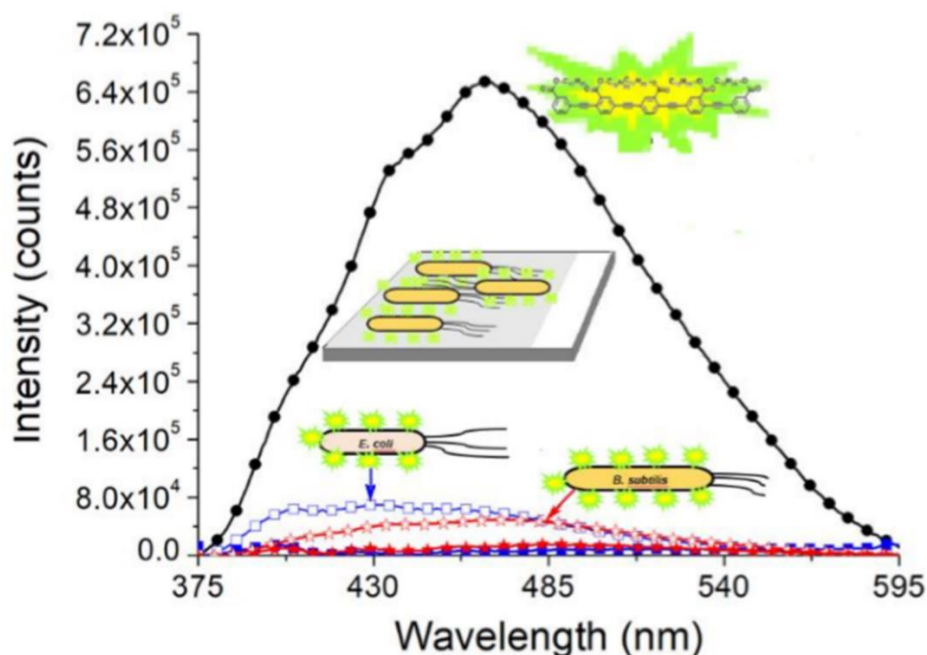


Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia presentados por muestras de frotis donde: ☆) *B. subtilis* LPM1 + pentámero, ☆) *B. subtilis* LPM1, □) *E. coli* DH5 α + pentámero, ●) *E. coli* DH5 α y ■) pentámero (García et al., 2019).

Ahora bien, con esto se visualizó que se requiere muy baja concentración de pentámero para teñir las bacterias, por lo cual, también se evaluaron mediante espectroscopía Raman, en particular polarizando el triple enlace presente en su estructura química, el cual, da señal a 2197 cm^{-1} (Polini y Yang, 2017). El análisis de superficie Raman sobre la bacteria *B. subtilis* LPM1 se muestra en la Figura 28. Se logró aislar una bacteria (Figura 28a) y se determinó el espectro Raman completo a lo largo de la bacteria –tipo tomografía-. En la Figura 28b se pueden ver la acumulación de todos los espectros en sección transversal X apreciándose las diferentes señales vibracionales; posiblemente tanto de la bacteria como del pentámero, sin embargo, el análisis se centró únicamente en la región del triple enlace. Del mapeo individual láser sobre la bacteria (Figura 28c), se identificaron 2 zonas, una donde no hay pentámero y la otra sobre la superficie completa de la bacteria. En la Figura 28d se presentan los espectros del escaneo, claramente se observa la señal de la vibración del triple enlace sobre la bacteria, mientras que en los lados laterales no hay presencia del pentámero, lo cual corrobora que los lavados retiró el exceso del pentámero de la superficie. Los resultados de este ensayo son muy importantes, ya que: i) demostramos que a pesar de usarse muy pequeñas cantidades del pentámero (incluso indetectable por UV-Vis), si es posible detectarlo por medio de fluorescencia, ii) el pentámero se deposita en toda la bacteria por adsorción, emitiendo fluorescencia detectada por LSCM y iii) la espectroscopía Raman demostró la sensibilidad de esta técnica como medio alternativo de detección.

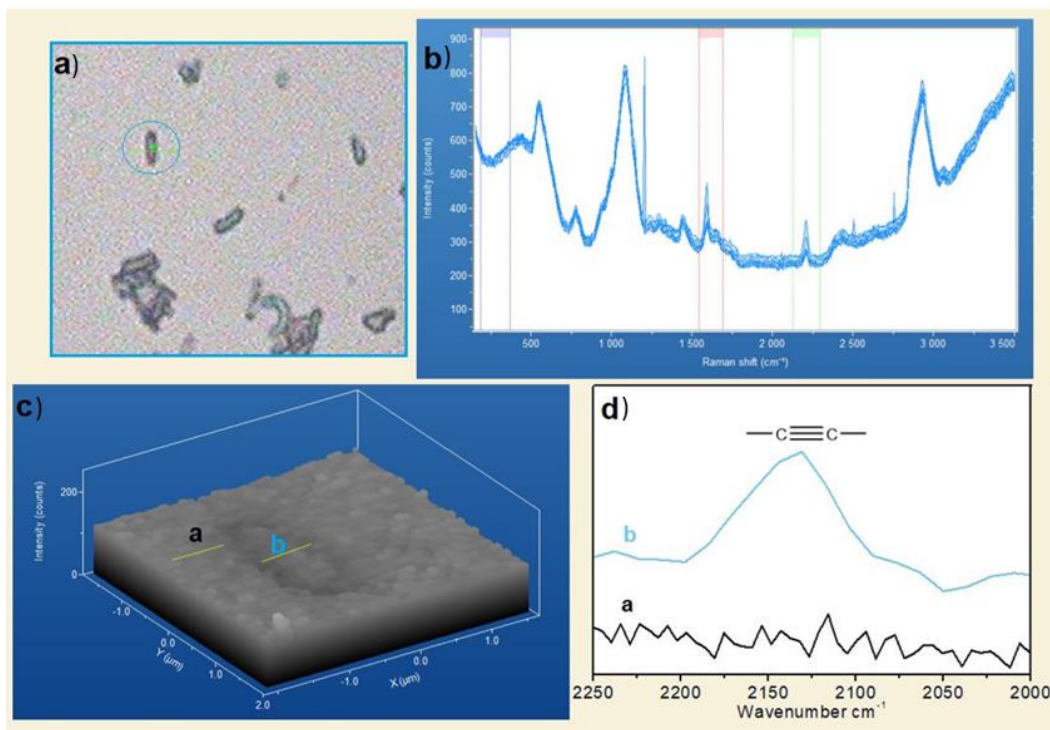


Figura 28. Análisis Raman de la bacteria *B. subtilis* LPM1 aislada y teñida con el marcador pentámero, donde a) *B. subtilis* LPM1 aislado interactuando con el marcador, b y c) mapeo espectral de X y Y, d) espectro Raman ($\text{—C}\equiv\text{C—}$ área de la señal) en las regiones a y b del inciso c (García *et al.*, 2019).

Se diseñó una serie de pirenos sulfonatos de sodios; pigmentos altamente polares, solubles en agua, con un rendimiento cuántico alto, estables al pH y temperatura. Sin embargo, para la utilización de estos se debían considerar los siguientes datos: i) si puede interactuar con bacterias, ii) suficiente balance de hidrofobicidad para evitar la eliminación de este durante el proceso de lavado de las bacterias, iii) balance se puede dar al sustituirlo con diferentes cadenas hidrocarbonadas, iii) la sustitución de grupos polares aumenta o disminuye al interactuar con las bacterias. A este respecto, no es el enfoque de este trabajo demostrar el tipo de interacción o selectividad de los diferentes grupos de los que esta funcionalizado el pireno sulfonato de sodio con las bacterias. No obstante, los resultados permitirán diseñar nuevos fluoróforos al sustituir el pireno sulfonato de sodio en moléculas del tipo fenilnetileno, el cual, es un proceso de trabajo en los laboratorios del CIQA.

VII.3.1. Interacción entre 5 marcadores fluorescentes y 6 cepas bacterianas.

VII.3.1.1. Pruebas espectroscópicas y microscópicas.

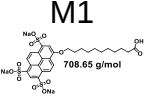
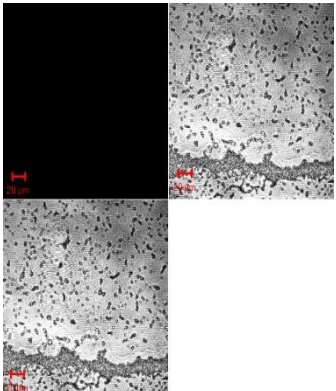
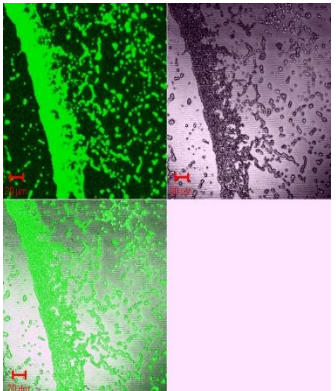
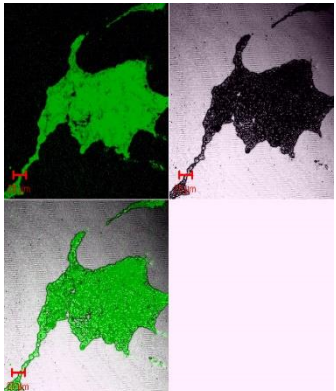
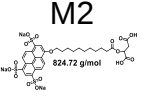
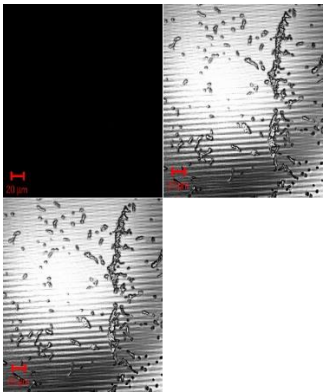
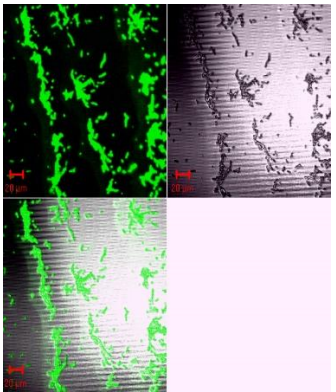
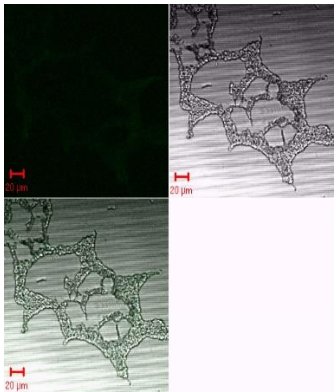
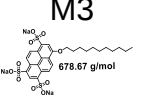
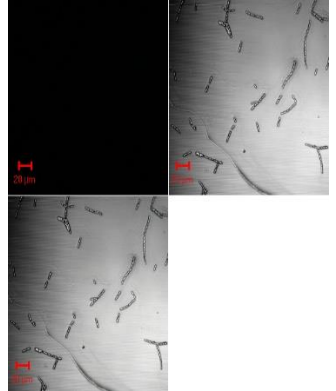
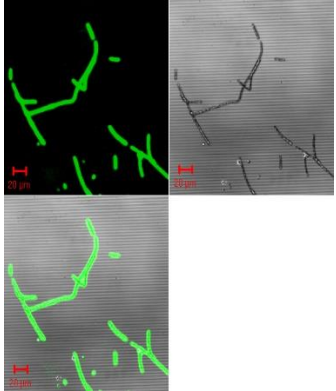
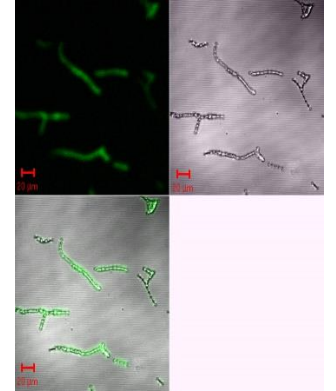
VII.3.1.1.1. Microscopía de barrido láser confocal.

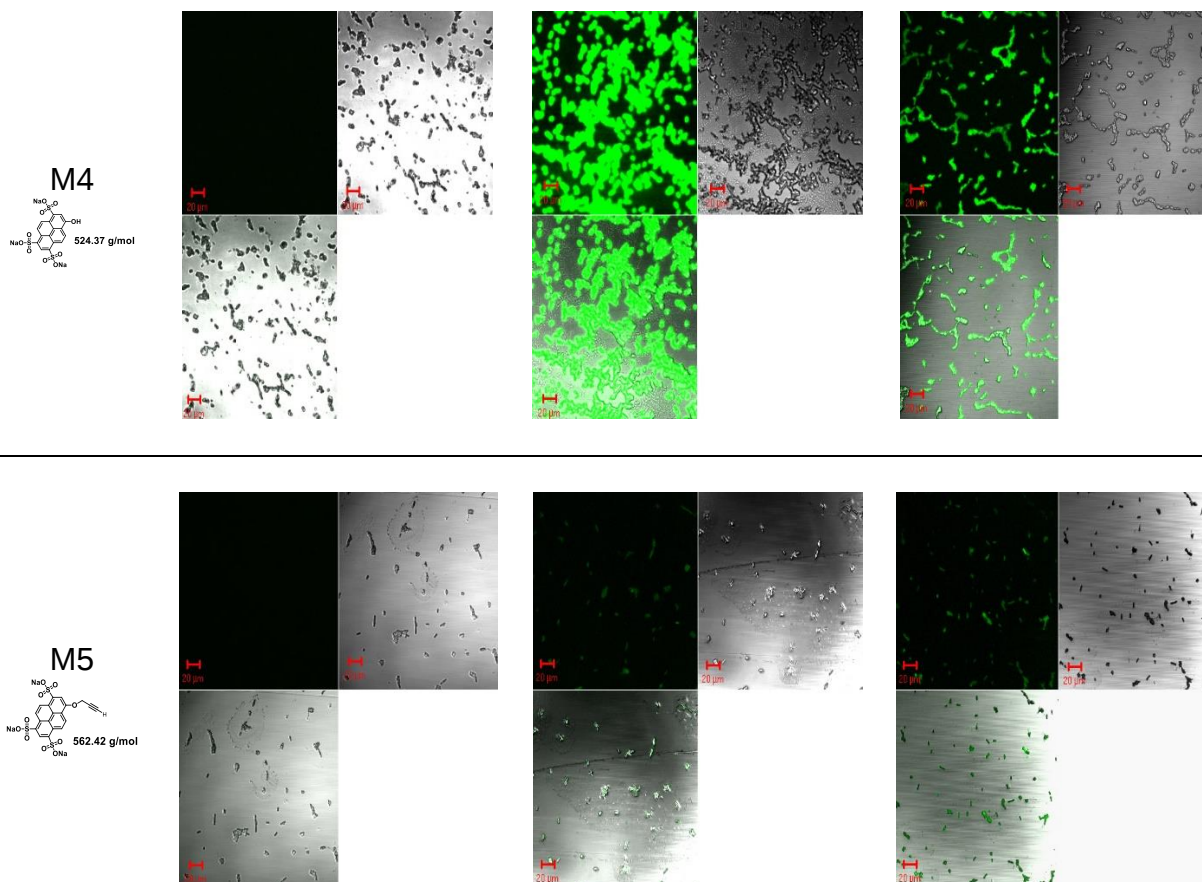
A partir de los resultados obtenidos con el pentámero y las dos cepas manejadas, se planteó la utilización de otros géneros bacterianos con la finalidad de visualizar los perfiles de interacción con las moléculas de pireno sulfonato de sodio fluorescentes. Los resultados referentes a la interacción de los 5 marcadores con las 6 cepas bacterianas se muestran en las siguientes tablas. Con fines del trabajo, se evaluaron 5 cepas no promotoras de crecimiento contra la cepa *B. subtilis* LPM1 identificada como PGPR.

En la Tabla 2 se aprecia el comportamiento que presentó la cepa promotora de crecimiento ***B. subtilis* LPM1** utilizando los 5 marcadores fluorescente, realizando el muestreo de la bacteria en contacto con el marcador sin lavado (SLvd) y aplicando un lavado (1Lvd), lo anterior con la finalidad de apreciar el comportamiento de la molécula con respecto a la pérdida o no por el agua.

Para el caso de esta cepa (LPM1) los marcadores que presentaron mejor interacción fueron el M1 y M4 ya que se observó una alta intensidad en dichas imágenes aun en los tratamientos que se les realizó lavados con H₂O. Mientras que en el caso de los marcadores restantes (M2, M3 y M5) se presentaron pérdidas en la fluorescencia debido al tratamiento de lavado realizado, esto indica que es más factible utilizar marcadores que no se pierdan en gran cantidad por los lavados para las siguientes pruebas a realizar.

Tabla 2. Comportamiento de *B. subtilis* LPM1 de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

Marcador	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 Control	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 + SLvd	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 + 1Lvd
M1 			
M2 			
M3 			



M1= Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida, M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico, M3= marcador pireno sulfonato de sodio con undecanoxo, M4= marcador hidroxypireno sulfonato de sodio, M5= marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace, SLvd= muestra sin realizar lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente y 1Lvd= muestras realizadas con 1 lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente.

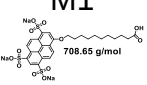
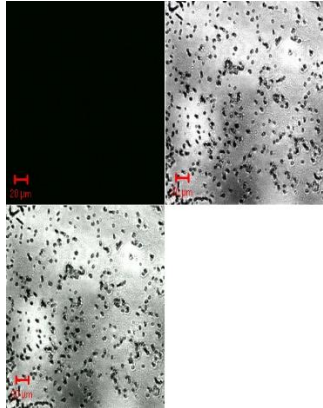
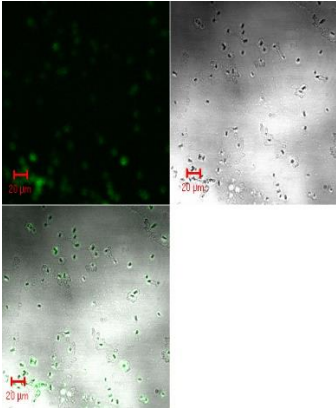
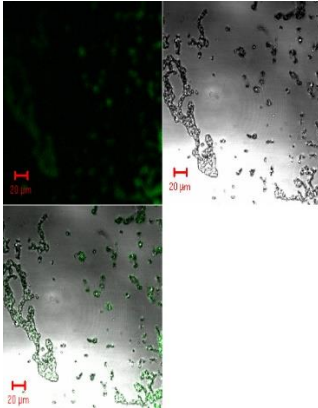
En la Tabla 3 se aprecia el comportamiento que presentó la cepa *B. subtilis* PY79 utilizando los 5 marcadores fluorescentes distintos, realizando el muestreo de la bacteria en contacto con el marcador sin lavado y aplicando un lavado. Esta bacteria fue utilizada en dicho experimento con la finalidad de tener controles positivos y negativos con respecto a la bacteria *B. subtilis* LPM1, buscando en este caso contrastar el comportamiento en dos cepas del mismo género con funciones y estilos de vida diferentes.

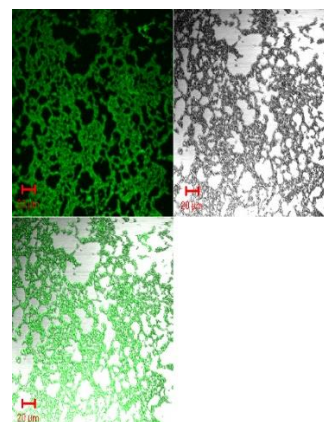
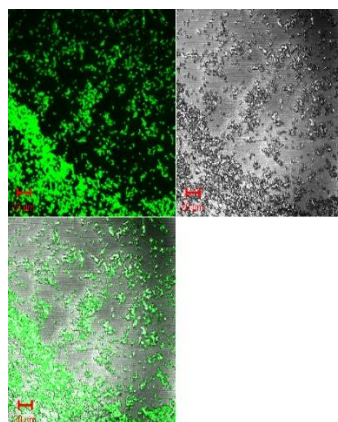
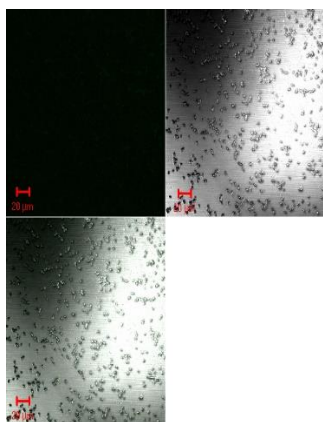
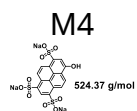
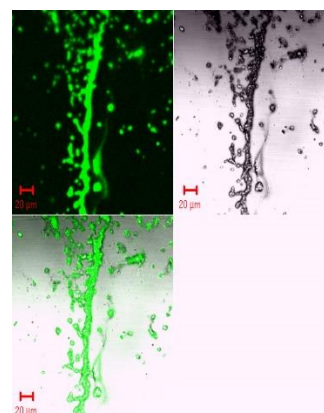
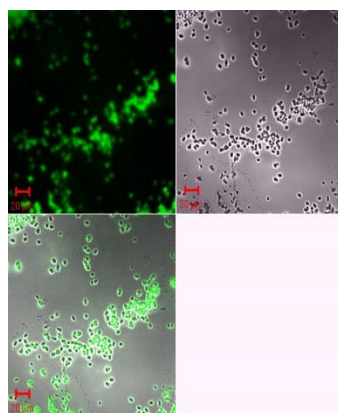
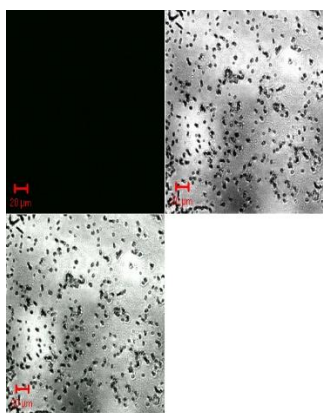
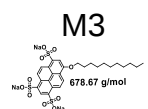
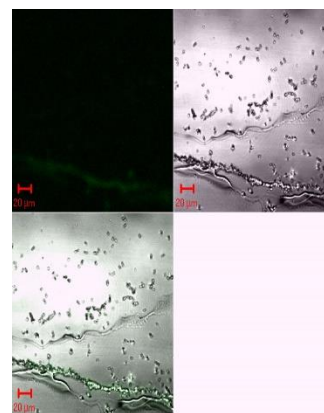
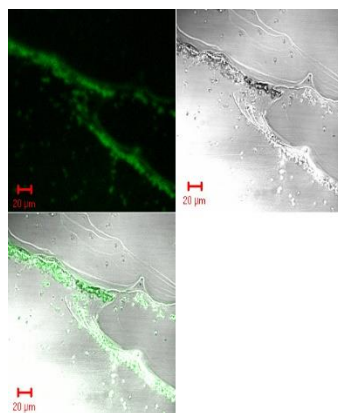
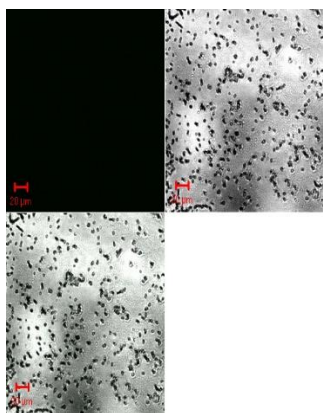
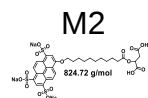
Esta bacteria es utilizada como modelo de estudio a nivel laboratorio, en un trabajo realizado por Valenzuela (2010) en plantas de tomate se probó contra *B. subtilis* BEB-DN

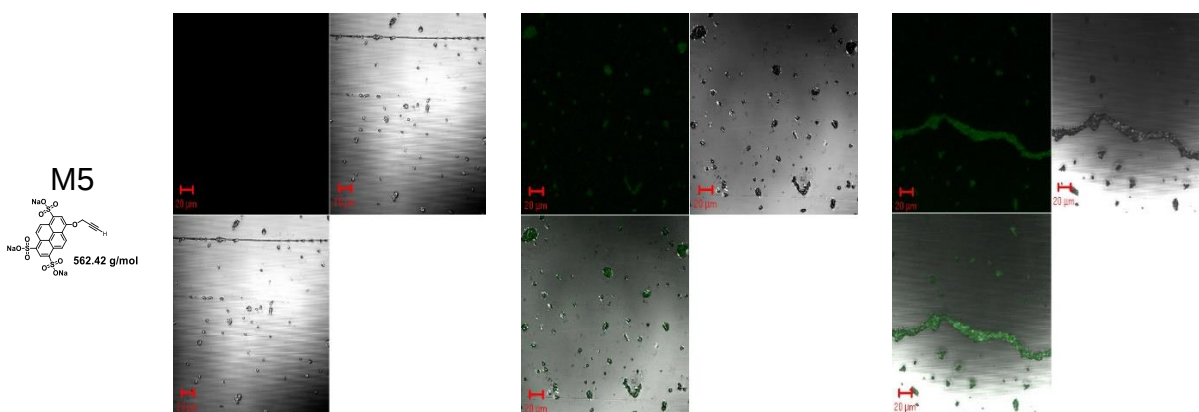
es una promotora de crecimiento, dando como resultado que a pesar de estar en el género de *B. subtilis*, no cumple la función de una PGPR.

En esta bacteria se pudo apreciar una mejor interacción con los marcadores M3 y M4, mientras que en los marcadores restantes (M1, M2 y M5) se presentaron pérdidas de fluorescencia en el tratamiento al que se le realizó un lavado. Es importante resaltar que el comportamiento de interacción de las moléculas fluorescentes con esta cepa no fue similar a *B. subtilis* LPM1, debido a que en el M1 y M2 se observa menor intensidad de fluorescencia aun sin lavado, lo que nos permite determinar por esta prueba de LSCM que la interacción varía hasta en el mismo género bacteriano, lo que indica que probablemente exista una diferencia estructural en ambos bacilos, así como compuestos que interaccionan en la pared celular de cada bacteria ocasionando en conjunto una variación en el comportamiento de cada cepa con su entorno y desarrollo (Hashem, Tabassum, y Fathi, 2019).

Tabla 3. Comportamiento de *B. subtilis* PY79 de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

Marcador	<i>Bacillus subtilis</i> PY79 Control	<i>Bacillus subtilis</i> PY79 + SLvd	<i>Bacillus subtilis</i> PY79 + 1Lvd
M1 			





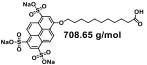
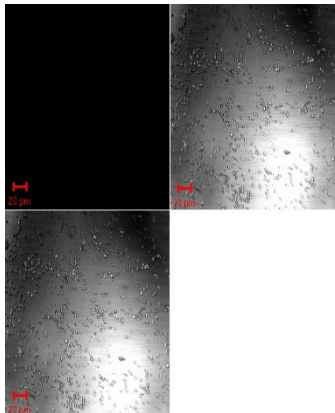
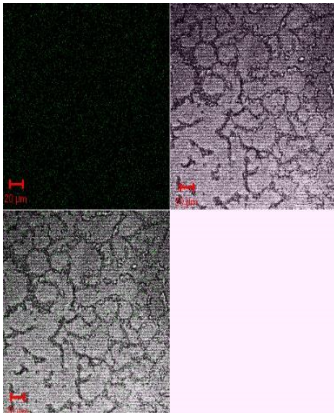
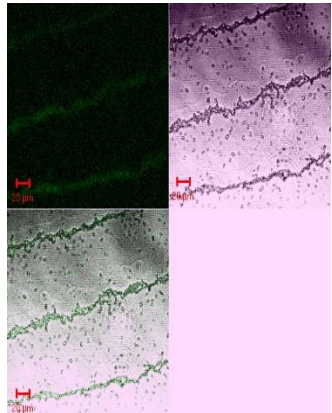
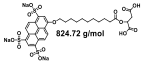
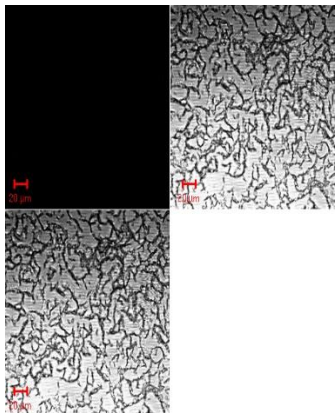
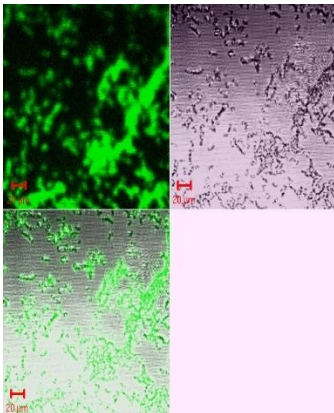
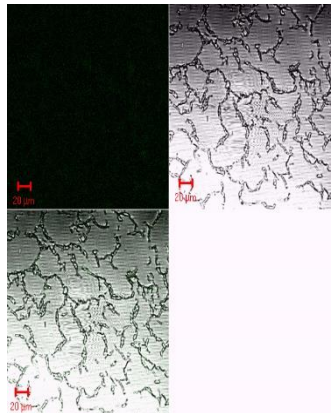
M1= Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida, M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico, M3= marcador pireno sulfonato de sodio con undecanoxy, M4= marcador hidroxi pireno sulfonato de sodio, M5= marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace, SLvd= muestra sin realizar lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente y 1Lvd= muestras realizadas con 1 lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente.

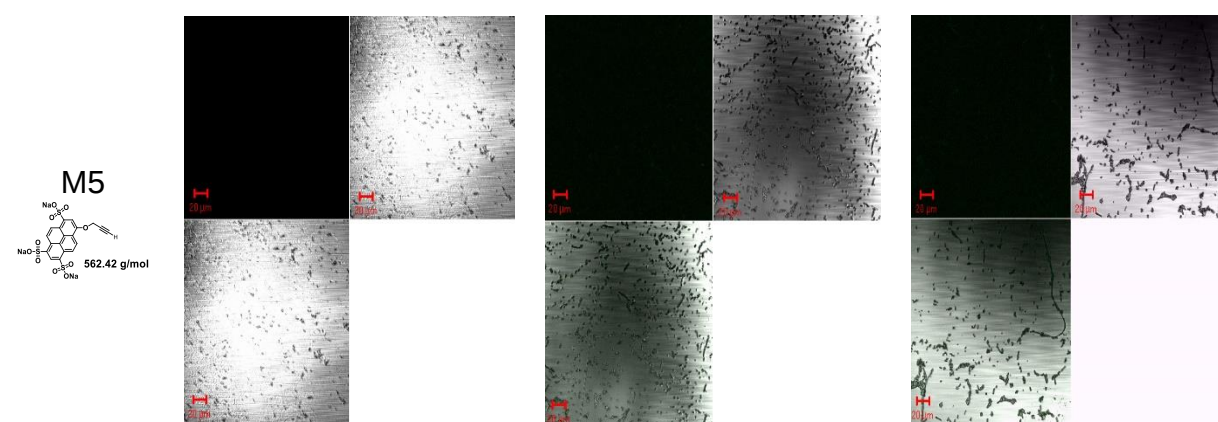
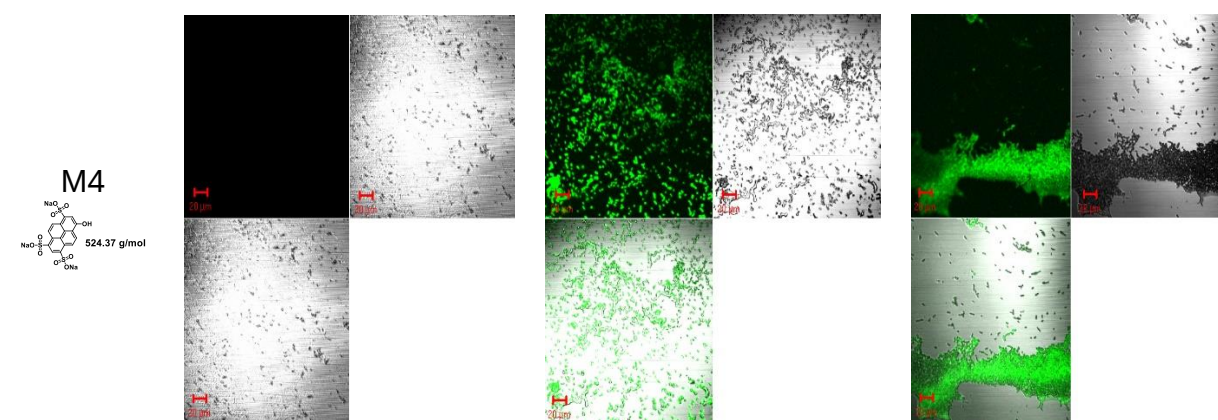
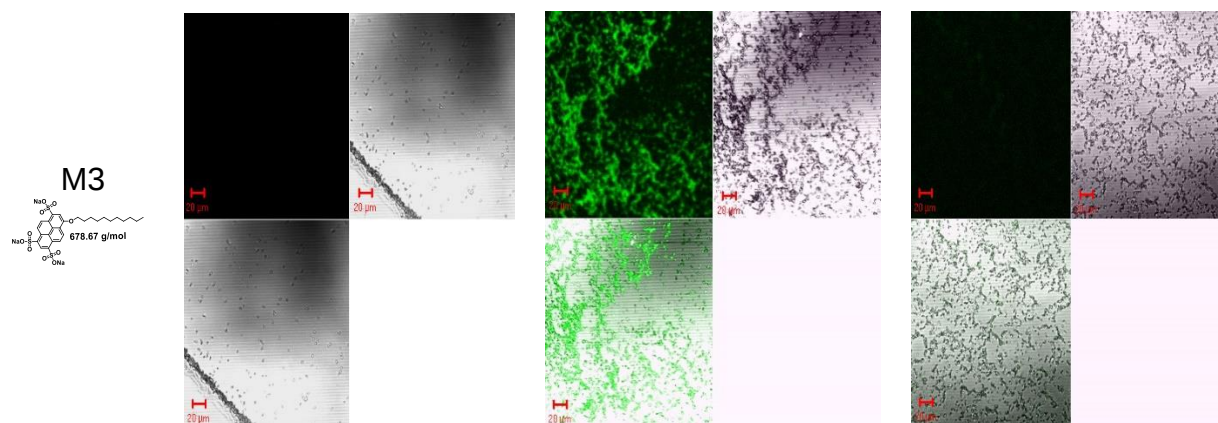
De la Tabla 4 a la Tabla 7 referente a este apartado de resultados muestran las 4 cepas bacterianas restantes utilizadas para dicho experimento. Si bien, el análisis es repetitivo, son un banco de datos para estudios a futuro. Cabe mencionar que estas cepas fueron utilizadas con la finalidad de ver que comportamiento presentaban los marcadores al estar en contacto con diferentes géneros bacterianos y estilo de vida (patógenos), posible variación en la conformación de la pared celular, así como para tener una idea si el marcador propuesto diera indicios característicos de alguna selectividad hacia alguna cepa.

En la Tabla 4 se aprecia el comportamiento que presentó la cepa ***E. coli* DH5α** utilizando los 5 marcadores fluorescente distintos, realizando el muestreo de la cepa bajo los mismos tratamientos, con la finalidad de apreciar el comportamiento del marcador con respecto a la pérdida o no por lavados con H₂O. Esta bacteria fue considerada debido a que es ampliamente utilizada como modelo de estudio en biología molecular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Contrario a las dos cepas anteriores mencionadas, *E. coli* DH5α es Gram-negativo debido a su conformación en la pared celular (Rastogi *et al.*, 2018), la cual, al final mostró un comportamiento de interacción distinto.

A este respecto, el marcador que presentó mayor interacción con esta cepa fue el M4 por la intensidad de fluorescencia emitida, sin embargo, para el M1 a pesar de que la fluorescencia es baja, no se observa una pérdida en la intensidad de fluorescencia en el tratamiento con lavado, mientras que con los otros marcadores se perdió con mucha facilidad después de realizarles el lavado; en aquellos tratamientos que no se les aplicó lavado se aprecia que la intensidad de fluorescencia fue mucho menor para esta bacteria en comparación con las anteriores cepas descritas.

Tabla 4. Comportamiento de *E. coli* DH5α de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

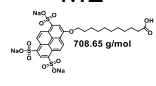
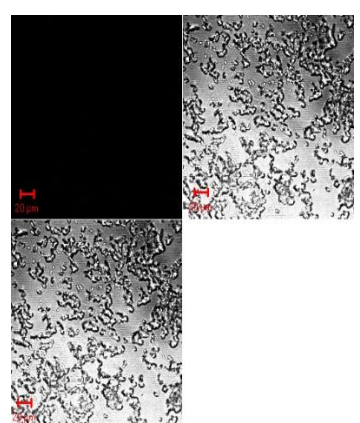
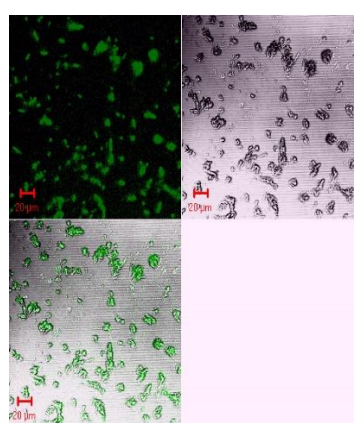
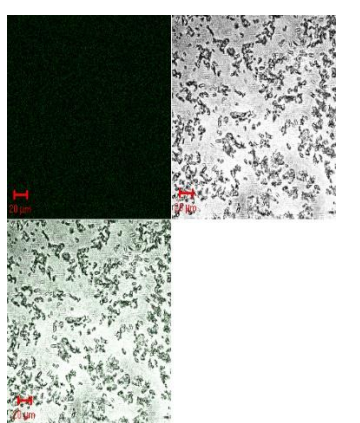
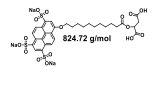
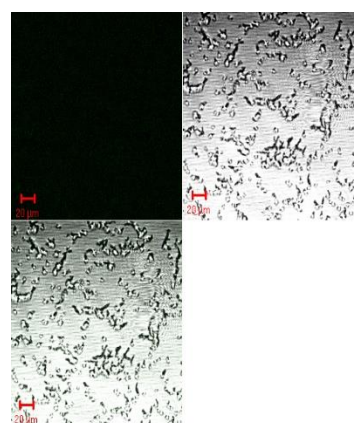
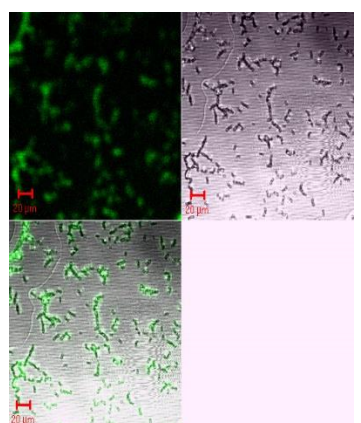
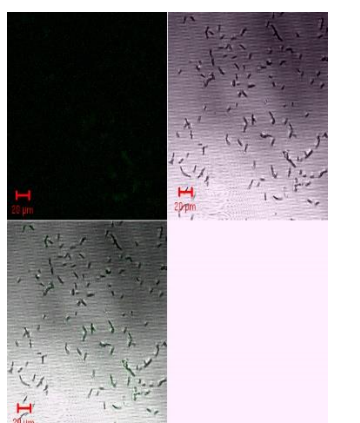
Marcador	<i>Escherichia Coli</i> DH5α Control	<i>Escherichia Coli</i> DH5α + SLvd	<i>Escherichia Coli</i> DH5α + 1Lvd
M1 			
M2 			

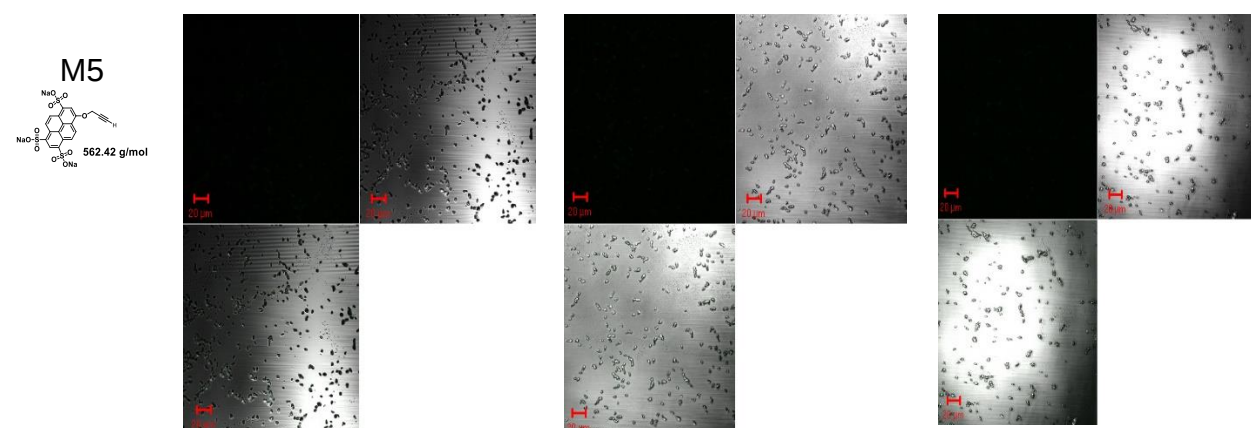
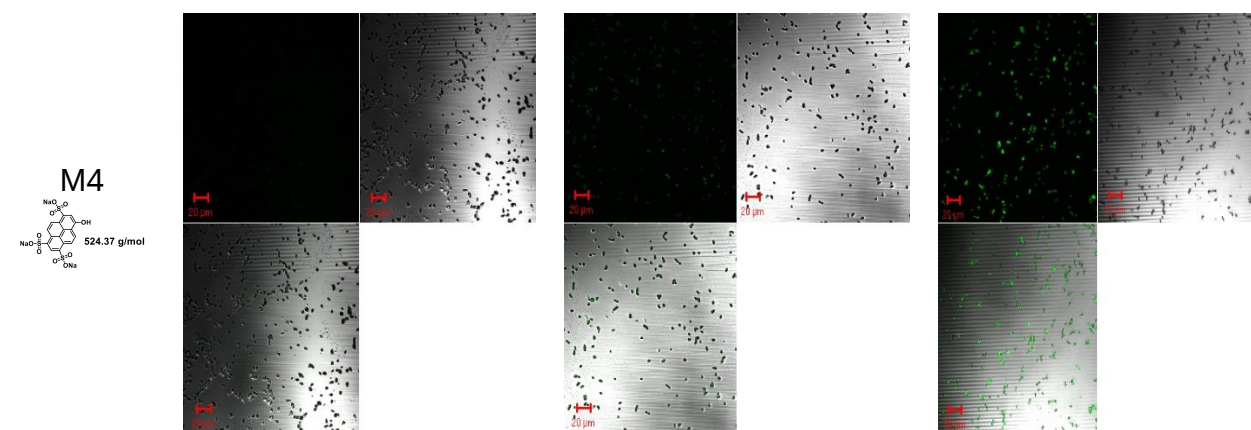
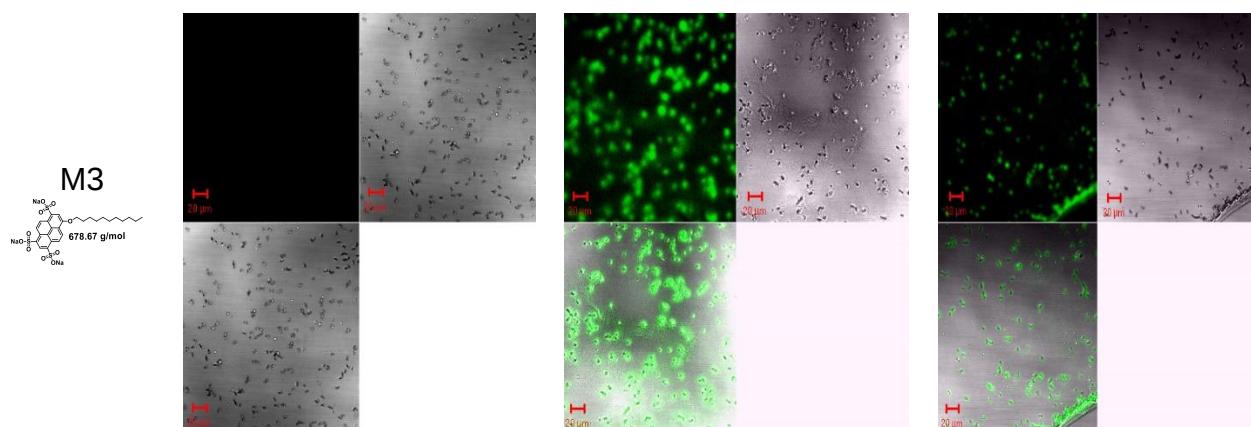


M1= Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida, M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico, M3= marcador pireno sulfonato de sodio con undecanoxo, M4= marcador hidroxi pireno sulfonato de sodio, M5= marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace, SLvd= muestra sin realizar lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente y 1Lvd= muestras realizadas con 1 lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente.

En la Tabla 5 se aprecia el comportamiento que presentó la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 utilizando los 5 marcadores fluorescente distintos, realizando el muestreo de la cepa bajo los mismos tratamientos. En esta bacteria se observó una mejor interacción con el M3, sin embargo, no se descarta el M1 y M4, ya que, a pesar de emitir baja fluorescencia, no presentan gran pérdida en la intensidad al realizar el lavado; para los marcadores restantes (M2 y M5) se presentó una perdida al realizar el lavado. Con estos resultados se puede apreciar que ninguno de los marcadores arrojó una intensidad tan alta como en las imágenes obtenidas para el género *B. subtilis*.

Tabla 5. Comportamiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

Marcador	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 Control	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 + SLvd	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 + 1Lvd
M1 			
M2 			

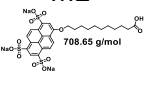
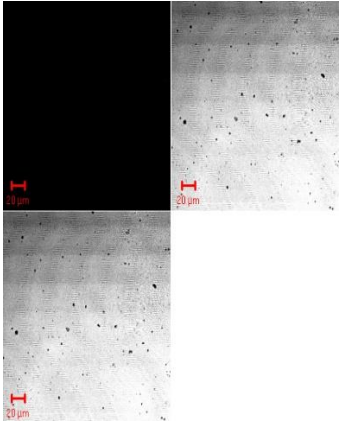
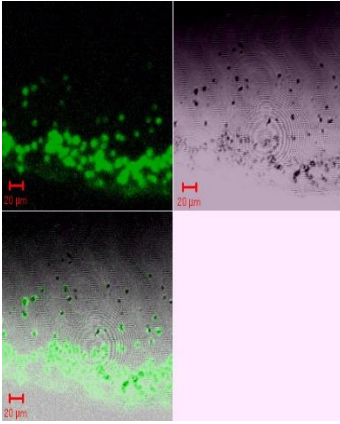
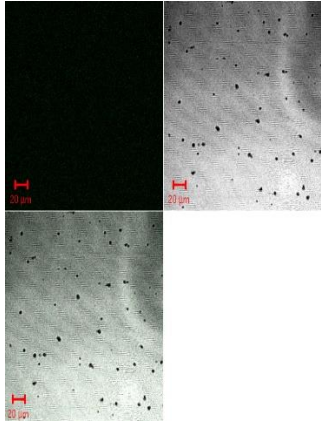
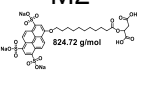
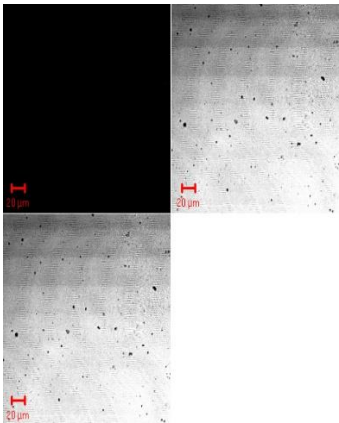
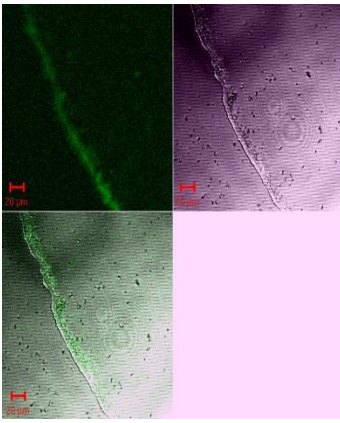
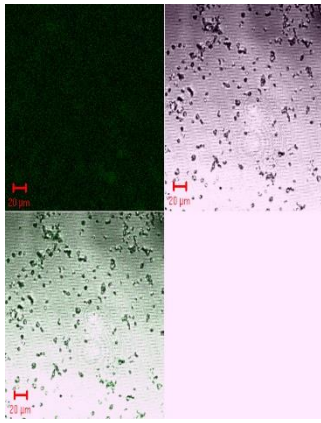


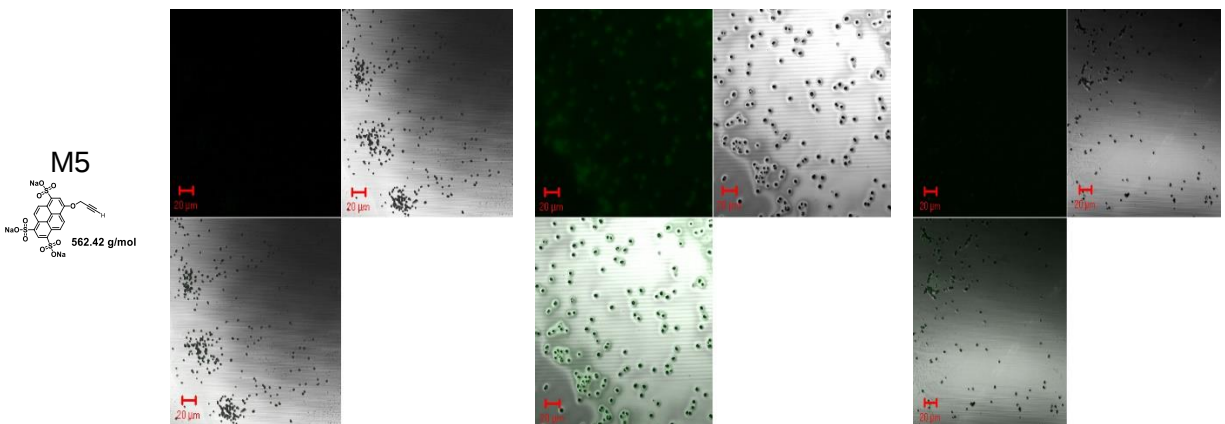
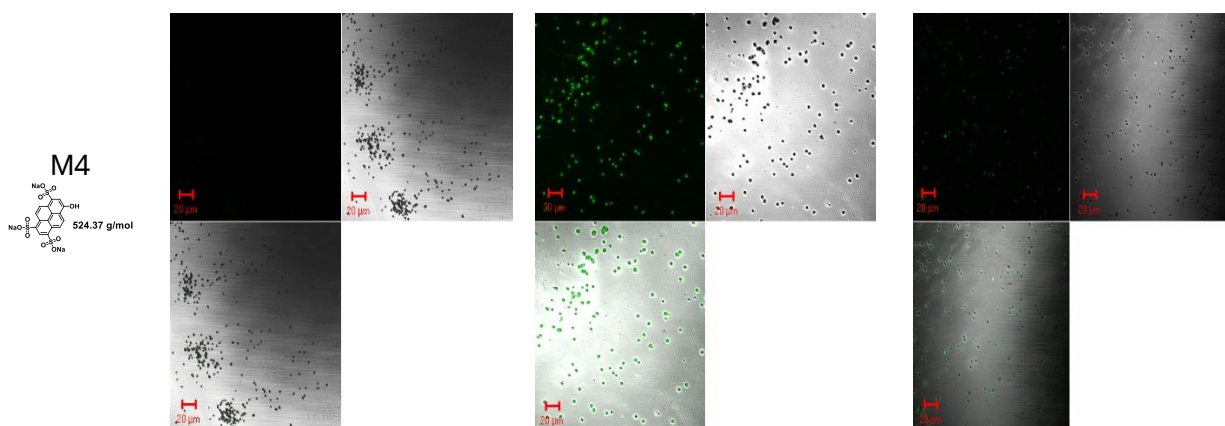
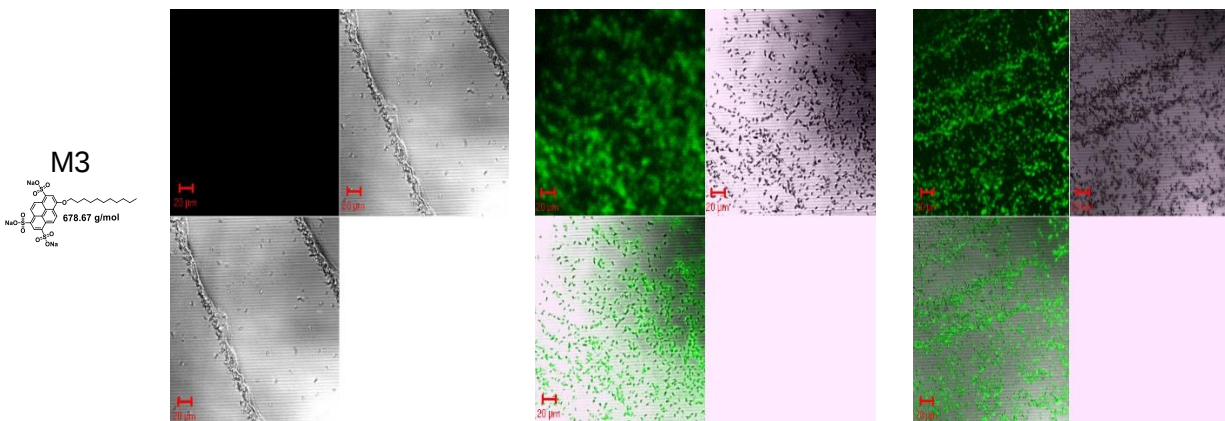
M1= Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida, M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico, M3= marcador pireno sulfonato de sodio con undecanoxo, M4= marcador hidroxi pireno sulfonato de sodio, M5= marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace, SLvd= muestra sin realizar lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente y 1Lvd= muestras realizadas con 1 lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente.

En la Tabla 6 se aprecia el comportamiento que presentó la bacteria *Pectobacterium cacticidum* utilizando los 5 marcadores fluorescente distintos, realizando el muestreo de la cepa bajo los mismos tratamientos.

En esta cepa se puede apreciar que el M1 y M3 presentan una intensidad de fluorescencia alta en los tratamientos sin lavado, en los tratamientos restantes (M2, M4 y M5) se visualiza claramente una perdida al realizar el lavado, estos comportamientos que han presentado las bacterias en la intensidad de fluorescencia sirven como datos que podrían permitir determinar parámetros que indique si existe o no la especificidad de alguna molécula con cierta cepa bacteriana.

Tabla 6. Comportamiento de *Pectobacterium cacticidum* de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

Marcador	<i>Pectobacterium cacticidum</i> Control	<i>Pectobacterium cacticidum</i> + SLvd	<i>Pectobacterium cacticidum</i> + 1Lvd
M1 			
M2 			

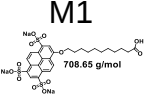
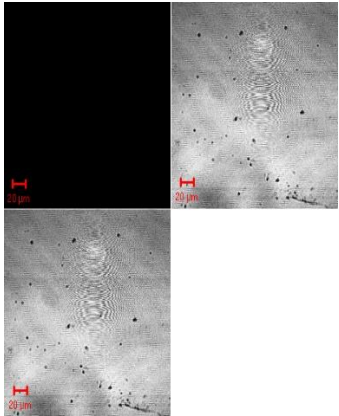
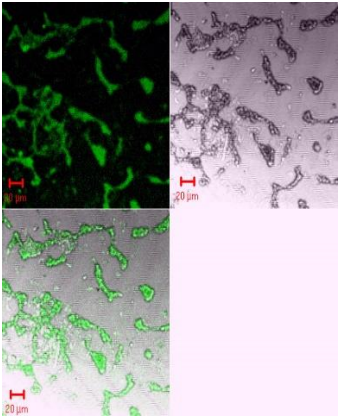
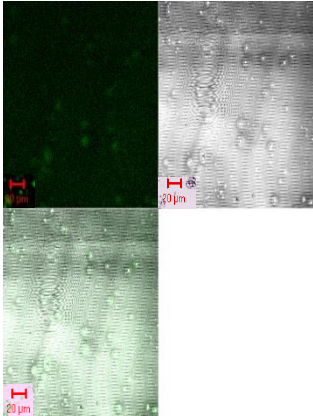
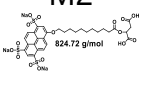
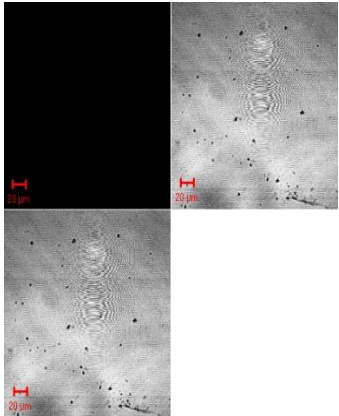
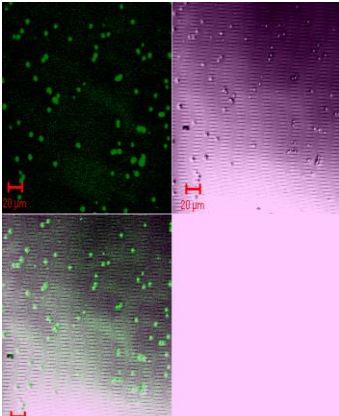
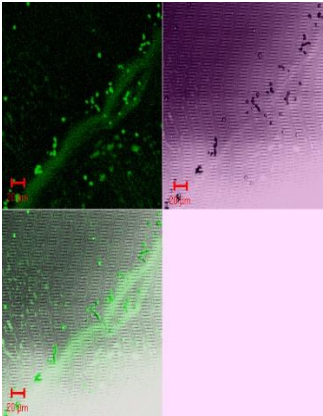
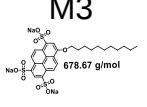
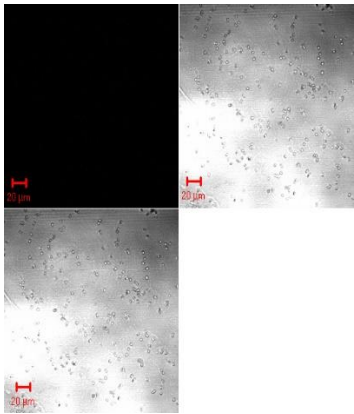
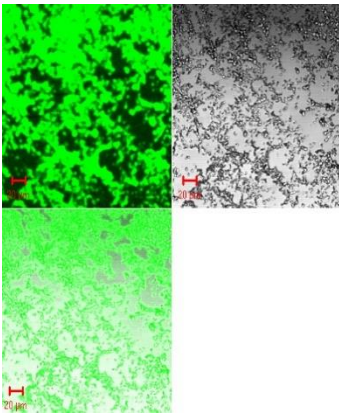
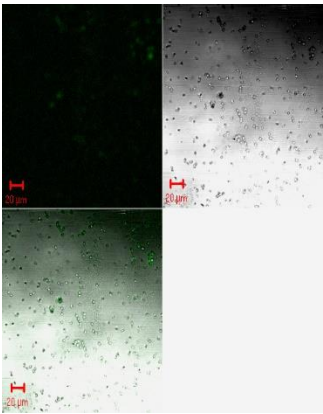


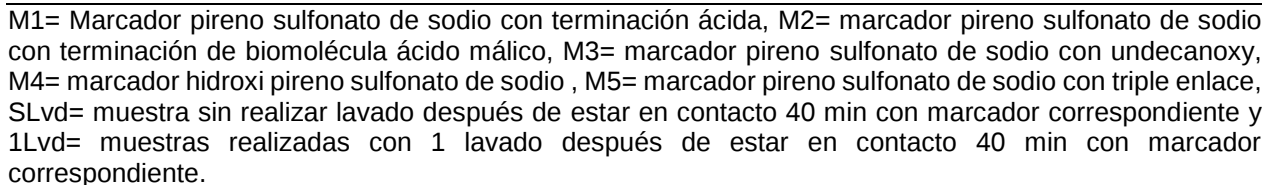
M1= Marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida, M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico, M3= marcador pireno sulfonato de sodio con undecanoxo, M4= marcador hidroxipireno sulfonato de sodio, M5= marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace, SLvd= muestra sin realizar lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente y 1Lvd= muestras realizadas con 1 lavado después de estar en contacto 40 min con marcador correspondiente.

En la Tabla 7 se aprecia el comportamiento que presentó la cepa ***Agrobacterium sp.*** utilizando los 5 marcadores fluorescente distintos, realizando el muestreo de la bacteria bajo los mismos tratamientos.

En esta bacteria se presenta una alta intensidad de fluorescencia con el M3, sin embargo, para todos los tratamientos realizados con lavado se presenta una pérdida considerable de la molécula, ya que la intensidad de los 5 marcadores aplicados disminuyó notoriamente. Estos datos obtenidos, únicamente permiten determinar si se presenta o no la interacción entre las cepas bacterianas, sin embargo, no se puede afirmar a que factor se debe la interacción con mayor o menor intensidad de fluorescencia en algunas bacterias, ni a que parte estructural se están uniendo los fluoróforos al estar en contacto determinado tiempo.

Tabla 7. Comportamiento de *Agrobacterium sp.* de ensayo *in vitro* sometida a 5 diferentes marcadores fluorescentes, imágenes representativas de un ensayo independiente.

Marcador	<i>Agrobacterium sp.</i> Control	<i>Agrobacterium sp.</i> + SLvd	<i>Agrobacterium sp.</i> + 1Lvd
M1 			
M2 			
M3 			



98

Se sabe que la estructura de la pared celular de las bacterias es muy variante al ser Gram-positivo o Gram-negativo (Silhavy, Kahne y Walker, 2010), pero este parámetro hasta el momento, no permite determinar en específico que sea un factor primordial en la interacción o no con las moléculas; al tener cepas bacterianas del grupo Gram-positivo (*B. subtilis* LPM1 y *B. subtilis* PY79) y Gram-negativo (*E. coli* DH5 α , *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pectobacterium cacticidum* y *Agrobacterium* sp.) no presentaron un patrón específico en su comportamiento para poder adjudicar a estas estructuras la interacción presentada.

La obtención de estos resultados abre una ventana para explorar el comportamiento en la interacción de marcador-bacteria, con el propósito de encontrar moléculas específicas o algún rasgo estructural que se vea involucrado en la interacción con los marcadores y sea responsable en la emisión de fluorescencia al estar interaccionando.

VII.3.1.1.1. Espectroscopía de fluorescencia.

Debido a los comportamientos variantes que presentaron las cepas bacterianas al interaccionar con cada marcador, tal y como se observó por LSCM, se optó por evaluar cuantitativamente su intensidad de emisión mediante espectroscopía de fluorescencia, la cual permitió determinar y corroborar los datos anteriormente descritos.

En la Figura 29 se presentan los datos obtenidos para la cepa ***B. subtilis* LPM1** al interaccionar con los 5 marcadores fluorescentes. Se puede apreciar los distintos comportamientos de la interacción bacteria-marcador; en general para los 5 tratamientos aplicados, se puede visualizar que la bacteria por sí sola presenta una intensidad muy baja de fluorescencia, ya que estas no superan los 500,000 conteos de intensidad.

Todos los tratamientos sin lavado presentaron un ligero desplazamiento hacia el color azul (Tobaldi *et al.*, 2019; Zambrano, 2019) obteniendo el promedio aproximadamente a los 500 nm su mayor pico de intensidad de fluorescencia con respecto en solución, cuyo promedio fue a 426 nm. Este fenómeno se puede atribuir a que las moléculas fluorescentes pueden presentar un desplazamiento en la emisión debido a estar en

película, donde hay interacciones en estado sólido (Arias *et al.*, 2017), la presencia de la fluorescencia en las cepas bacterianas tiene que ser en forma de nanopelícula por lo cual se presentó este desplazamiento comparado con las moléculas solas.

El comportamiento de interacción de las moléculas fluorescentes con las bacterias fue muy variado, para los marcadores M2, M3 y M5, la intensidad de fluorescencia se vio disminuida. Este comportamiento se debe a que, al encontrarse las células bacterianas recubiertas de los marcadores, la señal de fluorescencia se crea un fenómeno conocido como amortiguación de la fluorescencia o *quenching*, en el cual se ve reducida la emisión por la actividad de mecanismos involucrados en el retorno al estado energético basal (Juliá, 2006).

Caso contrario se presentó con las moléculas M1 y M4, donde la interacción del marcador con las bacterias generó una mayor intensidad de fluorescencia, en la literatura se encuentra reportado que existen polisacáridos en la superficie celular de las bacterias que están relacionados con la agregación de células bacterianas. La proteína bacteriana mayor de la membrana externa (MOMP), presente en esta bacteria, podrían estar involucradas en este fenómeno por una buena interacción entre éstas y las moléculas fluorescentes (Dutta, Rani y Podile, 2013), sin embargo, este dato solo es una suposición del posible comportamiento, ya que no se realizó una prueba que determinara exactamente a que estructura de la bacteria se estaba uniendo el marcador, lo cual constituye un trabajo que se llevara a cabo en el futuro.

El comportamiento presentado en espectroscopía de fluorescencia concuerda con la actividad que se visualizó en LSCM (Tabla 2), ya que los mejores tratamientos cualitativamente obtenidos para esta cepa (LPM1) presentando lavados fue M1 y M4, mientras que en los restantes tratamientos de interacción la disminución de fluorescencia era mayor.

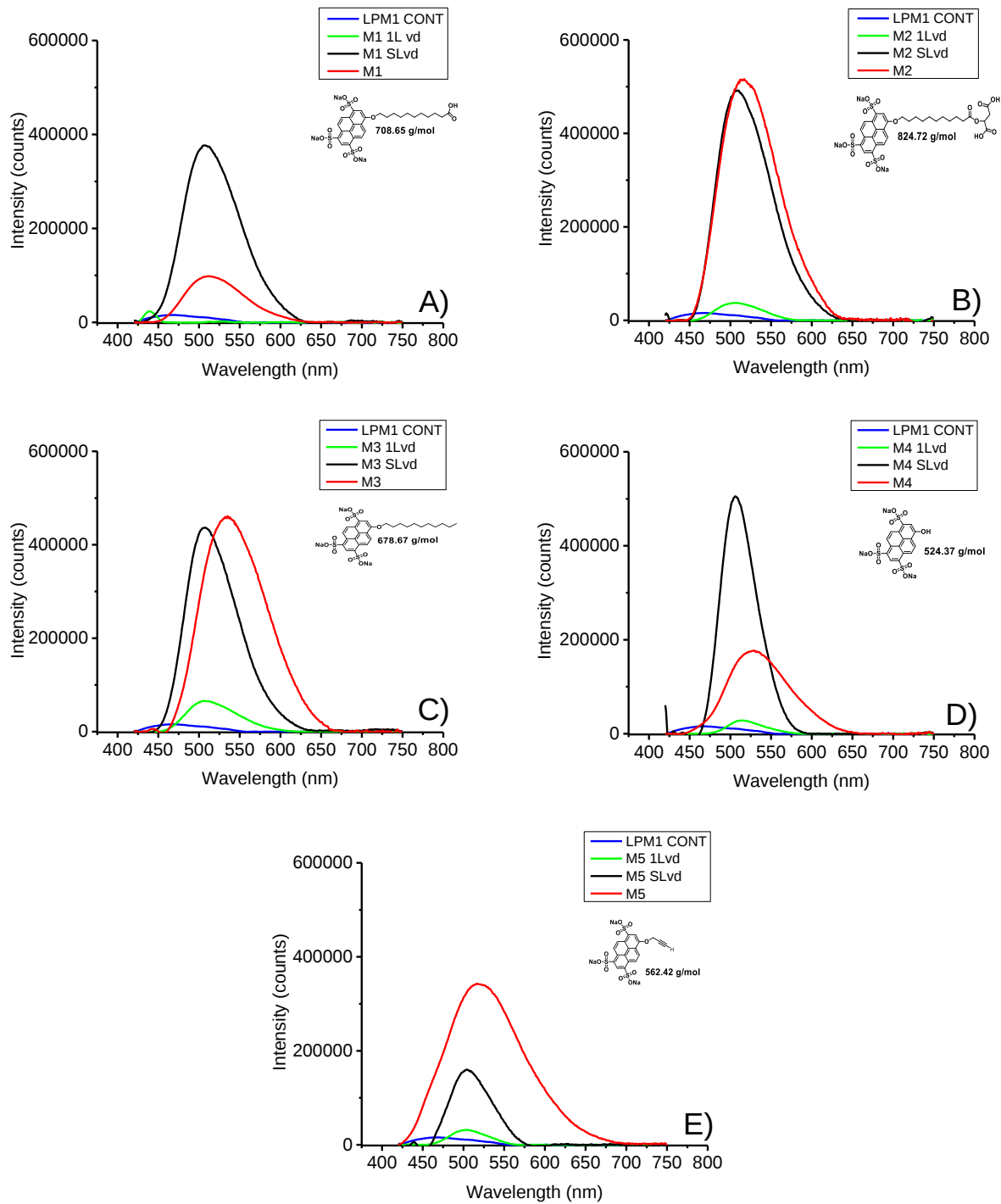


Figura 29. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *B. subtilis* LPM1 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

En la Figura 30 se puede apreciar el comportamiento de la cepa ***B. subtilis* PY79** donde la bacteria control no tiene una intensidad de fluorescencia que intervenga en los procesos; en todos los casos se muestra como una línea azul muy cercana al 0; en el espectro de emisión se visualiza un desplazamiento hacia la izquierda, fenómeno que se presentó también en la bacteria anteriormente mencionada. Esta actividad se atribuye a los factores previamente descritos, donde al ocurrir un cambio en el entorno de la molécula fluorescente ocasiona un desplazamiento en el espectro de emisión (Vela, 2016).

Los marcadores M2, M3, M4 y M5, presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en la molécula sola, mientras que los tratamientos que se encuentran en interacción fueron menores. El M1 presentó un comportamiento contrario ya que los tratamientos con lavado y sin lavado para este marcador superaron al tratamiento con la molécula sola, este comportamiento de superioridad, se puede adjudicar a que la molécula M1, presentó una mejor afinidad con esta cepa bacteriana en comparación con los otros marcadores, por eso la respuesta fue más intensa aun realizando el lavado correspondiente.

De manera cualitativa los tratamientos obtenidos en LSCM, indican que aquellos que presentaban mejor interacción con esta cepa era el M3 y M4 (Tabla 3) debido a la intensidad de fluorescencia que se presenta, para esta evaluación se manifestó el mismo comportamiento, aunque hubo una disminución en la intensidad, esta no fue tan baja como en los otros tratamientos (M2 y M5). Para el M1 las imágenes de LSCM no muestran una disminución en fluorescencia aun realizando el lavado correspondiente, lo que permite determinar que esta molécula también presenta una buena interacción con la bacteria, visualizando en el inciso A el valor de intensidad de fluorescencia más alto que en cualquier otro tratamiento aplicado.

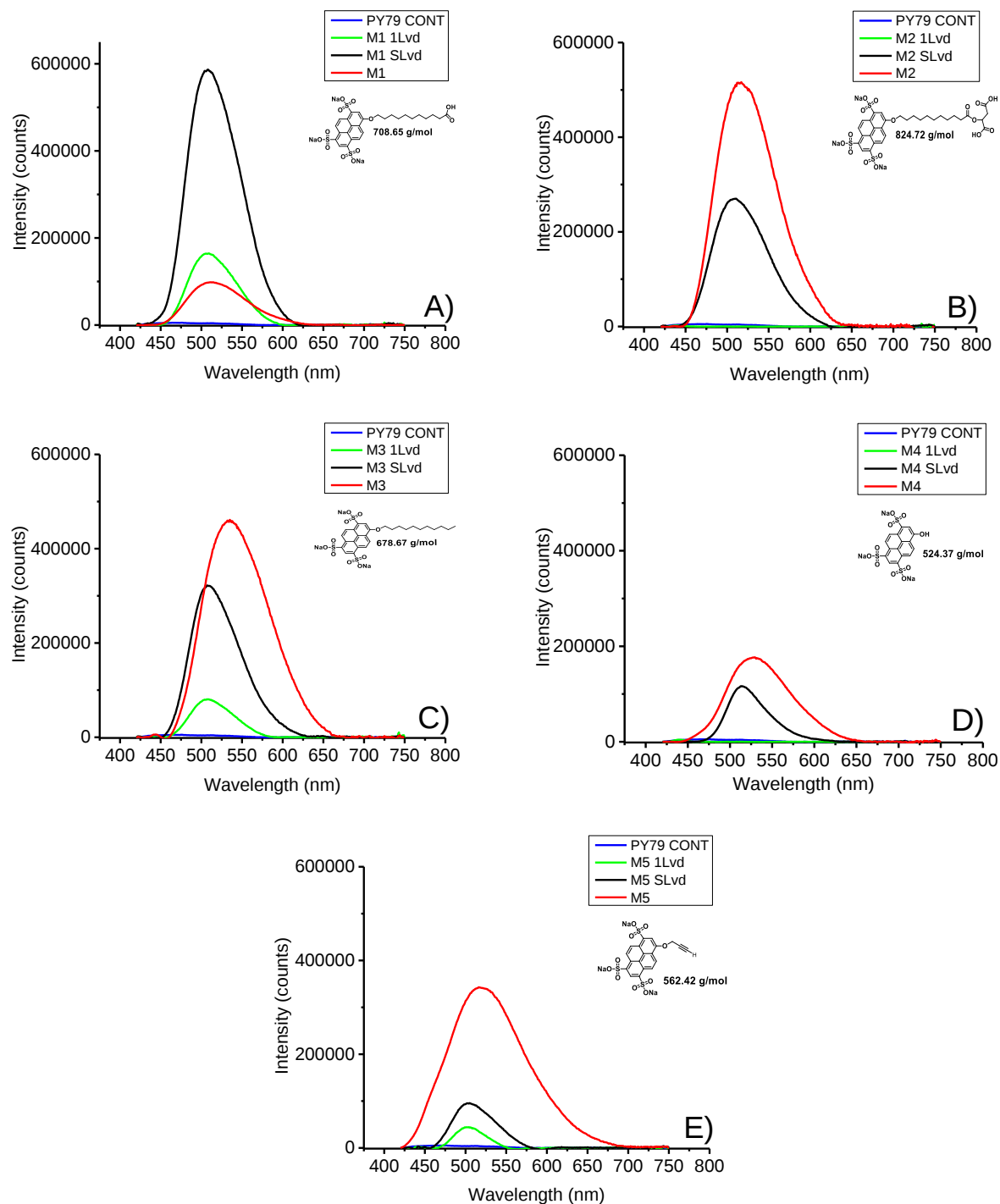


Figura 30. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *B. subtilis* PY79 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

En la Figura 31 se presenta el comportamiento obtenido por la bacteria *E. coli* DH5 α , nuevamente se presenta un desplazamiento del espectro de emisión para los tratamientos; los marcadores M2, M3, M4 y M5 emiten una mayor intensidad de fluorescencia que los que se encuentran interaccionando con la bacteria.

El control respectivo de este ensayo presenta una intensidad nula para esta bacteria. En la interacción con el M1 para este ensayo se observa que los tratamientos con lavado y sin lavado son superiores a la molécula sola, lo que nuevamente se puede atribuir a que ocurrió una mejor afinidad entre esta cepa bacteriana y esta molécula fluorescente probablemente por la alta afinidad con alguna proteína transmembranal ocasionando una mayor interacción que con las otras moléculas (Dutta *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en esta prueba comparados con los de LSCM, presentó que de manera cualitativa el M4 mostraba una mejor interacción con la bacteria debido a la fluorescencia que emitían las laminillas (Tabla 4), mientras que en este ensayo se presentó una baja intensidad; aunque disminuyó la intensidad de fluorescencia en esta prueba. Los resultados también nos indican que la interacción entre la cepa bacteriana y esta molécula se considera estable aun con el tratamiento de lavado, ya que la pérdida de fluorescencia fue mínima en comparación con otros tratamientos.

Para el resto de los tratamientos (M1, M2, M3 y M5) la relación entre ambas pruebas concuerda a los datos obtenidos en ésta, cabe mencionar que existe una diferencia entre la intensidad innata de cada molécula fluorescente pura, lo cual hace más visible la variabilidad entre la fluorescencia capturada en LSCM y en los espectros de emisión de la prueba de espectroscopía de fluorescencia.

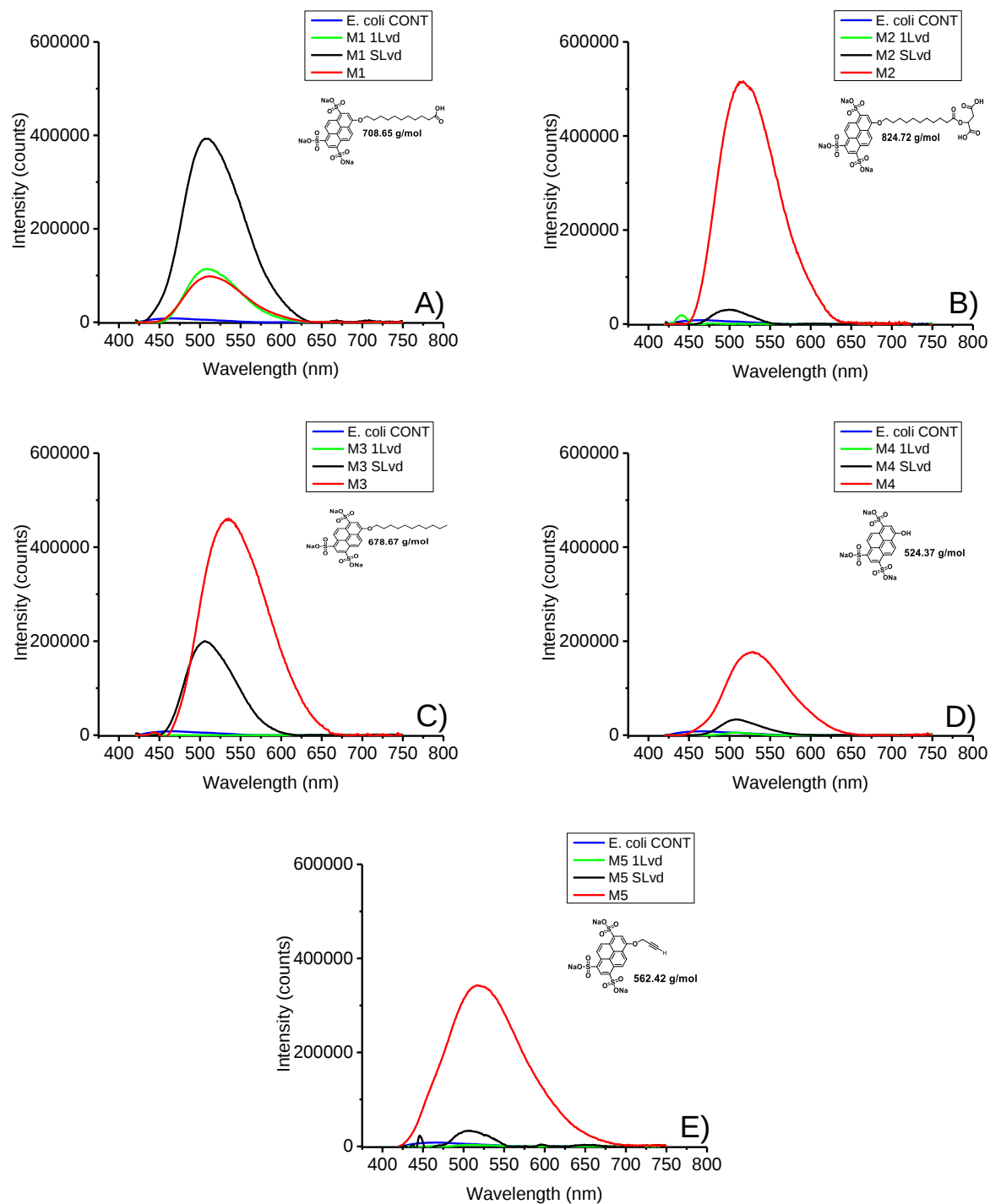


Figura 31. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *E. coli* DH5α interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

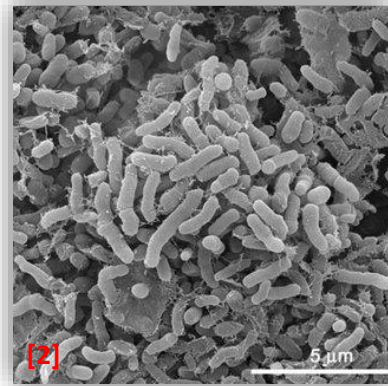
Los resultados representativos de espectroscopía de fluorescencia de las 3 cepas bacterianas restantes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pectobacterium cacticidum* y *Agrobacterium* sp. interaccionando con 5 moléculas fluorescentes, se encuentran en Anexo a. (Figura 43 a la Figura 45) debido al comportamiento similar de los resultados anteriormente descritos. Sin embargo, de todas las evaluaciones sobresale los ensayos hechos con el M1. A manera de resumen esto se representan en la Tabla 8 donde se muestran las mejores interacciones presentadas por las 6 bacterias con los 5 marcadores fluorescentes evaluadas en los ensayos de LSCM y espectroscopía de fluorescencia.

Tabla 8. Resumen de comportamiento presentado en la interacción bacteria-marcador fluorescente en las pruebas de LSCM y espectroscopía de fluorescencia, así como la morfología característica del género bacteriano de las 6 cepas probadas (imágenes ilustrativas).

Cepa	Mejor interacción Bacteria-Marcador	Morfología característica de género bacteriano
<i>B. subtilis</i> LPM1	M1* y M4	 [1]
<i>B. subtilis</i> PY79	M1, M3* y M4	 [1]

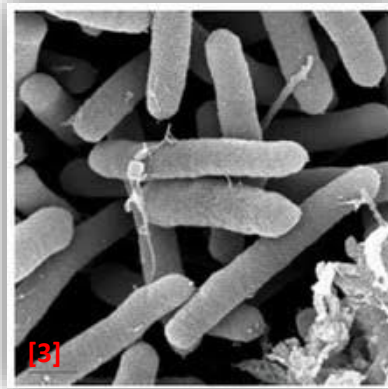
E. coli DH5α

M1* y M4



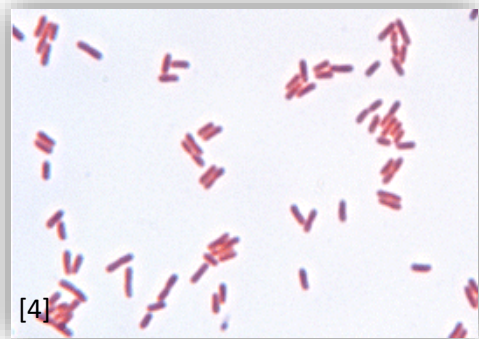
Pseudomonas
syringae pv. *tomato*
DC3000

M1*, M3 y M4



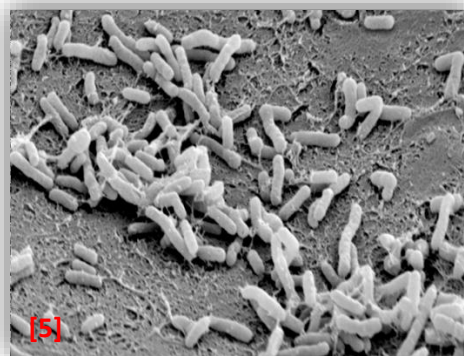
Pectobacterium
cacticidum

M1*, M3 y M4



Agrobacterium sp.

M1*, M3 y M4



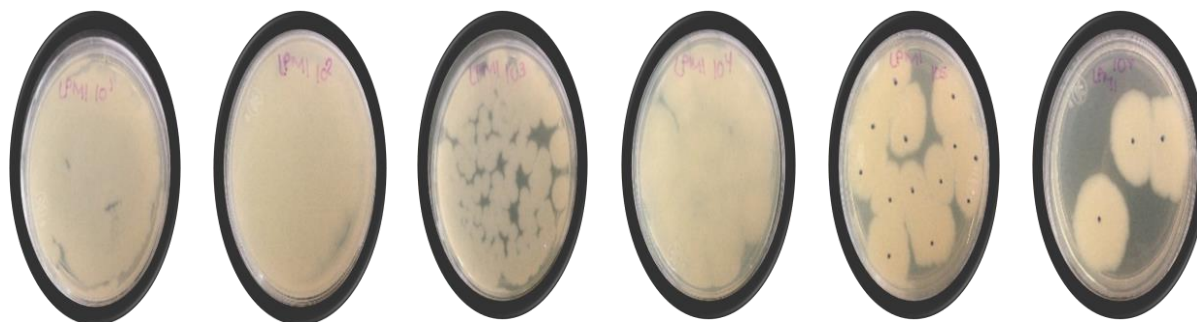
El * posicionado en la parte izquierda de los marcadores representa el marcador con el que la interacción fue mejor en las pruebas sometidas, [1] (IndiaMART, 2013), [2] (Annous, Fratamico, & Smith, 2009), [3] (Hardy, 2010), [4] (Niemi *et al.*, 2017) y [5] (Labroots, 2015).

VII.3.1.1. Cuantificación de UFC de 6 cepas bacterianas.

De las pruebas realizadas para identificar el comportamiento presentaba la interacción entre bacterias con los marcadores, se procedió a realizar el conteo de UFC, con la finalidad de determinar un estimado de la población presente (Lacroix *et al.*, 1996; Fillit *et al.*, 2010) en las muestras analizadas, la Tabla 9 muestra de manera representativa la prueba aplicada a la cepa *B. subtilis* LPM1.

Tabla 9. Cajas petri inoculadas con bacteria *B. subtilis* LPM1 a una $D_{0600nm} = 0.1$ para cuantificación de UFC · mL⁻¹. Imágenes representativas de un ensayo independiente.

<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ¹	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ²	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ³	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ⁴	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ⁵	<i>Bacillus subtilis</i> LPM1 10 ⁶
--	--	--	--	--	--



En la Tabla 10 se muestran los datos analizados correspondientes a un ensayo independiente para las 6 cepas bacterianas, la dilución 10^6 fue utilizada debido a la facilidad del conteo de colonias en placas mediante esta técnica (Golan *et al.*, 2010) basándose en diluciones seriadas en medios específicos. Independiente de que todas las muestras fueron ajustadas a una $DO_{600nm} = 0.1$, no se logró obtener el mismo número de $UFC \cdot mL^{-1}$, lo cual es atribuido a que las bacterias presentan diferencias en su cinética de crecimiento, debido a que el desempeño del metabolismo es variable en cada bacteria (Köhl *et al.*, 2011), incluso el uso de medios ricos en nutrientes, sintéticos o específicos, así como la temperatura puede generar dicha variación en algunos microorganismos (Schisler y Slininger, 1997). Para fines del trabajo, optamos por tratar de homogenizar la población basando en una $DO_{600nm} = 0.1$

Tabla 10. Datos analizados para cuantificación de $UFC \cdot mL^{-1}$ de 6 cepas bacterianas representativos de un ensayo independiente mostrando el conteo en la dilución 10^6 .

Cepa bacteriana	$UFC \cdot mL^{-1}$
<i>Bacillus subtilis</i> LPM1	6.4×10^8
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	8.0×10^7
<i>Escherichia Coli</i> DH5 α	4.9×10^8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000	6.4×10^9
<i>Pectobacterium cacticidum</i>	6.4×10^8
<i>Agrobacterium</i> sp.	4.8×10^8

VII.4. Promoción de crecimiento en 3 variedades de tomate.

Las PGPR, como se ha descrito en información previa, son utilizadas desde algunas décadas y en la actualidad como estrategias favorables en la agricultura, funcionando en muchos casos como biofertilizantes, fitoestimuladores, cicladores de nutrientes y/o biocontroladores (Gaiero *et al.*, 2013), como es el caso de la cepa de interés de este trabajo *B. subtilis* LPM1. La aplicación de esta cepa bacteriana en un ensayo de 3

variedades de tomate crecidas bajo condiciones de invernadero presentó diferencias estadísticamente significativas en el parámetro biométrico de biomasa seca de raíz, en la variedad Micro-Tom obtenido mediante un análisis destructivo, dicho resultado se observa en la Figura 33.

Cabe mencionar que este experimento fue desarrollado debido a que la variedad Micro-Tom, la cual fue de suma importancia para el desarrollo del experimento, no se encontraba reportada en algún trabajo con pruebas referente a los efectos causados en parámetros biométricos por alguna PGPR. Por tal motivo, se optó por montar dicho trabajo con la finalidad de comprobar la eficacia de la cepa *B. subtilis* LPM1 interaccionando con esta variedad de tomate, ya que una de las características que presentan las plantas al estar en contacto con rizobacterias, es la promoción de crecimiento en tejido radicular en distintas especies vegetales (Green y Sambrook, 2012) fenómeno que se presentó en la variedad de tomate de interés para el presente trabajo.

En la Figura 32 se puede visualizar el comportamiento radicular de la variedad Micro-Tom, donde se representa que la biomasa de dicha zona era mayor para las plantas que fueron tratadas con la bacteria *B. subtilis* LPM1. Se presentó el proceso de inhibición de la raíz principal para aumentar la generación de secundarias y pelos radiculares, este efecto se atribuye en diversos trabajos a que las rizobacterias en algunos casos, son capaces de mejorar la proliferación de las raíces, debido a la producción de AIA (Peñafiel-Jaramillo *et al.*, 2016) y la hidrólisis de la ACC por la ACC desaminasa, lo cual genera la disminución del contenido de etileno de las plantas ocasionando el incremento en las raíces (Mommer *et al.*, 2016). Con estos datos se pudo determinar que la variable de biomasa seca de la raíz presentó un 81.48% de $\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ en los tratamientos que fueron inoculados con la cepa bacteriana superiores al control.

La actividad que presenta esta bacteria al estar en contacto con plantas estudiadas, ha determinado que tiene la función principal de producir en la planta el incremento en raíces secundarias y pelos radiculares con la finalidad de tener mayor área contacto con el suelo y de esta forma absorber más cantidad de nutrientes y agua necesarios para el desarrollo y crecimiento de la planta (Compant *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016).

Micro – Tom.



Figura 32. Captura de zona radicular de ensayo montado en invernadero, donde se observa que las plantas que fueron tratadas con la bacteria *B. subtilis* LPM1 muestran un incremento en las raíces laterales y pelos radiculares en comparación con el control que presenta una mayor longitud en la raíz principal.

Para el caso de la variedad Floradade también presente en la Figura 33, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en esta variable evaluada, esto se le atribuye a que la planta de esta variedad es más grande que las otras dos variedades, tanto foliar como radicular (Lakshmanan *et al.*, 2014; Paudel *et al.*, 2014; Quesada-Ocampo *et al.*, 2016) (Figura 34), por lo cual las fechas en las que fueron realizados los análisis destructivos permitieron a la planta producir mayor contenido de raíz aceptable por la maceta en la que se encontraba, lo cual impidió que se desarrollaran de una forma óptima. En un ensayo similar realizado por Ibáñez (2019 tesis de licenciatura en proceso) indica que en los primeros muestreos donde la planta tenía área favorable para el desarrollo de su órgano radicular se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la evaluación.

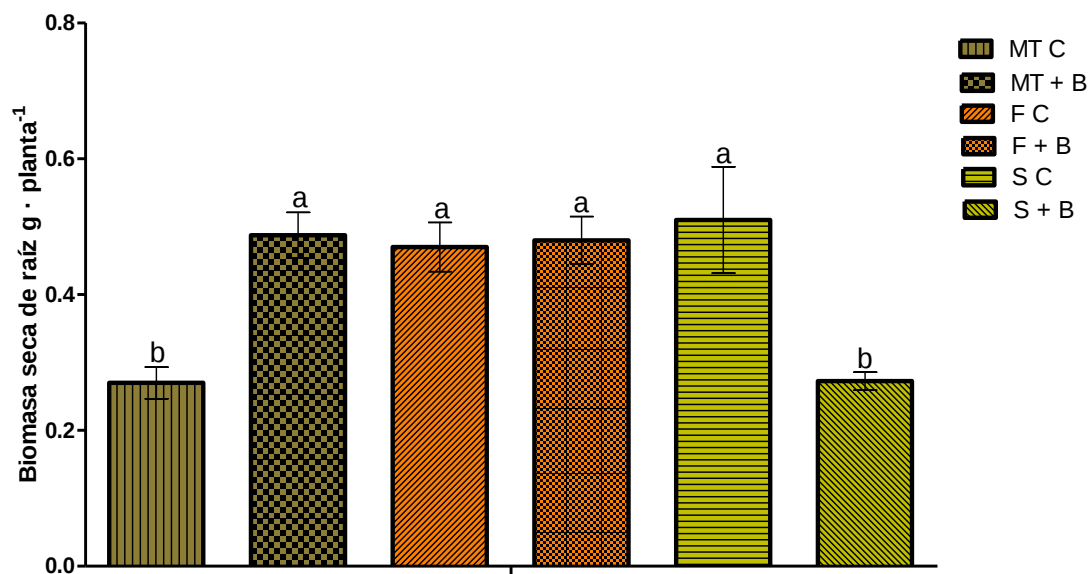


Figura 33. Comportamiento de variable biomasa seca de raíz evaluada de tres variedades de tomate en parámetros biométricos, sometidas a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), donde F C= Floradade Control, F+B= Floradade + LPM1, S C= Silvestre Control, S+B= Silvestre + LPM1, MT C= Micro-Tom Control y MT+B= Micro-Tom + LPM1.



Figura 34. Visualización de variabilidad en el crecimiento de las 3 variedades de tomate, *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *S. lycopersicum* cv. Silvestre y *S. lycopersicum* cv. Floradade.

Para el caso de la variedad Silvestre en la misma variable, se observa el comportamiento contrario a la variedad Micro-Tom, es decir, las plantas que fueron inoculadas con la cepa bacteriana presentaron menor $\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ de biomasa seca de raíz, sin embargo, con respecto a las otras variables evaluadas de los parámetros biométricos, que se visualizan en la Tabla 11, se mostraron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de las variables en dicha variedad, aquellos tratamientos que presentaron la inoculación con la bacteria promotora de crecimiento fueron los mejores; este análisis muestra que el efecto en esta variedad no se vio reflejado en la zona radicular, pero si en la zona aérea. Por otro lado, para la variedad Floradade no se mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas, lo cual nos puede indicar que no es una regla general para promoción de crecimiento por PGPR en todas las plantas, ya que algunos hospederos manifiestan marcada promoción mientras que otros no.

La variedad Micro-Tom que era de suma importancia para el desarrollo del experimento principalmente en el desarrollo radicular, mostró diferencias estadísticamente significativas en la variable biomasa fresca de raíz, obteniendo un 34.01% superior de $\text{g} \cdot \text{planta}^{-1}$ que el control, dicho efecto va de la mano con los resultados obtenidos en el parámetro de biomasa seca de raíz (Figura 33), lo que termina por comprobar que se manifestó el efecto característico de la bacteria *B. subtilis* LPM1 en el órgano de la raíz en esta variedad (Chávez-Betancourt *et al.*, 2006).

Tabla 11. Influencia de la cepa bacteriana *B. subtilis* LPM1 en los parámetros biométricos evaluados de 3 variedades de tomate sometidas a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tratamientos	Biomasa fresca de raíz (g · planta ⁻¹)	Biomasa fresca de vástago (g · planta ⁻¹)	Biomasa seca de vástago (g · planta ⁻¹)	Diámetro de tallo (cm · planta ⁻¹)	Altura (cm · planta ⁻¹)
F C	6.18 ± 0.67 a	24.99 ± 0.98 a	2.80 ± 0.98 a	6.30 ± 0.28 a	14.50 ± 0.17 a
F+B	6.33 ± 0.37 a	24.02 ± 1.02 a	2.73 ± 1.02 a	5.88 ± 0.12 b	14.25 ± 0.41 a
S C	8.05 ± 0.74 a	16.88 ± 1.20 b	2.20 ± 1.20 b	3.85 ± 0.16 c	11.53 ± 0.47 b
S+B	7.42 ± 0.77 b	20.96 ± 0.40 a	2.80 ± 0.40 a	5.00 ± 0.18 b	13.45 ± 0.55 a
MT C	3.46 ± 0.32 c	12.23 ± 0.68 c	1.63 ± 0.68 c	4.85 ± 0.23 b	7.25 ± 0.66 c
MT+B	4.64 ± 0.27 d	11.71 ± 0.41 d	1.46 ± 0.41 c	4.80 ± 0.24 b	6.38 ± 0.58 d

F C= Floradade Control, F+B= Floradade + *B. subtilis* LPM1, S C= Silvestre Control, S+B= Silvestre + *B. subtilis* LPM1, MT C= Micro-Tom Control y MT+B= Micro-Tom + *B. subtilis* LPM1.

VII.4.1. Patrones de colonización a nivel *in planta*.

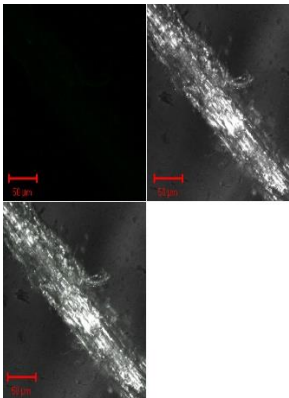
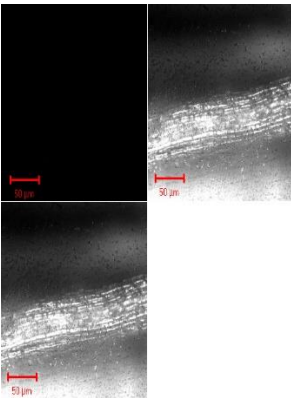
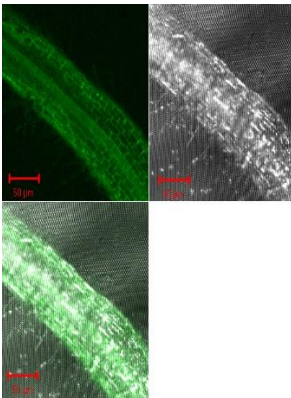
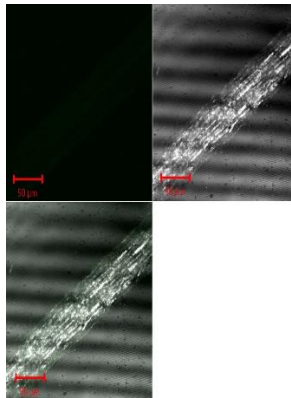
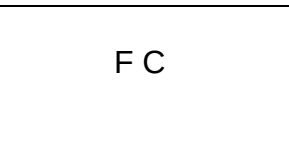
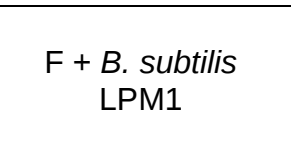
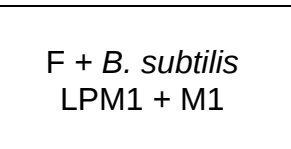
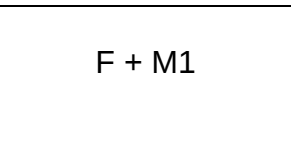
Debido a los resultados peculiares obtenidos en la caracterización espectroscópica de los marcadores en solución y el comportamiento obtenido en la interacción de las laminillas con las cepas bacterianas, se determinó utilizar para los estudios de patrones de colonización la molécula M1, su utilización en la prueba con raíces a nivel *in planta* permitió determinar los patrones que presenta la cepa *B. subtilis* LPM1.

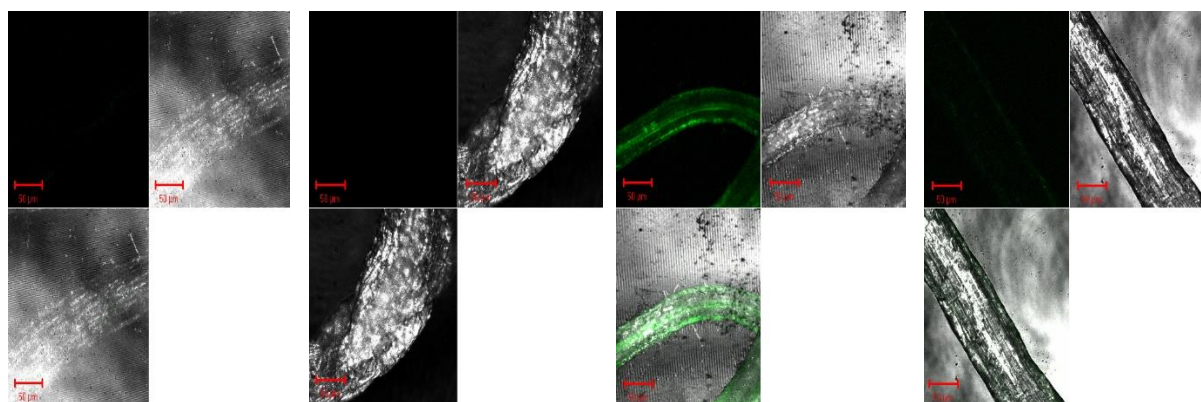
En la Tabla 11, se pueden observar imágenes representativas de zonas tomadas de la raíz y analizadas mediante LSCM, las tres variedades de tomate permitieron visualizar fluorescencia en zonas donde se presentaba la abundancia de pelos radiculares en los brotes de raíces secundaria en las zonas de alargamiento, mientras que en las regiones donde no se encontraba gran cantidad de pelos radiculares, meristemo apical zona de división y diferenciación celular, la fluorescencia no se pudo distinguir. En estudios donde se ha reportado colonización de bacterias a partir de la transformación de éstas (Gamez *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2016) se ha encontrado que la colonización se presenta en zonas que no son de crecimiento, en algunos casos formando biofilm (Overkamp *et al.*, 2013), la zonas de la caliptra y de división celular al estar en continua producción y reorden de células, no permite que la bacteria se quede estática en dichas zonas para poder formar

aglomerados de éstas y mediante esto colonizar la zona (Liu, Zhao y Chen, 2006; Ugoji, Laing y Hunter, 2005).

Es importante mencionar que dentro de los tratamientos aplicados, se planteó utilizar la raíz sola con el marcador (M1), con la finalidad de poder descartar que la fluorescencia estuviera siendo emitida por el tejido radicular y no por los patrones que se buscaban de la bacteria de interés, para las tres variedades se muestra esta imagen en la última fila de la Tabla 11, donde se descarta este fenómeno observando únicamente fluorescencia en la imagen correspondiente al tratamiento con la raíz de la planta + bacteria + molécula fluorescente M1.

Tabla 12. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de 3 variedades de tomate tratadas con M1, imágenes representativas de un ensayo independiente.

MT C	MT + <i>B. subtilis</i> LPM1	MT + <i>B. subtilis</i> LPM1 + M1	MT + M1
			
F C	F + <i>B. subtilis</i> LPM1	F + <i>B. subtilis</i> LPM1 + M1	F + M1
			

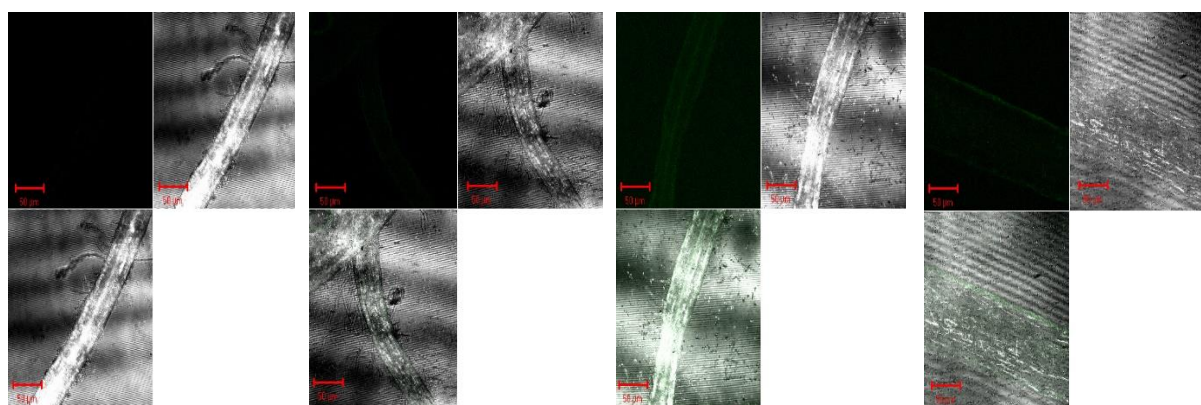


S C

S + *B. subtilis*
LPM1

S + *B. subtilis*
LPM1 + M1

S + M1



F C= Floradade Control, F+B= Floradade + *B. subtilis* LPM1, S C= Silvestre Control, S+B= Silvestre + *B. subtilis* LPM1, MT C= Micro-Tom Control y MT+B= Micro-Tom + *B. subtilis* LPM1.

Los patrones de colonización obtenidos en este ensayo y en la prueba *in vitro*, permiten constatar que esta molécula fluorescente M1 es eficaz para su aplicación en futuras pruebas y ensayos más profundos.

Comparando la respuesta emitida de la fluorescencia del marcador M1 con un trabajo desarrollado por Chu *et al.*, (2018), en el cual, al utilizar la bacteria *Bacillus megaterium* etiquetada con el gen GFP, pudo determinar los patrones de colonización hasta los 11 días después de haber inoculado su bacteria en las raíces con intensidades importantes de fluorescencia. A los 3 días cuando realizó su primera evaluación, solo pudo encontrar

población en las zona de elongación de la raíz con muy poca fluorescencia emitida por las bacterias y hasta los 11 días en los pelos radiculares y zona de elongación con una intensidad superior a su anterior evaluación; para la cepa PGPR evaluada en este ensayo a los dos días se pudo observar patrones muy completos en las zonas comúnmente reportadas para la colonización bacteriana; Es importante mencionar que las bacterias del genero *Bacillus* están reportadas que entre las 4 y 8 h después del primer contacto de la bacteria con el tejido radicular comienza la formación de biofilm (Allard-Massicotte *et al.*, 2016), proceso importante que ayuda a determinar los patrones de colonización en cualquier bacteria.

VII.5. Germinación y crecimiento *in vitro* en plantas de tomate.

VII.5.1. Aplicación foliar de elicitores químicos a plántulas.

VII.5.1.1. Análisis de ácidos orgánicos presentes en exudados radiculares por LC-MS.

Las plantas son generadoras de metabolitos secundarios, entre ellos ácidos orgánicos exudados por la zona radicular o compuestos volátiles por la zona aérea de las plantas, al estar expuestas a diversos tipos de estrés por factores bióticos y/o abióticos (Gouda *et al.*, 2018). La aplicación de elicitores químicos a nivel laboratorio son utilizados con la finalidad de sustituir los tipos de estrés por los factores anteriormente mencionados, buscando desencadenar respuestas tempranas de señalización en las plantas (Mandal *et al.*, 2013), por lo cual se planteó la utilización de tres compuestos diferentes en el desarrollo de este experimento.

Para los ensayos *in vitro*, se determinó de manera cuantitativa y cualitativa por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) por sus siglas en inglés *Liquid chromatography–mass spectrometry* la presencia de ácidos orgánicos en los exudados radiculares, ya que éstos juegan un papel importante en la interacción positiva o negativa que se presenta entre planta-microorganismo (Steinkellner, Mammerler, y Vierheilig, 2008). Lo anterior se hizo, con la finalidad de elegir el mejor tratamiento de elicitor para las pruebas posteriores.

Los datos obtenidos de dicho análisis se presentan en la Tabla 12, donde se pueden observar los mg cuantificados de cada muestra respectiva a 3 ácidos orgánicos analizados. La cuantificación total de los exudados inyectados en mg permitió seleccionar el tratamiento de BTH a una concentración de 500 μ M a las 12 horas después de haber sido expuesto a las plantas de la variedad Micro-Tom como el mejor inductor de exudados radiculares.

Los tratamientos empleando JA, BTH y AA, se encuentra reportados en diversos artículos como compuestos capaces de funcionar como elicitores tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, ya que se documenta que tienen la capacidad de inducir exudados radiculares en plantas (Ávila *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2015; Balmer *et al.*, 2015).

Tabla 13. Análisis de mg presentes correspondientes a tres ácidos orgánicos distintos en muestras de exudados radiculares de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. determinados por LC-MS.

Tratamiento	Tiempo (h)	Ácido fumárico (mg)	Ácido málico (mg)	Ácido succínico (mg)	Inyección total (mg)
JA	6	2.7E-06	5.872E-06	4.146E-07	8.99E-06
	12	1.93E-06	3.733E-06	4.499E-07	6.12E-06
	24	2.25E-06	5.195E-06	4.865E-07	7.93E-06
AA	6	1.63E-06	4.469E-06	4.763E-07	6.57E-06
	12	1.79E-06	4.792E-06	5.985E-07	7.18E-06
	24	1.74E-06	5.357E-06	4.349E-07	7.53E-06
BTH	6	2.53E-06	5.759E-06	5.842E-07	8.87E-06
	12	2.28E-06	7.252E-06	5.998E-07	1.01E-05
	24	2.99E-06	4.939E-06	6.595E-07	8.59E-06

Elicitores utilizados JA= Ácido jasmónico 75 μ M, AA= Ácido azelaico 100 μ M y BTH= Benzotiadiazol 500 μ M. mg obtenidos mediante la utilización de curvas de calibración con una R^2 de 0.99 en los tres ácidos orgánicos evaluados.

El BTH se encuentra reportado como un potente inductor de SAR debido a los criterios fisiológicos y bioquímicos, se encarga de defender a la planta activando respuestas

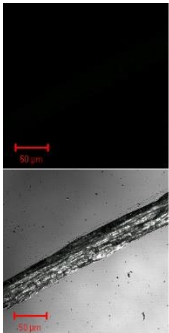
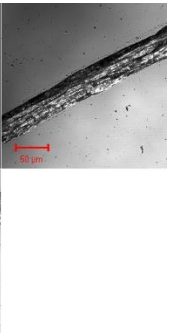
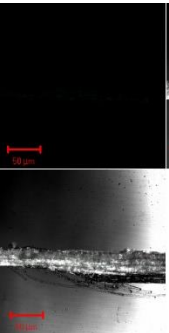
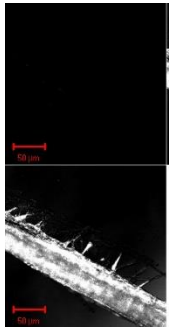
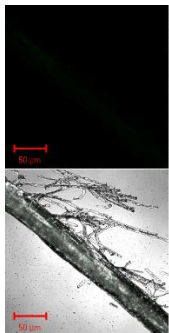
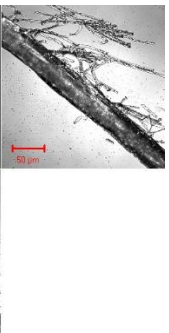
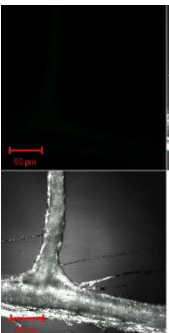
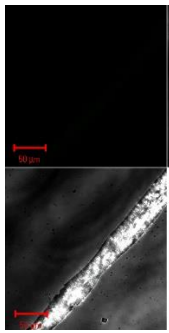
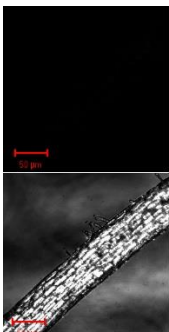
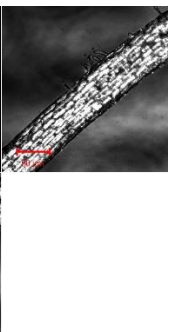
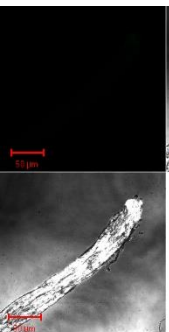
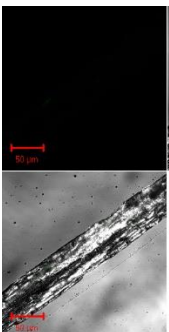
hipersensibles, que simulan el ataque ante patógenos y/o enfermedades que actúan induciendo a esta respuesta; de hecho, es un producto químico sintético que aplicado a diversas plantas ha generado respuestas favorables (Walters *et al.*, 2011; Mondia, 2009), para este ensayo y debido a los resultados obtenidos se determinó y considero mejor el tratamiento con BTH.

VII.5.2. Patrones de colonización a nivel *in vitro*.

La determinación de patrones de colonización, es utilizada y estudiada con la finalidad de tener un panorama de las zonas que se encuentran poblando las bacterias, así mismo identificar a que se deben estos comportamientos que presentan determinadas cepas bacterianas (Posada *et al.*, 2018). Para determinar los patrones de colonización a nivel *in vitro*, se realizaron ensayos similares a los de patrones de colonización *in planta*, para este ensayo la única variedad evaluada fue Micro-Tom, ya que era el modelo de estudio propuesto desde inicios del trabajo, principalmente, porque por su tamaño facilita la manipulación bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados de este ensayo se encuentran resumidos en las siguientes tablas, divididas por tratamientos. En la Tabla 13 se pueden apreciar imágenes obtenidas mediante LSCM, donde dicho tratamiento estaba conformado únicamente por la raíz de la planta (T1). Con estas imágenes, se logra comprobar que la raíces no emiten fluorescencia, lo que nos ayuda a descartar fluorescencia innata proveniente del tejido radicular, cabe mencionar que las imágenes fueron visualizadas en todas las longitudes de la raíz de la planta con la finalidad de evaluar las distintas zonas de desarrollo para éstas.

Tabla 14. Patrones de zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 1, imágenes representativas de un ensayo independiente.

	T1	R1	R2	R3
Zona 1				
Zona 2				
Zona 3				

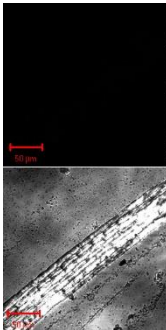
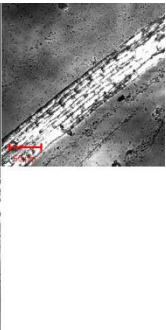
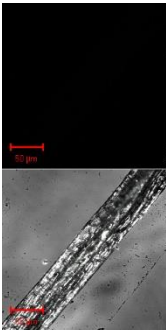
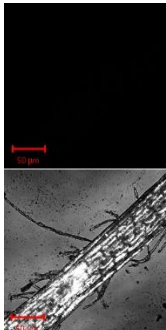
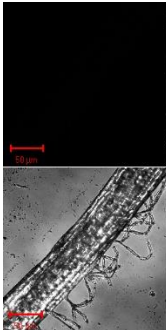
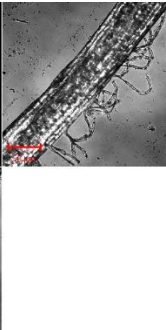
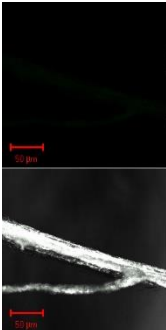
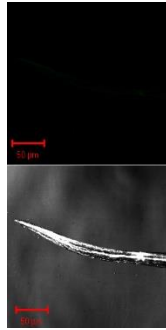
T1= *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, R1= repetición 1, R2= repetición 2 y R3= repetición 3.

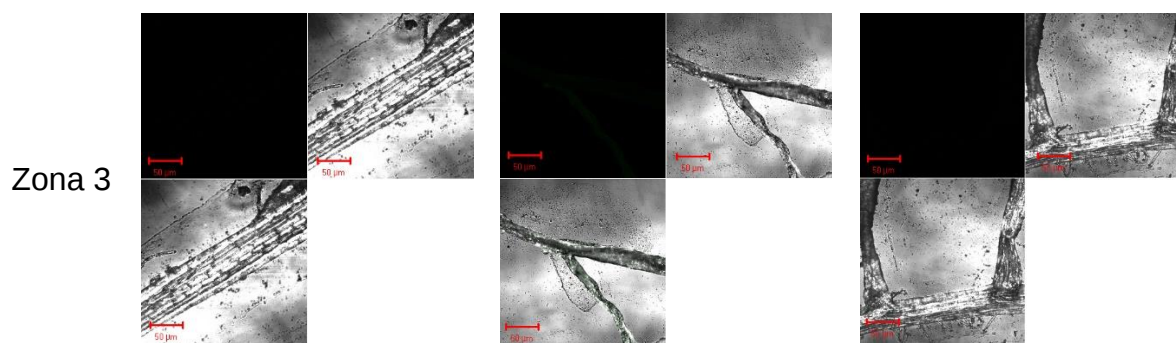
En la Tabla 14 se puede observar el segundo tratamiento (T2), el cual estaba conformado por la raíz de la planta + *B. subtilis* LPM1, este tratamiento solo fue propuesto como control, ya que debido a las pruebas anteriores realizadas en la interacción marcador-

bacteria ya se conocía que la cepa por sí sola no emitía fluorescencia en el LSCM. En estas imágenes se puede observar la división en zonas, esto con la finalidad de tener un ensayo representativo intentando igualar las regiones evaluadas en todos los tratamientos.

En algunas imágenes se alcanzan a ver pequeños puntos negros, los cuales nos indica la presencia de bacterias alrededor del tejido radicular. Debido a que para esta prueba se utilizó el lente 10x, no alcanzó a mostrarse un enfoque definido de la bacteria, pero si se comprobó la presencia de éstas.

Tabla 15. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 2, imágenes representativas de un ensayo independiente.

	T2	R1	R2	R3
Zona 1				
Zona 2				



T2= *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom + *B. subtilis* LPM1, R1= repetición 1, R2= repetición 2 y R3= repetición 3.

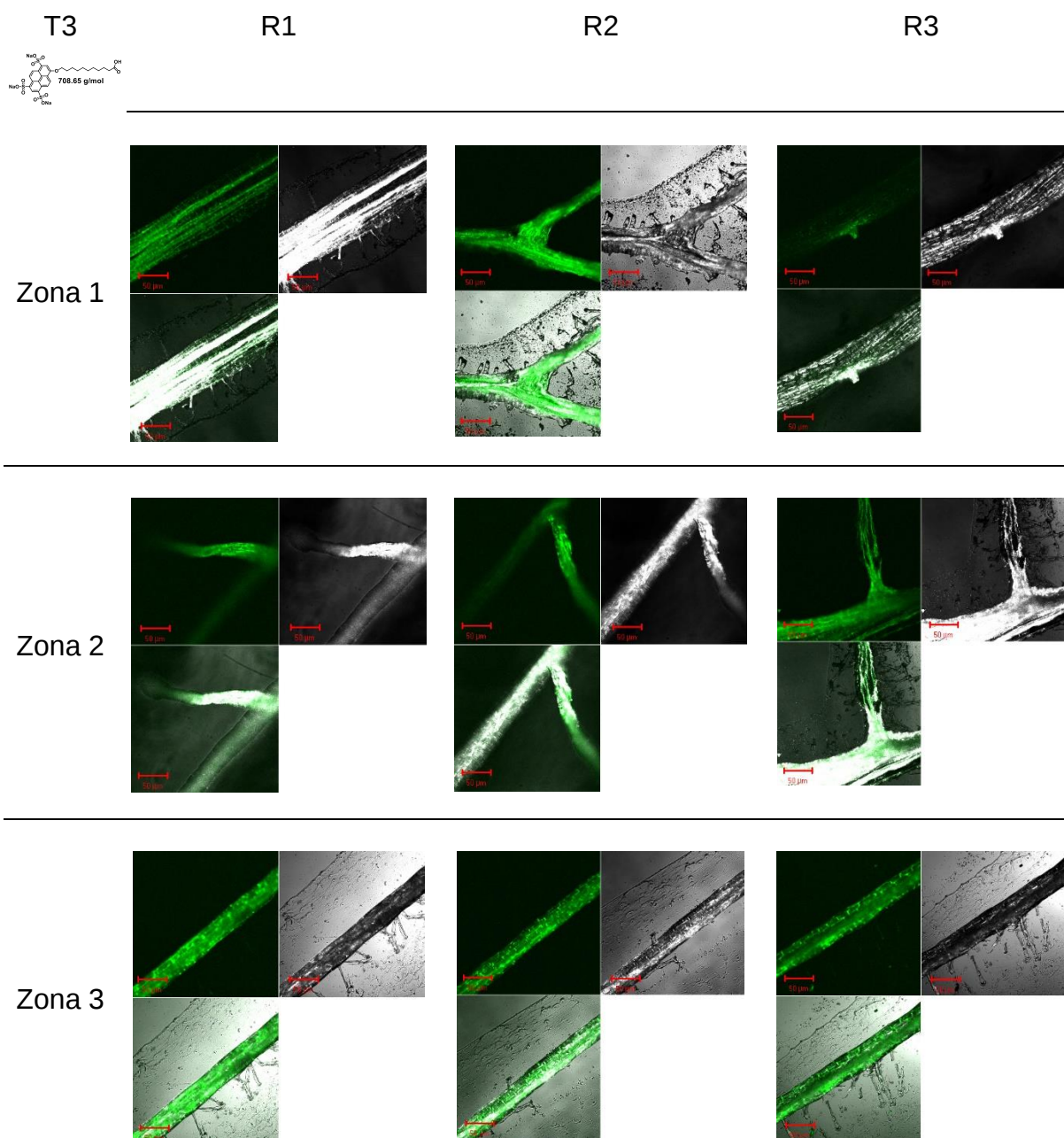
En la Tabla 15 se puede apreciar el tercer tratamiento (T3), el cual estaba conformado por la raíz de la planta + *B. subtilis* LPM1 + M1, dicho tratamiento como ya se había presentado a nivel *in planta*, se volvió a repetir en los patrones de esta evaluación. Las imágenes muestran fluorescencia en las zonas donde se tenía una mayor cantidad de pelos radiculares, así como brotes secundarios de raíz; se comprobó que no hubiera la presencia de fluorescencia en las zonas de meristemos apicales, ya que como lo mencionan diversos investigadores, estas zonas no son favorables para que las bacterias puedan colonizar debido al creciente cambio en el tejido por la generación de nuevas células (Cao *et al.*, 2011).

Las imágenes obtenidas permitieron visualizar que efectivamente se presentó la formación de biofilm en el tejido radicular, ya que se observa el recubrimiento total del tejido, y no solo en los pelos radiculares. Como bien se sabe, la cepa del género *B. subtilis* se caracteriza en ser formadora de biofilm, este proceso de formación está relacionado con la capacidad de motilidad de las bacterias, ya que dicho proceso les facilita colonizar y expandirse en estructuras maduras de la raíz de la planta (Ling *et al.*, 2011); zonas que se encontró emitiendo fluorescencia debido a la interacción planta-marcador.

También se puede observar en algunas imágenes la presencia de las bacterias como pequeños puntos negros alrededor de la raíz, este fenómeno se le adjudica a que las muestras fueron extraídas de la solución de agua en las que se incubaron, por lo cual al

colocar la raíz en los portaobjetos éstas pudieron tener un mayor contenido de agua al extraerlas, por lo cual se aprecian en algunas imágenes más bacterias que en otras.

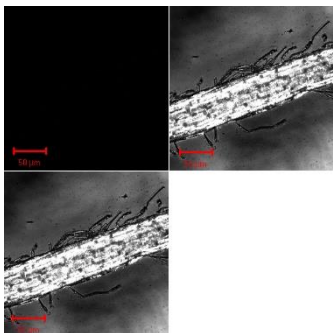
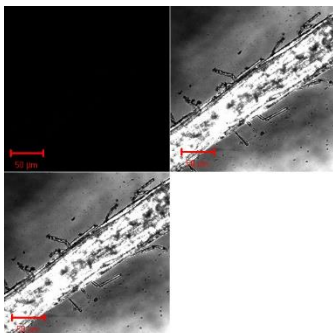
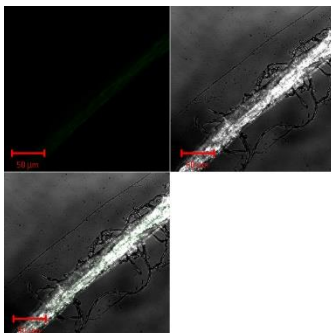
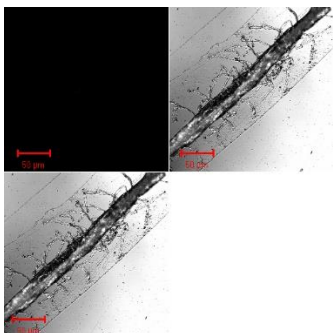
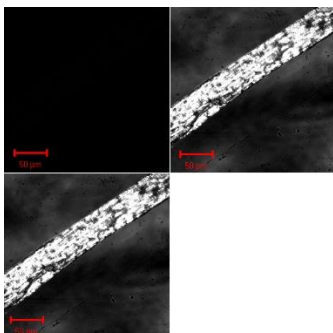
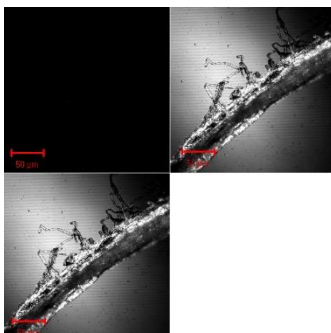
Tabla 16. Patrones de colonización en zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 3, imágenes representativas de un ensayo independiente.

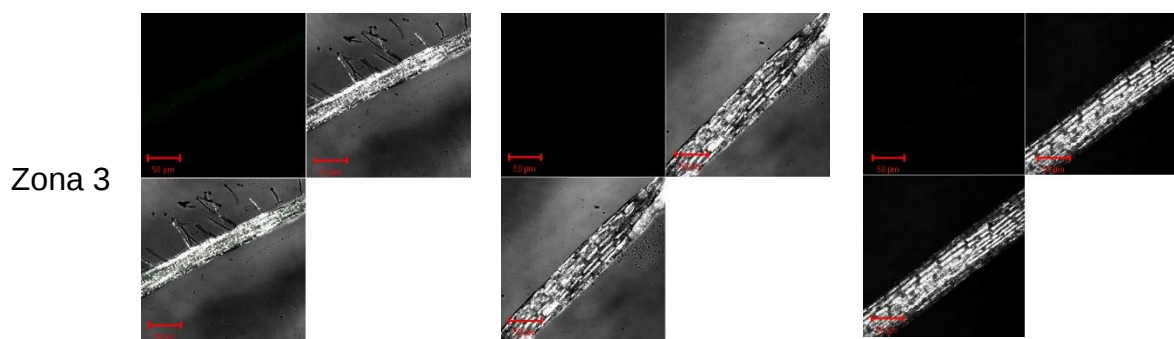


T3= *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom + *B. subtilis* LPM1 + M1, R1= repetición 1, R2= repetición 2 y R3= repetición 3.

El ultimo tratamiento utilizado (T4) consistió en las raíces de las plantas incubadas con M1 bajo las mismas condiciones aplicadas a los tres tratamientos antes mencionados. Se aplicó con la finalidad de descartar la presencia de fluorescencia por la interacción del marcador con el tejido radicular. La Tabla 16 nos permite visualizar que efectivamente la fluorescencia que se presentaba en la Tabla 15 estaba identificando a la interacción marcador-bacteria y no con el tejido radicular.

Tabla 17. Patrones de zona radicular de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom para el tratamiento 4, imágenes representativas de un ensayo independiente.

	T4	R1	R2	R3
Zona 1				
Zona 2				



T4= *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom + M1, R1= repetición 1, R2= repetición 2 y R3= repetición 3.

Este ensayo realizado para la evaluación de patrones de colonización, permitió obtener dichos datos de una manera sencilla en las raíces de la variedad Micro-Tom, existen diversos estudios que implican transformaciones bacterianas para poder visualizar la colonización, lo cual requiere implementar técnicas laboriosas (Chu *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2013; Liu, Zhao y Chen, 2006). La utilización de sondas específicas mediante la aplicación de técnicas como FISH y CARD-FISH permite su determinación, pero su aplicación es muy laboriosa en el manejo de las raíces y también requiere de técnicas moleculares complejas (Posada *et al.*, 2018; Anyane-Yeboah, 2011), otra técnica utilizada y también reportada es la cuantificación de éstas mediante qPCR o PCR normal, las cuales implican una mayor inversión de tiempo para la obtención de éstos y solo permiten obtener la presencia de las bacterias, más no sus patrones de colonización (Mendis *et al.*, 2018; Mosimann *et al.*, 2017).

La utilización del marcador M1 fluorescente fue apto para desarrollar este experimento, sin embargo, no se descarta la utilización de las 4 moléculas restantes, ya que, partiendo de estos datos obtenidos, la idea es diseñar moléculas que tengan especificidad. Algunos trabajos reportan que los diseños de marcadores fluorescentes sintetizados en conjunto con biomoléculas podrían determinar la especificidad en algunos casos bacterianos partiendo de señales químicas específicas considerando los elementos sensores involucrados (Tyler, Pullen, y Swager, 2000).

Comparando con otros trabajos ya documentados, donde se obtuvo que mediante exudados de plantas de arroz se puede ocasionar una atracción hacia la cepa aislada de

rizósfera *Bacillus* sp. y la cepa endófito *B. pumilus* (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003), los exudados de semillas y raíz de plantas de soja son capaces de atraer a la bacteria *B. megaterium* cepa B153-2-2 (Zheng y Sinclair, 1996), con estos reportes y los resultados obtenidos se logró demostrar que los exudados radiculares desempeñan un papel importante en el reclutamiento para la colonización radicular, en este caso la cepa *B. subtilis* LPM1 permitió comprobar dicho comportamiento a partir de la fluorescencia emitida por éstas en el ensayo anteriormente evaluado. Esta liberación de exudados radiculares fue promovida previamente por el efecto del BTH (que en la literatura hay pocos reportes) y cuya idea fue verificar si incrementaba la síntesis de exudados como se presentó en diferentes plantas modelo y con factores bióticos reportados (bacterias, hongos e insectos).

VII.6. Quimiotaxis bacteriana.

VII.6.1. Quimiotaxis en medio de cultivo sólido.

VII.6.1.1. Medio mínimo M9 con *B. subtilis* LPM1.

El fenómeno de quimiotaxis es un proceso complejo que se da en las bacterias móviles donde interviene el *quorum sensing*, las concentraciones idóneas de compuestos quimioatrayentes y/o fuentes de carbono, el pH del entorno, entre otros. Su manifestación se da como consecuencia de que las bacterias son capaces de detectar y/o a su vez responder a bajas concentraciones de compuestos orgánicos presentes en su ambiente (Ling *et al.*, 2011).

Para la determinación del fenómeno de quimiotaxis, se planteó la utilización de medio mínimo M9, debido a que su formulación está basada en las concentraciones mínimas necesarias para que un organismo pueda desarrollarse (Pérez-Reytor *et al.*, 2003; Meenakshi, 2013). A este respecto y con la finalidad de observar si diferentes concentraciones de los ácidos orgánicos aplicados podían fungir como compuestos quimioatrayentes para *B. subtilis* LPM1, la cepa fue inoculada inicialmente con una concentración de 7×10^8 UFC · mL⁻¹.

En la Tabla 18 se muestran los valores obtenidos de crecimiento en las cajas petri; donde se aprecia que las concentraciones utilizadas de los ácidos orgánicos presentan una variabilidad en el crecimiento de la cepa bacteriana, esta variación en las concentraciones juega un papel importante para la determinación y respuesta de las bacterias ante los cambios en las concentraciones de los agentes que le resultan atrayentes, ya que son capaces de detectar un gradiente de concentración (Gupta-Sood, 2003).

Tabla 18. Datos respectivos a crecimiento de bacteria *B. subtilis* LPM1, sometida a 5 ácidos orgánicos y 5 concentraciones distintas para determinar efecto de quimiotaxis presente por la bacteria hacia dichos ácidos.

[μ M]	Á. oxálico	Á. málico	Á. fumárico	Á. succínico	Á. cítrico
25 μ M	2.96 cm	1.60 cm	2.63 cm	2.50 cm	2.05 cm
50 μ M	3.25 cm	1.65 cm	1.75 cm	3.10 cm	1.65 cm
75 μ M	3.00 cm	3.76 cm	2.40 cm	2.40 cm	2.50 cm
100 μ M	2.80 cm	2.93 cm	1.90 cm	2.00 cm	1.80 cm
200 μ M	2.40 cm	2.70 cm	2.90 cm	2.00 cm	2.80 cm

Los recuadros rojos representan las concentraciones aplicadas de ácidos orgánicos donde el crecimiento fue superior al control que presentaba un valor de 3 cm.

El crecimiento presentado por la bacteria control (únicamente con medio mínimo M9) fue de 3 cm, mediante este valor se determinó que las concentraciones en las cuales los ácidos orgánicos funcionan como quimioatrayente fue en el caso de ácido oxálico 50 μ M, ácido málico 75 μ M y ácido succínico 50 μ M (Figura 35); la confirmación de estos ácidos orgánicos como quimioatrayente es atribuida a que no funcionaron como fuente de carbono para el crecimiento de la bacteria, debido a que con el incremento de concentraciones no se presentó un incremento en el desarrollo de la bacteria, fenómeno que es característico cuando su principal actividad con la bacteria es como fuente de carbono, proceso conocido como taxis bacteriana (Bi y Sourjik, 2018).

El proceso de adaptación que presenta la cepa *B. subtilis* para la quimiotaxis está relacionado con tres sistemas, los cuales mediante su intervención permiten una

actividad deseada en la quimiotaxis, esta actividad está dada por la intervención en conjunto del sistema de metilación, sistema CheC - CheD – CheYp y el sistema CheV, si no se presenta la activación de alguno de los dos últimos sistemas mencionados el proceso de quimiotaxis se ve reducido, la activación de estos sistemas se da a partir de proteínas transmembranales involucradas (Rao, Glekas y Ordal, 2008); para este ensayo realizado no se analizaron estos sistemas ni las proteínas involucradas, pero se le puede probablemente adjudicar a éstos la respuesta o no hacia los ácidos organismos probados.

Estos ácidos que se encuentran asociados a los metabolitos secundarios exudados radicularmente por las plantas funcionan como compuestos quimioatrayentes y/o fuente de carbono (Gupta-Sood, 2003; Krzyzanowska *et al.*, 2012) y son identificados como uno de los grupos presentes en la rizósfera en los exudados de las plantas ante estrés biótico y/o abiótico al que continuamente están sometidas, donde, dicho proceso de quimiotaxis es pieza clave para comprender un perfil y funcionamiento de las PGPR involucradas y su relación con estos ácidos orgánicos (Lakshmanan *et al.*, 2014; Das, 2014).

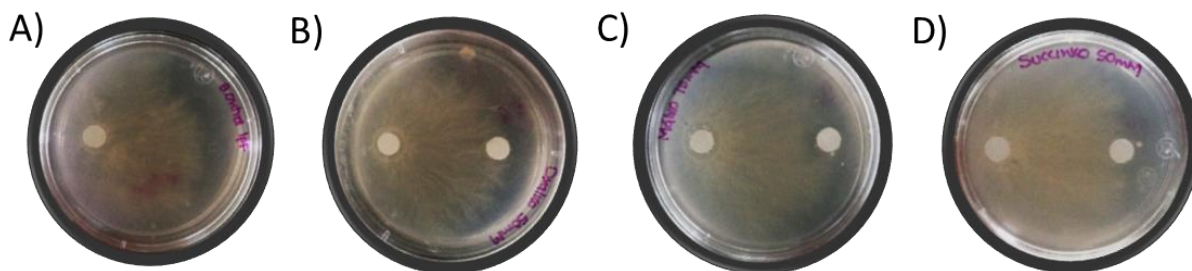


Figura 35. Cajas petri representativas a la prueba con medio mínimo M9, donde se aprecia el crecimiento de la cepa bacteriana sometida a las mejores concentraciones de ácidos orgánicos y su respectivo control, donde A) control, B) ácido oxálico 50 μM , C) ácido málico 75 μM y D) ácido succínico 50 μM .

A pesar de que las concentraciones utilizadas para el ácido fumárico y cítrico no presentaron mayor incremento en el crecimiento en comparación con el control, estos ácidos también se encuentran reportados en estudios de análisis de exudados de la raíz en plantas sometidas a estrés (Gupta-Sood, 2003). Sin embargo, se empleó la repetición de esta técnica con la finalidad de evaluar la quimiotaxis bacteriana ante diversas condiciones.

VII.6.1.2. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.

Con los resultados preliminares obtenidos referentes al ensayo de quimiotaxis, se propuso la repetición de dicho experimento modificando ciertas variables, para este se evaluaron *B. subtilis* LPM1, *B. subtilis* PY79 y *E. coli* DH5 α en medio mínimo M9, se determinaron las concentraciones medias del anterior experimento, descartando la más baja y la más alta propuestas en el preliminar, debido a que en ninguna de estas se presentó mayor crecimiento de la cepa respectivamente a su control. El comportamiento que presentaron dichas cepas en los medios utilizados se puede apreciar en las cinéticas presentadas en las siguientes gráficas.

El comportamiento de la PGPR *B. subtilis* LPM1 se aprecia en la Figura 36, donde la cepa estuvo en contacto por el medio de soporte con los ácidos orgánicos, para el caso de ácido fumárico 100 μ M, ácido málico 100 μ M y ácido cítrico 100 μ M, dichas concentraciones permitieron mayor crecimiento de la bacteria respectivamente a su control al haber estado expuesta a distancia en contacto 45 días.

En el caso del ácido oxálico y ácido succínico, no se presentó esta tendencia, ya que ninguno de los tratamientos superó al control a lo largo de la cinética evaluada. En la prueba realizada preliminar, se observó que para esta bacteria la concentración óptima en estos dos últimos ácidos era de 50 μ M, sin embargo, para este ensayo donde las variables fueron distintas, como el tiempo de contacto con el medio, la distancia entre el ácido orgánico y la bacteria inoculada, no se presentó la misma tendencia dando a conocer que esta variabilidad puede interferir con el comportamiento de la bacteria hacia algunos ácidos orgánicos, esto debido a que solo entre el 5 y 8% del genoma total de la bacteria está dedicado en la síntesis de metabolitos secundarios compuestos que están relacionados con la capacidad de detectar compuestos en su ambiente de desarrollo, esta actividad específica con cada compuesto puede variar dependiendo las condiciones de su entorno (Fira *et al.*, 2018).

El presente ensayo permitió determinar que con esta cepa bacteriana funciona como fuente de carbono, el ácido oxálico y ácido fumárico, ya que se muestra muy marcada la

tendencia que al incrementar la concentración de ácido en ambos casos también ocurre un incremento en el crecimiento bacteriano.

También se determinó el pH para descartar que este fuera responsable del crecimiento bacteriano. En el Anexo a. (Figura 46, Figura 47, Figura 48, Figura 49, Figura 50), se presentan 5 graficas donde se puede apreciar el comportamiento del pH el medio mínimo M9 con los 5 ácidos orgánicos utilizados. Como no se presentó una variación durante 1 mes, se descartó que el crecimiento de la bacteria hubiera estado influenciado por el gradiente de pH que se creía podría haber generado el ácido orgánico al medio.

El hecho de que no se haya presentado una variación en el pH se le atribuye a que la cantidad de ácido orgánico aplicado a los medios de soporte no era una cantidad considerable que pudiera ocasionar dicho cambio, ya que a cada muestra únicamente se le inoculaba un volumen de 100 μ L de la concentración correspondiente.

Contrario a los resultados presentados en el ensayo preliminar y en los cuales se partió para desarrollar esta prueba más completa, se presentó una variación en el comportamiento de la bacteria con los ácidos orgánicos. Esta variación se puede apreciar que en la mayoría de los ácidos ocurre después de haber estado en contacto mínimo a los 10 días, a partir de este tiempo es en donde se comienza a visualizar en las gráficas la tendencia de los resultados obtenidos en este ensayo, mientras que el preliminar fue evaluado a los 8 días y en éste no se le realizó un monitoreo continuo en la medición del crecimiento como en este ensayo extenso.

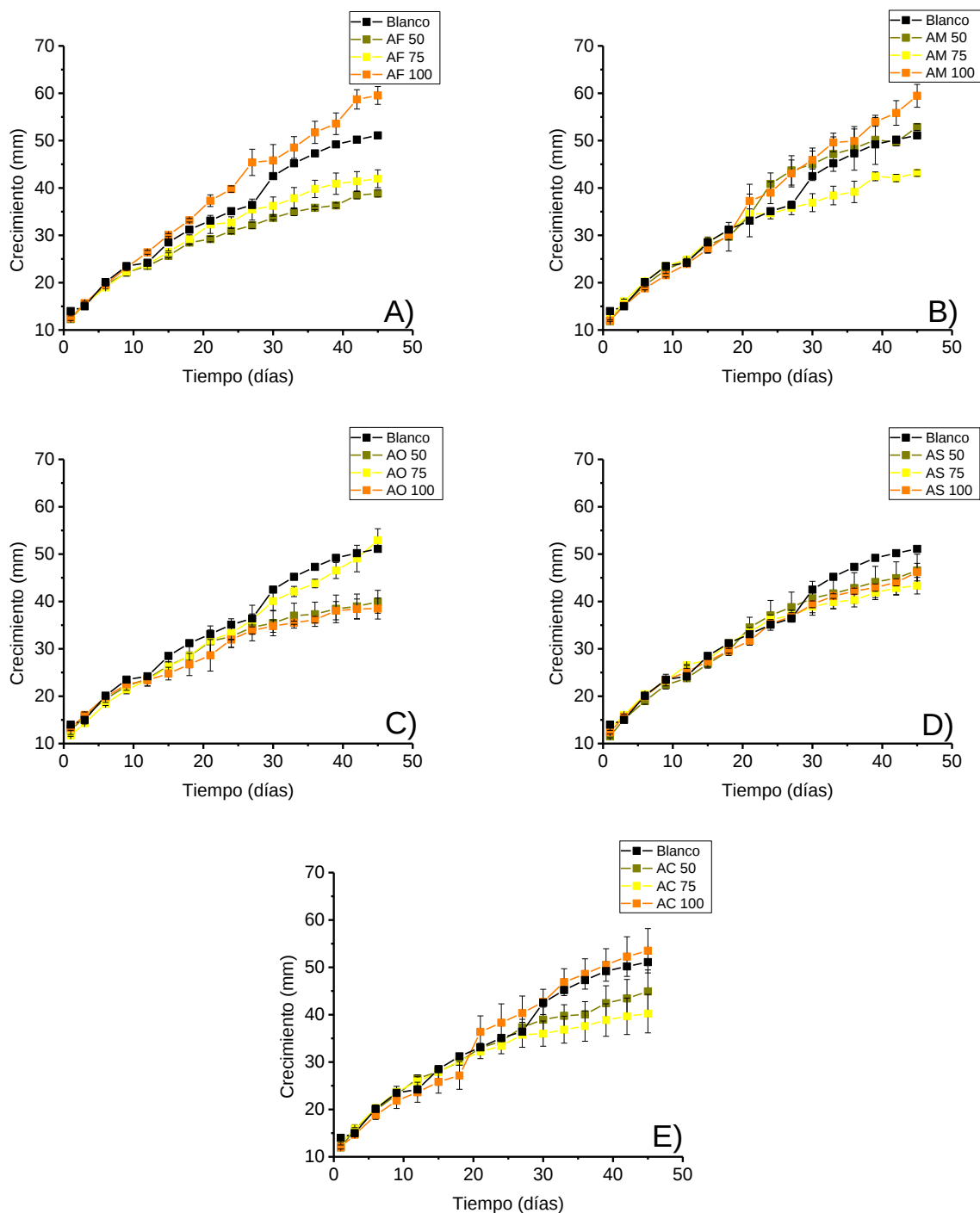


Figura 36. Comportamiento de cepa *B. subtilis* LPM1 en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

En el mismo ensayo evaluado en conjunto con la cepa *B. subtilis* PY79, se muestra el comportamiento respectivo al contacto de ésta con los ácidos orgánicos. En la Figura 37, se muestra que para esta bacteria el ácido fumárico 100 μ M y el oxálico 75 μ M, fueron en las concentraciones mencionadas aquellas que superaron el crecimiento con respecto al control, para el caso del ácido málico a principios de la cinética, la mejor concentración era 100 μ M. A partir del día 40 ocurrió un cambio drástico en el comportamiento de 75 μ M, ya que superó de manera importante al control y a la concentración de 100 μ M. Este efecto se le puede atribuir a que a en este momento la bacteria ya se encontraba más cercana al ácido orgánico, por lo cual al estar más disponible se presentó este proceso.

Para el caso de esta bacteria, no se determinó ningún ácido orgánico funcionando como fuente de carbono, ya que el crecimiento no fue proporcional a la concentración aplicada y como ya se mencionó, este es un parámetro importante para determinar la diferencia de un compuesto en la quimiotaxis; esta variación correspondiente a los ácidos orgánicos, se debe a que las bacterias cuentan con proteínas transmembranales que están involucradas en el proceso de quimiotaxis, las cuales tienen receptores y efectores específico para sensar compuestos quimiotácticos tanto benéficos como repelentes (Huang *et al.*, 2019).

Al comparar las dos cepas del mismo género bacteriano, se puede comprobar que los ácidos orgánicos pueden variar en su función para cada bacteria, en este caso fuente de carbono o quimioatrayente. La concentración óptima para el desarrollo de cada bacteria es un parámetro importante en el crecimiento de las bacterias (Hashem *et al.*, 2019), se sabe que a pesar de que las bacterias se agrupan en géneros bacterianos y que comparten ciertas características, también existe una variabilidad muy importante en su genoma, lo cual les permite reconocer compuestos que son capaces de identificar y/o utilizar dependiendo su estilo de vida y condiciones óptimas específicas favorables (Ewens, 2001). La cepa *B. subtilis* LPM1 al ser una cepa aislada de la rizósfera (Chávez-Betancourt *et al.*, 2006) mantiene ciertas actividades distintas a la cepa *B. subtilis* PY79, la cual es utilizada a nivel laboratorio como modelo de estudio (Ragione y Woodward, 2003). A estos factores en el estilo de vida se les atribuye el comportamiento distinto que se presentó en este ensayo de quimiotaxis (Brenner, Miller y Broughton, 2001).

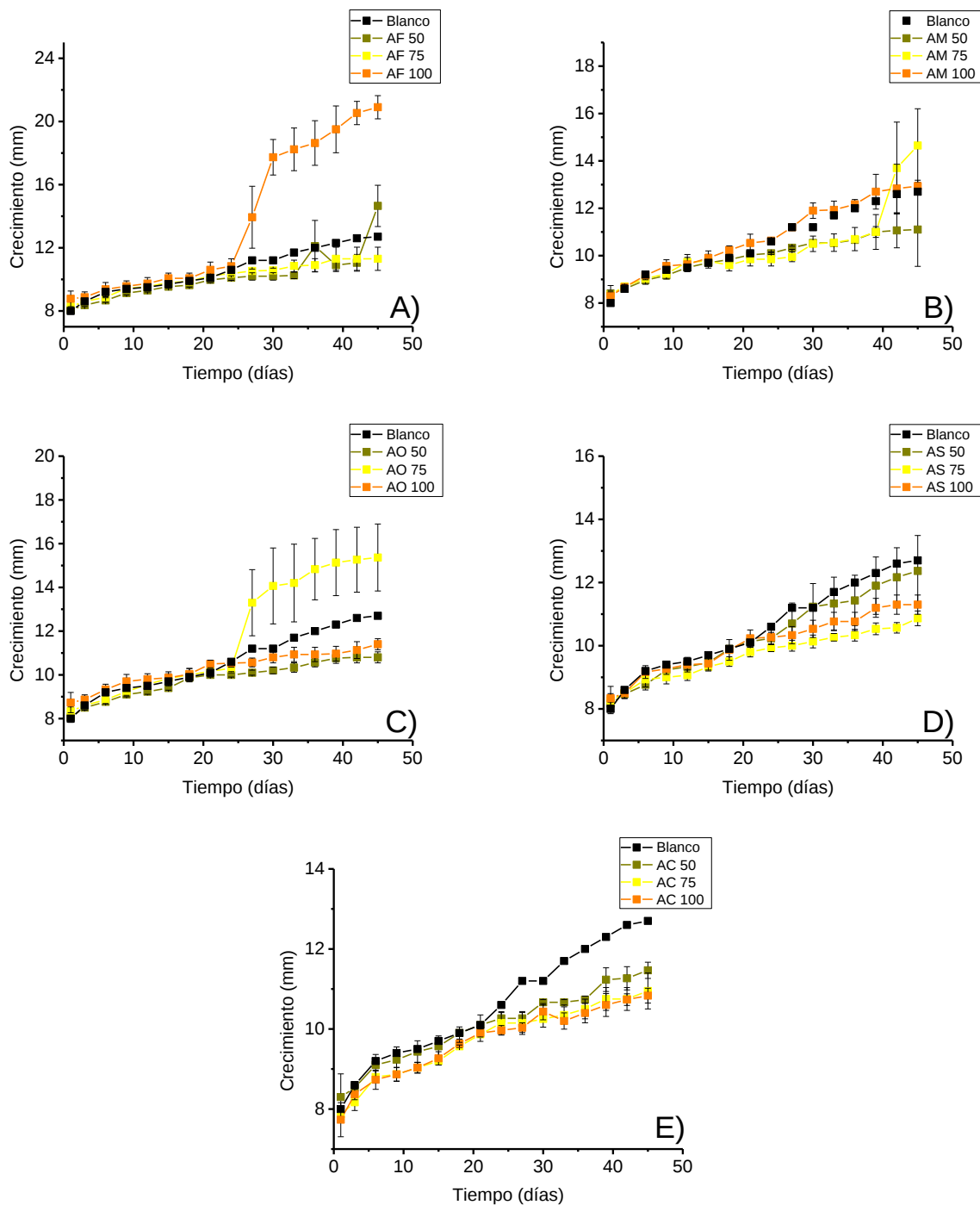


Figura 37. Comportamiento de cepa *B. subtilis* PY79 en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

La ultima cepa evaluada en este ensayo debido a su amplia aplicación como modelo de estudio *E. coli* DH5 α (Gao *et al.*, 2016), presentó un comportamiento distinto. En la Figura 38 se puede apreciar que todos los ácidos para esta cepa funcionaron como quimioatrayente, las mejores concentraciones para cada uno de estos fue ácido fumárico 75 μ M, ácido málico 100 μ M, ácido oxálico 75 μ M, ácido succínico 50 μ M y ácido cítrico 75 μ M, la peculiaridad que presentó esta cepa fue que la mayoría de las concentraciones fueron más bajas que las 2 cepas anteriores mencionadas.

Con la determinación de este ensayo y los resultados obtenidos, se puede apreciar que existe una variabilidad notoria entre las cepas utilizadas, así como diferencias marcadas hasta en el mismo género bacteriano en respuesta a los ácidos orgánicos y sus concentraciones, lo que permitió determinar la función de los ácidos orgánicos como quimioatrayente partiendo de una idea desde su estilo, capacidades de vida y compuestos involucrados en el reconocimiento de estas moléculas orgánicas (Cote *et al.*, 2015).

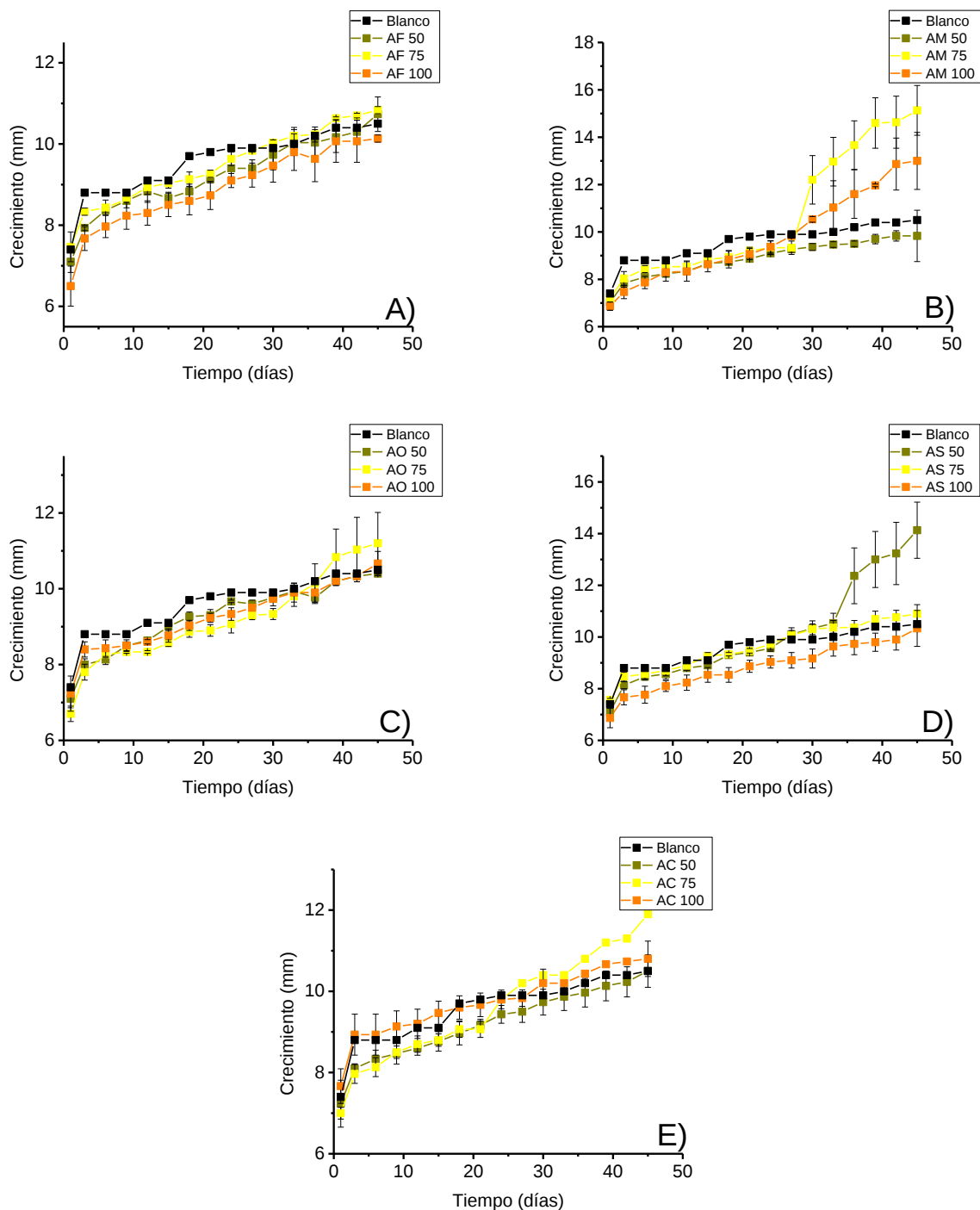


Figura 38. Comportamiento de cepa *E. coli* DH5α en medio mínimo M9 sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

VII.6.2. Quimiotaxis en medio de cultivo líquido.

VII.6.2.1. Medio mínimo M9 con 3 cepas bacterianas.

El proceso de quimiotaxis se encuentra también reportado como un proceso de respuesta rápida propulsado por el flagelo de la bacteria cuando el entorno está conformado por ambientes líquidos (Gao *et al.*, 2016), se propuso el desarrollo del mismo experimento, pero llevado a cabo en medio líquido evaluado a un tiempo no mayor a tres horas. Las concentraciones aplicadas para este ensayo, fueron basadas en los resultados obtenidos previamente en el ensayo de quimiotaxis en medio sólido, específicamente utilizando los valores favorables para la cepa *B. subtilis* LPM1 y aumentando en este ensayo el M1 y M2 moléculas fluorescentes que contenían terminaciones ácidas y que podían permitir tener un panorama sobre el comportamiento de atracción hacia ácidos por la bacteria.

La cepa *B. subtilis* LPM1 en la Tabla 19 presenta que los ácidos málico, oxálico y M1, la respuesta quimioatrayente fue temprana, mientras que para el ácido succínico y M2, la respuesta se vio reflejada a la hora de estar en contacto, en los restantes ácidos se presentó el proceso hasta los 90 min. Esta variabilidad notoria que presentó la cepa con cada ácido orgánico se debe a la capacidad que tiene de identificar y generar comunicación entre ellas para realizar dicho proceso de quimiotaxis (Franco *et al.*, 2019). A pesar de la diferencia de dicho proceso ante cada ácido orgánico, se logró comprobar mediante esta técnica que en tiempos cortos estos procesos de comunicación denominados como “*quorum sensing*” en las bacterias pudieran estar involucrados para llevar a cabo este proceso.

La cuantificación de UFC · mL⁻¹ más alta que se presentó para esta cepa fue en el tratamiento con ácido málico 100 µM con un valor de 2.1 x10⁹. Las UFC · mL⁻¹ iniciales para este ensayo respectivos de esta bacteria fue de 5.0 x10⁷, con este valor podemos determinar que las bacterias que se encontraban inicialmente ya estaban presentes en el tubo capilar y algunas más de las que se habían reproducido en ese lapso de tiempo en el mejor tratamiento cuando la cinética fue detenida.

El ácido málico se encuentra mayormente reportado como un fuerte quimioatrayente en la colonización de la raíz para cepas del género *B. subtilis* (Lakshmanan, Selvaraj, y Bais,

2014; Tan *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 2011; Rudrappa *et al.*, 2008), con este ensayo se pudo comprobar que para la cepa de interés PGPR funcionó de manera eficaz siendo el mejor reclutador de UFC · mL⁻¹ en un periodo corto de tiempo.

Tabla 19. Cuantificación de UFC · mL⁻¹ de la cepa *B. subtilis* LPM1 en cinética evaluada.

Tratamiento	30 min UFC · mL ⁻¹	60 min UFC · mL ⁻¹	90 min UFC · mL ⁻¹	120 min UFC · mL ⁻¹	150 min UFC · mL ⁻¹	180 min UFC · mL ⁻¹
AM	3.3 x10 ⁸	1.4 x10 ⁹	1.6 x10 ⁸	2.0 x10 ⁹	2.1 x10 ⁹	2.1 x10 ⁹
AF	0	0	0	4.0 x10 ⁸	4.1 x10 ⁹	1.7 x10 ⁹
AC	0	0	0	5.6 x10 ⁸	7.9 x10 ⁸	1.2 x10 ⁹
AO	1.3 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	2.1 x10 ⁸	2.1 x10 ⁸	2.2 x10 ⁸	2.5 x10 ⁸
AS	0	1 x10 ⁷	1.0 x10 ⁸	1.2 x10 ⁸	1.3 x10 ⁸	1.4 x10 ⁸
M1	2.1 x10 ⁸	2.2 x10 ⁸	2.4 x10 ⁸	2.5 x10 ⁸	2.8 x10 ⁸	3 x10 ⁸
M2	0	2 X10 ⁷	4 X10 ⁷	1.0 X10 ⁸	3.3 X10 ⁸	3.5 X10 ⁸
B	0	0	0	0	0	0

UFC · mL⁻¹ cuantificadas de la dilución 10⁶, AM= ácido málico, AF= ácido fumárico, AC= ácido cítrico, AO= ácido oxálico, AS= ácido succínico, M1= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido carboxílico y M2= marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácido málico.

En la Tabla 20 se muestran los datos obtenidos para la cepa *B. subtilis* PY79, en esta bacteria únicamente se evaluaron los 5 ácidos orgánicos. El ácido málico, fumárico y oxálico presentaron respuesta desde los 30 min, mientras que los dos ácidos restantes la presentaron hasta los 90 min. Nuevamente este proceso variante entre la migración hacia los ácidos se adjudica a la capacidad que tiene cada cepa bacteriana de identificar compuestos que le funcionen como quimioatrayente, proceso que se encuentra relacionado con compuestos o mecanismos distintos (Rudrappa *et al.*, 2008). Para esta diferente cepa de *B. subtilis*, a los 180 min de la evaluación el ácido cítrico fue el que presentó mayor número de UFC · mL⁻¹ con 3.4 x10⁹.

Las UFC · mL⁻¹ iniciales para este ensayo, respectivos a esta bacteria fue de 8.4 x10⁹, con este valor se determinó que no todas las bacterias se encontraban presentes en el tubo capilar del mejor tratamiento cuando la cinética fue detenida, caso contrario en la cepa *B. subtilis* LPM1, donde ya se encontraba la presencia de bacterias que ya se

habían duplicado en el mejor tratamiento siendo un 102.38% respectivo mientras que en esta cepa solo se tenía dentro del capilar un 40.47% de las células iniciales inoculadas.

Tabla 20. Cuantificación de UFC · mL⁻¹ de la cepa *B. subtilis* PY79 en cinética evaluada.

Tratamiento	30 min UFC · mL ⁻¹	60 min UFC · mL ⁻¹	90 min UFC · mL ⁻¹	120 min UFC · mL ⁻¹	150 min UFC · mL ⁻¹	180 min UFC · mL ⁻¹
AM	1 x10 ⁷	4 x10 ⁷	1.2 x10 ⁸	1.7 x10 ⁹	2.0 x10 ⁹	2.9 x10 ⁹
AF	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	6 x10 ⁷	2.1 x10 ⁸	1.1 x10 ⁹	1.7 x10 ⁹
AC	0	0	0	6 x10 ⁷	2.4 x10 ⁸	3.4 x10 ⁹
AO	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	8 x10 ⁷	5.5 x10 ⁸	2.0 x10 ⁹
AS	0	0	0	3.7 x10 ⁸	3.9 x10 ⁸	2.2 x10 ⁹
B	0	0	0	0	0	0

UFC · mL⁻¹ cuantificadas de la dilución 10⁶, AM= ácido málico, AF= ácido fumárico, AC= ácido cítrico, AO= ácido oxálico y AS= ácido succínico.

La cepa *E. coli* DH5α presentó un proceso quimioatrayente más pronto con la mayoría de los ácidos en comparación con las dos cepas antes mencionadas, se identificó una respuesta desde los 30 min con el ácido málico, fumárico y succínico, mientras que, con los dos restantes, la respuesta ocurrió a los 60 min. El valor más alto de UFC · mL⁻¹ para esta bacteria fue de 2.6 x10⁸ con el ácido fumárico. Cabe mencionar que las UFC · mL⁻¹ para este ensayo respectivo a esta bacteria fue de 3.3 x10⁹, con este valor podemos determinar que no todas las bacterias se encontraban presentes en el tubo capilar del mejor tratamiento, sino que solo se encontraba un 7.87% presentes cuando la cinética fue detenida. Esto se debe al rápido metabolismo y tasa de crecimiento típico de *E. coli*.

Tabla 21. Cuantificación de UFC · mL⁻¹ de la cepa *E. coli* DH5α en cinética evaluada.

Tratamiento	30 min UFC · mL ⁻¹	60 min UFC · mL ⁻¹	90 min UFC · mL ⁻¹	120 min UFC · mL ⁻¹	150 min UFC · mL ⁻¹	180 min UFC · mL ⁻¹
AM	1 x10 ⁷	9 x10 ⁷	2.1 x10 ⁸	9.3 x10 ⁸	9.7 x10 ⁸	1.2 x10 ⁹
AF	2 x10 ⁷	8 x10 ⁷	9 x10 ⁷	1.0 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	2.6 x10 ⁸
AC	0	5 x10 ⁷	7 x10 ⁷	9 x10 ⁷	6.1 x10 ⁸	2.1 x10 ⁸
AO	0	7 x10 ⁷	8 x10 ⁷	1.7 x10 ⁸	8.3 x10 ⁸	1.7 x10 ⁹
AS	1 x10 ⁷	6 x10 ⁷	5.3 x10 ⁸	7.0 x10 ⁸	1.3 x10 ⁹	1.4 x10 ⁹
B	0	0	0	0	0	0

UFC · mL⁻¹ cuantificadas de la dilución 10⁶, AM= ácido málico, AF= ácido fumárico, AC= ácido cítrico, AO= ácido oxálico y AS= ácido succínico.

Al comparar los tres valores obtenidos en los mejores tratamientos respectivos a cada bacteria, podemos estipular que para *E. coli* DH5α, el reclutamiento de bacterias fue más bajo en comparación con las dos anteriores, teniendo en segundo lugar a *B. subtilis* PY79 y en primer lugar a *B. subtilis* LPM1 con un valor mayor al 100%. Es importante destacar que el proceso de división celular influencia este ensayo, ya que también existe una porción de estas bacterias que murieron en ese lapso de tiempo por su ciclo de vida, y a diversos factores que influyen el crecimiento bacteriano, como el pH, la temperatura, presión osmótica y la atmósfera en la incubación, a pesar de que estos parámetros fueron los mismo en todas, existe una variación específica de cada bacteria en sus rangos óptimos de desarrollo, por lo cual su tasa de crecimiento fue variada (Rodríguez Cavallini, 2005).

VII.7. Motilidad.

VII.7.1. Medio LB diluido con 3 cepas bacterianas.

La motilidad permite que los organismos generen estrategias de supervivencia a partir de la evolución y adaptación ante diversos factores (Gao *et al.*, 2019) utilizando proteínas sensoras que les permitan reconocer mediante gradientes de concentración moléculas que pueden servirles como nutrientes o también como repelentes para llevar a cabo o no la colonización de las raíces en las plantas. Sin embargo, este proceso no se lleva a cabo

solo, sino que está acompañado de la quimiotaxis, fenómeno dependiente en la mayoría de las bacterias; este proceso es desencadenado cuando intervienen quimiorreceptores que provocan modificaciones en los estados de fosforilación de la quinasa CheA y su regulador de respuesta CheY, los cuales interactúan con el motor del flagelo ocasionando la motilidad en las bacterias, lo que permite a partir de este suceso la interacción inicial entre el huésped y el microorganismo; la presencia y abundancia de los quimiorreceptores en las bacterias es dependiente del estilo de vida y el tamaño de su genoma (Allard-Massicotte *et al.*, 2016).

En conjunto al experimento antes mencionado de quimiotaxis en medio mínimo M9 sólido y basándose en otra metodología reportada para evaluar la relación entre motilidad y quimiotaxis (Weert *et al.*, 2002), se reporta que los flagelos, las fimbrias y los pilis permiten que las bacterias puedan adherirse a las plantas, las flagelinas son cruciales en esta interacción, ya que están involucradas en el reconocimiento de plantas hospedantes y no hospedantes (Dutta, Rani y Podile, 2013). El efecto evaluado de motilidad se encuentra relacionado con la actividad de estos tres compuestos anteriormente mencionados correspondientes a las estructuras bacterianas, así como al proceso de quimiotaxis por lo cual se realizó dicha prueba.

Se obtuvieron resultados muy variantes e inesperados para las tres cepas probadas; para las dos bacterias del género *B. subtilis*, la utilización de medio LB 20 veces diluido, ocasiono un desorden en el desarrollo de las bacterias, generando el crecimiento acelerado en algunos tratamientos y en otros atrasando dicho proceso.

En la Figura 39 y en la Figura 40 se observa el comportamiento variante en las dos cepas del género *B. subtilis*, donde en algunas mediciones se presentan desviaciones estándar muy elevadas, debido al descontrol que presentaron las bacterias durante su crecimiento. El ensayo fue detenido a los 6 días debido a que la caja estaba cubierta completamente por las bacterias en la mayoría de los tratamientos.

Esta metodología estaba diseñada y probada en *Pseudomonas fluorescens*, una bacteria Gram-negativa (Weert *et al.*, 2002). En la Figura 41 se muestra a *E. coli* DH5 α , una bacteria también Gram-negativa en la cual se pudo evaluar su crecimiento hasta los 45

días mientras que las dos cepas de *B. subtilis* únicamente alcanzaron una medición a los 6 días después de inocularlas.

Este comportamiento nos da una idea sobre un posible factor variante entre estas dos cepas y las dos cepas de *B. subtilis* evaluadas, ya que presentan diferencias en su envoltura celular. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas desempeña un papel muy importante para la protección de éstas permitiendo estabilizar la membrana interna, mientras que en las Gram-positivas no cuentan con ésta, pero si con una pared gruesa de peptidoglicano, éstas a menudo viven en ambientes hostiles pero al carecer de la membrana exterior de protección, el comportamiento es diferente, estas estructura complejas en ambos tipos de bacterias tienen la capacidad de regular su respuestas ante las cambiantes condiciones de su entorno (Silhavy *et al.*, 2010), por lo cual dicho fenómeno podría estar relacionado con la variación en el crecimiento presentado en las cepas Gram-positivas de la Gram-negativas.

La variabilidad que presentó *E. coli* DH5 α , se atribuye a que los nutrientes no fueron suficientes para su desarrollo óptimo, por lo cual su crecimiento se vio reducido de manera significativa en comparación a su crecimiento promedio normal (Burkart, Toguchi y Harshey, 1998), a pesar de que se obtuvo un crecimiento en esta última bacteria, los datos también fueron muy variantes, ya que en algunos tratamientos después de cierto tiempo, comenzó a presentar anomalías en su desarrollo, presentando la misma tendencia que las cepas de *B. subtilis*.

Mediante el análisis de pruebas reportadas sobre quimiotaxis líquida y sólida así como la motilidad en este trabajo, permitieron determinar mediante su análisis comparativo que el entorno en el que se encuentran en desarrollo y crecimiento las bacterias influye en dichas variables dependiendo las características de cada cepa; la conformación de moléculas externas y sus concentraciones, permiten a las bacterias generar una relación de comunicación entre ellas, con la finalidad de señalar si el compuesto funge como benéfico a dañino para estas. Mediante las pruebas sometidas con los ácidos orgánicos se determinó cuales funcionaron como fuentes de carbono o como moléculas quimiotácticos para las 3 bacterias probadas.

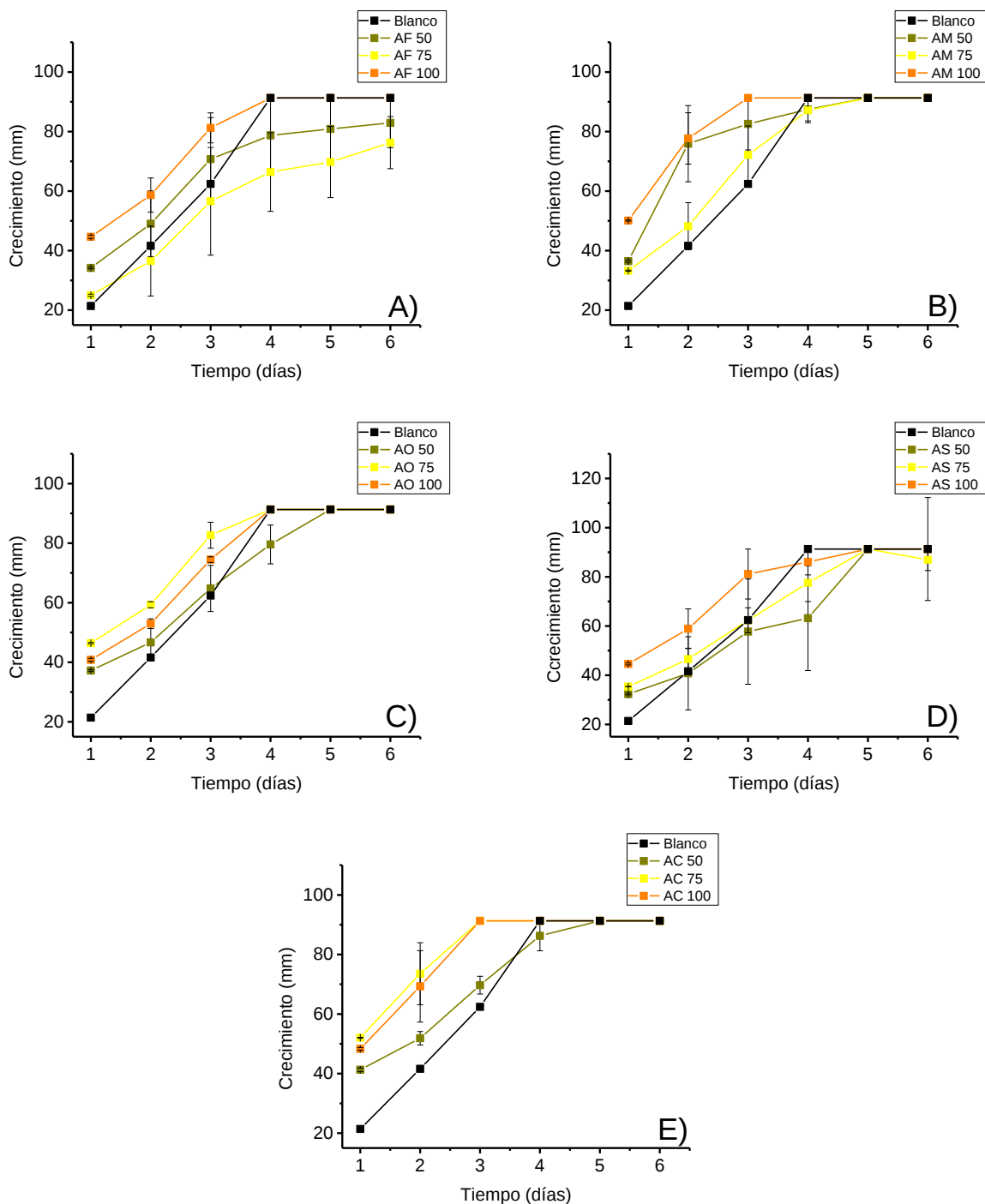


Figura 39. Comportamiento de cepa *B. subtilis* LPM1 en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada día con una duración de 6 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

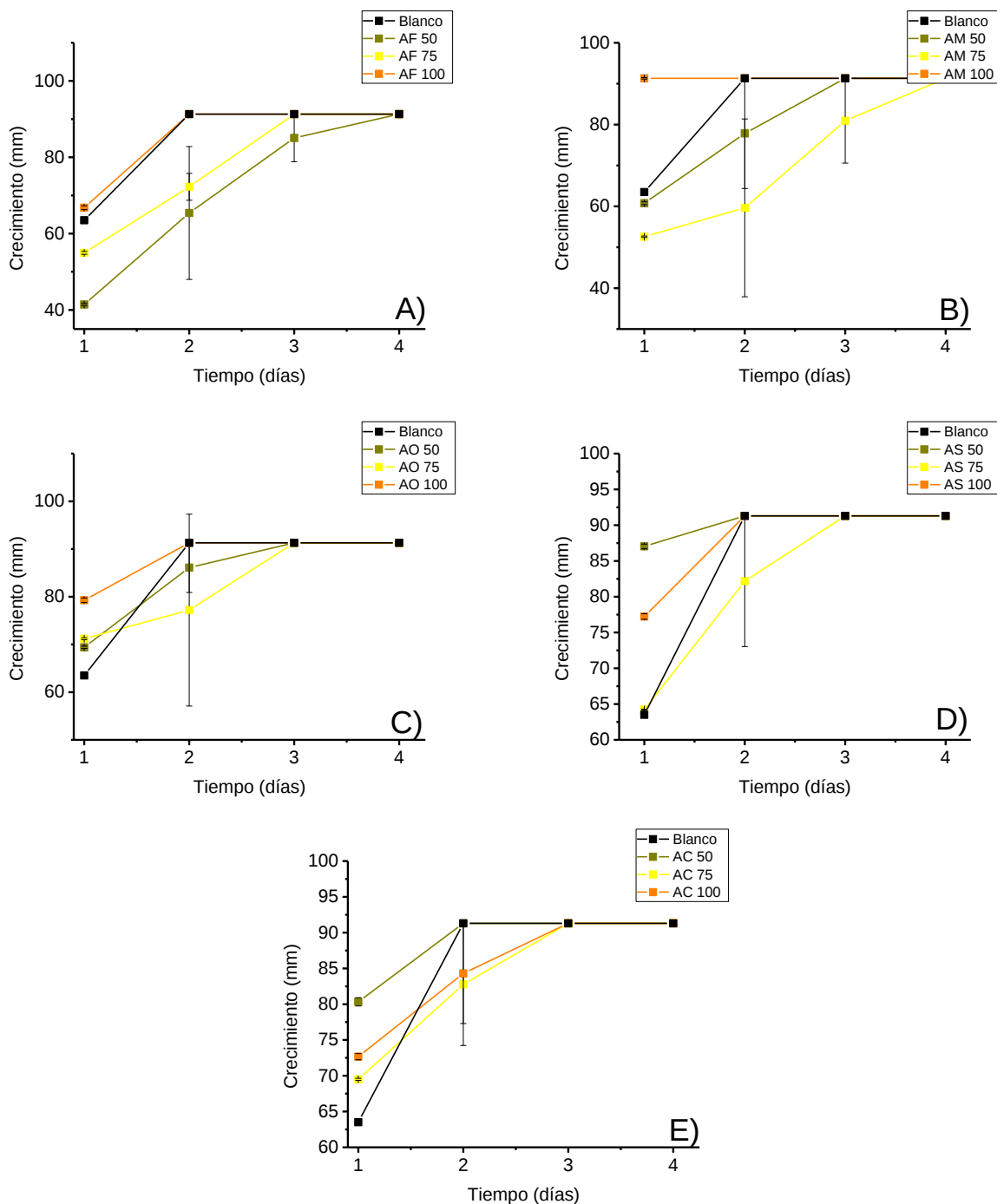


Figura 40. Comportamiento de cepa *B. subtilis* PY79 en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada día con una duración de 4 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

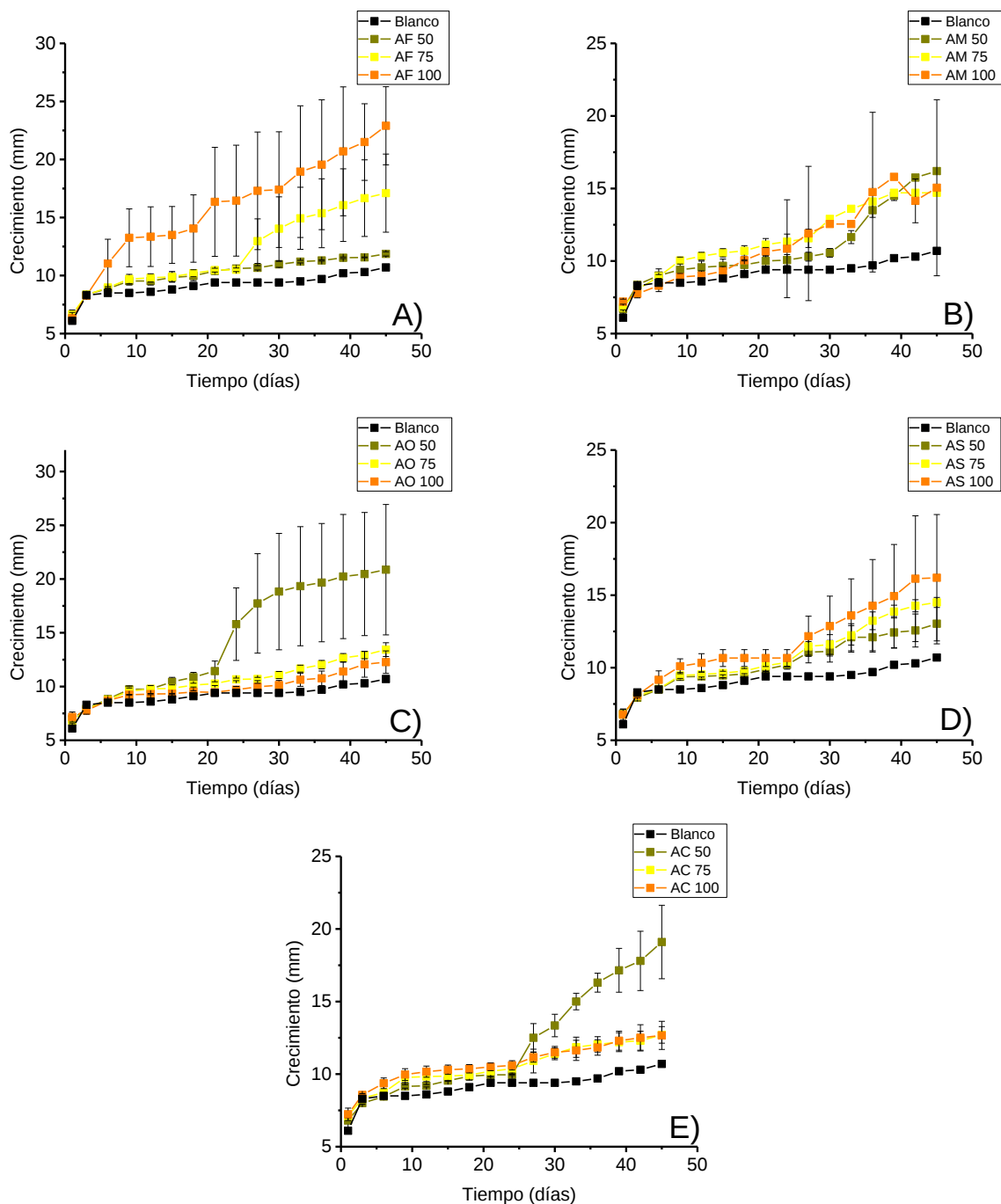


Figura 41. Comportamiento de cepa *E. coli* DH5α en medio LB diluido sólido, realizando mediciones cada 3 días con una duración de 45 días de crecimiento en contacto con cinco ácidos orgánicos distintos, donde A) ácido fumárico, B) ácido málico, C) ácido oxálico, D) ácido succínico y E) ácido cítrico.

VIII. CONCLUSIONES.

Se caracterizaron los marcadores mediante fluorescencia, determinando sus propiedades de tiempo de vida, rendimiento cuántico y desplazamiento de Stoke, lo cual permitió escoger al marcador idóneo para las pruebas posteriores.

Se cumplió con la estandarización de la técnica mediante los ensayos preliminares, probando la cepa *B. subtilis* LPM1 y *E. coli* DH5 α mediante un marcador pentámero del tipo fenilenetnileno, lo que aportó datos para la publicación de un artículo a partir de dichas pruebas.

El pentámero con cadena alquílicas de 12 carbonos presentó un rendimiento cuántico de 77%, buena solubilidad en solventes polares en particular N-metilpirrolidona, lo que permitió la mezcla de esta molécula con el medio de cultivo de bacterias para su evaluación.

La aplicación de la técnica de Raman utilizada en las pruebas con el pentámero, permitió escanear y reconocer una bacteria sola, a la cual se le determinaron sus espectros a lo largo de la bacteria gracias a la facilidad de polarizabilidad del triple enlace..

La evaluación de 5 marcadores fluorescentes con 6 diferentes cepas bacterianas, mostró diferentes patrones en la intensidad de fluorescencia evaluados en LSCM y mediante espectroscopía de fluorescencia, siendo el M1 aquel que presento en la mayoría de las bacterias intensidades de fluorescencia mayores al resto de las moléculas probadas.

Se confirmó la función de la cepa *B. subtilis* LPM1 como una PGPR en el experimento montado en el invernadero, debido a la promoción de crecimiento en el tejido radicular para la variedad de *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom y en la zona aérea para *S. lycopersicum* cv. Silvestre, mostrando diferencias estadísticamente significativas respectivas a su control.

La aplicación del M1 para determinar los ensayos de colonización en raíces de tomate de la variedad Micro-Tom con *B. subtilis* LPM1 a nivel *in vitro* e *in planta* permitió conocer

y visualizar las zonas en las que se presentaron los patrones de colonización bacteriana (zona de alargamiento, pelos radiculares, brotes secundarios de raíz, en general, estructuras maduras de la raíz) de una manera sencilla.

La aplicación del elicitador químico BTH a una concentración de 500 μM expuesto 12 horas a la planta de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom generó la mayor producción de exudados radiculares por esta (ácidos orgánicos evaluados), los cuales fueron analizados cualitativamente y cuantitativamente mediante LC-MS.

Los ensayos de quimiotaxis en medio sólido prueba preliminar determinaron que la cepa *B. subtilis* LPM1 resultó como mejor reclutadora de los ácidos oxálico, succínico y málico, siendo este último aquel que presentó mejores resultados en el crecimiento en comparación de los otros dos ácidos.

El ensayo extenso de quimiotaxis en medio sólido para *B. subtilis* LPM1 el ácido fumárico, cítrico y málico a una concentración de 100 μM se comportaron como compuestos quimioatrayentes.

La quimiotaxis en medio líquido permitió evaluar la respuesta rápida y temprana de tres cepas bacterianas hacia concentraciones de compuestos orgánicos óptimos obtenidos de ensayos previos, reportados como quimioatrayentes. Determinando que la cepa *B. subtilis* LPM1 presentó una mejor actividad quimiotáctica hacia los ácidos orgánicos utilizados migrando en un 102.38% en el mejor tratamiento, mientras que *B. subtilis* PY79 solo alcanzo un 40.47% y *E. coli* DH5 α un 7.87%

El ensayo de motilidad permitió visualizar la relación que existe entre quimiotaxis y motilidad bacteriana a partir de la taxis unidireccional, presentando una respuesta temprana en las cepas de genero *B. subtilis* y tardío en *E. coli* DH5 α .

VIII.1. Conclusión final.

Se logró obtener el objetivo principal del trabajo de tesis por la determinación de los patrones de colonización de la bacteria *B. subtilis* LPM1 a nivel *in vitro* en la raíz de tomate

de la variedad Micro-Tom y a nivel *in planta* en las raíces de las variedades de tomate Floradade, Micro-Tom y Silvestre mediante la utilización del marcador fluorescente M1 a partir de LSCM, el cual fue diseñado basándose en los experimentos evaluados en el pentámero también probado en este trabajo. Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo de investigación es aceptada.

IX. PERSPECTIVAS.

Se propone a futuro realizar estudios más complejos para determinar la(s) zona(s) blanco a la que se pega o se encuentran interaccionando las moléculas fluorescentes en las bacterias, con la finalidad de tener una idea del por qué el comportamiento tan variado en la respuesta de los marcadores con las distintas cepas.

X. ANEXO A.

Comportamiento presentado en el parámetro de tiempo de vida evaluado para la caracterización de 5 moléculas fluorescentes.

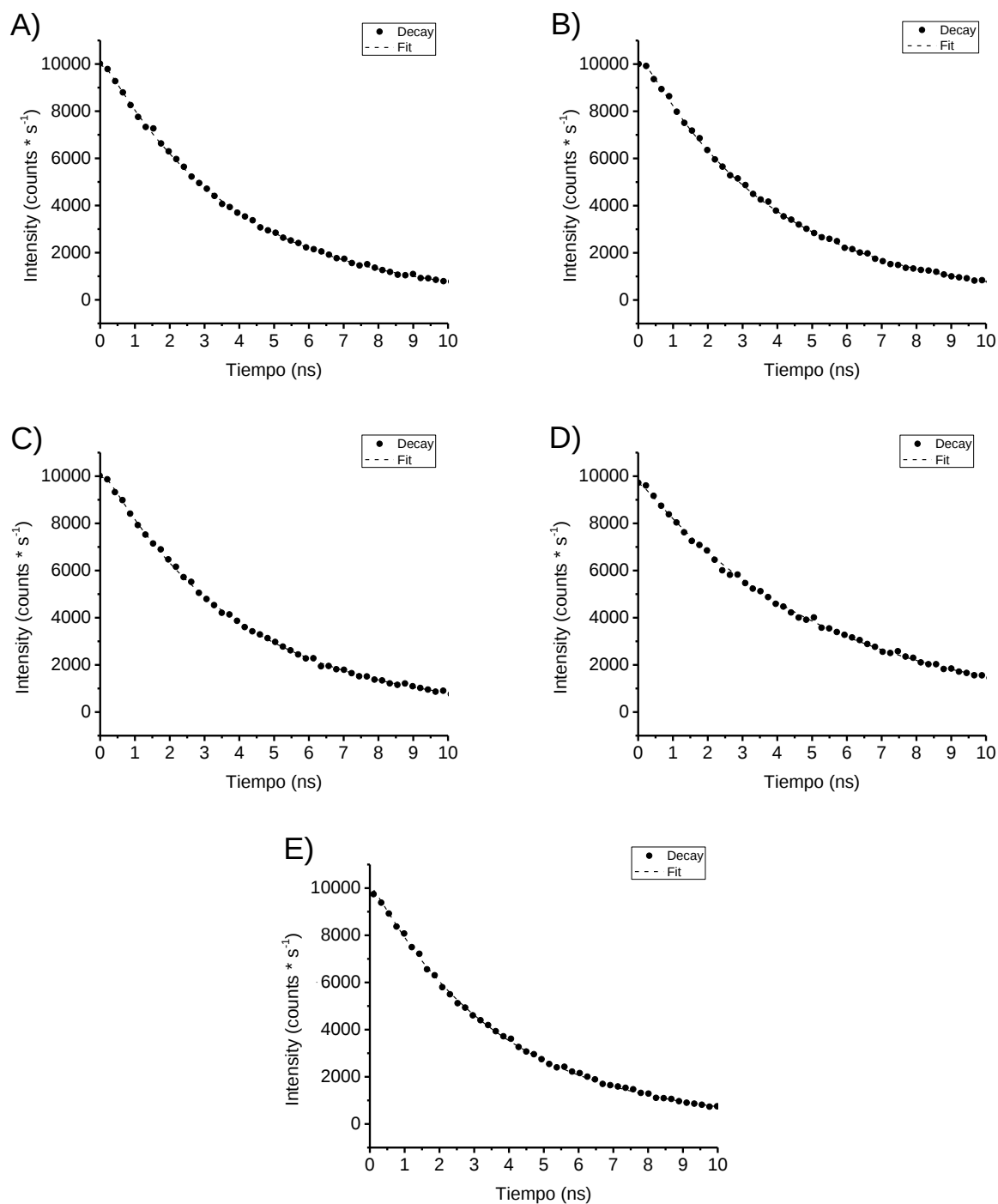


Figura 42. Tiempo de vida de moléculas fluorescentes donde A) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación ácida (M1), B) marcador pireno sulfonato de sodio con terminación de biomolécula ácido málico (M2), C) marcador pireno con undecanoxo (M3), D) marcador hidroxipireno sulfonato de sodio (M4), E) marcador pireno sulfonato de sodio con triple enlace (M5), Decay= decaimiento y Fit= ajuste.

Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia de 3 cepas bacterianas (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pectobacterium cacticidum* y *Agrobacterium* sp.) interaccionando con 5 moléculas fluorescentes.

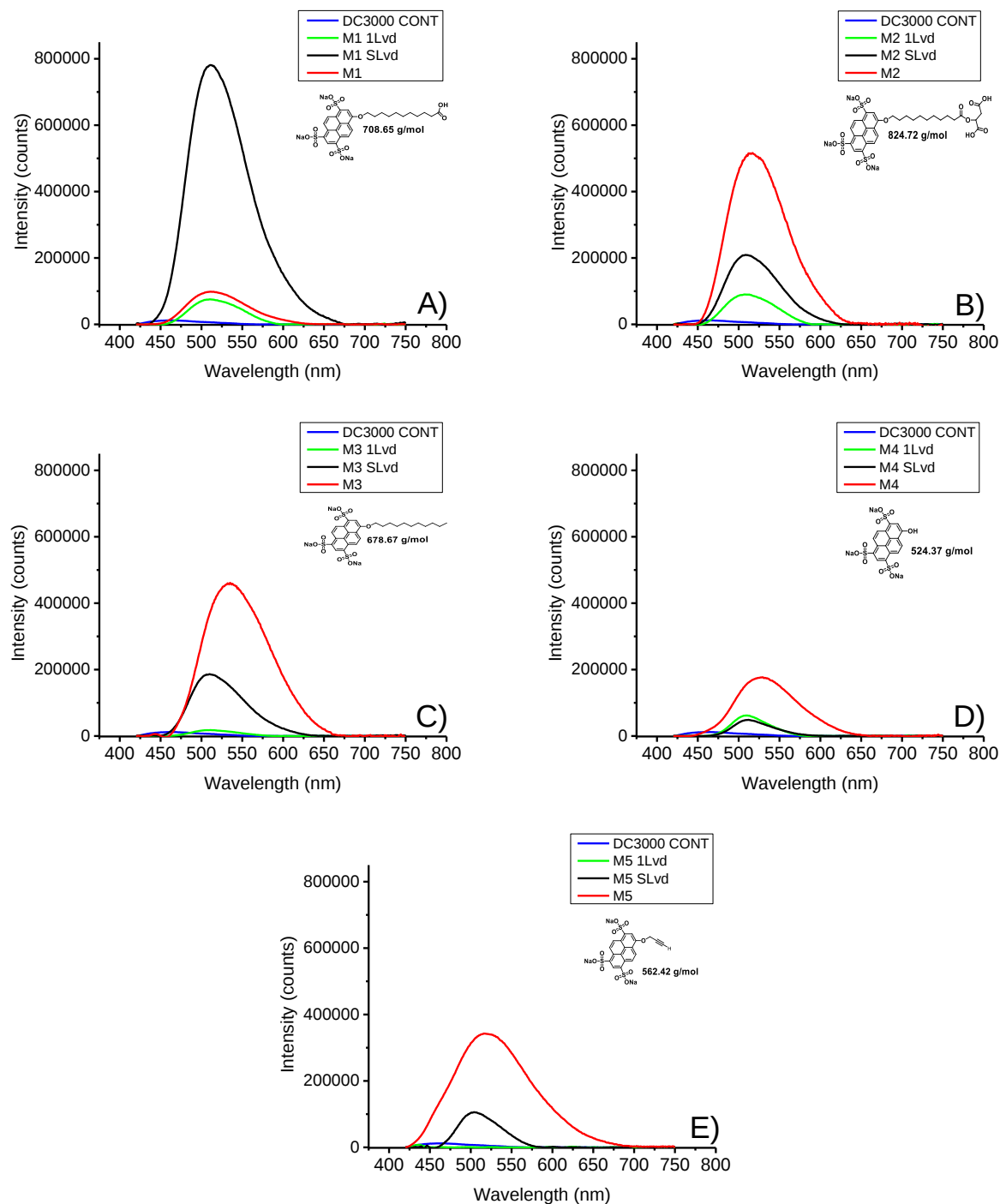


Figura 43. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

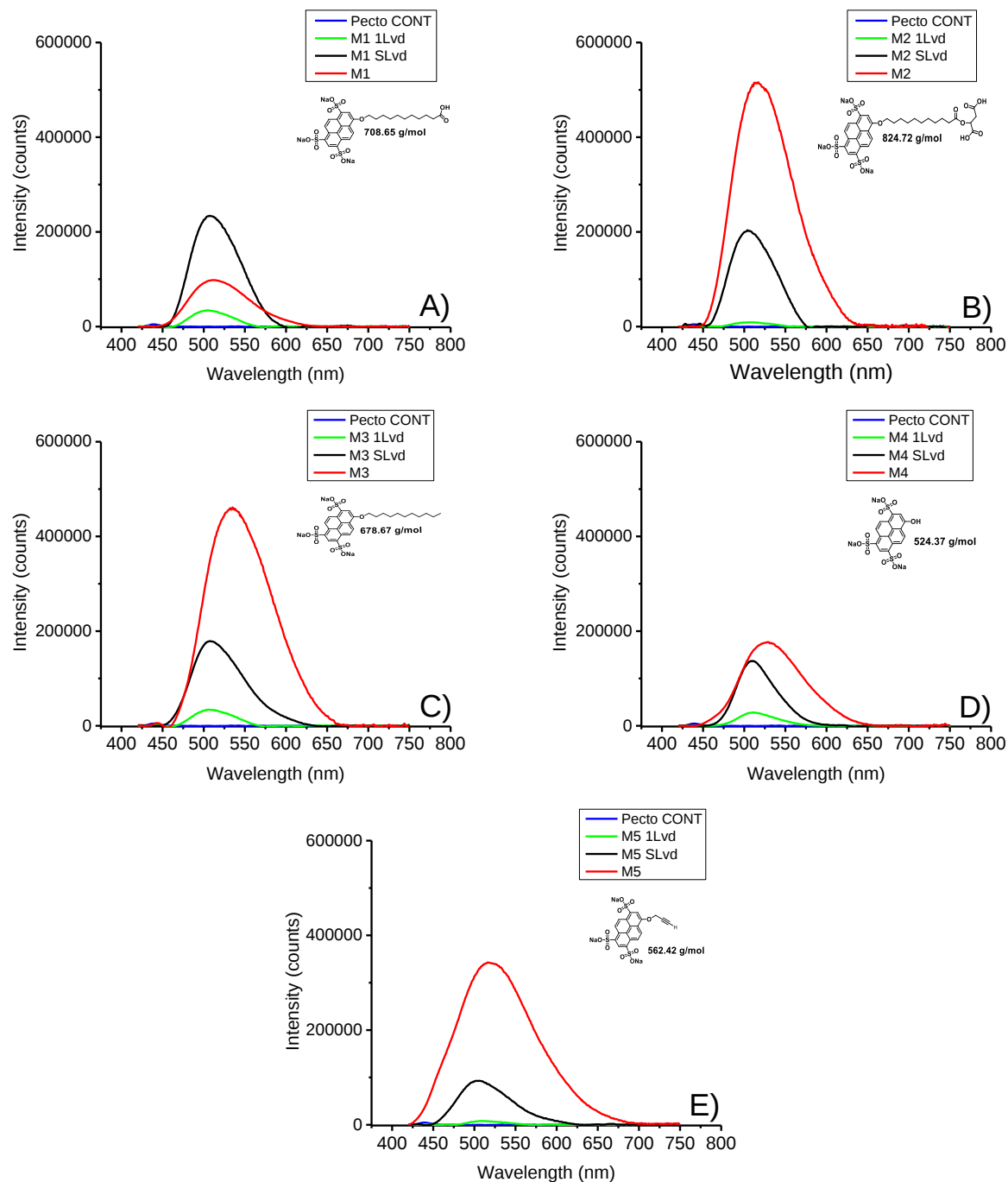


Figura 44. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *Pectobacterium cacticidum* interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

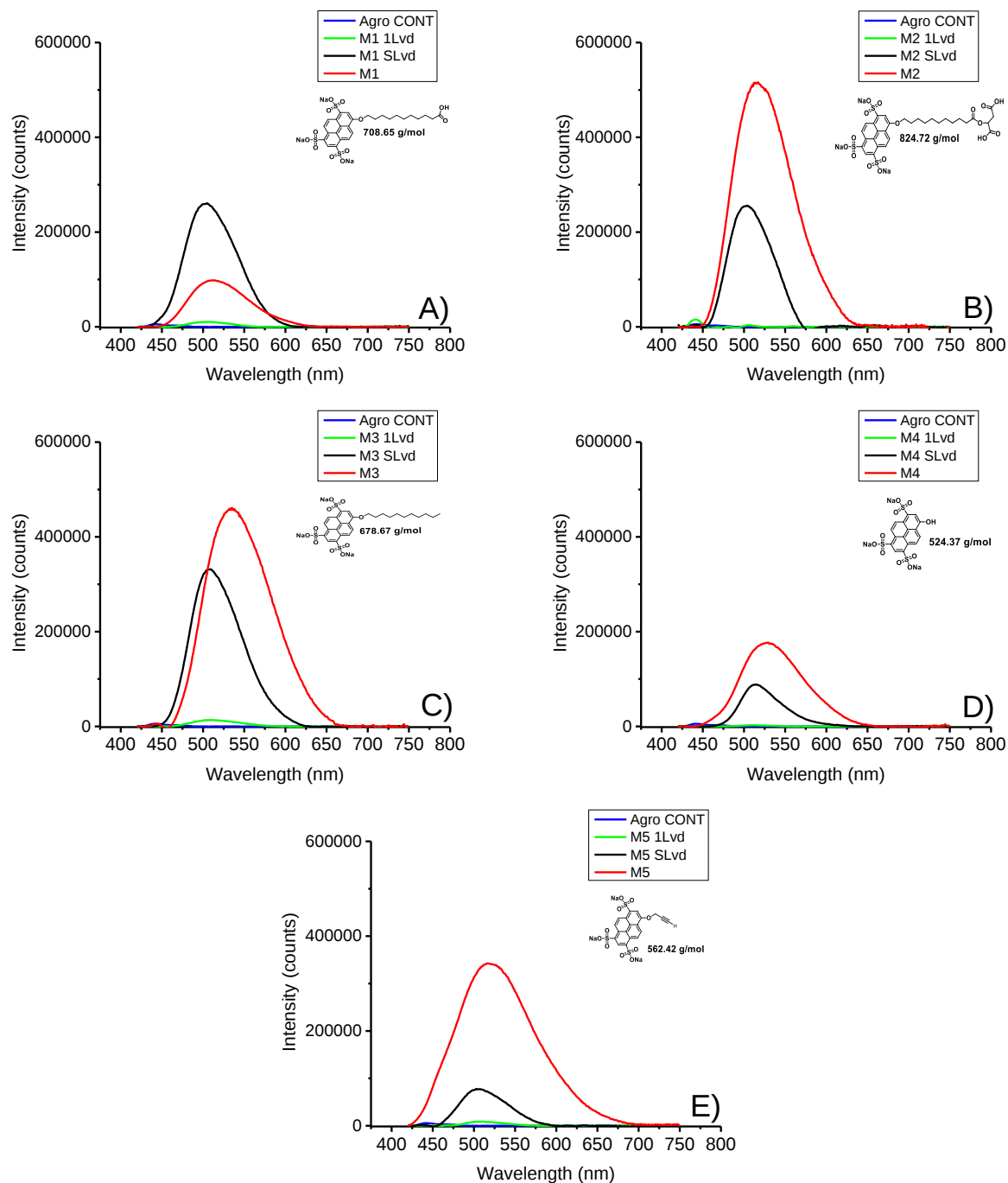


Figura 45. Comportamiento de espectroscopía de fluorescencia en laminillas con la cepa *Agrobacterium sp.* interaccionando con 5 moléculas fluorescentes. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, 1Lvd = un lavado, SLvd= sin lavado y CONT= control de cepa bacteriana.

Evaluaciones de pH en medio mínimo M9 interaccionando con 5 ácidos orgánicos distintos, ensayo realizado semanalmente con una duración de 1 mes.

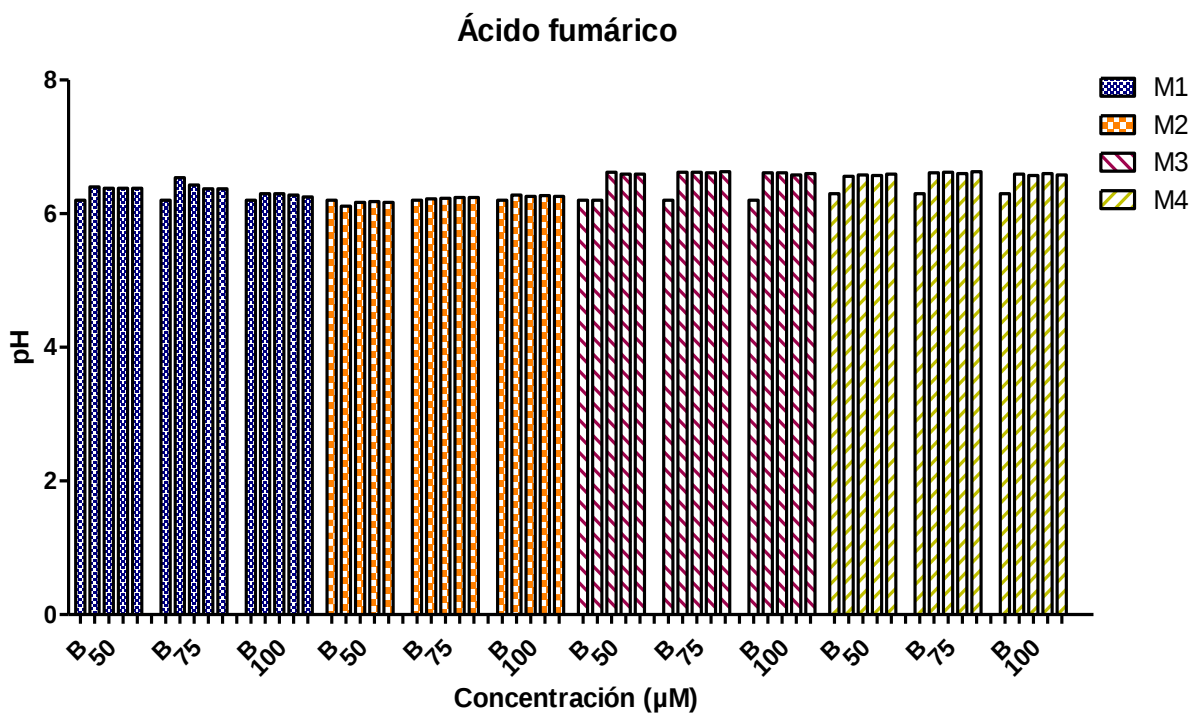


Figura 46. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido fumárico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 µM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.

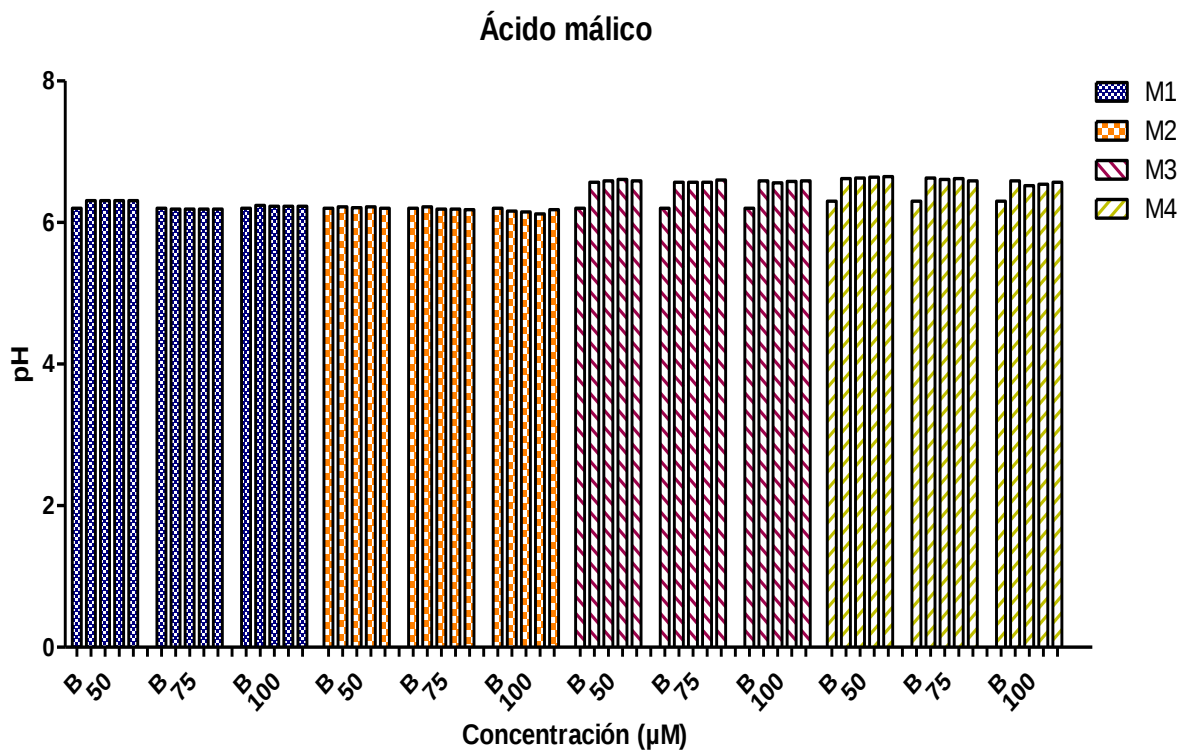


Figura 47. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido málico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 µM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.

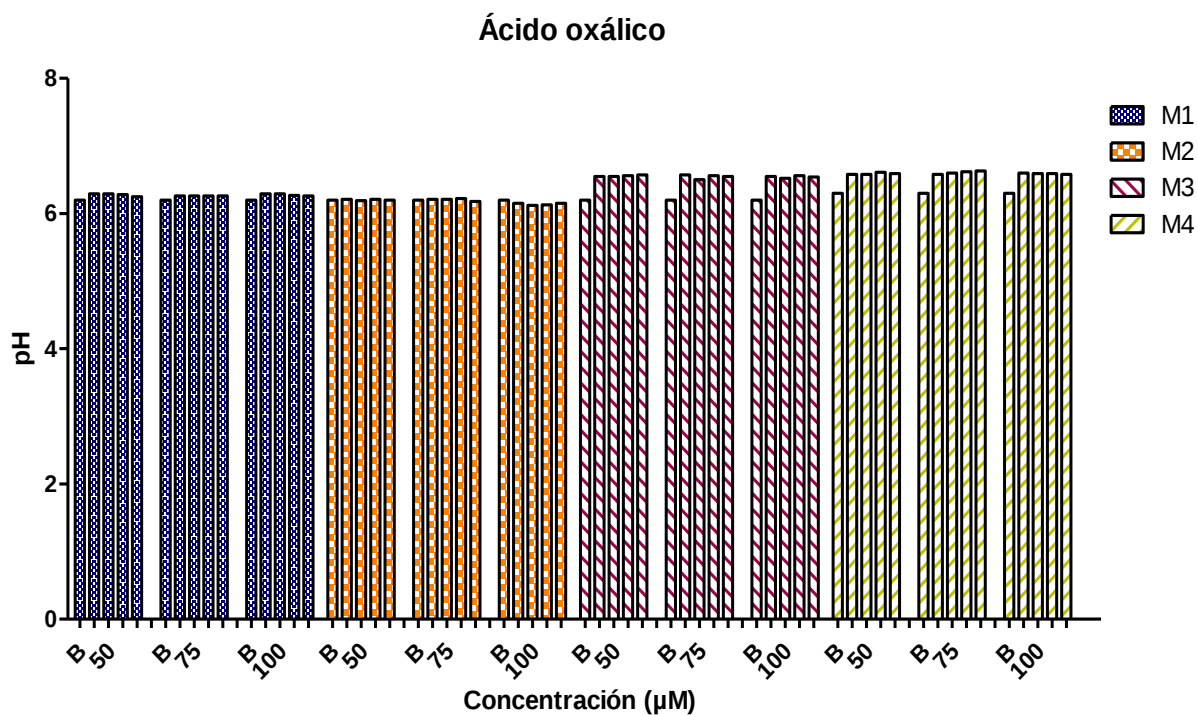


Figura 48. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido oxálico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 µM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.

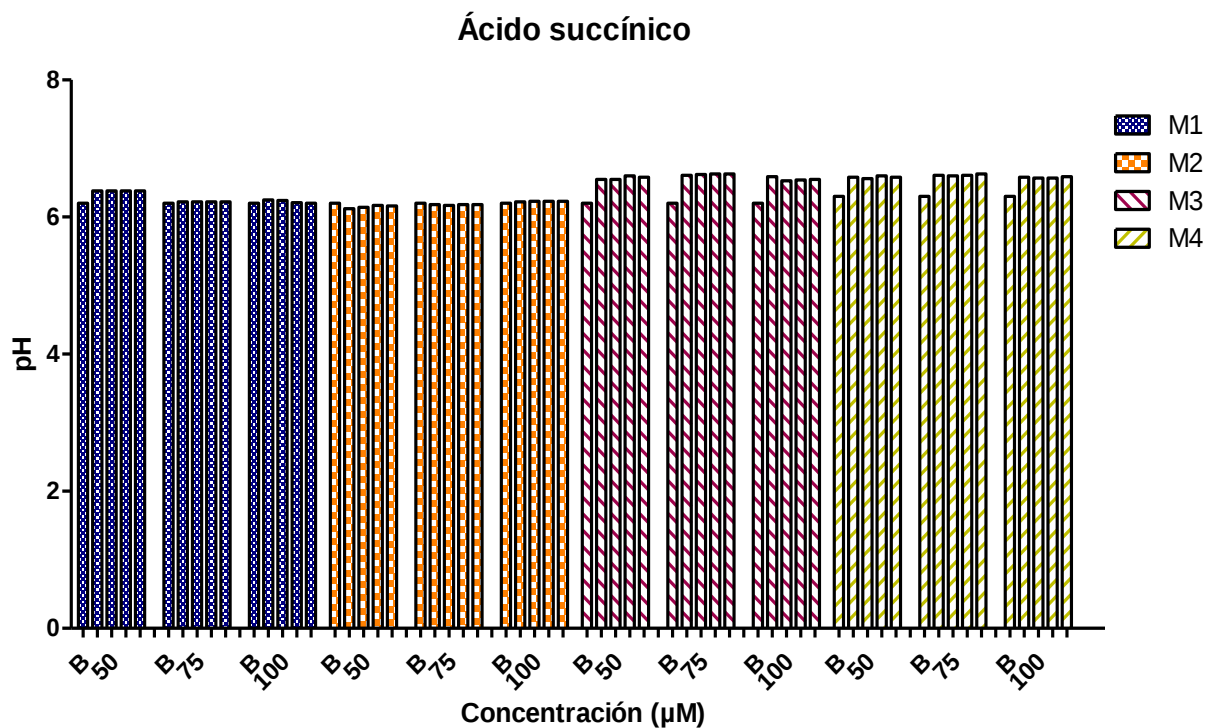


Figura 49. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido succínico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 µM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.

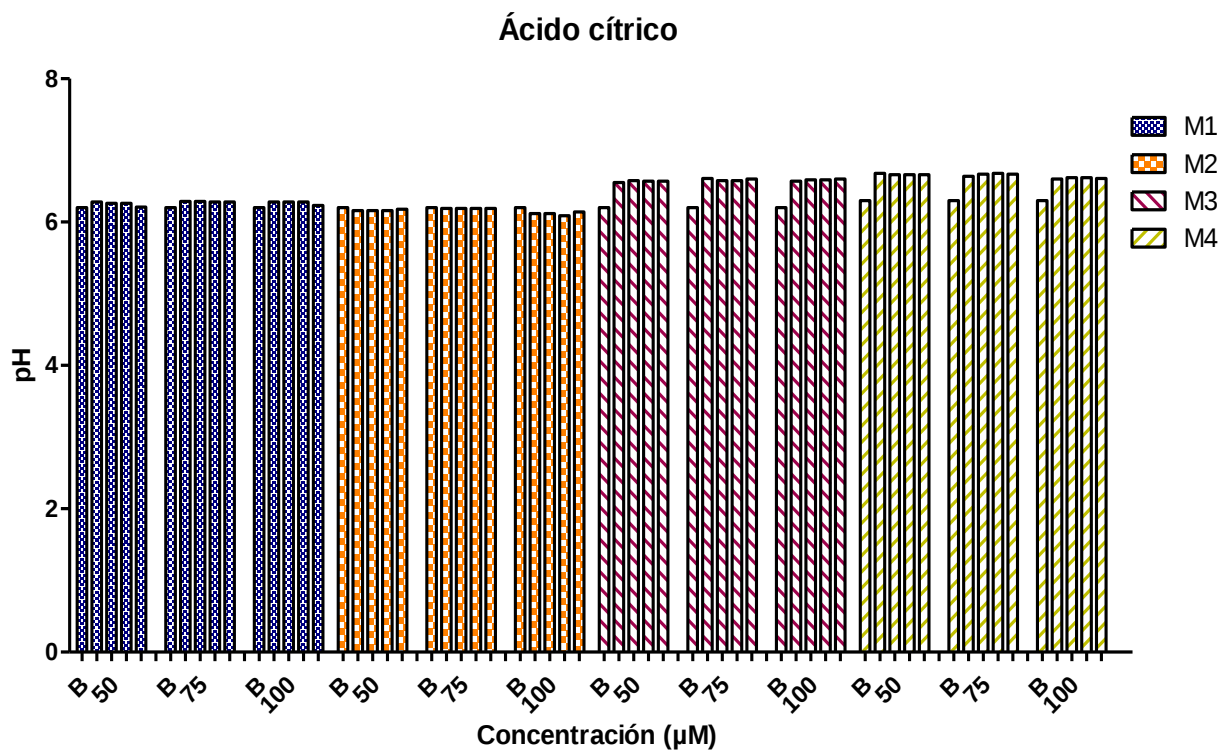


Figura 50. Comportamiento de pH en medio mínimo M9 interaccionando con ácido cítrico a tres concentraciones distintas 50, 75 y 100 µM, donde B= blanco, M1= muestreo 1, M2= muestreo 2, M3= muestreo 3 y M4= muestreo 4.

XI. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J.-F., Garneau, D., ... Beauregard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* Early Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots Involves Multiple Chemotaxis Receptors. *MBio*, 7(6), e01664-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16>
- Andrés, J. A., Rovera, M., Guiñazú, L. B., Pastor, N. A., & Rosas, S. B. (2012). Interactions Between Legumes and Rhizobia Under Stress Conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 77–94). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_5
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, Y. K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338–347. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Annous, B. A., Fratamico, P. M., & Smith, J. L. (2009, January). Scientific status summary: Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01022.x>
- Anyane-Yeboah, K. (2011). *Genetics. Pediatric Secrets*. Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06561-0.00008-2>
- Aréchiga, H. (1996). *Los fenómenos fundamentales de la vida*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=pQYm7IF7g7MC&dq=hidrófilico&source=gb_s_navlinks_s
- Arias, E., Méndez, M. T., Arias, E., Moggio, I., Ledezma, A., Romero, J., ... Giorgetti, E. (2017a). Supramolecular Recognition of *Escherichia coli* Bacteria by Fluorescent Oligo(Phenyleneethynylene)s with Mannopyranoside Termini Groups. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/s17051025>
- Arias, E., Méndez, M. T., Arias, E., Moggio, I., Ledezma, A., Romero, J., ... Giorgetti, E. (2017b). Supramolecular Recognition of *Escherichia coli* Bacteria by Fluorescent Oligo(Phenyleneethynylene)s with Mannopyranoside Termini Groups. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/S17051025>
- Arora, N. K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., & Maheshwari, D. K. (2012). PGPR for Protection of Plant Health Under Saline Conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 239–258). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_12
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., & Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2009.08.001>

- Atkins, P. W., De Paula, J., & Cwi, S. (2008). *Atkins química física*. Médica Panamericana.
- Ávila, A. C., Ochoa, J., Proaño, K., & Martínez, M. C. (2019). Jasmonic acid and nitric oxide protects naranjilla (*Solanum quitoense*) against infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* by eliciting plant defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 129–136.
<https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2019.01.002>
- Ayuk, M. E. D., Bader, C., Jürgen, N., Wolfgang, G., & Klemm, E. (2003). Investigation of the Photophysical and Electrochemical Properties of Alkoxy-Substituted Arylene–Ethynylene/Arylene–Vinylene Hybrid Polymers.
<https://doi.org/10.1021/MA0301395>
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S., & Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249(2), 271–277. <https://doi.org/10.1023/A:1022888900465>
- Badri, D. V., Chaparro, J. M., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2013). Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of arabidopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 4502–4512.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433300>
- Badri, D. V., Quintana, N., El Kassis, E. G., Kim, H. K., Choi, Y. H., Sugiyama, A., ... Vivanco, J. M. (2009). An ABC Transporter Mutation Alters Root Exudation of Phytochemicals That Provoke an Overhaul of Natural Soil Microbiota. *Plant Physiology*, 151(4), 2006–2017. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147462>
- Bais, Harsh P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233–266.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bais, Harsh Pal, Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134(1), 307–319.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2015). The “prime-ome”: Towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science*, 20(7), 443–452.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.002>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621–E1630.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>

- Bi, S., & Sourjik, V. (2018). Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2018.02.002>
- Biedrzycki, M. L., & Bais, H. P. (2013). Root Secretions: Interrelating Genes and Molecules to Microbial Associations. Is it All that Simple? *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 1, 137–140. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch12>
- Bowen, G. D., & Rovira, A. D. (1999). The Rhizosphere and Its Management To Improve Plant Growth. *Advances in Agronomy*, 66, 1–102. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60425-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60425-3)
- Brencic, A., & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 69(1), 155–194. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.155-194.2005>
- Brenner, S., Miller, J. H., & Broughton, W. (William J. . (2001). *Encyclopedia of genetics*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122270802/encyclopedia-of-genetics>
- Burkart, M., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2568>
- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). Bacillus subtilis SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495–506. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0556-2>
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Tyson, G. W., Vivanco, J. M., & Schenk, P. M. (2013). Activation of the Jasmonic Acid Plant Defence Pathway Alters the Composition of Rhizosphere Bacterial Communities. *PLoS ONE*, 8(2), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056457>
- Cassels, A. C., & Rafferty-McArdle, S. M. (2012). Priming of Plant Defences by PGPR against Fungal and Bacterial Plant Foliar Pathogens. In *Bacteria in Agrobiolology: Stress Management* (pp. 1–26). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_1
- Chan, Y. K., Savard, M. E., Reid, L. M., Cyr, T., McCormick, W. A., & Seguin, C. (2009). Identification of lipopeptide antibiotics of a Bacillus subtilis isolate and their control of Fusarium graminearum diseases in maize and wheat. *BioControl*, 54(4), 567–574. <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9201-x>
- Chávez-Betancourt, C. Olalde-Portugal, V., Sánchez-Arizpe, A., Padrón-Corral, E. y

- Flores-Olivas, A. (2006). Uso de rizobacterias para el control de hongos fitopatógenos y promoción de crecimiento en plantas. *Revista Agraria- Nueva Epoca*, 3(01868063), 24–31. Retrieved from http://www.uaaan.mx/DirInv/portal_agraria/agraria/PDF3/contenido03.pdf
- Chen, Y., Cao, S., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J., & Losick, R. (2012). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85(3), 418–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x>
- Chernin, L., & Glick, B. R. (2012). The Use of ACC Deaminase to Increase the Tolerance of Plants to Various Phytopathogens. In *Bacteria in Agrobiolology: Stress Management* (pp. 279–299). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_14
- Chu, S., Zhang, D., Zhi, Y., Wang, B., Chi, C.-P., Zhang, D., ... Zhou, P. (2018). Enhanced removal of nitrate in the maize rhizosphere by plant growth-promoting *Bacillus megaterium* NCT-2, and its colonization pattern in response to nitrate. *Chemosphere*, 208, 316–324. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.05.189>
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685–1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>
- Compant, S., Van Der Heijden, M. G. A., & Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 197–214. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x>
- Cote, C. K., Heffron, J. D., Bozue, J. A., & Welkos, S. L. (2015). *Bacillus anthracis* and Other *Bacillus* Species. *Molecular Medical Microbiology*, 1789–1844. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00102-5>
- Cox, J. R., Müller, P., & Swager, T. M. (2011). Interrupted Energy Transfer: Highly Selective Detection of Cyclic Ketones in the Vapor Phase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(33), 12910–12913. <https://doi.org/10.1021/ja202277h>
- Das, S. (2014). *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13533-7>
- De-la-Pena, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2014). Biotic Interactions in the Rhizosphere: A Diverse Cooperative Enterprise for Plant Productivity. *Plant Physiology*, 166(2), 701–719. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241810>
- Deloya-Martínez, A. (2006). Métodos de análisis físicos y espectrofométricos para el análisis de aguas residuales. *Revista Tecnología En Marcha*, 19(2), 31. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835509.pdf>
- Disney, M. D., Zheng, J., Swager, T. M., & Seeberger, P. H. (2004). Detection of

- Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 126(41), 13343–13346.
<https://doi.org/10.1021/ja047936i>
- Dutta, S., Rani, T. S., & Podile, A. R. (2013). Root Exudate-Induced Alterations in *Bacillus cereus* Cell Wall Contribute to Root Colonization and Plant Growth Promotion. *PLoS ONE*, 8(10), e78369.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078369>
- Egamberdieva, D. (2012). The Management of Soil Quality and Plant Productivity in Stressed Environment with Rhizobacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 27–40). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_2
- Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (n.d.). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Retrieved from www.medigraphic.org.mx
- Ewens, W. J. (2001). *Additive Genetic Variance*. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press. <https://doi.org/10.1006/RWGN.2001.1513>
- Fan, B. (2011). Plant colonization by GFP-labeled *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 and transcriptomic profiling of its response to plant root exudates, 1–123. Retrieved from papers3://publication/uuid/3E824701-900C-482D-9D3D-22B9DCCFF254
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2010.12.022>
- Fillit, H., Rockwood, K., Woodhouse, K. W., & Brocklehurst, J. C. (John C. (2010). *Brocklehurst's textbook of geriatric medicine and gerontology*. Saunders/Elsevier.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55.
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2018.07.044>
- Franco, A. G., Cadavid, L. F., Arévalo-Ferro, C., FRANCO, Á. G., CADAVID, L. F., & ARÉVALO-FERRO, C. (2019). Biofilms and Extracts from Bacteria Producing “Quorum Sensing” Signaling Molecules Promote Chemotaxis and Settlement Behaviors in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa) Larvae. *Acta Biológica Colombiana*, 24(1), 150–162. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.73642>
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738–1750.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>

- Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., & Rodriguez, F. (2019). Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiological Research*, 220, 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.11.006>
- Gao, S., Wu, H., Wang, W., Yang, Y., Xie, S., Xie, Y., & Gao, X. (2013). Efficient colonization and harpins mediated enhancement in growth and biocontrol of wilt disease in tomato by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 57(6), 526–533. <https://doi.org/10.1111/lam.12144>
- Gao, Shengfeng, Wu, H., Yu, X., Qian, L., & Gao, X. (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, 98, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.03.011>
- Gao, T., Ding, M., Yang, C.-H., Fan, H., Chai, Y., & Li, Y. (2019). The phosphotransferase system gene ptsH plays an important role in MnSOD production, biofilm formation, swarming motility, and root colonization in *Bacillus cereus* 905. *Research in Microbiology*, 170(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2018.10.002>
- García, C., Turlakov, G., Moggio, I., Arias, E., Valenzuela, J. H., Hernández, M., ... Ziolo, R. F. (2019). Synthesis and photophysical properties of conjugated (dodecyl)benzoateethynylene macromolecules: staining of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* rhizobacteria. *New Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05892J>
- García, V. (1995). *Introducción a la microbiología. (2a ed.)* (EUNED). Costa Rica: 1995. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=K_ETVnqnMZIC&pg=PA47&dq=tincion+gram+libros&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjYyq2k7JPgAhVQlqwKHTuiAk8Q6AEIOzAC#v=onepage&q=tincion gram libros&f=false
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.09.009>
- Golan, A., Kerem, Z., Tun, O. M., Luzzatto, T., Lipsky, A., & Yedidia, I. (2010). Combining flow cytometry and *gfp* reporter gene for quantitative evaluation of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* in *Ornithogalum dubium* plantlets. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1136–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04517.x>
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2017.08.016>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Chapter I, Isolation and Quantification of DNA.*

- Molecular cloning, A laboratory manual* (Vol. 1).
<https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>
- Guo, X., Liang, Y., Zhang, Y., Lasorella, A., Kee, B. L., & Fu, Y. X. (2015). Innate Lymphoid Cells Control Early Colonization Resistance against Intestinal Pathogens through ID2-Dependent Regulation of the Microbiota. *Immunity*, 42(4), 731–743.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.012>
- Gupta Sood, S. (2003). Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00155-7)
- Hardy, J. (2010). Chemtrails - Tanker Enemy (english): The rain-making bacteria (by Jay Hardy). Retrieved October 28, 2019, from <http://tankerenemy.blogspot.com/2010/11/rain-making-bacteria-by-jay-hardy.html>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd_Allah, E. (2019). Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.05.004>
- Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldivar, R. H., & Gallegos-Morales, G. (2010). Biocontrol de Rhizoctonia solani y Fusarium sp. con Microencapsulados de Bacillus subtilis y su Efecto en Crecimiento y Rendimiento de Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.). *Revista Agraria -Nueva Epoca-Año VII*, 7(3), 1–9. Retrieved from [http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/54/Agraria_2010\(7\)1-3-2.pdf](http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/54/Agraria_2010(7)1-3-2.pdf)
- Huang, Z., Pan, X., Xu, N., & Guo, M. (2019). Bacterial chemotaxis coupling protein: Structure, function and diversity. *Microbiological Research*, 219, 40–48.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.11.001>
- Ibañez, E. (2019). *Promoción de crecimiento en plantas de tomate (Solanum lycopersicum) por Bacillus subtilis cepa LPM1*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- IndiaMART. (2013). BIOFORTE Bacillus Subtilis, Pack Size: 1kg, Rs 75 /kilogram | ID: 14199524530. Retrieved October 28, 2019, from <https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-subtilis-14199524530.html>
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2012). Hormonal Signaling by PGPR Improves Plant Health Under Stress Conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 119–140). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_7
- Juliá, J. E. (2006). *Análisis de chorros diesel mediante fluorescencia inducida por láser*. Reverté.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi

- and bacteria. *Biological Control*, 57(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2010.12.004>
- Krzyzanowska, D., Obuchowski, M., Bikowski, M., Rychlowski, M., Jafra, S., Krzyzanowska, D., ... Jafra, S. (2012). Colonization of Potato Rhizosphere by GFP-Tagged *Bacillus subtilis* MB73/2, *Pseudomonas* sp. P482 and *Ochrobactrum* sp. A44 Shown on Large Sections of Roots Using Enrichment Sample Preparation and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Sensors*, 12(12), 17608–17619.
<https://doi.org/10.3390/s121217608>
- Kumar, R., Yadav, R., Kolhe, M. A., Bhosale, R. S., & Narayan, R. (2018). 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) based high fluorescent, pH stimuli waterborne polyurethane coatings. *Polymer*, 136, 157–165.
<https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2017.12.056>
- La Ragione, R. M., & Woodward, M. J. (2003). Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Veterinary Microbiology*, 94(3), 245–256.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00077-4)
- Labroots. (2015). Better Know a Microbe: *Agrobacterium tumefaciens* | Microbiology. Retrieved October 28, 2019, from
<https://www.labroots.com/trending/microbiology/1518/better-know-a-microbe-agrobacterium-tumefaciens>
- Lacroix, C., Sodini, I., & Corrieu, G. (1996). Microbiological stability of an immobilized cell bioreactor with mixed lactic acid bacteria during continuous fermentation of milk. *Progress in Biotechnology*, 11, 600–607. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80082-7](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80082-7)
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US.
- Lakshmanan, V., Selvaraj, G., & Bais, H. P. (2014). Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an Aboveground Problem. *Plant Physiology*, 166(2), 689–700. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245811>
- Lakshmanan, Venkatachalam, Selvaraj, G., & Bais, H. P. (2014). Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiology*, 166(2), 689–700. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245811>
- LaMondia, J. A. (2009). Efficacy of fungicides and a systemic acquired resistance activator (acibenzolar-S-methyl) against tobacco blue mould. *Crop Protection*, 28(1), 72–76. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2008.08.017>
- Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., ... Dangl, J. L. (2015). Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, 349(6250), 860–864.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa8764>
- Ling, N., Raza, W., Ma, J., Huang, Q., & Shen, Q. (2011). Identification and role of

- organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 47(6), 374–379.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.08.009>
- Liu, X., Zhao, H., & Chen, S. (2006). Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52(3), 186–190.
<https://doi.org/10.1007/s00284-005-0162-3>
- Liu, Y., Zhang, N., Qiu, M., Feng, H., Vivanco, J. M., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. *FEMS Microbiology Letters*, 353(1), 49–56.
<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12406>
- Maheshwari, D. K., Kumar, S., Maheshwari, N. K., Patel, D., & Saraf, M. (2012). Nutrient Availability and Management in the Rhizosphere by Microorganisms. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 301–326). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_15
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A. K., & Acharya, P. (2013). Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/561056>
- Matthew D. Disney, †, Juan Zheng, ‡, Timothy M. Swager, ‡ and, & Peter H. Seeberger*, †. (2004). Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. <https://doi.org/10.1021/JA047936I>
- Meenakshi, A. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.-T., Waidyaratne, P., ... De La Fuente, L. (2018). Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLOS ONE*, 13(2), e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., & Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1729–1742.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp053>
- Miranda, O. R., You, C.-C., Phillips, R., Kim, I.-B., Ghosh, P. S., Bunz, U. H. F., & Rotello, V. M. (2007). Array-Based Sensing of Proteins Using Conjugated Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 129(32), 9856–9857.
<https://doi.org/10.1021/ja0737927>
- Miransari, M. (2012). Microbial Products and Soil Stresses. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 65–75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_4
- Mishra, P. K., Bisht, S. C., Bisht, J. K., & Bhatt, J. C. (2012). Cold-Tolerant PGPRs as

- Bioinoculants for Stress Management. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 95–118). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_6
- Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100(9), 1692–1705. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>
- Mommer, L., Hinsinger, P., Prigent-Combaret, C., & Visser, E. J. W. (2016). Advances in the rhizosphere: stretching the interface of life. *Plant and Soil*, 407(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3040-9>
- Mosimann, C., Oberhänsli, T., Ziegler, D., Nassal, D., Kandeler, E., Boller, T., ... Thonar, C. (2017). Tracing of Two Pseudomonas Strains in the Root and Rhizoplane of Maize, as Related to Their Plant Growth-Promoting Effect in Contrasting Soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02150>
- Neyen, C., & Lemaitre, B. (2016). Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Current Opinion in Immunology*, 38, 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2015.10.007>
- Nhut, D. T., Nguyen, N. H., & Thuy, D. T. T. (2006). A novel *in vitro* hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.027>
- Niemi, O., Laine, P., Koskinen, P., Pasanen, M., Pennanen, V., Harjunpää, H., ... Pirhonen, M. (2017). Genome sequence of the model plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* SCC1. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0301-z>
- Nihorimbere Venant, Marc Ongena, Maite smargiassi, & Philippe thonart. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol.Agron.Soc.Envirón.*, 15(2), 327–337.
- Nováková, M., Motyka, V., Dobrev, P. I., Malbeck, J., Gaudinová, A., & Vanková, R. (2005). Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2877–2883. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri282>
- Overkamp, W., Beilharz, K., Weme, R. D. O., Solopova, A., Karsens, H., Kovács, Á. T., ... Veening, J. W. (2013). Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6481–6490. <https://doi.org/10.1128/AEM.02033-13>
- Paudel, S., Rajotte, E. G., & Felton, G. W. (2014). Benefits and costs of tomato seed treatment with plant defense elicitors for insect resistance. *Arthropod-Plant Interactions*, 8(6), 539–545. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9335-y>
- Peñafiel-Jaramillo, M. F., Torres-Navarrete, E. D., Barrera-Álvarez, A. E., Prieto-

- Encalada, H. G., Carriel, J. M., Hayron, △, & Canchignia-Martínez, F. (2016). Producing Indole-3-Acetic Acid Using *Pseudomonas Veronii* R4 and *in vitro* formation of roots in "Thompson Seedless" Grapevine Leaves. *Ciencias Agrarias*, 9(1), 31–36. Retrieved from http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V9 N1 4Peñafiel et al.pdf
- Pérez-Reytor, D., Yoel, L., Ramos, C., Domínguez Vázquez, I., Estela, A., & Espinosa, S. (2003). *Verificación rápida de la pureza microbiológica de bancos de Escherichia coli K12*. Cubanacán, Playa, Habana, Cuba. Retrieved from <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol Apl/2003/20/4/BA002004231-237OC.pdf>
- Phillips, R. L. I. (2008). Poly(para-phenyleneethynylene)s: probing the biological interface with biomolecular materials. Retrieved from <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/26555>
- Piccoli, P. (2013). Symbiotic Endophytes, 37, 151–163. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4>
- Polini, A., & Yang, F. (2017). Physicochemical characterization of nanofiber composites. *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*, 97–115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100173-8.00005-3>
- Posada, L. F., Álvarez, J. C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., & Villegas-Escobar, V. (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiological Research*, 217, 69–80. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.08.017>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>
- Quesada-Ocampo, L. M., Vargas, A. M., Naegelé, R. P., Francis, D. M., & Hausbeck, M. K. (2016). Resistance to Crown and Root Rot Caused by *Phytophthora capsici* in a Tomato Advanced Backcross of *Solanum habrochaites* and *Solanum lycopersicum*. *Plant Disease*, 100(4), 829–835. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0888-RE>
- Ramírez-Puebla, S. T., Servín-Garcidueñas, L. E., Jiménez-Marín, B., Bolaños, L. M., Rosenblueth, M., Martínez, J., ... Martínez-Romero, E. (2013). Gut and Root Microbiota Commonalities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 2–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02553-12>
- Rao, C. V., Glekas, G. D., & Ordal, G. W. (2008). The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends in Microbiology*, 16(10), 480–487. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.07.003>
- Rastogi, V., Yadav, P., Navneet Verma, ., & Verma, A. (2018). Preparation and characterization of transdermal mediated microemulsion delivery of T4

- bacteriophages against E.coli bacteria: a novel anti-microbial approach. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48, 393–407. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0335-7>
- Reija, B. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas ...* - Belén Reija Otero - Google Books. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=Wx-KvSohCE0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Reyes, J., García, A., Izquierdo, P., Allara, M., & Valero, K. (2002). Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 52(1), 68–73. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000100010
- Rodríguez Cavallini, E. (2005). *Bacteriología general : principios y prácticas de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Rojas, G. (2019). *Evaluación de emisión de compuestos volátiles en plantas de tomate colonizadas por Bacillus subtilis contra la infestación de insectos*. Universidad Autonoma Agraria Antoni Narro.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Pare, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, 148(3), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Rudrappa, Thimmaraju, Biedrzycki, M. L., & Bais, H. P. (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(2), 153–166. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x>
- Rudrappa, Thimmaraju, Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148(3), 1547–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Sakaguchi, T., Sanada, K., Nakasuji, C., & Hashimoto, T. (2011). Synthesis and gas permeability of poly(p-phenyleneethynylene)s having bulky alkoxy or alkyl groups. *Polymer Bulletin*, 66(9), 1177–1189. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0342-6>
- SantaLucia, J., Mok, M. C., Mok, D. W. S., Brand, L., & Gordon, M. P. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1460–1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>
- Saravanakumar, D. (2012). Rhizobacterial ACC Deaminase in Plant Growth and Stress Amelioration. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 187–204). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_9
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, D. P., & Singh, H. B. (2012). Rhizobacteria Mediated

- Induced Systemic Tolerance in Plants: Prospects for Abiotic Stress Management. In *Bacteria in Agrobiology: Stress Management* (pp. 225–238). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_11
- Schermann, J.-P. (2008). Spectroscopy. *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*, 59–128. <https://doi.org/10.1016/B978-044452708-0.50003-4>
- Schisler, D. A., & Slininger, P. J. (1997). Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 172–179. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900422>
- Schultz, J. C., Appel, H. M., Ferrieri, A. P., & Arnold, T. M. (2013). Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in Plant Science*, 4, 324. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00324>
- Selvakumar, G., Panneerselvam, P., & Ganeshamurthy, A. N. (2012). Bacterial Mediated Alleviation of Abiotic Stress in Crops. In *Bacteria in Agrobiology: Stress Management* (pp. 205–224). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_10
- Shilev, S., Naydenov, M., Prieto, M. S., Vassilev, N., & Sancho, E. D. (2012). PGPR as Inoculants in Management of Lands Contaminated with Trace Elements. In *Bacteria in Agrobiology: Stress Management* (pp. 259–277). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_13
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Soares, A. M. S., Oliveira, J. T. A., Rocha, C. Q., Ferreira, A. T. S., Perales, J., Zanatta, A. C., ... Costa-Junior, L. M. (2018). Myracrodruon urundeuva seed exudates proteome and anthelmintic activity against Haemonchus contortus. *PLOS ONE*, 13(7), e0200848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200848>
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Steinkellner, S., Mammerler, R., & Vierheilig, H. (2008). Effects of Membrane Filtering of Tomato Root Exudates on Conidial Germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Phytopathology*, 156(7–8), 489–492. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01378.x>
- Steinkellner, Siegrid, Mammerler, R., & Vierheilig, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 122(3), 395–401. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9306-1>
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I.-C., & Hahm, Y. T. (2015a). Antimicrobial peptides of

- the genus *Bacillus* : a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I.-C., & Hahm, Y. T. (2015b). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus* : a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2012.10.011>
- Tanhuanpää, K., Virtanen, J., & Somerharju, P. (2000). Fluorescence imaging of pyrene-labeled lipids in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1497(3), 308–320. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996655>
- Thomas, S. W., Guy D. Joly, A., & Swager*, T. M. (2007). Chemical Sensors Based on Amplifying Fluorescent Conjugated Polymers. <https://doi.org/10.1021/CR0501339>
- Tobaldi, D. M., Lajaunie, L., Rozman, N., Caetano, A. P. F., Seabra, M. P., Sever Škapin, A., ... Labrincha, J. A. (2019). Impact of the absolute rutile fraction on TiO₂ visible-light absorption and visible-light-promoted photocatalytic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 382, 111940. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2019.111940>
- Turan, M., Esitken, A., & Sahin, F. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alleviators for Soil Degradation. In *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* (pp. 41–63). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23465-1_3
- Tyler, D. M., Pullen, E. A., & Swager, M. T. (2000). Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors. *Journal of the American Chemical Society*, 100, 37. <https://doi.org/10.1021/CR9801014>
- Ugoji, E. O., Laing, M. D., & Hunter, C. H. (2005). Colonization of *Bacillus* spp. on seeds and in plant rhizoplane. *Journal of Environmental Biology*, 26(3), 459–466. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16334283>
- Valenzuela, J. H. (2010). *Resistencia sistémica inducida en plantas de tomate (Solanum lycopersicum) inoculadas con Bacillus subtilis BEB-DN contra la infestación de mosquita blanca (Bemisia tabaci)*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD IRAPUATO.
- Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2013). *Molecular Fluorescence : principles and applications*. Wiley-VCH.
- Van Dam, N. M., & Bouwmeester, H. J. (2016). Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science*, 21(3), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>

- Vázquez, J. (2012). *Análisis del índice grado día y del índice de estrés hídrico en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero e hidroponía*. CIQA. Retrieved from [https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/223/1/JairoVazquez Lee maestria.pdf](https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/223/1/JairoVazquezLee maestria.pdf)
- Vela Gurovic, M. S. (2016). Isolation and Identification of Eneidiynes and Cycloaromatized Derivatives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 47, 29–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63603-4.00002-4>
- Venturi, V., & Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R., Janous, D., & Formanek, P. (2013). Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(2), 175–199. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000360>
- Vrchotová, B., Lovecká, P., Dražková, M., Macková, M., & Macek, T. (2013). Influence of root exudates on the bacterial degradation of chlorobenzoic acids. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 872026. <https://doi.org/10.1155/2013/872026>
- Walters, D. R., Havis, N. D., Sablou, C., & Walsh, D. J. (2011). Possible trade-off associated with the use of a combination of resistance elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(4), 188–192. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2011.02.001>
- Weder†, C., Mark S. Wrighton*, ‡, Rolf Spreiter, Christian Bosshard, A., & Günter, P. (1996). Effect of the Solid State Structure on the Third-Order Nonlinear Optical Response of Poly(2,5-dialkoxy-p-phenyleneethynylene)s. <https://doi.org/10.1021/JP961078Y>
- Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H. M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., ... Lugtenberg, B. J. J. (2002). Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1173–1180. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1173>
- Woo, H.-H., Orbach, M. J., Hirsch, A. M., Hawes, M. C., Qin, B., Findlay, K., ... Osbourn, A. (1999). Meristem-Localized Inducible Expression of a UDP-Glycosyltransferase Gene Is Essential for Growth and Development in Pea and Alfalfa. *THE PLANT CELL ONLINE*, 11(12), 2303–2316. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2303>
- Yamada, K., Kanai, M., Osakabe, Y., Ohiraki, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). Monosaccharide absorption activity of Arabidopsis roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43577–43586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269712>
- Zambrano, C. (2019). Análisis Químicos de Muestras Biológicas Mediante Microscopía

Electrónica de Barrido, 28(4), 646–649.

- Zgad Zaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D. B., ... Radutoiu, S. (2015). A Legume Genetic Framework Controls Infection of Nodules by Symbiotic and Endophytic Bacteria. *PLoS Genetics*, 11(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005280>
- Zhang, N., Van der Putten, W. H., & Veen, G. F. C. (2016). Effects of root decomposition on plant-soil feedback of early- and mid-successional plant species. *New Phytologist*, 212(1), 220–231. <https://doi.org/10.1111/nph.14007>
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zheng, X. Y., & Sinclair, J. B. (1996). Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48(1), 21–35. <https://doi.org/10.1006/PMPP.1996.0003>
- Zou, C. S., Mo, M. H., Gu, Y. Q., Zhou, J. P., Zhang, K. Q., Zhang, S. S. a, ... Deleu, M. (2013). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Applied and Environmental Microbiology*, 8(2), 274–302. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712.zobacterium>