

Proyecto: **Metabolitos bacterianos que influyen en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

Alumno: Harvey Antonni Brindis Vidal

Carrera: Ing. Bioquímica

No. de control: 10270401

Asesor interno:

Dr. Reiner Rincón Rosales

Asesor externo:

Dr. Víctor Olalde Portugal

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 10 de Diciembre del 2014

INDICE

JUSTIFICACION	4
OBJETIVOS	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
PROBLEMAS A RESOLVER.....	5
PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	5
Extrategia experimental para determinar cambios en la arquitectura de la raíz	5
Crecimiento de cepa bacteriana	5
Obtencion del Extracto libre de células (ELC) de <i>Bacillus subtilis</i> BB-DN.....	6
Obtencion de fracciones de metabolitos extracelulares mediante cromatografía de Intercambio Iónico	6
Obtencion de fracción de metabolito extracelular mediante cromatografía en Sep-PAK fase reversa.....	6
Evaluacion de la capacidad promotora en raices.....	7
Analisis de datos por programas estadisticos	7
Obtencion de fraccion de interes por cromatografía líquida por alta presión (HPLC)	8
Extrategia experimental para determinar cambios en la floración.	8
Crecimiento de cepa bacteriana	8
Obtencion del paquete celular de <i>Bacillus subtilis</i> BB-DN	8
Cuantificación del tiempo de floración	8
Analisis de datos por programas estadisticos	8
RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
Resultados sobre cambios en la arquitectura de la raíz	9
Separación y obtención de fracción de interés por Cromatografía de Intercambio Iónico.....	9
Separación y purificación por Cromatografía Líquida en fase reversa (Sep-PAK C18)	10
Evaluación de la capacidad promotora en raíces.....	10
Separación y purificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en fase reversa	15
Resultados sobre cambios en la floración.....	16
Efecto de la inoculación de <i>Bacillus subtilis</i> BB-DN sobre el tiempo de floración	16
Efecto de la inoculación de <i>Bacillus subtilis</i> BB-DN sobre el tiempo de antesis.	18
CONCLUSIONES	20

RECOMENDACIONES	20
COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXOS	23

JUSTIFICACION

La morfología, estructura y sistemas de las raíces son partes cruciales de la adaptación de las plantas en la heterogeneidad del suelo, en la determinación del tamaño de la rizósfera, configuración y acceso a los elementos proporcionados por el suelo (Stanova et.al., 2012). En este contexto la raíz es una parte vital y esencial de la planta, el hecho de que *Bacillus subtilis* pueda impactar de forma positiva a la arquitectura de la raíz puede significar enormes ventajas debido a que le proporcionaría a la planta un incremento en la absorción de agua y minerales del suelo, ocasionando así un mejor crecimiento y desarrollo de la planta (Audesirk et al.,2003; Tondopo-Jiménez, 2013).

Por otro lado el control del periodo de floración es un atributo de gran importancia en la adaptabilidad de un cultivo a un ambiente dado (Arnon, 1980), este cambio de etapa fisiológica se encuentra regulado por diferentes rutas, entre las cuales se encuentran la del fotoperiodo, la de giberelinas, la de caminos autónomos (Garner & Allard, 1920; Chouard, 1960; Poethig, 2003; Amasino, 2010). Recientemente se ha encontrado otra ruta, la cual está relacionada a la cantidad de nitratos disponibles (Castro et al., 2011). En este contexto, si un nutriente como lo es el nitrógeno puede ser el regulador de la floración, es bastante probable que exista relación también con los microorganismos que se encuentra en contacto con la planta en la rizósfera, sobre todo *Bacillus subtilis* debido a que ha sido reportada como fijadora de nitrógeno, productora de sideróforos y solubilizadora de fosforo (Ahemad & Saghir, 2011; Kumar, Prakash, & Johri, 2011).

OBJETIVOS

Demostrar que los metabolitos bacterianos de *Bacillus subtilis* BB-DN modifican la arquitectura de la raíz e influyen en la floración en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar las fracciones por Cromatografía de intercambio iónico del Extracto libre de células de *Bacillus subtilis* BB-DN en raíces de *Arabidopsis thaliana*.

Evaluar la actividad biológica de fracciones obtenidas por Cromatografía líquida en fase reversa del Extracto libre de células de *Bacillus subtilis* BB-DN en raíces de *Arabidopsis thaliana*

Evaluar la influencia de la cepa de *Bacillus subtilis* BB-DN en la floración de *Arabidopsis thaliana*

PROBLEMAS A RESOLVER

Considerando que la cepa *Bacillus subtilis* BB-DN sea capaz de influir de manera positiva tanto en la arquitectura de la raíz, desarrollo radicular y en el tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*, este proyecto contribuiría a la generación de conocimientos para un mejor desarrollo, crecimiento y reproducción de la planta, atendiendo así a la problemática de cómo mejorar los cultivos a través de vías alternas de las ya conocidas.

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

Estrategia experimental para determinar cambios en la arquitectura de la raíz

Crecimiento de cepa bacteriana

El crecimiento de *Bacillus Subtillis* BB-DN se obtuvo de acuerdo a lo descrito por Tondopo-Jiménez (2013) donde la cepa fue inoculada con tres asadas del tubo inclinado que contenía a la bacteria, en 25 ml de medio infusión de papa (Anexo 3) contenido en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, el cual se incubó a 28 °C a 150 rpm durante 24 horas. Este cultivo se empleó para inocular 1000 ml de medio infusión de papa contenido en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml; el cual se incubó a 28 °C y a 150 rpm durante 18 horas, tiempo indicado para que el cultivo se encuentre en fase estacionaria temprana.

Obtención del Extracto libre de células (ELC) de Bacillus subtilis BB-DN

El cultivo bacteriano fue cosechado en una centrifuga Beckman J2-MC a 10 000 rpm durante 35 min, el sobrenadante se separó en un matraz estéril (extracto libre de células) y el paquete celular se eliminó (Jiménez-Delgadillo, 2004; Tondopo-Jiménez, 2013)

Obtención de fracciones de metabolitos extracelulares mediante cromatografía de Intercambio Iónico

El extracto libre de células (ELC) obtenido (1000 ml) se fraccionó por cromatografía de intercambio iónico en serie, para esto se utilizaron dos columnas de intercambio iónico conectadas en serie (Anexo 4 y 5). La primera contenía resina de intercambio aniónico Macropep High Q (BioRad Laboratories), y la segunda una resina de intercambio catiónico MacroPep high S (BioRad Laboratories). Los volúmenes de empaquetamiento (v) de las columnas (2.5 cm I.D x 8 cm) fueron de 70 y 75 ml, respectivamente, las cuales fueron equilibradas con amortiguador Tris 0.01M pH 8.0. El ELC ajustado a pH 8 se hizo pasar por las columnas con un flujo de 1 ml/min. Posteriormente, la columna de intercambio catiónico (S) se lavó con el amortiguador Tris 0.01 M pH 8.0 y los compuestos retenidos en la columna se eluyeron con un gradiente continuo de KCl 0.5 M (250 ml), a un flujo de 1 ml/min, y se colectaron 250 fracciones de 1 ml a cada una ellas se les determinó la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650, con las que se graficó un cromatograma. Las fracciones correspondientes a los picos de interés de acuerdo a lo obtenido por Tondopo-Jiménez (2013) se colectaron y se procedió al siguiente paso.

Obtención de fracción de metabolito extracelular mediante cromatografía en Sep-PAK fase reversa

Las fracciones obtenidas por intercambio iónico y que mostraron actividad sobre raíces de acuerdo a lo reportado por Tondopo-Jiménez (2013), se purificaron por cromatografía líquida en fase reversa usando columnas Sep-pak C18 (columna 6.5 x 1.2 cm, Vac Cartridge, partícula de 55-105 μm , poro 125 Å, 1 g, Waters, volumen de 4 ml), previamente equilibradas con 0.1% TFA (ácido trifluoroacético). La elución de los compuestos retenidos se realizó haciendo pasar secuencialmente por la columna 15 ml de acetonitrilo (grado HPLC) al 50%, 75% y 100% por gravedad (Anexo 6).

Los compuestos eluidos con acetonitrilo al 100% se colectaron en fracciones de 1 ml, y se les determinó su absorbancia en espectrofotómetro Beckman DU-650 a una longitud de onda de 280 nm, para obtener el cromatograma correspondiente. Únicamente se trabajó con estas fracciones debido a que en resultados

preliminares realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de proteínas (CINVESTAV-UI) indicaron que la actividad biológica está en las fracciones más hidrofóbicas. Después, las fracciones de interés se concentraron en la centrifuga Eppendorf Concentrator plus a 30 °C para eliminar el acetonitrilo

Las fracciones obtenidas se resuspendieron en 50 µl de agua desionizada y se le determinó su actividad biológica como se describe más adelante.

Evaluación de la capacidad promotora en raíces

El análisis de promoción de crecimiento se realizó tomando en cuenta los cambios en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana Col-0*. El protocolo que se siguió fue primeramente esterilizando la superficie de las semillas con un lavado con etanol al 70% durante 3 minutos, finalizando con 5 lavados con agua estéril. Después en condiciones asépticas se colocaron 4 semillas por caja en placas Petri con 20 ml de medio de Murashige and Skoog (MS)(Sigma Aldrich)(Anexo 7 y 8) y se colocaron durante 48 horas a 4 °C en oscuridad.

Después las placas fueron colocadas verticalmente en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 14/10 h de luz/oscuridad a 22 ± 2 °C para que germinaran.

Posteriormente, las plántulas de 4 días de edad (después de la germinación) se colocaron en placas con 20 ml de medio MS adicionado con la fracción correspondiente (equivalente a lo contenido en 10 ml de extracto libre de células), y se mantuvieron en cámara de crecimiento (mismas condiciones), con un diseño completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento.

Después de 15 días se evaluaron los cambios en la arquitectura de la raíz, a cada placa se le tomó una fotografía (distancia de 35 cm de la cámara fotográfica).

Análisis de datos por programas estadísticos

Cada una de las fotografías se analizó empleando el programa Win-RHIZO (Régent Instruments) determinando los siguientes parámetros: longitud total, superficie total, volumen, diámetro promedio, número de puntas (entendiéndose como el número de extremos hallados en las raíces, incluyendo las raíces laterales y pelos radiculares) y número de bifurcaciones (refiriéndose al número de veces que la raíz, ya sea principal o una secundaria se divide en dos).

Con los resultados obtenidos del programa Win-RHIZO, se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$) y la comparación de medias por el método Duncan ($p < 0.05$) con la ayuda del programa estadístico R.

Obtención de fracción de interés por cromatografía líquida por alta presión (HPLC)

La fracción con efectos positivos sobre la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, se separó por cromatografía HPLC de fase reversa, en un cromatógrafo capilar Agilent Technologies 1200 series con arreglo de diodos, provisto con una columna C:18 (4.6 x 150 mm, Zorbax 300 extend Agilent), con tamaño de partícula de 3.5 µm, con tamaño de poro de 80 Å, con un flujo de 1 ml/min. Se aplicaron 50 µl de las muestras concentradas para su análisis. Los solventes utilizados fueron 0.1% TFA en agua (Solvente A) y acetonitrilo (grado HPLC) al 100% en TFA 0.1% (Solvente B). Después de lavar la columna con solvente A durante 5 minutos, la elución se realizó con un gradiente lineal de 0 al 100% del solvente B en 60 minutos. La detección se realizó a 3 longitudes de onda: 220, 280 y 360 nm. Los picos obtenidos en HPLC se colectaron.

Estrategia experimental para determinar cambios en la floración.

Crecimiento de cepa bacteriana

El protocolo seguido para el crecimiento de cepa bacteriana fue el mismo empleado en la estrategia experimental para determinar cambios en la arquitectura de la raíz.

Obtención del paquete celular de Bacillus subtilis BB-DN

El cultivo bacteriano fue cosechado en una centrifuga Kendro biofuge Statos y Centrifuga d-37520 a 10 000 rpm durante 30 min, el sobrenadante se deshecho y el paquete celular se resuspendió en 50 ml de Agua estéril

Cuantificación del tiempo de floración

Se empleó plantas silvestres de *A. thaliana Col-0* que se sometieron a tratamiento con *B. subtilis* usando cultivos de 1000 ml de caldo nutritivo y/o infusión de papa.

Posteriormente se inoculó con 1 ml de dicho cultivo a plántulas aclimatadas en condiciones de invernadero, para ello se tomó como parámetro de floración la aparición del primordio floral, así como el cambio en el número de hojas de roseta. En tanto que en la antesis se monitoreó el número de hojas de roseta y el número de días después de la germinación hasta llegar a esa etapa. El inoculo bacteriano fue único. Se usó un sistema de bloques al azar en condiciones de invernadero, con 24 repeticiones, usando como controles negativos a plantas silvestres Col-0 sin inoculo bacteriano.

Análisis de datos por programas estadísticos

Con los resultados obtenidos de la cuantificación del tiempo de floración, se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$) y la comparación de medias por el método de Duncan con el programa R.

RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados sobre cambios en la arquitectura de la raíz

Separación y obtención de fracción de interés por Cromatografía de Intercambio Iónico.

Para obtener el metabolito extracelular perteneciente a la cepa de *Bacillus subtilis* BB-DN en base a las perspectivas propuestas por Tondopo-Jiménez (2013), se procedió a pasar el Extracto Libre de Células (ELC) en las columnas de Cromatografía de Intercambio Iónico.

La elución correspondiente a esta cromatografía únicamente se hizo a la columna MacroPrep High S (Intercambio catiónico), esto en relación a los estudios hechos por Jiménez-Delgadillo (2004) donde revela que en esta columna se encuentran una amplia variedad de metabolitos, los cuales se encuentren involucrados en la estimulación del crecimiento de la raíz.

Como se observa en la figura 1, se obtuvieron 3 picos de acuerdo al siguiente patrón de elución de KCl: 0.18 M, 0.28M y 0.35M, respectivamente. Se colectó la fracción 1 correspondiente al pico de absorbancia de interés para continuar con el proceso anteriormente descrito.

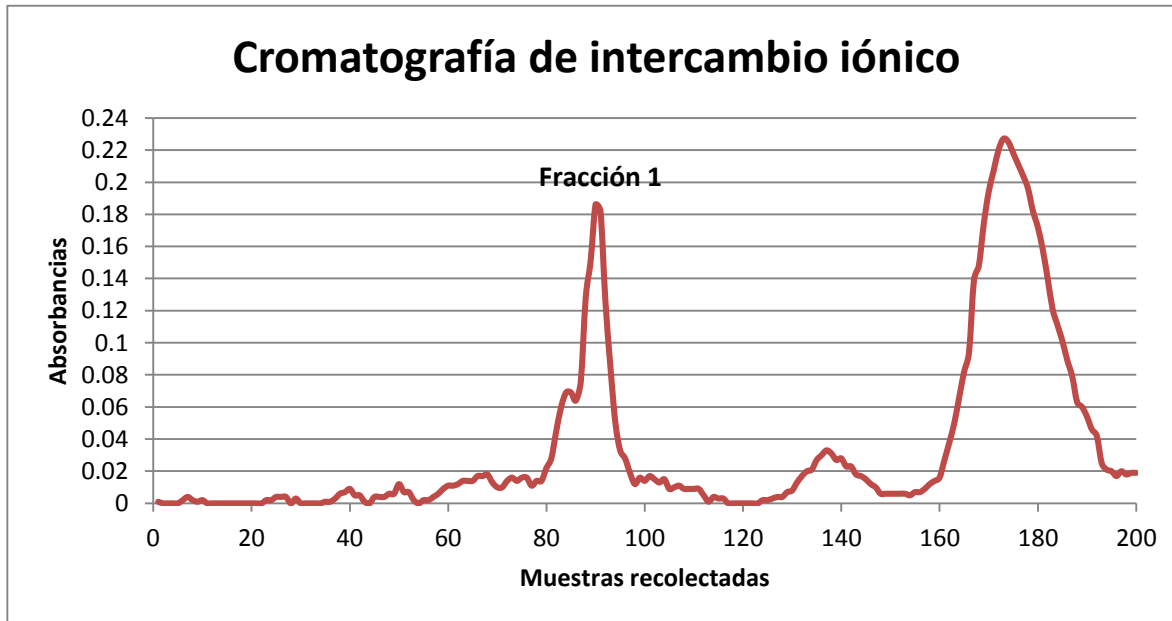


Figura 1. Cromatografía de intercambio iónico del ELC de *Bacillus subtilis* BB-DN, en columna MacroPrep High S. Elución en gradiente de KCl 0.5 M con flujo de 1 ml/min, la lectura de las muestras fue a una longitud de onda de 280 nm.

Separación y purificación por Cromatografía Líquida en fase reversa (Sep-PAK C18)

De la fracción 1 obtenida en la Cromatografía de intercambio iónico, se continuó el proceso de purificación con cromatografía en columnas Sep-PAK 18. Esta fracción presentó su perfil de elución al 100% de Acetonitrilo.

Como se observa en la figura 2, se obtuvieron 5 picos, los cuales se colectaron para su posterior evaluación biológica en raíces de *A. thaliana*.

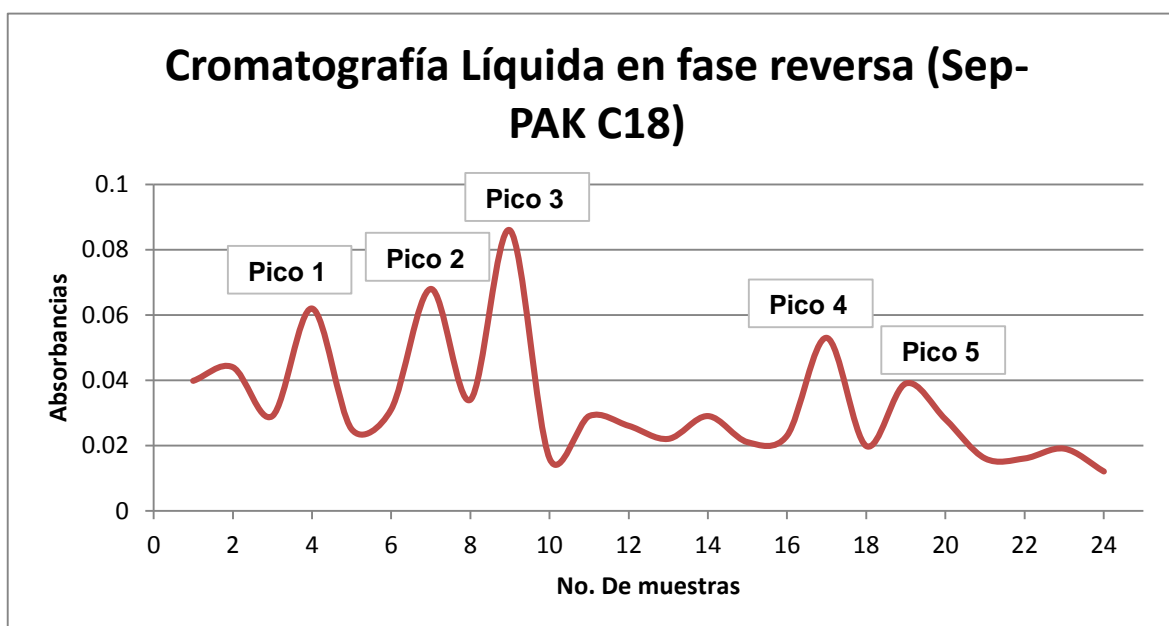


Figura 2. Cromatografía Líquida en fase reversa (Sep-PAK C18). Picos obtenidos en elución de Acetonitrilo al 100% de la fracción 1 proveniente del ELC de *Bacillus subtilis* BB-DN.

Evaluación de la capacidad promotora en raíces

Los bioensayos realizados en los picos uno (1) y tres (3) de las fracciones de interés en relación a las perspectivas propuestas por Tondopo-Jiménez (2013) tienen actividad biológica estadísticamente significativa en las raíces (tabla 1).

Tabla 1. Valores obtenidos de los parámetros de evaluación en las fracciones de interés y en el control.

Fracciones	Longitud (mm)	Superficie total (mm ²)	Volumen total (mm ³)
Control	1728.09	24142.79	27024.14
Pico 1	2843.93	40967.35	47223.1
Pico 3	2405.99	34273.02	38275.62

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación al incremento de longitud, superficie total y volumen total de los picos uno (1) y tres (3) en comparación al control. Como se aprecia en la figura 3, estos picos promueven y afectan tanto el desarrollo como a la arquitectura de la raíz.

En tanto que para el número de puntas y asimismo para el número de bifurcaciones, el pico uno (1) fue el único en mostrar diferencia significativa con respecto al control. Los valores obtenidos en el pico uno (1) fue de 268.79 y 385.58, en contraste con el control que fue de 165.38 y 165.38 respectivamente (Fig. 4 y 5).

Por lo tanto, es indudable la promoción de raíces provocadas por la cepa bacteriana, observando así un claro incremento por ambos picos (1 y 3) en el porcentaje de Longitud, Superficie total y Volumen total en comparación al control.

Sin embargo el pico uno (1) presenta un mayor incremento en los parámetros antes mencionados, como se observa en la figura 6.

Las plantas poseen numerosas estrategias y habilidades para sobrevivir en condiciones adversas, un punto crucial para su supervivencia es la necesidad de obtener nutrientes para su crecimiento y desarrollo (Adamczyk et al., 2012). Ante tales condiciones las plantas realizan asociaciones simbióticas con algunas bacterias, entre las cuales se encuentra *Bacillus subtilis*, el hecho de que metabolitos bacterianos (pico uno y tres) de esta cepa provoquen modificaciones sobre la arquitectura de la raíz proporcionando un incremento en longitud, superficie y volumen total, nos indica que la planta puede absorber una cantidad mayor de agua y nutrientes de acuerdo a lo reportado por (Himmelbauer, Loiskandl, & Kastanek, 2004). Entre otras bacterias capaces de contribuir a la

proliferación de raíces en plantas se encuentra *Azospirillum spp*, la cual sintetiza ácido Indol acético y mejoran el desarrollo de la raíz (Dobbelaere et al., 1999; Tsavkelova et al., 2007). Por el contrario estudios realizados con rizobacteria *Serratia marcescens* 90-166 sobre *A. thaliana* revelaron que esta cepa es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz primaria, no obstante induce la formación de raíces laterales en una cantidad poco mayor al doble en comparación al control (Chun-Lin et al., 2010).

Las plantas poseen un mecanismo de regulación de raíces laterales en respuesta a señales nutricionales (Malamy & Ryan , 2001), sin embargo por los resultados obtenidos, el pico uno demuestra que el metabolito bacteriano es capaz de aumentar la proliferación de estas raíces además de proporcionar un incremento en el número de pelos radiculares, las cuales son esenciales para mantener activos los sistemas metabólicos internos (Kass, 1996; Kreuter, 2005). Estudios donde se evalúa al agente de biocontrol *P. fluorescens* se demuestra que el antibiótico bacteriano 2-4 diacetilfloroglucinol producido por esta cepa induce la proliferación de raíces laterales en plántulas de tomate (Brazelton et al., 2008), asimismo la inoculación de una planta con el hongo *Trichoderma virens* resulta en efectos de estimulación y desarrollo de raíces laterales (Contreras-Cornejo et al., 2009).

Bajo este concepto podemos asegurar que no solo los procesos morfogenéticos definen el sistema de arquitectura de la raíz sino también metabolitos extracelulares de *Bacillus subtilis* BB-DN son capaces de realizar dicha acción.

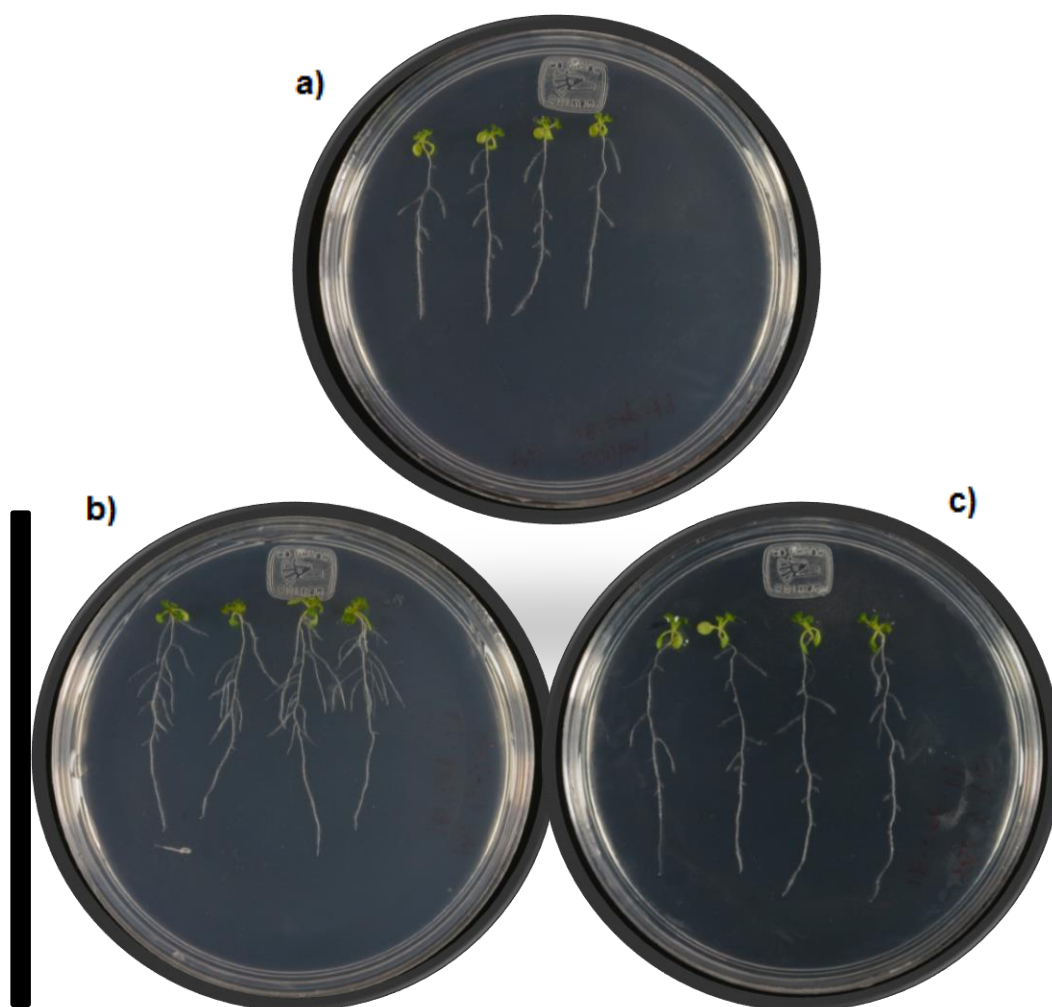


Figura 3. Efecto de las fracciones obtenidas en cromatografía líquida en fase reversa Sep-PAK C18. a) control (Medio MS). b) Pico 1. c) Pico 3. Escala de barra 6.5 cm. Las semillas fueron germinadas en medio MS, después se transfirieron a placas con medio MS suplementado con la fracción, y se dejaron crecer 15 días en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 14/10 de luz/oscuridad a 22 ± 2 °C.

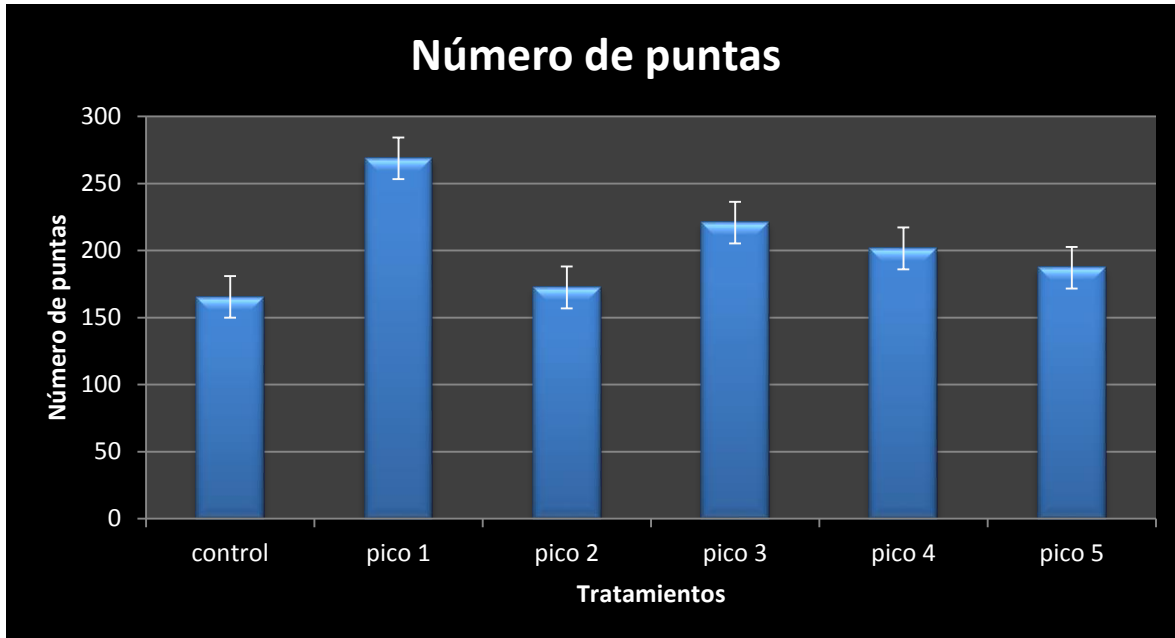


Figura 4. Efecto sobre el número de puntas en la raíz de *A. thaliana* de las fracciones obtenidas en cromatografía líquida en fase reversa Sep-PAK C18. Único y evidente efecto del pico 1 sobre el parámetro en cuestión, en contraste al control y demás fracciones.

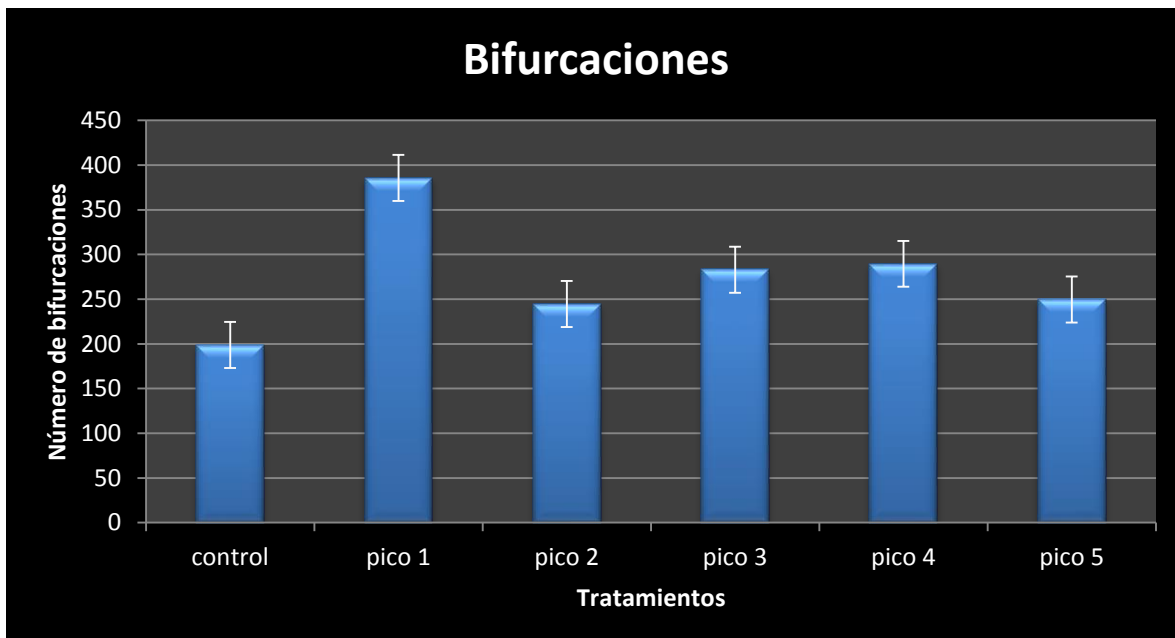


Figura 5. Efecto sobre bifurcaciones en la raíz de *A. thaliana* de las fracciones obtenidas en cromatografía líquida en fase reversa Sep-PAK C18. Único y evidente efecto del pico 1 sobre el parámetro en cuestión, en contraste al control y demás fracciones.

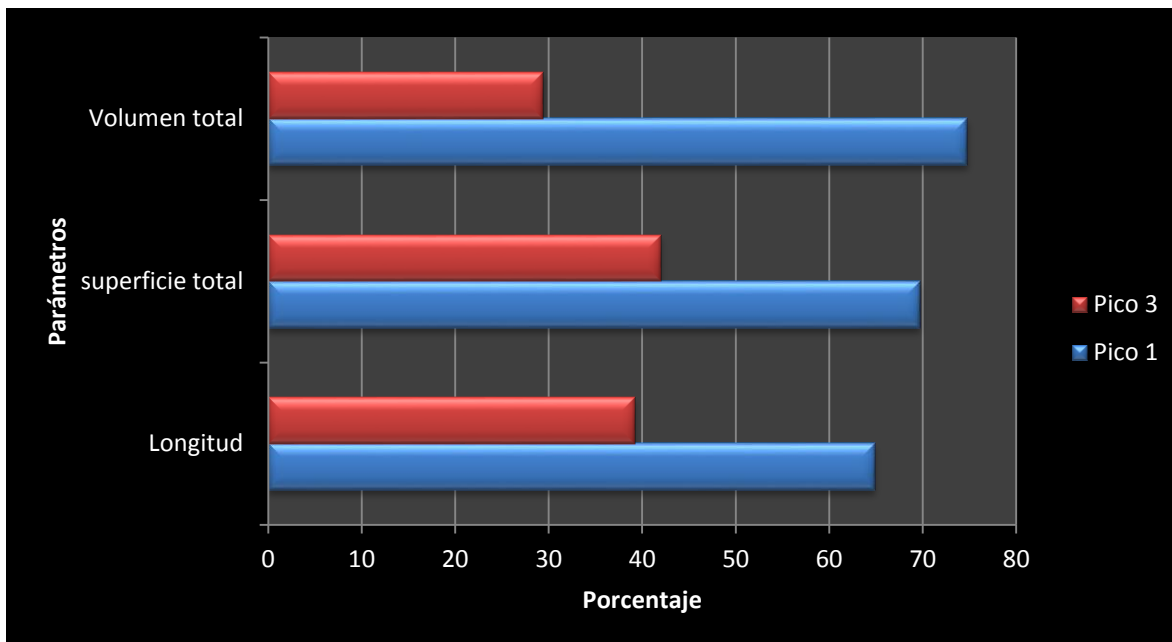


Figura 6. Porcentaje de incremento en los parámetros de Longitud, superficie total y volumen total en raíces de *A. thaliana* por parte de *B. subtilis* BB-DN en comparación al control.

Separación y purificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en fase reversa

En base a lo obtenido en la actividad biológica de los picos en raíces de *A. thaliana*, se procedió a realizar una separación por Cromatografía de alta eficacia (HPLC) en fase reversa para el pico 1, que fue el que presentó mayor influencia sobre la arquitectura de la raíz. Como se observa en la Figura 7 se obtuvo un pico en el tiempo de retención de 15.705 min con una concentración de elución de acetonitrilo al 27%. Este pico se relaciona de acuerdo a lo encontrado por Tondopo-Jiménez (2013) en donde colecta y evalúa una fracción similar que eluye en tiempo de retención de 16.6 min a 28.8% de acetonitrilo, presentando actividad biológica sobre el desarrollo de la raíz en *A. thaliana*. Cabe señalar que este pico de interés solo fue detectado a una longitud de onda de 360 nm.

Considerando la presencia del mismo pico en ambos estudios, se cree que en éste se encuentra el “metabolito” que provoca una influencia positiva sobre la arquitectura de la raíz.

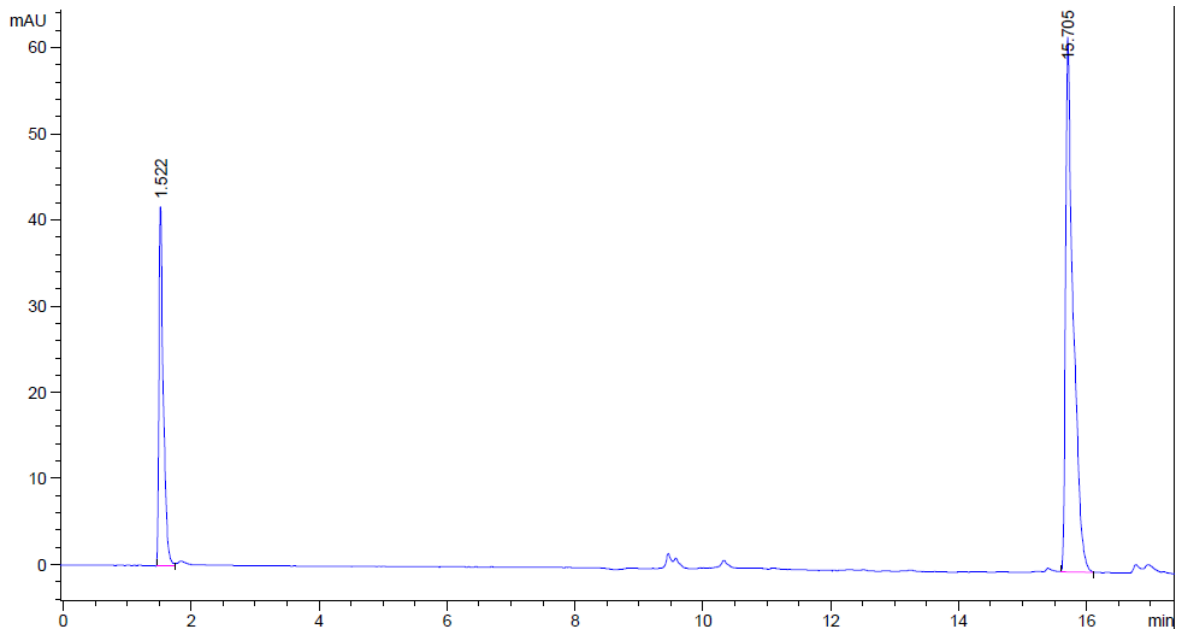


Figura 7. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa del pico 1 a una longitud de onda de 360 nm.

Resultados sobre cambios en la floración

Efecto de la inoculación de Bacillus subtilis BB-DN sobre el tiempo de floración

Bajo condiciones controladas en cuarto de crecimiento anteriormente descritas, es evidente la influencia del inóculo sobre la aparición del primordio floral respecto al control. Mediante el análisis de Duncan ($\alpha=0.05$) se encontró diferencia significativa entre el control y la cepa bacteriana con respecto al número de hojas observadas en la aparición del primordio floral (Fig. 8). Demostrando entonces un incremento en el número de hojas de roseta por parte de la cepa bacteriana.

Mientras que el porcentaje de floración se observa una clara diferencia entre los dos tratamientos, presentándose así un comportamiento contrario en relación a la cantidad de plantas que florecen en los distintos tiempos de germinación (Fig.9). En donde el control presenta el mayor porcentaje de floración en el día 25 después de la germinación, en tanto que la cepa de *Bacillus subtilis* BB-DN ocurre en el día 29 después de la germinación.

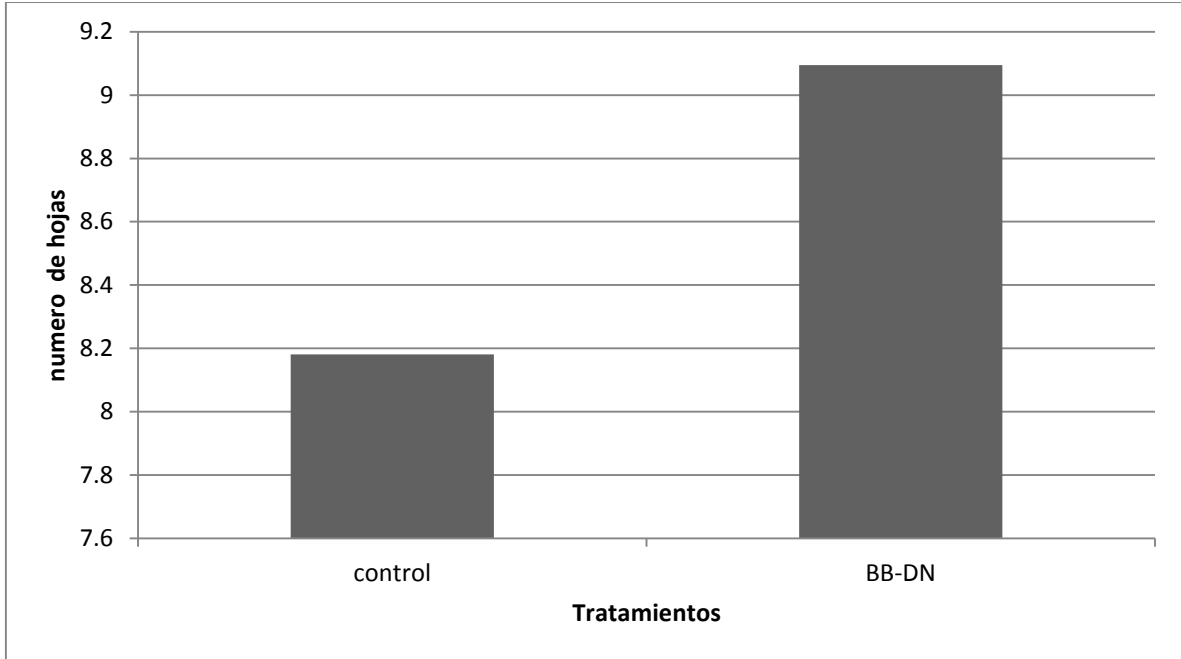


Figura 8. Número de hojas promedio obtenidas en el momento de la aparición del primordio floral de los diferentes tratamientos.

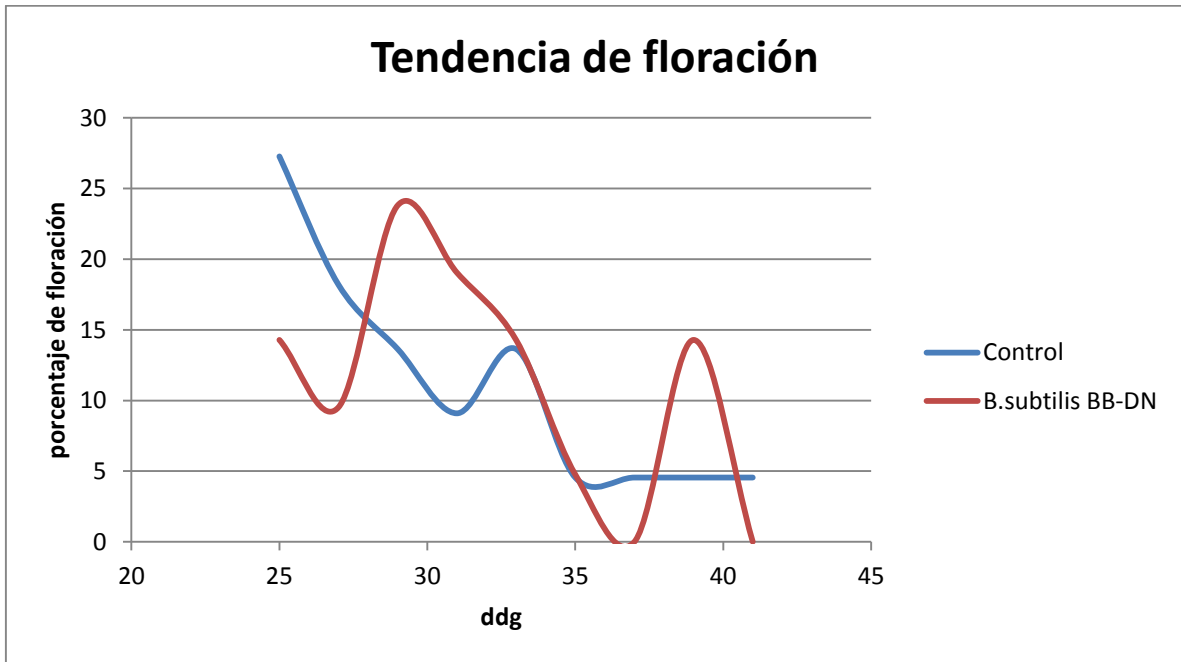


Figura 9. Tendencia de floración de los tratamientos evaluados en relación del porcentaje de floración a los días después de germinación.

Efecto de la inoculación de Bacillus subtilis BB-DN sobre el tiempo de antesis.

Es evidente la influencia provocada por *Bacillus subtilis* BB-DN en el tiempo de antesis sobre *A. thaliana*, se puede observar claramente una floración tardía de la cepa bacteriana en relación al control (Fig. 10). Observando así que el mayor número de plantas que presentan antesis en el control sean en día 35 después de la germinación, mientras que *Bacillus subtilis* BB-DN aplaza este tiempo hasta el día 41 después de la germinación.

Asimismo el número de hojas obtenidas en el momento de antesis, existe una diferencia significativa (Duncan $\alpha=0.05$) entre plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* BB-DN y las plantas control (Fig. 11). Demostrando entonces un incremento en el número de hojas de roseta por parte de la cepa bacteriana.

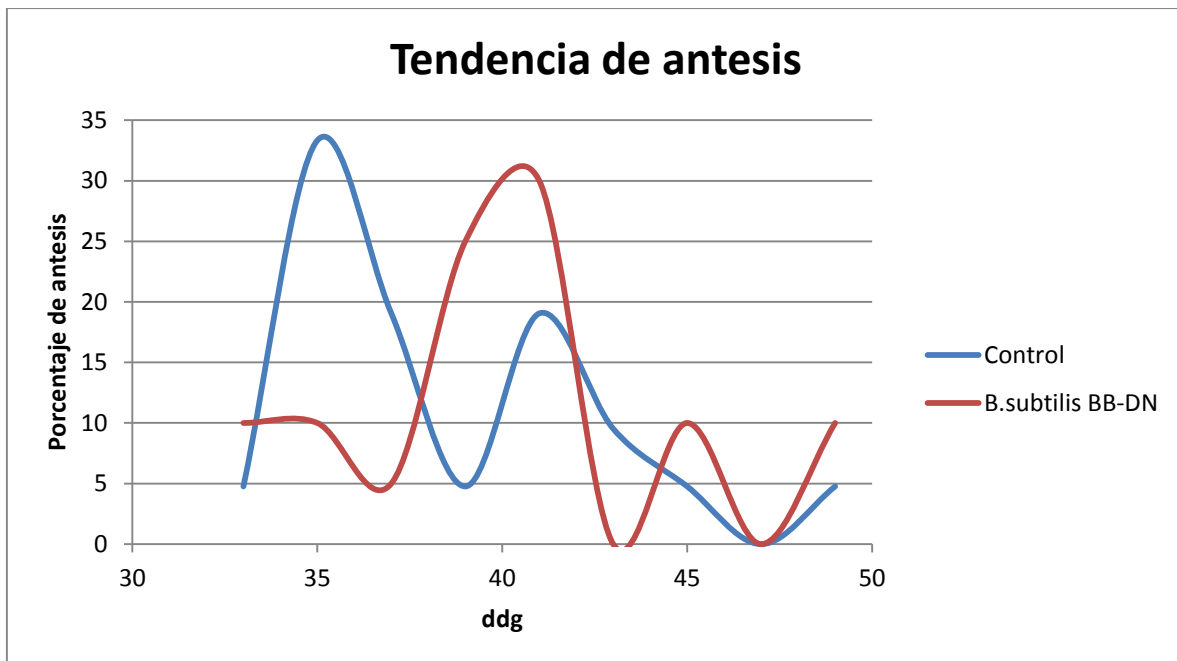


Figura 10. Tendencia de antesis de los tratamientos evaluados en relación del porcentaje de antesis a los días después de germinación.

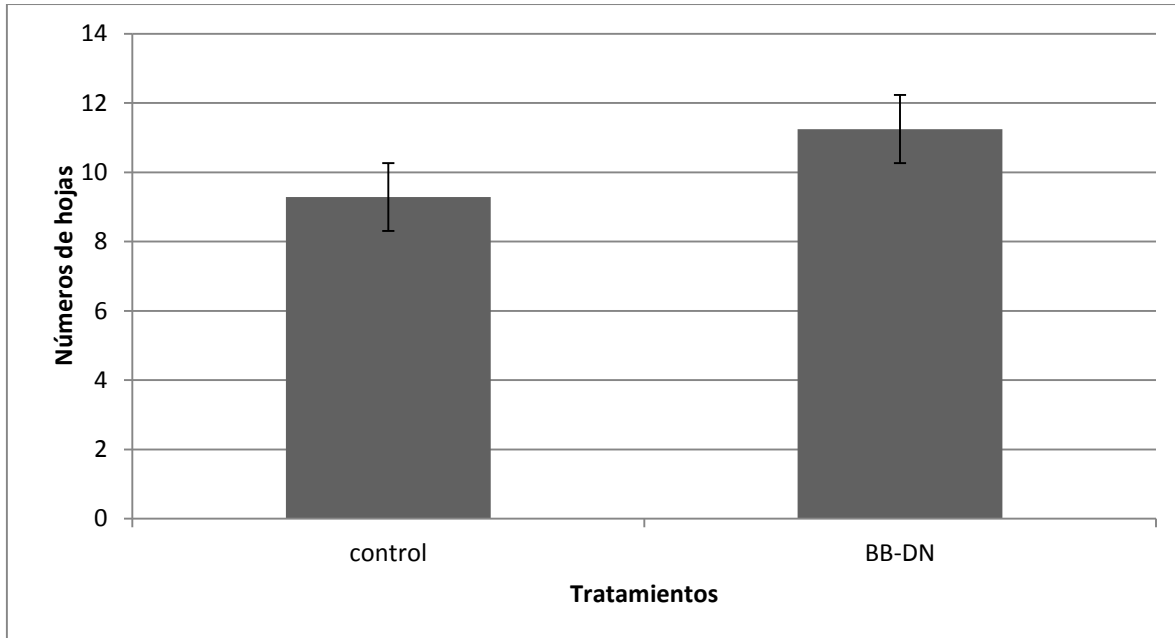


Figura 11. Número de hojas promedio obtenidas en el momento de anthesis de los diferentes tratamientos.

La floración en las plantas marca el paso del desarrollo vegetativo hacia el reproductivo, cuya consecuencia última es la generación de una progenie capaz de permitir la perpetuación de la especie. El paso al estado floral representa para las angiospermas el cambio más importante en el desarrollo de su ciclo de vida (Guevara & Jimenez, 2006). Este tiempo de floración y anthesis puede estar regulada bajo la interacción de *Bacillus subtilis*, esto es en base a los resultados obtenidos, las cuales en ambos casos aplazan los periodos hacia la iniciación de la floración y desarrollo del proceso de anthesis en *A. thaliana*, esto puede deberse a la presencia de ciertos compuestos producidos por la cepa durante el desarrollo de la planta, actuando así en la regulación del tiempo de floración. Décadas de estudios han revelado que varias especies de plantas poseen una variedad de fascinantes sistemas para el control del tiempo de floración: tales como el fotoperiodo donde el tiempo de exposición de las hojas a la luz inducen este proceso (Garner & Allard, 1920; Amasino, 2010); asimismo la temperatura influye de manera decisiva sobre la iniciación de la floración, proceso conocido como vernalización (Chouard, 1960; Amasino, 2010). Existen también los denominados caminos autónomos, los cuales son independientes de las señales ambientales pero que sin embargo influyen en el proceso de floración (Poethig, 2003; Amasino, 2010). De igual manera también puede ser modificada a través de fitohormonas (Mouradov et al., 2002; Amasino, 2010; Castro et al., 2011) entre las cuales figuran: Giberelinas, estas han sido ampliamente estudiada debido a que su aplicación acelera el tiempo de floración (Davis , 2009); de la misma forma la

aplicación de la citoquinina 6-benzilaminopurina a plantas de *A. thaliana* bajo crecimiento hidropónico provoca una fuerte promoción de floración en ausencia de todos los factores inductores conocidos (Aloia et al., 2011).

La cepa de *Bacillus subtilis* BB-DN proporciona un camino independiente a estos, asemejándose así a los estudios hechos por Castro 2011 en donde aporta un camino independiente a los conocidos, demostrando que niveles bajos de nitratos inducen a una floración temprana.

CONCLUSIONES

Metabolitos producidos por *Bacillus subtilis* BB-DN tienen la capacidad de modificar el desarrollo y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

El sistema de arquitectura de la raíz se puede definir por la interacción de metabolitos bacterianos y no solo por los procesos morfogénicos.

Bacillus subtilis BB-DN influye en el proceso de floración, retrasando así el desarrollo de este proceso en su ciclo de vida.

RECOMENDACIONES

Para obtener los resultados esperados se recomienda un seguimiento detallado de los procesos de separación y purificación por Cromatografía, teniendo un especial cuidado sobre las resinas pertenecientes a la Cromatografía de intercambio iónico, la cual se recomienda que sea nueva en el momento de su utilización.

COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

Realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la ingeniería bioquímica y difundir sus resultados.

Trabajar en equipos multidisciplinarios y multiculturales con liderazgo, sentido crítico y comprometido con la calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, B., Smolander, A., Kitunen, V., & Godlewski, M. (2012). Proteoid roots and exudation of proteases by plant roots. *Secretions and exudates in biological Systems*, 90-237.
- Ahemad , M., & Saghir, M. K. (2011). Functional aspects of plant growth promoting rhizobacterias recent advancements. *Insight Microbiol*, 39-54.
- Aloia, M. D., Bonhomme, D., Bouche , F., Tamsed dak, K., Ormenese, S., Torti , S., y otros. (2011). Cytokinin promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The plant journal*, 972-979.
- Amasino. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The plant journal*, 1001-1013.
- Arnon, I. (1980). *Factores agricolas en planificacion y desarrollo regional*. San Jose: IICA.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biologia la vida en la tierra*. Mexico: Pearson Educación.
- Brazelton, J. N., Pfeufer, E. E., Sweat, T. A., Gardener, B. B., & Coenen, C. (2008). 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol. Plant Microbe Interact*, 1349-1358.
- Castro, M. I., Loef, I., Bartetzko, L., Searle, I., Coupland, G., Stitt, M., y otros. (2011). Nitrate regulates floral induction in Arabidopsis, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*, 539-552.
- Chouard, P. (1960). Vernalization an its relations to dormancy. *Plant Physiol*, 191-238.
- Chun-Lin, S., Hyo-Bee, P., Jong Suk, L., Sangryeol, R., & Choong-Min, R. (2010). Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in arabidopsis thaliana by the rhizobacterium serratia marcescens 90-166 is through auxin-dependent and independet signaling pathways. *Molecules and cells*, 251-258.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio , J. (2009). Trichoderma virens, a plant beneficial fungus, enhances

- biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1579-1592.
- Davis , S. (2009). Integrating hormones into the floral-transition pathways of *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell Environmental*, 1201-1210.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys , A., Vande, B. A., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 155-164.
- Garner, W. W., & Allard, H. A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factor of the environment on growth and reproduction in plants. *J.Agric*, 553-606.
- Guevara, E., & Jimenez, V. (2006). *La reproduccion de las plantas*. San Jose: Universidad de Costa Rica.
- Himmelbauer, M. L., Loiskandl, W., & Kastanek, F. (2004). Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different Image analyses systems. *Plant and soil*, 111-120.
- Jiménez-Delgadillo, R. (2004). *Peptidos secretados por Bacillus subtilis que modifican la arquitectura de la raíz de Arabidopsis thaliana*. Tesis para obtener el grado de doctora den ciencias: CINVESTAV-UI.
- Kass, D. C. (1996). *Fertilidad de suelos*. San Jose: EUNED.
- Kreuter, M. L. (2005). *Jardin y huerto biologicos*. Madrid: S.A MUNDI-PRENSA LIBROS.
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem*. Madhya Pradesh: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystem.
- Malamy, J. E., & Ryan , K. (2001). Environmental Regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 899-909.
- Mouradov, A., Cremer, F., & Coupland, G. (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The plant cell*, 111-130.
- Poethig, R. S. (2003). Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science*, 334-336.
- Stanova, A., Durisova, E., Banasova, V., Gurinova , E., Nadubinska, M., Kenderesova, L., y otros. (2012). Root system morphology and primary root

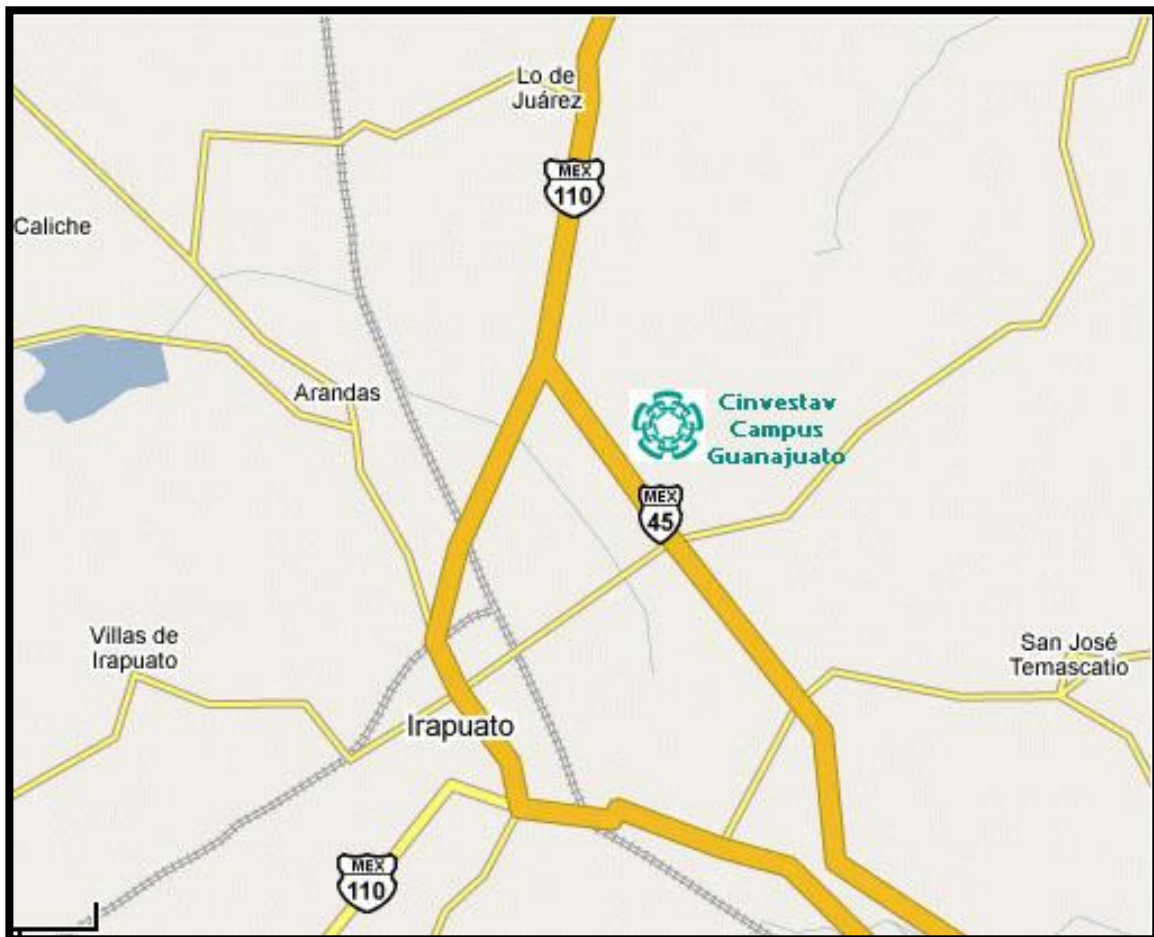
anatomy in natural non-metallicolous and metallicolous population of three *Arabidopsis* species differing in heavy metal tolerance. *Versita*, 505-516.

Tondopo-Jiménez, E. (2013). *Purificación de metabolitos extracelulares de Bacillus subtilis BB-DN que promueven crecimiento vegetal*. Tesis para obtener grado de Maestra en ciencias: CINVESTAV-Unidad Irapuato.

Tsavkelova, E. A., Cherdvntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol*, 69-76.

ANEXOS

Anexo1. Ubicación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, sobre la carretera Irapuato-León



Anexo 2. Ubicación del Laboratorio 5 “Bioquímica Ecológica” en el Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato



Anexo 3. Medio Infusión de papa (IP)

200 g de papa cortados en cuadros

1 L de agua destilada

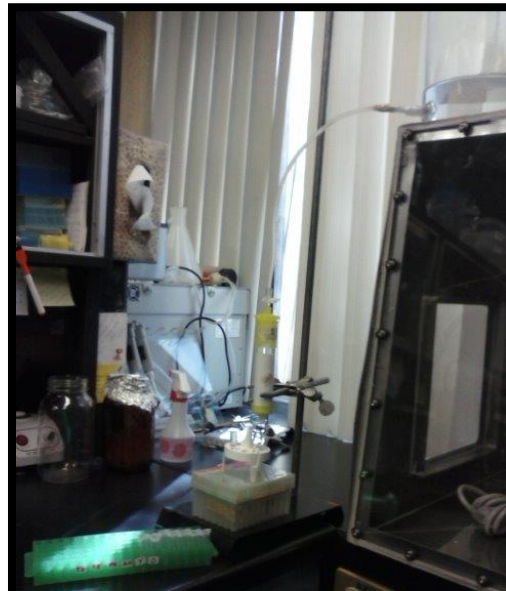
Los trozos de papa se colocan en un recipiente con agua destilada y se coloca a fuego lento hasta ebullición; se mantiene en esta condición durante 20 minutos. Después se filtra usando un filtro de algodón sobre un embudo, se realiza el aforo a 1000 ml con agua destilada y se realiza la esterilización a 120 °C durante 15 minutos.

Anexo 4. Propiedades de Resina Macro-Prep Ion Exchange Media

Se usaron dos tipos de resina:

- Macro-Prep High S es un soporte de intercambio de aniones, con el grupo funcional $-\text{SO}_3^-$, con capacidad iónica de $160 \pm 40 \mu\text{eq/ml}$, tamaño de poro de 1000 \AA y con una estabilidad de pH de 1-12.
- Macro-Prep High Q es un soporte de intercambio catiónico, con el grupo funcional $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, con capacidad iónica de $400 \pm 75 \mu\text{eq/ml}$, tamaño de poro de 1000 \AA y con una estabilidad de pH de 1-10.

Anexo 5. Durante la elución de la Columna High MacroPrep S (Cromatografía de Intercambio Iónico)



Anexo 6. Durante la purificación por Cromatografía Líquida en fase reversa (Sep-PAK C18)



Anexo 7. Medio Murashige & Skoog (MS)

0.88 g de Sales MS

10 g de Sacarosa

6.66 g de Agar Bacteriológico

1 L de agua destilada

Las sales MS y la sacarosa se colocan en un recipiente con agua destilada (aprox. 700 ml) y se mezclan hasta obtener una solución homogénea, posteriormente se ajusta el pH a 5.7. Después se agrega agar bacteriológico y se realiza la esterilización a 120°C durante 15 minutos.

Anexo 8. Pre germinación de las plantas de *A. thaliana* en cuarto de crecimiento.

