BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DICETOPIPERAZINAS Y GIBELERINAS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL"

RESULTADOS DE TESIS

SANDRA BAÑUELOS AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO

H. PUEBLA DE Z. SEPTIEMBRE 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN ...……...……...…….....2

2. MARCO TEÓRICO ..…….…….…4

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal …….…….……..4
2.2 Metabolitos secundarios de *Bacillus* spp ……..……..…6
2.3 Dicetopiperazinas promotores del crecimiento vegetal …….…...8
2.4 Giberelinas promotores del crecimiento vegetal …….....9

3. MARCO DE REFERENCIA ……..11

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ……..13

5. JUSTIFICACIÓN ……...……14

6. OBJETIVOS ……...…15

7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN ……...…16

8. METODOLOGÍA …….…..…17

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ……...…20

10. CONCLUSIONES ……...…34

11. BIBLIOGRAFÍA ……...…35

1- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha surgido una tendencia hacia la producción limpia, cuyo fin es reducir el uso de insumos químicos para la fertilización y control de fitopatógenos que producen pérdidas agronómicas no solo en cultivos anuales sino también en cultivos perennes. Estos agroquímicos están implicados en la alteración de la microbiota natural del suelo, de manera que la reducen considerablemente y perjudican las interacciones benéficas entre el microorganismo y la planta. Por esta razón las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos que puedan ser usados para restablecer estas interacciones, al punto que sean empleados como bioestimulantes y/o biocontroladores, que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción.

Los bioestimulantes pueden actuar mediante la síntesis de reguladores de crecimiento, como auxinas y giberelinas, que producen un aumento en el desarrollo de pelos radicales y en la densidad misma de la raíz, manifestándose en el aumento de la capacidad de absorción de agua y captación de nutrientes, dando a la planta mayor viabilidad, productividad y resistencia a condiciones adversas como sequía. Debido a que las especies de bacilos tienen las características de encontrarse omnipresentes en el suelo, tienen alta tolerancia térmica, se desarrollan rápidamente en medio líquido, tienen una rápida formación de esporas altamente resistentes y son considerados agentes biológicos seguros, su potencial como biocontroladores es muy alto.

Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos que están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural. En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación.

En trabajos previos del grupo de trabajo a partir de cepas de *Bacillus* sp se habían aislado e identificado unos compuestos llamados dicetopiperazinas (DCP´s) con alto potencial como promotores del crecimiento vegetal.

Dada la importancia de las giberelinas (GA´s) como promotoras del crecimiento vegetal, en este trabajo se realizará una búsqueda de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de suelos de diferentes Estados de la República Mexicana, que tuvieran presencia de giberelinas y de dicetopiperazinas y se evaluará el papel de ambos compuestos como promotores del crecimiento vegetal.

2- MARCO TEÓRICO

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

El suelo es uno de los hábitats microbianos que presenta mayor diversidad, se estima que alberga cerca de 10^9 microorganismos por gramo de suelo y 10^4 especies diferentes por gramo de suelo. Estos microorganismos pueden interactuar en la rizósfera, con las raíces de las plantas, de modo que los exudados radicales, ricos en compuestos orgánicos les aportan gran variedad de nutrientes para llevar a cabo sus actividades metabólicas. En cuanto a la interacción que los microorganismos establecen con las plantas se pueden distinguir tres grandes grupos de comunidades microbianas, a saber:

1. Saprófitos: son microorganismos que utilizan la materia orgánica como fuente nutricional para llevar a cabo su actividad metabólica.
2. Patógenos: son los microorganismos responsables de muchas enfermedades en las plantas.
3. Simbiontes mutualistas: estos microorganismos benefician el desarrollo y nutrición de las plantas.

De estos últimos, se han descrito diversos efectos benéficos, como la estimulación del desarrollo radicular y la germinación de las semillas de las plantas, debido a la producción de vitaminas, fitohormonas y otras sustancias. Muchos microorganismos mejoran las características estructurales del suelo, mediante la formación de agregados estables, resultado del crecimiento microbiano; varios están implicados en los ciclos biogeoquímicos de algunos nutrientes, de manera que actúan como biofertilizantes, aportando nutrientes al suelo.

También se ha encontrado que la resistencia de algunas plantas a factores estresantes de naturaleza biótica o abiótica se debe a la presencia de microorganismos capaces de establecer actividad antagonista frente a fitopatógenos,

o que aumentan la tolerancia a la salinidad de los suelos o al déficit de agua. A estos microorganismos se les ha denominado, rizosféricos o rizobacterias, debido a la preferencia que tienen de interactuar en el sistema conformado por el suelo y la raíz. Estos microorganismos se conocen como microorganismos promotores de crecimiento vegetal y poseen diferentes mecanismos de acción:

1. Antagonismo o supresión de microorganismos fitopatógenos.
2. Proporcionando elementos biodisponibles para la planta (Biofertilizantes), como nitrógeno y fósforo.
3. Producción de fitohormonas (Bioestimulantes).

Las fitohormonas son moléculas de bajo peso molecular, se les ha llamado "Reguladores del Crecimiento Vegetal", estas sustancias actúan en diversos tejidos diana, cumpliendo diferentes funciones fisiológicas, influyen en la división y diferenciación celular, dormancia y germinación de semillas, desarrollo de frutos y florescencia, actúan a concentraciones muy bajas y sus efectos varían de acuerdo a la interacción con otros reguladores. Estos bioestimulantes pueden actuar mediante la síntesis de reguladores de crecimiento, como auxinas y giberelinas, que producen un aumento en el desarrollo de pelos radicales y en la densidad misma de la raíz, manifestándose en el aumento de la capacidad de absorción de agua y captación de nutrientes, dando a la planta mayor viabilidad, productividad y resistencia a condiciones adversas como sequía.[1]

En respuesta al impacto ambiental causado por el uso de agroquímicos la comunidad científica ha puesto su mirada en los microorganismos benéficos o bacterias promotoras de crecimiento vegetal, capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas bacterias median a favor de las plantas por medio de complejas interacciones. La diversidad microbiana del suelo interactúa con la raíz y establece procesos simbióticos que benefician el desarrollo posterior de la planta. Estudios recientes demuestran que son muchos los microorganismos implicados en

la ecología microbiana del suelo que utilizándolos correctamente pueden incluso reemplazar el uso de agroquímicos. [2, 3]

2.2 *Bacillus* spp productor de metabolitos con gran potencial biológico.

Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.[4] En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación. [5] Esta amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos secundarios expande el potencial de la importancia industrial y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas.[6] Dentro de los metabolitos secundarios producidos por especies de *Bacillus* spp. se encuentran cuatro familias: bacteriocinas, lantibióticos, lipopéptidos y policétidos[6].

Una de las especies del género *Bacillus* spp. más reconocidas por su potencial como agente de control biológico es *B. thuringiensis*. Esta propiedad recae principalmente en su capacidad para sintetizar toxinas, enzimas y metabolitos secundarios que actúan contra otras bacterias, hongos, insectos y nemátodos. *B. cereus* es también una especie poseedora de propiedades como las de *B. thuringiensis* pero no muy aplicada como agente de control biológico[7]. La producción de estos metabolitos es muy sensible a factores ambientales o a las condiciones de cultivo, y por tanto, su producción *in vitro* depende de la composición del medio de cultivo en el que se hace crecer al microorganismo productor[8].

Las bacteriocinas son péptidos con actividad bactericida que son producidos por síntesis ribosomal y segregados por un gran número de especies bacterianas como

un mecanismo para inhibir el crecimiento de otras bacterias con las que compiten por el espacio y la fuente de nutrientes[9.10]. Pueden presentar pesos moleculares, propiedades bioquímicas, espectros y mecanismos de acción variables[6]. Los lantibióticos son péptidos antibióticos dentro de los que se encuentran a la subtilina y bacilisina.

Los lipopéptidos son compuestos anfifílicos sintetizados no ribosóbicamente que exhiben un amplio espectro antimicrobiano debido a su actividad surfactante. Comparten una estructura cíclica común que consiste en un ácido graso β-amino o β-hidroxilo integrado a un residuo peptídico. Las diferencias en la secuencia aminoacídica y la ramificación del ácido graso permiten la clasificación de los lipopéptidos en tres familias llamadas iturinas, fengicinas y surfactinas[11].

Múltiples especies de *Bacillus* han sido identificadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en base a la producción de antibióticos, la inhibición de síntesis de etileno de la planta y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas.[12,13] Respecto a las especies que pueden favorecer el crecimiento vegetal, un campo reciente y fundamental de la biología es el estudio de los procesos que regulan la interacción entre las bacterias y los eucariontes, ya que las bacterias pueden comunicarse a través de señales moleculares, en un proceso conocido como quorum-sensing (QS). Las bacterias, tanto patógenas como simbiontes de las plantas, requieren del QS para comunicarse satisfactoriamente con sus huéspedes. Las plantas por otra parte han desarrollado múltiples mecanismos para percibir estas señales químicas. Las bacterias que habitan la rizósfera pueden influir sobre el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, tales como el ácido indol-3-acético (AIA, ver figura 1), auxinas naturales u otros metabolitos secundarios.

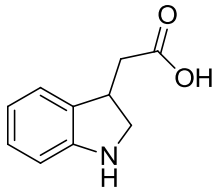


Figura 1: AIA principal auxina natural

La aplicación de estos metabolitos estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares, los cuales participan en la captación de agua y nutrientes y esto permite un incremento en la producción de biomasa.

2.3 Dicetopiperazinas promotores del crecimiento vegetal

La comunicación planta-bacteria puede ocurrir por medio de diferentes compuestos, algunos de los cuales mimetizan la actividad de fitohormonas endógenas. Los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos a las cuales se les ha encontrado diversas funciones biológicas tal como ser promotoras del crecimiento vegetal, antibacterial o antifúngica.

Aunque las dicetopiperazinas son moléculas bioactivas notables, existe poca información concerniente a su biosíntesis en bacterias y su papel en la comunicación con las plantas, este estudio dio como resultado el análisis de 3 dicetopiperazinas como promotores de crecimiento vegetal.[14] Las dicetopiperazinas tienen una función en la comunicación entre células llamada quorum-sensing, que es la forma en la cual las bacterias establecen una vía de comunicación de célula a célula en la ecología y este proceso está regulado por diferentes compuestos. Se ha visto que estos compuestos intervienen en el quorum-sensing que modula la señalización de las auxinas promoviendo el crecimiento vegetal.[14]

Estos ciclodipéptidos consisten en un anillo que contiene dos enlaces peptídicos y esta estructura cíclica confiere una gran estabilidad y resistencia a la digestión humana. Esta última propiedad permite que los dipéptidos sean utilizados como andamios para medicamentos, además de poseer una serie de propiedades biológicas interesantes, incluyendo propiedades antivirales, antibióticas y actividad antitumoral. Muchos organismos tanto marinos como terrestres forman algunos de estos compuestos y estos han demostrado ser prometedores para varias rutas en la industria farmacéutica y con múltiples funciones.[15]

2.4 Giberelinas promotores del crecimiento vegetal

Las giberelinas (GAs) constituyen una gran familia de ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos, algunos miembros funcionan como hormonas de crecimiento en plantas superiores. Además de ser fitohormonas, las GAs también están presentes en algunos hongos y bacterias, se identificaron por primera vez en 1926 en Japón como productos secundarios del hongo patógeno de arroz *Fusarium fujikuroi* causante de síntomas de sobrecrecimiento (enfermedad "bakanae") en plántulas de arroz. El compuesto GA3 (figura 2) se aisló por primera vez por científicos japoneses, dicho compuesto presentaba capacidad para restaurar el crecimiento normal de las plantas mutantes enanas, conjuntamente la aparición de sustancias tipo-GA3 en plantas superiores llevaron a la sugerencia de que las GAs son hormonas vegetales naturales que regulan el crecimiento y desarrollo en plantas superiores.[16]

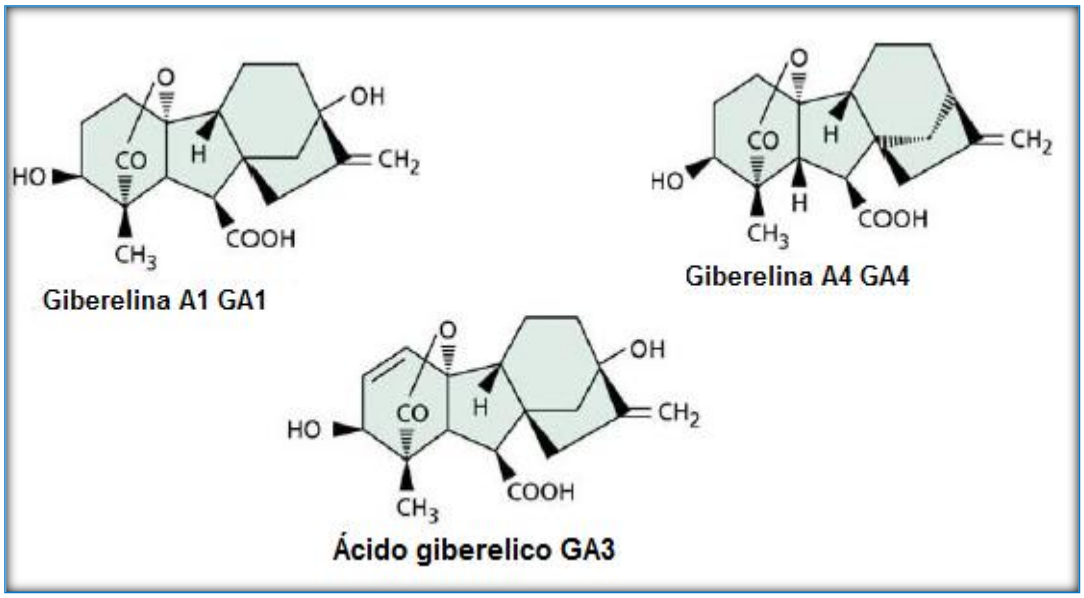


Figura 2. Estructuras de algunas giberelinas

No solo están presentes en hongos y plantas sino también en bacterias en donde actúan como metabolitos secundarios que pudieran jugar un papel como factores de señalización hacia la planta huésped. Las fitohormonas incluyendo auxinas, citoquininas, ácido abscísico, giberelinas y etileno inducen respuestas fisiológicas importantes en diferentes estados de desarrollo de la planta. Las giberelinas están asociadas con varios procesos de desarrollo de la planta como es germinación, elongación del tallo, floración y desarrollo de los frutos, como se muestra en la figura 3.[17] También promueve el crecimiento de raíces la abundancia de pelos radiculares y retraso en el envejecimiento celular de las plantas.

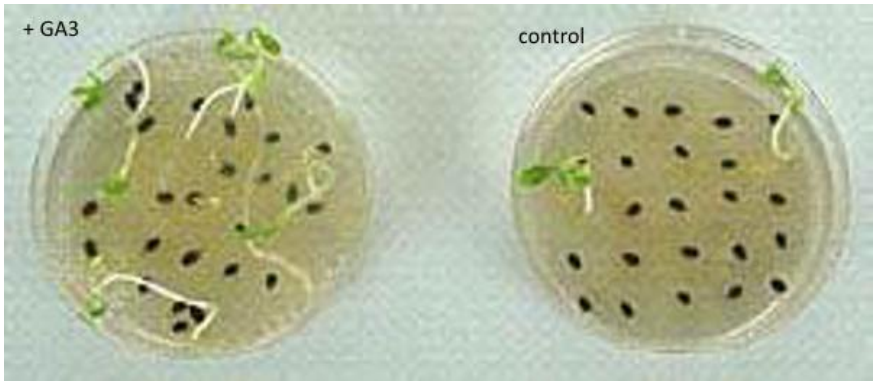


Figura 3. Inducción de la germinación.

Los efectos de las giberelinas endógenas y exógenas en el rompimiento de la latencia de semillas han sido reconocidos en diversas especies de plantas; la aplicación de giberelinas puede reemplazar la necesidad de un estímulo ambiental específico como la temperatura o la luz. Se proponen dos mecanismos de acción de las giberelinas en el proceso de germinación, el primeo es su influencia en la hidrólisis de las reservas de alimento y el segundo mecanismo de acción consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión.[18]

3- MARCO DE REFERENCIA

Existen muchas bacterias que producen giberelinas como promotores del crecimiento vegetal. Entre ellas la bacteria del género *Bacillus* sp. También ha demostrado tener la capacidad de ser una productora de giberelinas. Concretamente, en estudios previos se ha demostrado que dos especies de *Bacillus* como son *B. pumilus y B. licheniformis* que tenían fuerte actividad promotora del crecimiento eran productoras de giberelinas las cuales eran las responsables de esa actividad biológica junto con las auxinas.[19] También la especie de *B. amyloliquefaciens* ha demostrado tener la habilidad de producir giberelinas con capacidad de ser buenas promotoras del crecimiento vegetal del arroz. [20] Más recientemente se han aislado giberelinas de la especie *B. siamensis* probando que diferentes especies de *Bacillus* tienen capacidad de secretar giberelinas promoviendo el crecimiento vegetal en diferentes plantas.[21]

Nakagawa en 2013 describieron una dicetopiperazina que es el ciclo L-Prolina-L-Tirosina ya que a este le llaman también llamado maculosin. Varios informes también han descrito a "maculosin" ya sea como un mero metabolito secundario o por tener varias bioactividades, incluso como una citotoxina de la hierba anual *Centaurea maculosa* (Figura 4). Las actividades antimicrobianas de macusolin son débiles. Este compuesto mostró una débil actividad contra *Escherichia coli*. [22]

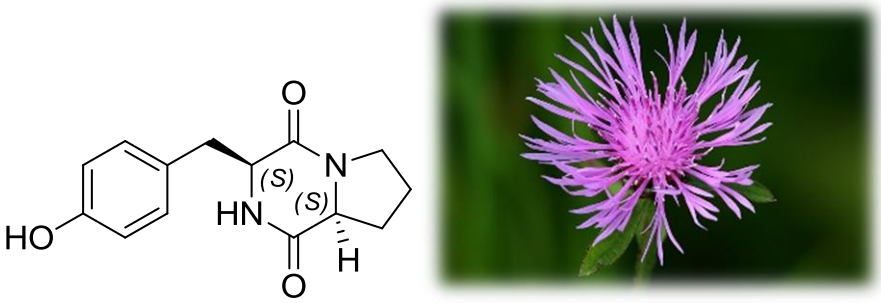


Figura 4: Maculosin o ciclo (L-Pro-L-Tyr) y *Centaurea maculosa*

Trabajos recientes en el grupo de trabajo del laboratorio donde se llevó a cabo este proyecto se logró al aislamiento de las cuatro dicetopiperazinas ciclo-(L-Pro-L-Leu),

ciclo-(L-Pro-L-Val), ciclo-(L-Pro-L-Phe) y ciclo-(L-Pro-L-Tyr) aisladas de una cepa de *Bacillus thuringiensis* (Figura 5).[23]

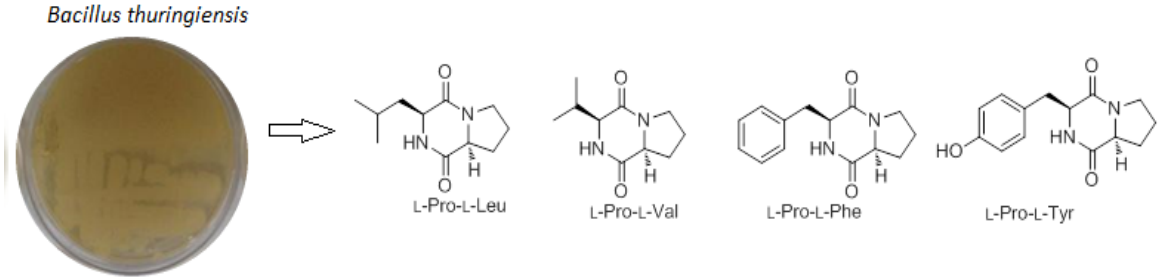


Figura 5: Ciclodipéptidos o dicetopiperazinas extraidas de *B. thuringiensis*

Se han descrito éstos compuestos modulan las vías de señalización de las auxinas y promueven el crecimiento vegetal permitiendo proponer una importante función de las dicetopiperazinas (DCPs) en la comunicación planta-bacteria, tal y como se muestra en la figura 6.[24]

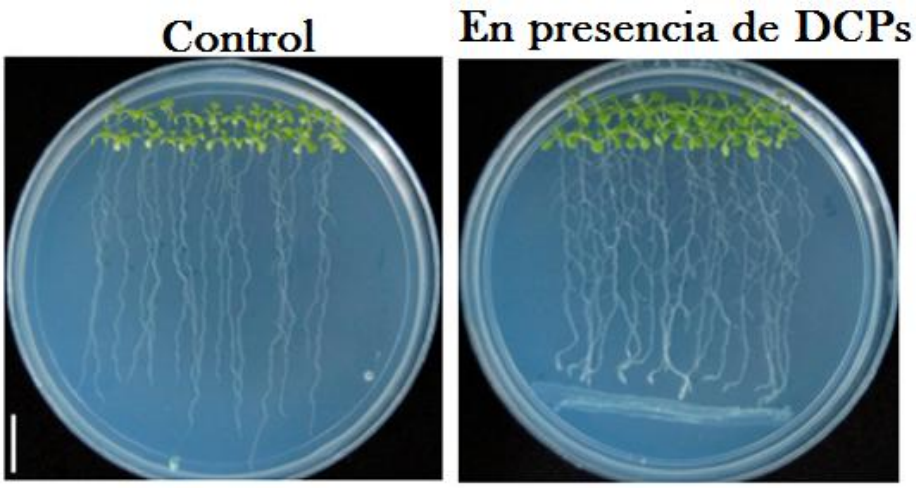


Figura 6: Crecimiento de semillas de *Arabidopsis taliana* en ausencia y en presencia de dicetopiperazinas.

4- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México a pesar de ser considerado uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo, no ha enfocado suficientes esfuerzos a la exploración de la diversidad microbiana con el objetivo de identificar cepas productoras de metabolitos secundarios a los que se les pueda dar una aplicación biotecnológica.

La identificación e investigación de metabolitos secundarios con actividades de ser estimulantes del crecimiento vegetal contribuirá al desarrollo de investigaciones cuya finalidad sea generar productos agrícolas para un mejor desarrollo de las plantas debido a que gran parte de la producción agrícola nacional se ve comprometida por el ataque de organismos patógenos (principalmente hongos). El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de cepas de *Bacillus sp.* nativas de México para producir los compuestos dicetopiperazinas y giberelinas que tienen actividad promotora de plantas.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta científica:

¿Se podrán identificar cepas de *Bacillus* sp. con la capacidad para producir giberelinas y dicetopiperazinas al mismo tiempo y que tengan efecto de ser promotores del crecimiento vegetal?

5- JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas ha surgido una tendencia hacia la producción limpia, cuyo fin es reducir el uso de insumos químicos para la fertilización y control de fitopatógenos que producen pérdidas agronómicas no solo en cultivos anuales sino también en cultivos perennes. Estos agroquímicos están implicados en la alteración de la microbiota natural del suelo, de manera que la reducen considerablemente y perjudican las interacciones benéficas entre el microorganismo y la planta. Por esta razón las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos que puedan ser usados para restablecer estas interacciones, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores, que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción.

Las giberelinas y las dicetopiperazinas están involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo en plantas superiores. La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y enfermedades de las plantas resulta una alternativa atractiva pues su aplicación directa, la de sus derivados o metabolitos secundarios. Por lo tanto, en este proyecto se pretende obtener por lo menos una cepa de Bacillus sp. con capacidad de secretar dicetopiperazinas y giberelinas al medio y que tengan un efecto de promover el crecimiento vegetal.

6- OBJETIVOS

6.1- Objetivo general

Obtener cepas con capacidad productora de dicetopiperazinas y giberelinas al mismo tiempo y que promuevan el crecimiento vegetal.

6.2- Objetivos particulares

- Obtener de una colección de cepas de Bacillus sp. cepas con capacidad de producir dicetopiperaznas y giberelinas.
- Extraer de esa cepa las dicetopiperazinas y giberelinas, identificando ambos compuestos por técnicas espectroscópicas.
- Seleccionar semillas de crecimiento rápido y optimizar el medio de crecimiento de las mismas.
- Probar la capacidad de la cepa seleccionada para promover el crecimiento de las semillas en comparación con un control.
- Probar la habilidad de las dicetopiperazinas y giberelinas aisladas solas y en combinación para promover el crecimiento de las semillas.

7- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Observacional, descriptivo, transversal, experimental y prospectivo.

Universo de estudio: Cepas de *Bacillus sp.* aislados de la tierra de diferentes regiones de la República Mexicana.

Número de muestras: 84 cepas.

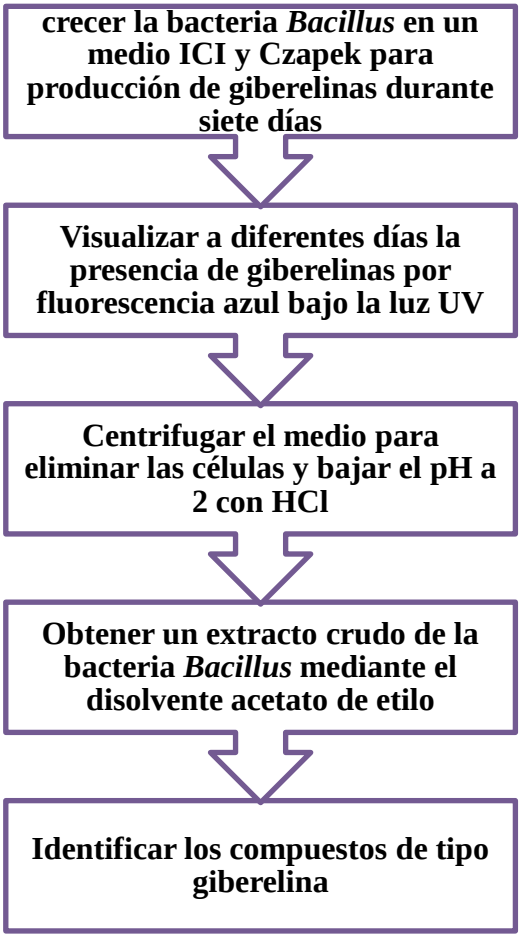
Criterios de selección de muestra

a. Inclusión: Aquellas cepas que mostraron la presencia de dicetopiperazinas y giberelinas.
b. Exclusión: Aquellas cepas que no mostraron la presencia de dicetopiperazinas y giberelinas.

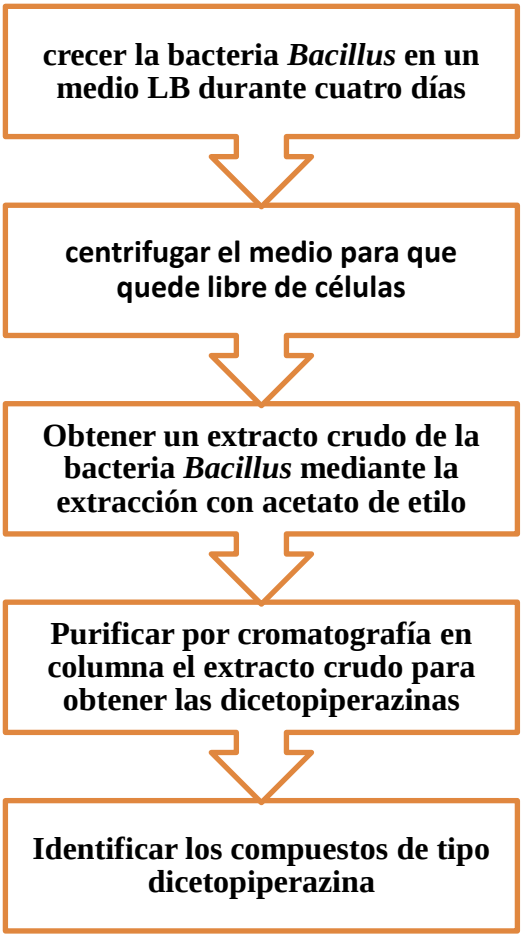
8- METODOLOGÏA

El desarrollo de la metodología se procederá por medio del siguiente diagrama de trabajo.

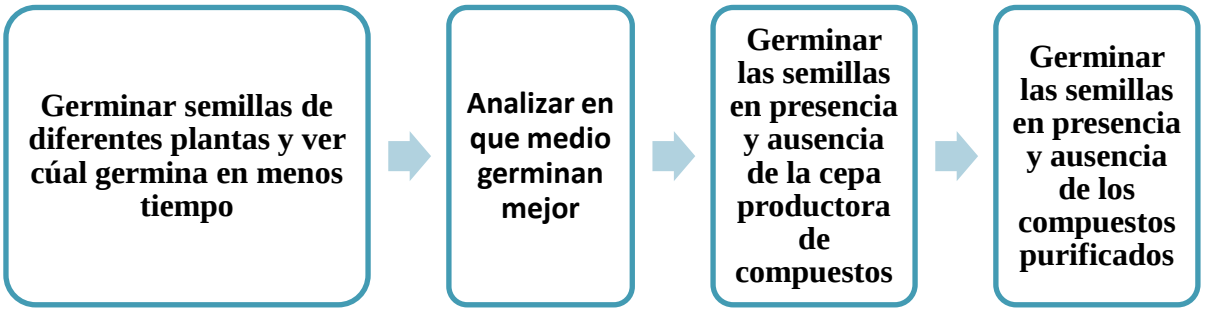
Obtencion de giberelina



Obtencion de dicetopiperazina



Germinación de semillas y su evaluación



8.1. Crecimiento de las cepas de *Bacillus* sp para producción de giberelinas y dicetopiperazinas

Las cepas a utilizar se crecieron primeramente en una placa de medio sólido LB (Luria Bertani), durante 24 horas, y se reviso que permaneciera sin ninguna contaminación por alguna otra bacteria u hongo.

Posteriormente se procedió a crecerlas en medio ICI y medio Czapek para la producción de giberelinas. Los aislados obtenidos se inocularon en 5 ml de medio ICI y se incubaron 30°C por 7 días en condiciones de oscuridad y agitación (175 rpm). Una vez que las muestras salieron de incubación se tomo una alícuota de 0.2 mL del medio de cultivo y se mezclo con 0.2 mL de etanol (96%, v/v), a esta mezcla se adiciono 2 mL de una mezcla fría de volúmenes iguales de Acidó sulfúrico y etanol al 96%. La mezcla se incubo a 48°C por 30 minutos. Las muestras fueron observadas con lámpara UV, las muestras positivas presentaron fluorescencia verde. Se utilizaron como control negativo tubos sin cultivo y como control positivo el reactivo de ácido giberelico (sigma) a diferentes concentraciones.

Para la producción de dicetopiperazinas las cepas candidatas de tener giberelinas se crecieron en medio LB por 4 días a 30 ^{o}C y 175 rpm. Pasado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar, con el fin de separar células del cultivo líquido, a 6000 rpm durante 15 min separando por decantación el botón celular del cultivo ya tratado.

8.2 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos

Al cultivo ya sin células se procedió a realizar una extracción con acetato de etilo en una relación 1:1 de volumen por 3 veces. Posteriormente la fase orgánica recolectada se seco con Na_2SO_4, y se concentró a presión reducida obteniendo un extracto crudo.

Del extracto obtenido se observó la presencia de giberelinas a través de luz UV.

La obtención y purificación de las dicetopiperazinas se realizó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando los eluyentes de acetato de etilo: acetona. A estas fracciones se les evaporó el disolvente y se observaron la presencia de dicetopiperazinas, compuestos de los cuales ya se tiene experiencia en obtenerlos en el laboratorio.

8.3 Germinación de diferentes tipos de semillas en varios medios

Las semillas que fueron usadas en este estudio son: de jitomate (*Solanum lycopersicum*), acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), apio (*Apium graveolens*), manzanilla (Matricaria chamomilla), pasto (*Agrostis tenuis*), rábano (*Raphanus sativus*) y chía (*Salvia hispánica*).

Las semillas se tuvieron que desinfectar. Para ello se procedió de la siguiente manera:

1- En 20 mL de hipoclorito de sodio (1%) se agrego las semillas y se hicieron lavados de 2-5 min, dejando reposar 2 minutos.
2- Posteriormente, se colocaron las semillas en 20 mL de etanol al 70% y se lavaron por 2-5 minutos y dejando reposar 2 minutos.
3- Se quitaron los residuos con lavados con agua destilada estéril de la misma forma que los lavados anteriores. Este paso ya se realizo en condiciones de esterilidad.
4- Se secaron y se guardaron en condiciones de esterilidad para su posterior sembrado.

Una vez desinfectadas las semillas se sembraron en medios sólido (placas de trisG con agar), semisólido de TrisG al 0.75% de agar, semisólido de TrisG al 0.37% de agar y en medio líquido de TrisG. Esto sirvió para determinar en donde crecían mejor y qué semillas serian las más aptas para realizar las pruebas de crecimiento con la cepa inductora y productora de giberelinas y dicetopiperazinas.

9- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Obtención de cepas con capacidad de producir giberelinas

De una colección de 284 cepas de *Bacillus* del laboratorio aisladas de diferentes Estados de la República se escogieron las primeras 84 cepas para probar su capacidad primeramente de producir giberelinas mediante una identificación cualitativa. Para ello se procedió como se describió en la parte experimental. Las cepas fueron crecidas primero en un medio ICI (adecuado para la producción de las giberelinas) y la presencia o ausencia de giberelinas fue identificado cualitativamente por la emisión de fluorescencia bajo la luz UV. Se utilizó como control negativo un tubo sin cultivo y como control positivo el reactivo del ácido giberélico comercial diluyendo 0.100 gramos en 200 microlitros de agua destilada (Figura 7).

Figura 7. Controles positivo y negativo observados bajo la luz UV.

Esta búsqueda de cepas productoras de giberelinas se llevó a cabo durante 16 días de crecimiento siguiendo una cinética de producción de ácido giberélico para ver cuál era el tiempo óptimo para la producción de este compuesto. A continuación, en la Tabla 1 se observan los resultados del análisis de las 84 cepas (una (+) denota la producción de giberelinas y una (-) no producción de giberelinas)

Tabla 1: Análisis de las 84 cepas probadas para la producción de giberelinas.

Cepa	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16
ELI 1	+	+	+	+	+	+	+
ELI 2	+	+	+	+	+	+	+
ELI 3	+	+	+	+	+	+	+
ELI 4	+	+	+	+	+	+	+
ELI 5	-	-	-	-	-	-	-
ELI 6	-	-	-	-	-	-	-
ELI 7	+	+	+	+	+	+	+
ELI 8	+	+	+	+	+	+	+
ELI 9	+	+	+	+	+	+	+
ELI 10	-	-	-	-	-	-	-
ELI 11	-	-	-	-	-	-	-
ELI 12	-	-	-	-	-	-	-
ELI 13	-	-	-	-	-	-	-
ELI 14	-	-	-	+	+	+	++
ELI 15	-	-	-	-	-	-	-
ELI 16	-	-	-	-	-	-	-
ELI 17	-	+	++	++	++	++	++
ELI 18	-	-	-	-		+	+
ELI 19	-	+	++	++	++	++	++
ELI 20	-	-	-	-	-	-	-
ELI 21	+	+	+	+	+	++	++
ELI 22	+	+	+	++	++	++	++
ELI 23	X	x	++	++	++	++	++
ELI 24	+	+	++	++	++	++	++
ELI 25	+	+	+	+	++	++	++
ELI 26	+	+	+	+	++	++	++
ELI 27	-	-	-	-	-	-	-
ELI28	+	+	+	+	++	++	++
ELI 29	+	+	+	+	++	++	++
ELI 30	+	+	++	++	++	++	++
ELI 31	-	-	-	-	-	-	-
ELI 32	+	+	+	+	++	++	++
ELI 33	+	+	++	++	++	++	++
ELI 34	+	+	+	+	++	++	++
ELI 35	+	+	+	+	++	++	++
ELI 36	+	+	+	-	++	++	++
ELI 37	-	-	-	-	+	+	++

ELI 38	-	-	-	+	+	+	+
ELI 39	-	-	-	-	-	+	+
ELI 40	-	-	-	-	-	+	+
ELI 41	-	-	-	+	+	+	++
ELI 42	-	-	-				
ELI 43	-	-	-	+	+	++	++
ELI 44	-	-	-	+	+	+	+
ELI 45	-	-	-	+	+	+	+
ELI 46	-	-	-	-	-	-	-
ELI 47	-	-	-	-	-	+	+
ELI 48	-	-	-	-	-	+	+
ELI 49	-	-	-	-	-	-	-
ELI 50	-	-	-	-	+	+	+
ELI 51	-	-	+	+	+	+	+
ELI 52	-	-	-	-	-	-	-
ELI 53	-	-	+	+	+	+	+
ELI 54	-	-	+	+	++	++	++
ELI 55	-	-	+	+	+	+	+
ELI 56	-	-	+	+	+	+	+
ELI 57	-	-	+	+	+	+	+
ELI 58	-	-	-	-	-	-	-
ELI 59	-	-	+	+	++	++	++
ELI 60	-	-	+	+	+	+	+
ELI 61	-	-	-	-	-	+	+
ELI 62	-	-	-	-		+	+
ELI 63	-	-	-	-	+	+	+
ELI 64	-	-	-	-	-	+	+
ELI 65	-	-	-	-		+	+
ELI 66	-	-	-	-	+	+	+
ELI 67	-	-	-	-		+	+
ELI 68	-	-	-	-	+	++	++
ELI 69	-	-	-	-	+	+	+
ELI 70	-	-	-	-	+	++	++
ELI 71	-	-	-	-	+	++	++
ELI 72	-	-	-	-	+	+	++
ELI 73	-	-	-	-	-	-	-
ELI 74	-	-	-	-	-	-	-
ELI 75	-	-	-	-	-	-	-
ELI 76	-	-	-	-	-	-	-
ELI 77	-	-	-	-	-	-	-
ELI 78	-	-	-	-	-	-	-
ELI 79	-	-	-	-	-	-	-
ELI 80	-	-	-	-	-	-	-
ELI 81	-	-	-	-	-	-	-
ELI 82	-	-	-	-	-	-	-

ELI 83	-	-	-	-	-	-	-
ELI 84	-	-	-	-	-	-	-

De los resultados obtenidos se puede observar que en los primeros seis días las cepas casi no tienen producción de giberelinas y es a partir del décimo día que se ve aumentada esta producción, aunque un 33 % de las cepas no presentaron ningún indicio de producción de giberelinas. De las cepas que se vieron con una mayor producción se seleccionaron dos cepas al azar, ELI24 y ELI30, para continuar con los experimentos, como se observa en la siguiente tabla 2.

Tabla 2: Cinética de producción de giberelinas durante 14 días.

Cepa	DIA 4	DIA 6	DIA8	DIA 10	DIA 12	DIA 14
ELI 24	+	+	++	++	++	++
ELI 30	+	++	++	++	++	++
CTRL (+)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CTRL (-)	---	----	---	---	---	---

Se puede observar que ambas cepas a los ocho días tienen su máxima producción con una ventaja para la cepa ELI30 la cual tiene su máxima producción al sexto día. La cantidad de fluorescencia no era tanta como la del control lo cual hacía difícil observar el fenómeno bajo la luz UV, como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Muestras de las cepas ELI 24 y ELI30 bajo la luz UV.

Tal y como se describió en la metodología también se utilizó el medio Czapek para ver la producción de giberelinas durante 8 días ya que después no se observaba mayor cambio y sólo se utilizaron las dos cepas seleccionadas para ello, como se muestra en la figura 9.

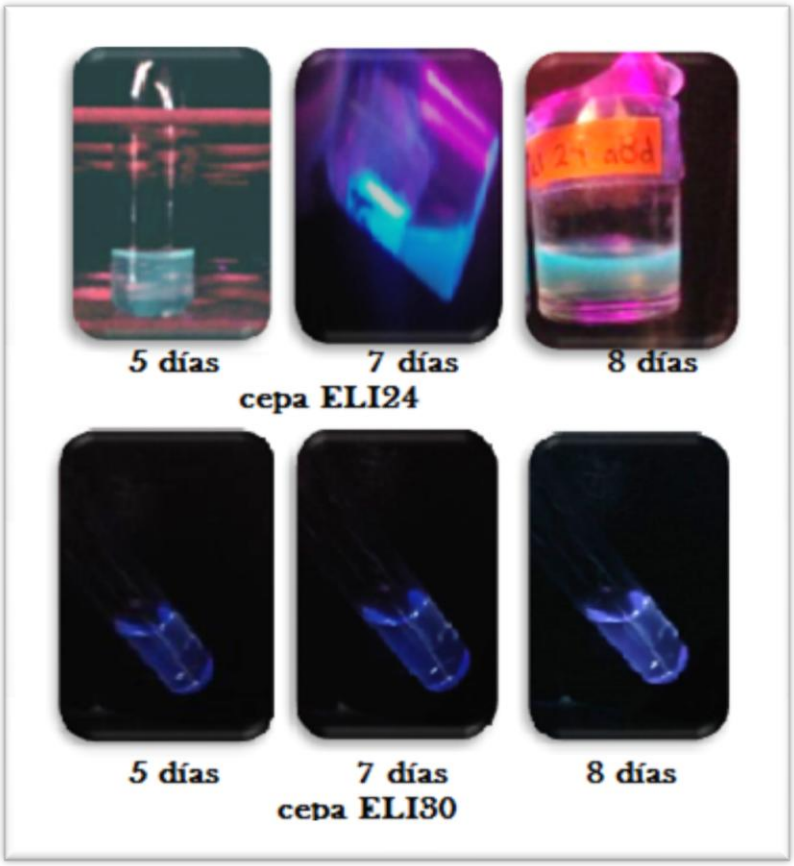


Figura 9: Producción de giberelinas en las cepas ELI 24 y ELI30

Para evaluar si ambas cepas poseen compuestos de tipo dicetopiperazinas se debe de realizar su extracción que se describe en la siguiente sección.

9.2 Extracción de giberelinas y dicetopiperazinas

9.2.1 Extracción de giberelinas

Se tenían por lo tanto dos cepas, ELI24 y ELI30 como productoras de giberelinas, como se muestra en la figura 10.

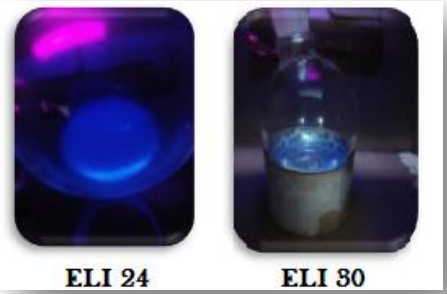
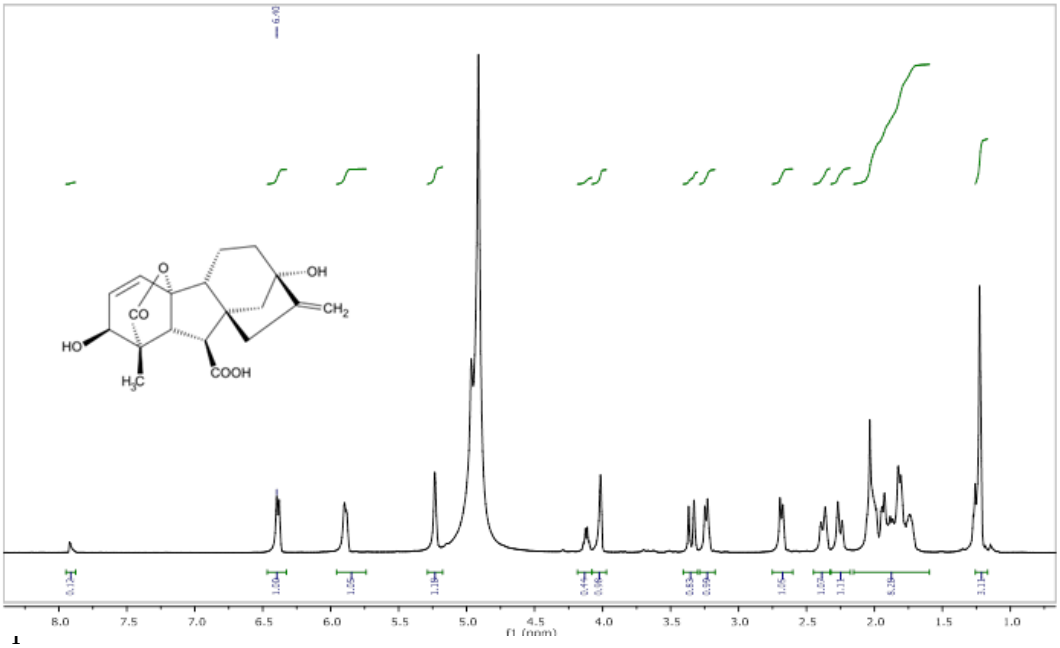


Figura 10. Cepas productoras de giberelinas

Para extraer la giberelina se realizó el crecimiento de las cepas en medio Czapek obteniendo un extracto crudo que tenía fluorescencia y que se tenía que someter a una extracción. Como se tenía la giberelina comercial se obtuvo un espectro de la misma para tener una referencia de comparación. El espectro se obtuvo en metanol deuterado y es el que se muestra en la figura 11.



gura 11: Espectro de RMN ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ de la giberelina

Sin embargo, a pesar de haber sometido el extracto crudo a diferentes métodos cromatográficos, que incluyen columna en gel de sílice y placas en capa fina, nunca se pudieron obtener las giberelinas separadas, lo cual se confirmaba por los espectros RMN comparándolos con el espectro de la giberelina comercial. Una explicación es que probablemente debido a su alta polaridad pudo haberse quedado retenida en la columna y se necesitaría más tiempo para poder dedicarse a su separación. Por lo tanto, la presencia de las giberelinas en las cepas ELI24 y ELI30 fue detectada solamente de manera cualitativa por la fluorescencia emitida bajo la luz UV.

9.2.2 **Extracción de**icetopiperazinas

Lo siguiente era demostrar la presencia de dicetopiperazinas para lo cual el cultivo de la cepa ELI30 se creció en medio LB durante cuatro días, se procedió a realizar una extracción con disolvente como es el acetato de etilo, como se describió en la metodología (ver en la pag. 17). Una vez obtenido el extracto crudo, éste se sometió a una cromatografía en gel de sílice, eluyéndola con diferentes disolventes. Se logró obtener una fracción eluída con acetato de etilo:acetona, de aspecto líquido viscoso cuyo análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^{1}H confirmó la presencia de tres dicetopiperazinas que se encontraban juntas en la misma fracción: ciclo (L-Prolina-L-Valina), ciclo (L-Prolina-L-Leucina) y ciclo (L-prolina-L-fenilalanina), como se muestra en la Figura 12. Tiene señales características en aproximadamente 7 ppm para los grupos fenilos de la fenilalanina, grupos isopropilo en 1 ppm para la valina y la leucina y las señales en 4 y 3.5 ppm para el ciclo de la prolina.

El experimento de la extracción de las dicetopiperazinas se repitió con la cepa ELI24 la cual también generó una fracción cuyo análisis por RMN ^{1}H de mostró que tenía la presencia de otras tres dicetopiperazinas. Sin embargo, su análisis mostró una diferencia respecto a la cepa anterior, ya que ésta no tenía ciclo (L-Pro-L-Leu) pero si ciclo(L-Pro-L-Tyr), por la presencia de dos dobles hacia 7 ppm de los fenilos sustituidos en para, como se muestra en la Figura 13.

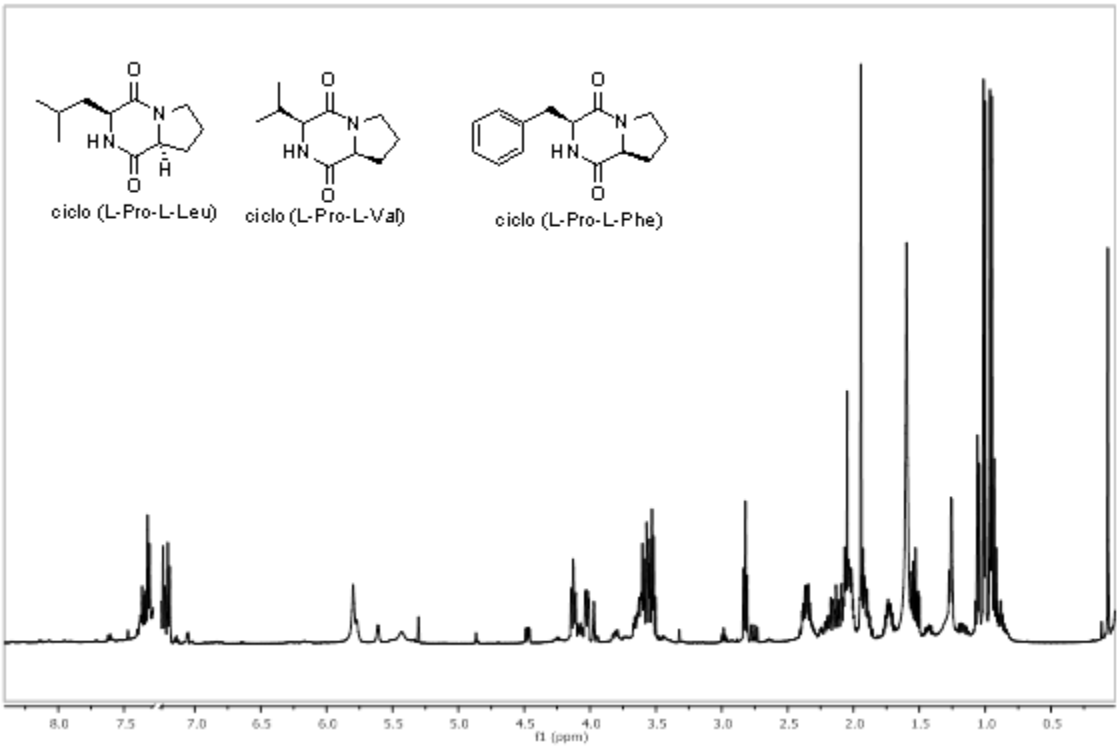


Figura 12: Espectro de RMN ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ de la Fracción de las DCP's ELI 30

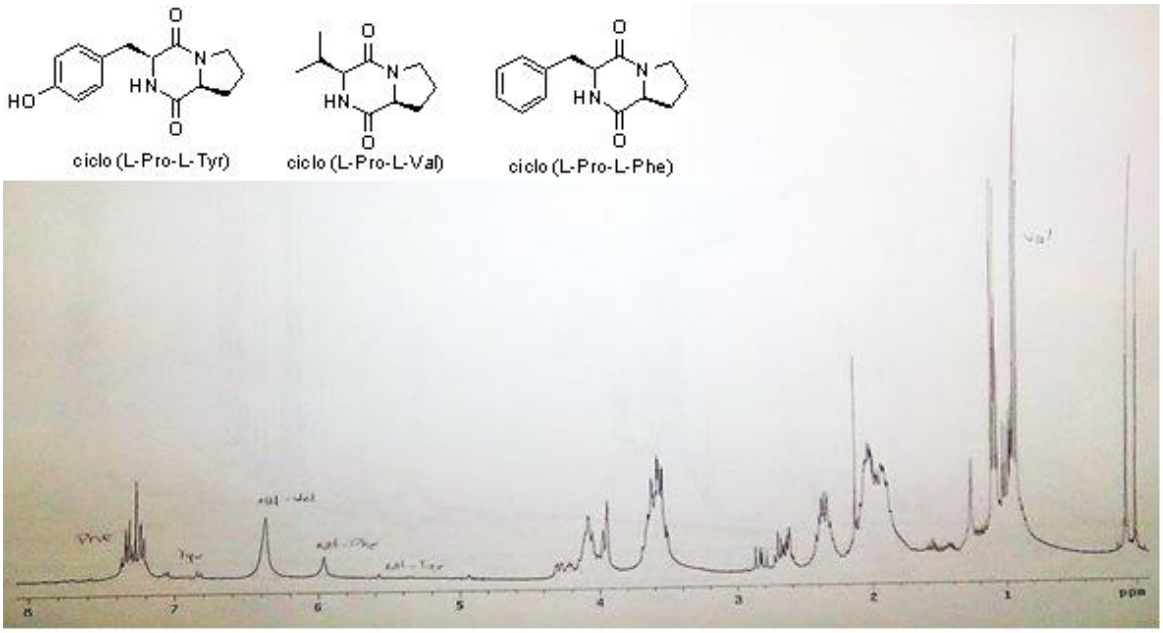


Figura 13: Espectro de RMN ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ de la Fracción de las DCP's ELI 24

9.3 Selección de semillas con óptimas condiciones de crecimiento

Para evaluar la capacidad de las dos cepas seleccionadas de promover el crecimiento en plantas, primero había que decidir qué planta era la que crecía más rápido y en qué medio para realizar los experimentos siguientes. Primeramente se utilizaron las semillas de Jitomate, Apio, Manzanilla y Pasto en los medios TrisG líquido y TrisGM (medio TrisG con 0.75% de agar) en tubos de vidrio (Figura 14). Para ello las semillas eran tratadas con soluciones de hipoclorito de sodio a baja concentración para su esterilización como se menciona en la parte experimental y se guardaban para ensayos posteriores. La germinación de semillas se siguió durante 7 días, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Germinación de semillas en tubos con medio TrisG y TrisGM

Medio de cultivo	Jitomate			Apio			Manzanilla			Pasto		
	Días de inoculación											
	Día 2	Día 5	Día 7	Día 2	Día 5	Día 7	Día 2	Día 5	Día 7	Día 2	Día 5	Día 7
Tris G	-	-	+	-	-	-	- *	+*	+*	+	+	+++ *
Tris GM	-	-	-	-	-	-	*	*	+*	-	-	+

(+) = crecimiento; (-) = no crecimiento y (*) = contaminación

Se pudo observar que el pasto era la semilla que más rápidamente germinaba de las probadas inicialmente, sin embargo en los tubos de vidrio la contaminación en el medio TrisG siempre aparecía a pesar de mantener los tubos en ambiente estéril.

Figura 14: Crecimiento de semillas en tubos

Se intentó la germinación en placa con agar TrisG semisólido (0.75% de agar) con semillas de pasto y Jitomate, sin embargo, no hubo tanto crecimiento de las semillas, como se muestra en la Figura 15.

Figura 15: Germinación de semillas en medio TrisG semisólido (0.75% de agar)

Debido a los problemas mencionados anteriormente se pensó en germinar las semillas en algodón estéril, humedecido con agua estéril, para luego realizar una micropropagación en tierra. Se realizó el experimento por diez días y con las semillas de rábano, perejil, chía, apio, espinaca, pasto, cilantro, jitomate y manzanilla, como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4: Germinación de semillas en algodón

semilla	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Rábano	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++++
Perejil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Chía	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Apio	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
Espinaca	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
Pasto	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Cilantro	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+++
Jitomate	-	-	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
Manzanilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = Germinación, (-) = No germinación, y (*) = contaminación

Tal y como se muestra en la Tabla 4 las semillas de rábano (Figura 16) fueron las que crecieron más y sin problema por lo que se decidió trabajar con estas semillas.

Figura 16: Germinación de las semillas de rábano en algodón

Lo siguiente era estandarizar la micropropagación con las semillas de rábano. Para ello lo primero que se hizo fue esterilizar la tierra tres veces a 15 libras por 15 minutos. Para asegurar la completa esterilización de la tierra se realizó un recuento en placa de los microorganismos de la tierra teniendo un recuento de cero. A continuación en condiciones de esterilidad se colocó una porción de tierra estéril en pocillos previamente esterilizados y se pone la semilla ya germinada. Se agregaron 300 ml de agua estéril a cada pocillo con tierra una vez inoculada la plántula. Se mantiene por un periodo de dos días la micropropagación asegurando que la planta ya se haya adaptado a la tierra (Figura 17).

Figura 17: Control de la esterilidad de la tierra y micropropagación de las plántulas.

9.4 Evaluación de las cepas seleccionadas, las dicetopiperazinas y giberelina solas y en combinación para promover el crecimiento de las semillas.

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas para germinar y crecer las semillas más apropiadas, se procedió a realizar el experimento con la tierra inoculada con las dos cepas seleccionadas, utilizando como control tierra sin inocular. No se observó un efecto notorio entre el control y la aplicación de las cepas, por ello se procedió a evaluar el efecto de los compuestos.

Se procedió a probar el efecto en el crecimiento de las semillas de la giberelina comercial, debido a que no se lograron obtener las giberelinas extraídas de las cepas, y de las dicetopiperazinas solas y en combinación con las giberelinas, como se muestra en la Figura 18. Las dicetopiperazinas fueron extraídas de ambas cepas y se juntaron ya que prácticamente eran las mismas y por lo tanto se evaluó el efecto de las 4 DCPs obtenidas. Fueron diluídas en 1 mL de agua estéril y se aplicaron 200 µl de dicha solución. De la giberelina comercial se pesó 0.1 g y se resuspendió en 200 µl de agua estéril para tener una concentración de 0.5 mg/µl que fue la concentración aplicada. Cuando se aplicó la mezcla de DCPs y giberelinas se pusieron 100 µl de cada una.

Figura 18: Tierra inoculada con las cepas y con los compuestos

Las plántulas se dejaron crecer veinte días al cabo de los cuales se les medía la raíz, el tallo y se veía la floración como se puede observar en la figura 19.

Figura 19: Medición de las plántulas

Los datos que se obtuvieron en cuanto a floración, aumento de la raíz y el tallo son los que se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de los compuestos giberelina y dicetopiperazinas en las funciones de la planta

Función fisiológica	Control (agua estéril)	GA	DCP´s	Mezcla GA´s y DCP´s
Floración	---	---	+	++
Aumento de raíz	+	++	---	++
tallo	+	---	+	++

--- = no se notó efecto

De los datos presentados en la tabla 5 se puede observar que la giberelina comercial tuvo un efecto en el aumento de la raíz, mientras que las dicetopiperazinas tuvieron un aumento en la floración de la plántula. Pero el efecto más notorio fue el de la mezcla de ambos compuestos ya que se notó un aumento en cada función fisiológica. Esto se muestra de manera clara en la figura 20 donde se aprecia un claro efecto de ambos compuestos juntos, lo cual demuestra un sinergismo de los dos compuestos. Estos experimentos se realizaron por triplicado, coincidiendo los resultados en todas las réplicas.

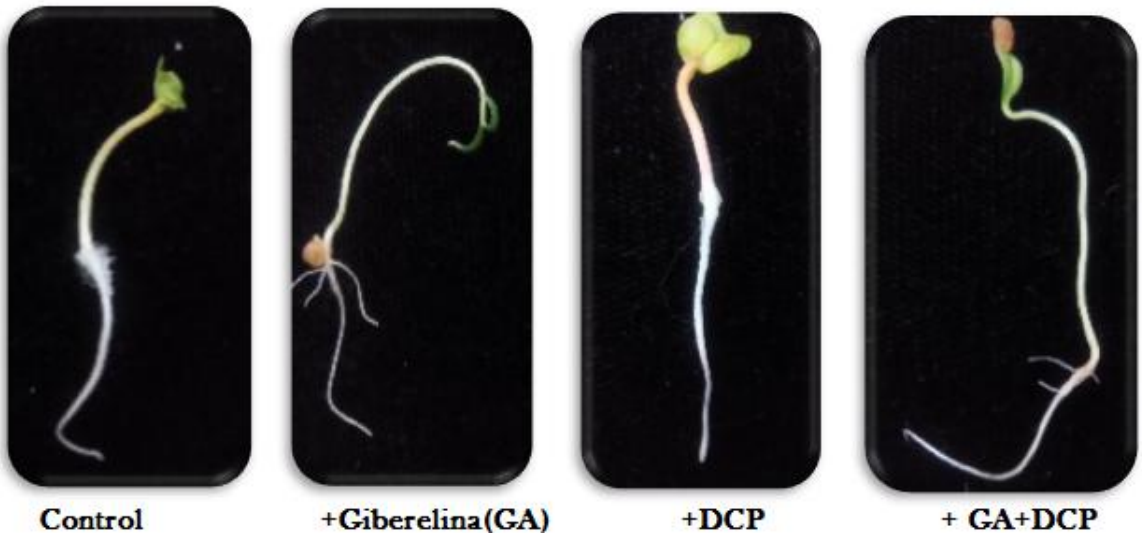


Figura 20. Efecto de los compuestos en las funciones fisiológicas de las plántulas

10- CONCLUSIONES

- Se lograron obtener dos cepas ELI24 y ELI30 con capacidad de producir giberelinas y dicetopiperazinas.

- Se pudo comprobar de manera cualitativa por la fluorescencia bajo la luz UV la presencia de giberelinas; sin embargo, no se pudieron purificar y extraer, probablemente por la alta polaridad de dichos compuestos.

- Las dicetopiperazinas se lograron extraer e identificar por métodos espectroscópicos, pudiendo constatar que las cepas ELI24 y ELI30 variaban en el tipo de dicetopiperazinas producidas.

- De todas las semillas utilizadas la del rábano resultó ser la más apropiada para los experimentos de semillas por la rapidez y facilidad de crecimiento.

- Se lograron establecer las condiciones óptimas para la germinación y crecimiento de semillas, controlando la contaminación, siendo primero germinadas en algodón y posteriormente propagadas en tierra estéril.

- Se logró ver que tanto la giberelina comercial como las dicetopiperazinas aisladas tenían un efecto benéfico en el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, el mayor efecto fue el de la mezcla de ambos compuestos apoyando la hipótesis de un sinergismo entre ambos compuestos.

11- BIBLIOGRAFÍA

1. Saharan BS., Nehra V. (2001). Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research.* Volume 2011: LSMR-21.
2. Timmusk S, Paalme V, Pavlicek T, et al. (2011) "Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates," PLoS One, 6, e17968.
3. Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. Current Opinion in Biotechnology, 20: 642–650.
4. Stein T. **2005** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol*. *56*, 845-857
5. Demain AL, Fang A. **2000** The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*., *69*, 1-39
6. Sansinenea E, Ortiz A. **2011.**Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett***.,** *33*, 1523-1538.
7. Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Constanza, L. y Sánchez, C. **2011.***Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas*, *9*, 177-187.
8. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. **2005.***The journal of antibiotics*, *58*, 1-26.
9. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. y Mayorga, L. **2009** Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, *73*, 63-72.
10. Bais, H., Fall, R., y Vivanco, J. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, **2004**, *134*, 307-319.
11. Romero, D., Vicente, A. y Rakoptoaly, R. The iturin and fengycin families of polipeptides are key factors in antagonis of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *The America Phytopatology Society*, **2007**, *20*, 431-440.
12. Reva, O. N.; Smirnov, V.V.; Petterson, B.; Priest, F.G. Int. J. Syst. Evol. Micr., 2002, 52, 101-107.

13. Lee, Y-J.; Lee, S-J.; Kim, S. H.; Lee, S. J.; Kim, B-C.; Lee, H-S.; Jeong, H.; Lee, D-W. J. Bacteriol. 2012, 194, 5705-5706.
14. Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108: 7253-7258.
15. Arachchilage, A. P. W.; Wang, F.; Feyer, V.; Plekan, O.; Prince, K. C. J. Chem. Phys. 2012, 135, 1243301-1.
16. Tudzynski, B. (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, 66(6), 597-611.
17. Gomi K, Matsuoka M. Gibberellin signalling pathway. Curr Opin Plant Biol 6: 489-493, 2003.
18. Debeaujon, I. Koornneef, M. (2000). Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. Plant Physiol. 122: 415-424.
19. Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouachi, J.R., Tadeo, F., Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria Bacillus pumilus and Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiol. Plant. 111, 206-211.
20. Shahzad R, Waqas M, Latif Khan A, Asaf S, Aaqil Khan M, Kang S-M, Yun B-W, Lee I-J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. Plant Physiology and Biochemistry 106, 236-243.
21. Ambawade1 M.S., Pathade G. R. (2015). Production of Gibberellic Acid by *Bacillus siamensis* BE 76 Isolated from Banana Plant (musa spp). International Journal of Science and Research.4: 394-398.
22. Nakagawa, K.; Takada, K.; Imamura, N. (2013) Probable novel MEP pathway inhibitor and its binding protein, IspG. Biosci. Biotechnol. Biochem, 77, 1449-1454.
23. Sansinenea, E.; Salazar, F.; Jiménez, J.; Mendoza, A.; Ortiz, A. (2016) Diketopiperazines derivatives isolated from Bacillus thuringiensis and Bacillus

endophyticus, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. Tetrahedron Lett. 57, 2604-2607.

24. Ortiz-Castro, R.; Díaz-Pérez, C.; Martínez-Trujillo, M.; del Río, R. E.; Campos-García, J.; López-Bucio, J. (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 7253–7258.