



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS DEL ICUAP**

**FUNCIÓN DEL GEN *galU* EN *Pseudomonas stutzeri* A1501 Y EN SU  
INTERACCIÓN CON ARROZ**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**PRESENTA:  
SHEIREN ASKASI MARTÍNEZ MÉNDEZ**

**DIRECTORES:  
D.C. RICARDO CARREÑO LÓPEZ  
D.C. JULIA MARÍA ALATORRE**

**ENERO 2025**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 3 de diciembre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Sheiren Askasi Martínez Méndez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Función del gen *galU* en *Pseudomonas stutzeri* A1501 y en su interacción con arroz”**

A nuestro juicio, la alumna **Sheiren Askasi Martínez Méndez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

**Atentamente.**

“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

**D.C. Jesús Muñoz-Rojas**

**D.C. Vianey Marín Cevada**

**D.C. Antonino Baez Rogelio**

**D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, expreso mi más sincero agradecimiento a mis padres y a mi hermano, quienes son el núcleo de todo lo que soy y el hogar al que siempre puedo regresar.

A Alejandro, por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia, cuya presencia y respaldo, aunque a la distancia, siempre han sido una fuente de fortaleza y ánimo.

A mis asesores, el D.C. Ricardo Carreño López y la D.C. Julia María Alatorre, por su invaluable orientación académica y, especialmente, por ser un ejemplo constante de gentileza y empatía.

A mis amigos, por hacer más ligeros los momentos difíciles y enriquecer mi vida con su compañía.

A mis compañeros y amigos del posgrado y del laboratorio de Biología Molecular, con quienes compartí tanto risas como desafíos a lo largo de esta etapa. Ha sido un privilegio conocerlos, y espero que nuestros caminos se crucen nuevamente en el futuro.

Finalmente, a Titi. Espero que, desde donde te encuentres, te sientas orgulloso de la persona en la que me he convertido y que, si existe otra vida, podamos encontrarnos nuevamente.

## Índice

ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 .....	8
ANTECEDENTES <i>galU</i> .....	10
UDP-Glucosa .....	12
JUSTIFICACIÓN .....	13
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVOS .....	14
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
METODOLOGÍA .....	15
Purificación de ADN cromosómico .....	15
Purificación de DNA por Sílica .....	15
“Wizard Genomic Purification Kit” .....	15
Purificación de ADN plasmídico .....	16
Purificación de DNA plasmídico por Miniprep-lisis alcalina .....	16
“Zippy Plasmid Miniprep Kit” .....	16
Purificación de DNA plasmídico por Sílica .....	17
Preparación de células competentes .....	17
PCR .....	17
Esterilización de semillas de arroz .....	18
Inoculación de semillas de arroz con cepas de <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 silvestre (WT) y mutante en gen <i>galU</i> .....	18
Evaluación de adhesión en semillas de arroz .....	18
Montaje de sistema hidropónico .....	19
Evaluación de colonización de arroz .....	19
Evaluación del crecimiento vegetal .....	19
Cuantificación de la producción de clorofila .....	19
Purificación de DNA de gel de agarosa .....	19
Evaluación de crecimiento bacteriano .....	20

Evaluación de fenotipos en placa .....	20
Clonación de amplicones en pGEM T Easy.....	20
Transformación bacteriana.....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	22
<b>DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>Conclusiones.</b> .....	53
<b>Perspectivas.</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	58
<b>Medios de cultivo</b> .....	58

## ABREVIATURAS

ADN o DNA: ácido desoxirribonucleico  
ARN o RNA: ácido ribonucleico  
pb: pares de bases  
CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio  
CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio  
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato  
*E. coli*: *Escherichia coli*  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
kb: kilo pares de bases  
LB: Luria Bertani  
mM: milimolar  
mg: miligramo  
MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnesio  
ml: mililitro  
Mg: magnesio  
NaCl: cloruro de sodio  
NaI: yoduro de sodio  
nm: nanómetro  
DO: densidad óptica  
*P. stutzeri*: *Pseudomonas stutzeri*  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
rpm: revoluciones por minuto  
SDS: Dodecilsulfato de sodio  
TE: Tris EDTA  
UDP: uridina difosfato  
UFC: unidades formadoras de colonias  
µL: microlitro  
WT: wild type / cepa silvestre

## RESUMEN

*Pseudomonas stutzeri* A1501 es una bacteria rizosférica promotora del crecimiento vegetal originalmente aislada de la raíz de la planta de arroz. Este cereal representa una de las principales fuentes de energía a nivel mundial. En este estudio se trabajó con una cepa de *Pseudomonas stutzeri* A1501 mutante en el gen *galU* que codifica para la enzima UTP-glucosa-1-fostato-uridiltransferasa necesaria para la producción de UDP-glucosa. Este azúcar es un intermediario esencial en el metabolismo de carbohidratos y está involucrado en la producción de exopolisacárido, el cual se considera un factor crucial para la colonización bacteriana en plantas. Se realizaron estudios de los fenotipos presentados en dicha mutante, así como la interacción de este microorganismo con plantas de arroz mediante evaluaciones de adhesión y colonización.

## ABSTRACT

*Pseudomonas stutzeri* A1501 is a rhizospheric growth-promoting bacteria originally isolated from the root of rice plants. Rice is one of the main sources of energy worldwide. This study focused on a mutant strain of *Pseudomonas stutzeri* A1501 lacking the *galU* gene, which encodes the enzyme UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, necessary to produce UDP-glucose. This sugar is an essential intermediate in carbohydrate metabolism and is involved in the production of exopolysaccharide, considered a crucial factor for bacterial colonization in plants. Phenotypic studies of the mutant were performed, as well as evaluations of the microorganism's interaction with rice plants, focusing on adhesion and colonization.

## INTRODUCCIÓN

### *Pseudomonas stutzeri* A1501

Es un bacilo Gram- móvil por flagelación monótrica, su tamaño va de 1 a 3µm de largo y 0.5µm de grosor. Al igual que otras especies de *Pseudomonas* es capaz de crecer en medios mínimos e incluso algunas cepas pueden crecer diazotróficamente. *P. stutzeri* tiene un metabolismo respiratorio donde el oxígeno es el último aceptor de electrones y el nitrato un aceptor alternativo (Lalucat *et al*; 2006).

El género *Pseudomonas* es dominante en asociación con la rizósfera de trigo, cebada y arroz de humedales (Chan *et al*; 1994), (Diallo *et al*; 2004), (Lovel *et al*; 2000). En un estudio en donde se evaluó el nitrógeno fijado en el suelo por la diversidad bacteriana se observó que un alto porcentaje de los genes *nifH* encontrados son idénticos a los presentes en *P. stutzeri* porque lo que se cree que su rol como organismo fijador de nitrógeno es más importante del previamente considerado (Diallo *et al*; 2004).

*Pseudomonas stutzeri* A1501 fue aislada de las raíces de la planta de arroz y reside en la capa de mucílago. Se ha observado mediante microscopia que el 10% de las bacterias ancladas a la superficie ingresan en las células de la raíz y también se demostró la presencia de las células bacterianas dentro de la raíz en plantas inoculadas con esta cepa (You & Zhou, 1989), (Vermeiren *et al*; 1999).

La cepa A1501 es usada en China como inoculante en plantas de arroz debido a su capacidad de colonización endófitas en las raíces de la planta y su actividad fijadora de nitrógeno (Pham *et al*; 2017). Al ser una bacteria promotora del crecimiento vegetal representa una alternativa ante el uso desmedido de agroquímicos en la actualidad. El primer paso para la interacción bacteria-planta depende de una colonización exitosa, para ello la bacteria deberá desarrollar diferentes estrategias que propicien la adherencia a la superficie de las plantas, una de ellas es la formación de biopelícula.

Una biopelícula es una comunidad bacteriana con una estructura compleja que se encuentra embebida en una sustancia polimérica extracelular producida por las mismas bacterias. Su composición es variada y puede contener proteínas, ADN extracelular, polisacáridos y lípidos (Song Ding *et al*; 2019). Diferentes factores ambientales regulan la producción de la biopelícula como el pH, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Para iniciar la formación de la biopelícula primero debe existir una interacción entre las bacterias de vida libre y una superficie, una vez adheridas a esta comienza la producción de exopolisacárido y ADN extracelular que formarán distintas capas hasta conseguir una biopelícula madura (Ueda & Saneoka, 2015).

Dentro de las fases de formación de biopelícula, la formación de exopolisacárido permite una adhesión irreversible de las bacterias a la superficie formando una barrera que protege esta unión (Achinas *et al*; 2019). Se ha observado que la producción de exopolisacárido es crucial para la colonización de las rizobacterias y la fijación de nitrógeno, *Pseudomonas stutzeri* tiende a formar mayor cantidad de biopelícula en condiciones de baja presencia de nitrógeno (Wang *et al*; 2017). El género *Pseudomonas* ocupa diversos nichos ecológicos, algunas especies son propensas a causar enfermedades y otras sólo residen en su ambiente o incluso pueden ser benéficas para este. En cualquiera de estos casos, las bacterias suelen existir adheridas a diferentes superficies y suelen estar encapsuladas en biopelícula. La composición de la biopelícula puede ser variada entre especies y aunque *P. aeruginosa* ha sido el objeto de estudio principal debido a su relevancia clínica, algunas otras especies ya han sido estudiadas y se conoce que los polisacáridos principales que conforman la biopelícula del género son: el alginato, lévano, Psl (compuesto de manosa y galactosa), Pel (compuesto principalmente de galactosamina y N-acetilgalactosamina unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4) (Ma *et al*; 2007) y la celulosa (Mann & Wozniak, 2011).

El gen *galU* codifica para la enzima UDP-glucosa-pirofosforilasa que participa en la síntesis de UDP-glucosa a partir de glucosa-1- fosfato y UTP. La UDP-glucosa es un intermediario importante en el metabolismo de carbohidratos. Participa en la síntesis de celulosa (Römling , 2002), glucógeno y el metabolismo de la galactosa (Holden *et al*; 2003).

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias y posee una secuencia de aminoácidos y una estructura tridimensional distintas a su versión producida en células eucariotas (Flores *et al*; 1997).

La UDP- glucosa también parece desempeñar un papel importante en la regulación de genes en *Escherichia coli*. Las mutaciones en genes que están involucrados son su síntesis como *pgi*, *pgm* y *galU* conducen a una mayor expresión de genes involucrados con el factor sigma S y a mayores niveles de sigma S durante la fase estacionaria (Böhringer *et al*; 1995).

Existen estudios en donde se resalta la importancia del gen *galU* en la formación de lipopolisacárido estructural y su relación con la patogenicidad. Los genes *galU* y *galE* son esenciales para la formación de biopelícula en *V. cholerae*, lo que sugiere que tiene un papel esencial en la síntesis de exopolisacárido (Nesper *et al*; 2001).

Como se mencionó con anterioridad la cepa A1501 de *Pseudomonas stutzeri* es usada como inoculante en plantas de arroz en China ya que fue aislada en la zona radicular de estas plantas. El arroz es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial, en especial en el continente asiático donde se produce el 90% de la producción mundial. Existen más de 110 000 variedades y su cultivo se remonta a 10 000 años atrás. En la actualidad su cultivo se ha extendido a otros continentes como América, Europa y África.

El arroz proporciona nutrientes esenciales como magnesio, fósforo y varias vitaminas. A medida que la población mundial crece, será crucial garantizar su suministro adecuado, su integridad nutricional y la sostenibilidad de los sistemas de producción del arroz (Fukagawa & Ziska, 2019)

## ANTECEDENTES

### *galU*

El gen *galU* codifica la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa o UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPG: PP). Esta enzima está ampliamente distribuida en animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, no guarda relación con la enzima homóloga producida por organismos eucariotas (Flores *et al*; 1997). Las UDPG: PP presentes en procariontes se encuentran altamente conservadas. Las alteraciones en el gen *galU* tienen repercusiones importantes en la biosíntesis de la mayoría de los polisacáridos (Mollerach & García, 2000). En la **Error! Reference source not found.**, se presenta un resumen acerca del gen *galU* y algunos de los efectos generales que se han reportado en bacterias con mutaciones en dicho gen, más adelante se abordarán estos efectos con mayor detalle.

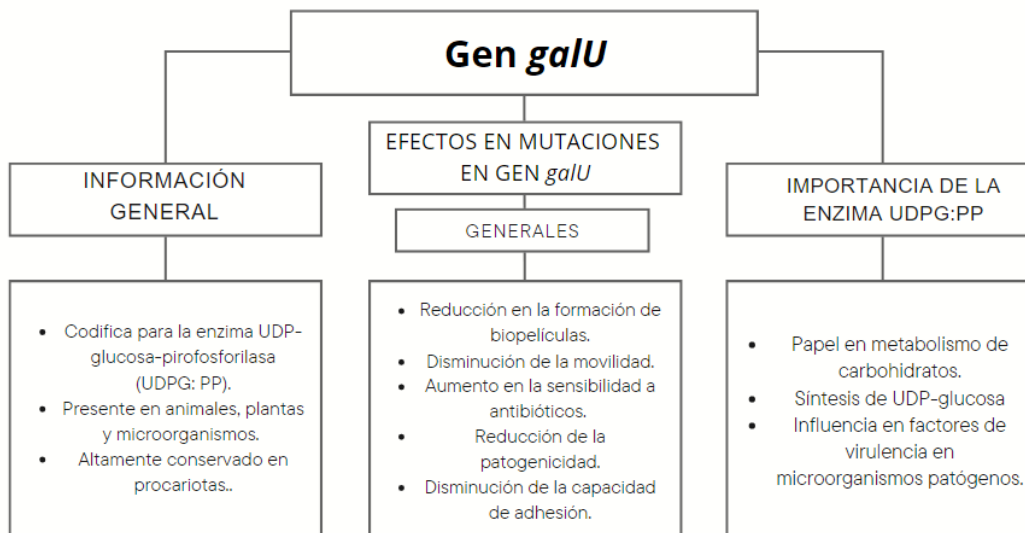


Figura 1. El gen *galU* y efectos en bacterias con mutaciones en *galU*.

Diversos estudios han revelado los efectos de las mutaciones en el gen *galU*. En general, se ha observado una reducción en la formación de biopelícula, movilidad, resistencia a antibióticos, patogenicidad y adhesión a células hospedadoras. En *Salmonella typhimurium*, *galU* desempeña un papel crucial en la formación de biopelícula, la sensibilidad a antibióticos, la capacidad de adhesión a células hospedadoras y la patogenicidad (Guo *et al.*, 2023).

En *Lactobacillus acidophilus*, se han reportado deficiencias en el metabolismo de lactosa y galactosa, morfología celular irregular con acortamiento celular, cápsula más delgada y rugosa, y división celular anormal (Zeng *et al.*, 2022). El knockout del gen *galU* en *Helicobacter pylori* mostró que el lípido A, componente de sus lipopolisacáridos, presentaba características diferentes a las de la cepa silvestre, así como un aumento significativo en la sensibilidad a antibióticos (Feng *et al.*, 2023).

En cuanto a bacterias del mismo género, en mutantes de *Pseudomonas syringae* con delección en el gen *galU*, se ha reportado una reducción en la movilidad y una afectación en la producción del lipopolisacárido, lo que repercute en su supervivencia en las plantas hospederas (Deng *et al.*, 2010).

Aún no existen reportes de estudios de mutaciones en el gen *galU* en *P. stutzeri*, sin embargo, dado que estudios filogenéticos (Özen & Ussery, 2012) han demostrado una gran similitud entre *Pseudomonas stutzeri* y *Azotobacter vinelandii*, podemos usar este último como referente. En *Azotobacter vinelandii*, los mutantes con disrupciones en *galU*, aunque no se vieron afectados en términos de viabilidad, presentaron defectos en el crecimiento. Este resultado sugiere que, aunque el gen *galU* no sea esencial, es fundamental para el desarrollo normal de la bacteria (Knutson *et al.*; 2021).

### UDP-glucosa-pirofosforilasa

La UDP-glucosa-pirofosforilasa (UDPG: PP) es una enzima crucial en el metabolismo de carbohidratos. Participa en la síntesis de UDP-glucosa, es un precursor clave de las glicosiltransferasas en varios microorganismos y afecta algunos factores de virulencia en microorganismos patógenos.

Esta enzima cataliza la reacción reversible de UDP-glucosa y pirofosfato (PP<sub>i</sub>) partir de glucosa-1-fosfato y UTP (Figura 1).

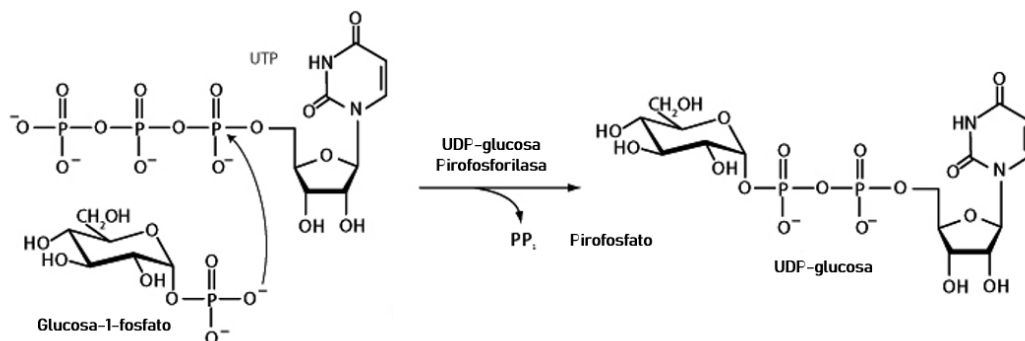


Figura 1 Reacción catalizada por la UDP-glucosa Pirofosforilasa. (Premed Village, 2024).

La UDPG: PP pertenece a la superfamilia de las nucleótido difosfato-azúcar-pirofosforilasas. Dada su actividad esencial en el metabolismo se encuentra distribuida en todos los dominios de la vida. (Berbís *et al.*; 2014).

## UDP-Glucosa

Los azúcares nucleótido desempeñan roles esenciales en todos los organismos vivos como los bloques de construcción de la biosíntesis de carbohidratos y sus conjugados. Estos azúcares son donadores de glicosilo y fosfoglicosilo en la síntesis de carbohidratos (Mikkola, 2020).

La UDP-glucosa es un metabolito altamente funcional y esencial en numerosos procesos biológicos, desempeñando un papel clave en el metabolismo de carbohidratos. Actúa como donador de glucosa en la síntesis de glucógeno y polisacáridos, además de participar en la producción de lipopolisacáridos, componentes fundamentales de la pared celular, así como en la formación de polisacáridos capsulares y de membrana. También se ha relacionado su producción con la osmotolerancia y el desarrollo del tamaño celular. Su versatilidad la convierte en un metabolito central en la biología celular (Berbís *et al*; 2015).

Se ha reportado que la UDP-glucosa también podría tener un importante papel en la señalización intracelular en el control de la expresión de *osmY* y otros genes dependientes de la subunidad  $\sigma^S$  de la RNA polimerasa (Böhlinger *et al*; 1995).

La UDP-glucosa es un sustrato para la síntesis de la UDP-glucosa-6-deshidrogenasa la cual cataliza la conversión de UDP-glucosa en ácido glucorónico, en muchas bacterias Gram – este sustrato es un precursor del antígeno O, un componente esencial del lipopolisacárido. Además, en la mayoría de las bacterias, la UDP-glucosa, es necesaria para la utilización de galactosa a través de la vía Leloir. En este proceso se forman UDP-galactosa y UDP-galacturonato los cuales son utilizados como azúcares donadores para la síntesis de polisacáridos bacterianos (Berbís *et al*; 2015), (Muñoz *et al*; 2002).

## JUSTIFICACIÓN

La participación de la UDP-glucosa en el metabolismo de carbohidratos juega un papel esencial en la síntesis de lipopolisacárido para la formación de biopelícula. Este mecanismo podría ser esencial para la interacción entre *Pseudomonas stutzeri* A1501, bacteria promotora del crecimiento vegetal, y la colonización exitosa de plantas de arroz. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal presentan una alternativa al uso excesivo de agroquímicos y la alta demanda en la producción de alimentos.

Los fenotipos asociados al gen *galU* no han sido estudiados en *Pseudomonas stutzeri*, los resultados obtenidos de este estudio podrían acercarnos a elucidar el mecanismo necesario para la interacción *P. stutzeri*- arroz.

## HIPÓTESIS

El gen *galU* participa en la morfología colonial, formación de biopelícula e interviene en la interacción *Pseudomonas stutzeri* A1501-arroz.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la función del gen *galU* en *Pseudomonas stutzeri* A1501 y en la interacción con el arroz.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar el efecto de la mutación del gen *galU* sobre la morfología colonial y formación de biopelícula en *Pseudomonas stutzeri* A1501.
2. Evaluar el efecto de la mutación del gen *galU* en el proceso de adhesión, colonización de *Pseudomonas stutzeri* A1501 al arroz y en la promoción del crecimiento de la planta.

## METODOLOGÍA

### Purificación de ADN cromosómico.

#### Purificación de DNA por Sílica

En un tubo Falcon de 50 ml se inocularon 10 ml de medio LB a partir de una colonia aislada de cultivo de *Pseudomonas stutzeri* A1501 y se colocó en incubación con agitación durante 16-18h a 32°C. Se tomó 1 ml del cultivo y se colocó en un microtubo de 1.5 ml, se centrifugó durante 2 minutos a 13 300 rpm y se eliminó el sobrenadante. El “pellet” resultante se resuspendió en 500µl de buffer  $TE_{50/20}$ , se centrifugó durante 2 minutos a 13300 rpm y se eliminó el sobrenadante. El “pellet” se resuspendió en 450µl de buffer  $TE_{50/20}$  (ver Anexos) se agregaron 5µl de proteinasa K (10 mg/ml), se homogeneizó por inversión y se incubó durante 1h a 37°C. Se agregaron 50µl de SDS al 10%, se homogeneizó por inversión y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Se agregaron 100µl de NaCl 5M, se homogeneizó por inversión y se incubó a 65°C. Se añadieron 100µl de CTAB a 65°C, se homogeneizó por inversión y se incubó durante 15 minutos a 65°C. Se adicionaron 200µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se homogeneizó por inversión y se centrifugó durante 5 minutos a 13300 rpm. Este paso se repite mientras se observa turbidez en la interfaz. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml nuevo al que se incorporaron 500µl de Yoduro de Sodio (NaI) 6M y se homogeneizó por inversión. Se adicionaron 20µl de sílica previamente resuspendida, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minuto a 13300 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 500µl de New Wash 1x (ver Anexos), se resuspendió por agitación, se centrifugó durante 1 minuto a 13300 rpm y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más y se dejó secar el pellet a 37°C, una vez seco se añadieron 50µl de agua destilada “PISA” y se incubó durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 13300 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml nuevo y se almacenó a -20°C.

#### “Wizard Genomic Purification Kit”

En un tubo Falcon de 50 ml se colocaron 5 ml de medio LB y se incubaron con agitación a 37°C durante 15-18h, a partir de este cultivo se tomó 1 ml y se agregó a un microtubo de 1.5ml, se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos en la microcentrífuga “LabNet Spectrafuge 24D” y se decantó el sobrenadante. El “pellet” de células se resuspendió por completo en 600µl de “Nuclei Lysis Solution”, la mezcla se incubó a 80°C durante 5 minutos en el termoblock y se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se agregaron 3µl de RNAsa y se mezcló por inversión, la mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C y al finalizar 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 600µl de “Protein Precipitation Solution” y se homogeneizó con el vórtex durante 20s, la mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó durante 4 minutos a 13300 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo microtubo y se agregaron 600µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló lentamente. Se centrifugó a 13300 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 600µl de etanol al 70% frío sin agitar, se centrifugó a 13300 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento a 37°C hasta completa evaporación del etanol y se guardó en congelación. Para utilizar se usaron 20µl de agua pisa para resuspender el producto de la extracción.

## **Purificación de ADN plasmídico.**

### **Purificación de DNA plasmídico por Miniprep-lisis alcalina**

En un tubo Falcon de 50 ml y con 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente se inoculó una centésima de volumen de la cepa y se incubaron en agitación a 37°C durante 16-18h. Se colocó 1ml de cultivo en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13300 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 µl de la solución 1 (ver Anexos), se resuspendió con ayuda de una micropipeta y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µl de solución 2 (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se dejó reposar en un baño de hielo durante 5 minutos. Se agregaron 300 µl de solución 3 (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se dejó en un baño de hielo durante 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 13300 rpm y se recuperó el sobrenadante en un microtubo nuevo. Se agregaron 30 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 13300 rpm durante 10 minutos y en un tubo nuevo se recuperó el sobrenadante teniendo especial cuidado de no alterar la fase más densa. Se realizó un lavado con 400 µl cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 13300 rpm durante 10 minutos. En un tubo nuevo se recuperaron 800 µl del sobrenadante sin alterar la fase densa y se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente, se centrifugó a 13300 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% frío, se centrifugó a 13300 rpm durante 5 minutos. Se decantó lentamente el sobrenadante y se dejó secar a 37°C hasta la completa evaporación del etanol.

### **“Zippy Plasmid Miniprep Kit”**

En un tubo Falcon de 50 ml y con 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente se inoculó una centésima de volumen de la cepa y se incubaron en agitación a 37°C durante 16-18h. Del cultivo previo se tomaron 600 µl y se colocaron en un microtubo de 1.5ml se agregaron 100 µl de 7x “Lysis Buffer” (color azul) y se mezcló por inversión. Se dejó reposar por no más de 2 minutos y se agregaron 350 µl de “Neutralization Buffer” (color amarillo) frío y se mezcló por inversión. Una vez completa la neutralización (la muestra se volvió amarilla) se centrifugó a 13300 rpm durante 4 minutos. Se recuperaron 900 µl de sobrenadante en una columna “Zymo-Spin” evitando resuspender el sedimento, se colocó en una columna de recolección y se centrifugó a 13300 rpm durante 15s. Se desechó el flujo y se colocó la columna en el mismo tubo de recolección, se añadieron 200µl de “EndoWash Buffer” en el centro de la columna y se centrifugó 30s a 13300 rpm. Se agregaron 400µl de “Zippy Wash Buffer” en el centro de la columna y se centrifugó a 13300 rpm durante 1 min. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de microcentrífuga limpio y se añadieron 30 µl de “Zippy Elution Buffer” directo a la matriz de la columna, se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó durante 30s a 13300 rpm. El flujo (DNA plasmídico) recolectado se almacenó en congelación hasta su uso.

### **Purificación de DNA plasmídico por Sílica**

En un tubo Falcon de 50 ml y con 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente se inoculó una centésima de volumen de la cepa y se incubaron en agitación a 37°C durante 16-18h. Se colocó 1ml de cultivo en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13300 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 µl de la solución 1, se resuspendió con ayuda de una micropipeta y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µl de solución 2, se homogeneizó por inversión y se dejó reposar en un baño de hielo durante 5 minutos. Se agregaron 300 µl de solución 3, se homogeneizó por inversión y se dejó en un baño de hielo durante 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 13300 rpm, se recuperaron 900 µl del sobrenadante y se repartieron en dos microtubos de 1.5 ml colocando 450µl en cada uno. Se añadieron dos volúmenes (900 µl) de NAI 6 M en cada tubo y se homogeneizó por inversión. Se adicionaron 20 µl de sílica previamente resuspendida, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 minutos a 13300 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 800 µl de New Wash 1x, se resuspendió por agitación, se centrifugó durante 1 minuto a 13300 rpm y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más y se dejó secar el "pellet" a 37°C, una vez seco se añadieron 10µl de agua destilada "PISA" y se incubó durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 13300 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml nuevo y se almacenó en congelación.

### **Preparación de células competentes**

A partir de una colonia aislada de la cepa *E. coli* DH5α se inocularon 10 ml de medio LB en un tubo Falcon de 50ml y se colocó en incubación con agitación a 37°C durante 16-18h. A partir del cultivo anterior se inocularon 100 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 500ml y se colocó en incubación con agitación a 37°C durante 2-3 h o hasta haber alcanzado una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm. Se tomaron 20 ml del cultivo y se colocaron en un tubo para centrifuga, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 0°C en la centrifuga Allegra 64R Beckman Coulter. Se decantó el medio y se agregaron 5ml de solución de competencia fría, la pastilla se resuspendió por completo con movimientos circulares suaves en un baño de hielo y el tubo se dejó reposar sumergido en hielo durante 30 minutos, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm (este paso se repitió 3 veces). Se decantó la solución y se agregó 1ml de solución de competencia nueva para resuspender el "pellet" formado, una vez homogeneizado se realizaron alícuotas de 100 µl en microtubos estériles y se almacenaron a - 80°C.

### **PCR**

En un tubo de microcentrifuga de 200 µL se adicionaron los siguientes reactivos: 26 µL de agua destilada, 4,5 µL de dNTPs 2 mM, 3,0 µL de muestra de ADN, 3,0 µL de oligonucleótido o 'primer' Forward 100 µM, 3,0 µL de oligonucleótido o 'primer' Reverse 100 µM, 4,5 µL de Buffer DreamTaq Polimerasa 10x y 1 µL de la enzima DreamTaq Polimerasa dando un volumen final de 45 µL. Se mezcló suavemente con una pipeta. Se puso en el termociclador LabNet MultiGene Mini con ciclos determinados los cuales fueron variando según los oligonucleótidos utilizados. Para la amplificación del gen galU las características se muestran en (Tabla 1). Transcurrido el tiempo predeterminado, la PCR se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa (0.7% de agarosa, 80-95 V por 45-90 minutos) con buffer TBE (ver Anexos) 0.5x (Anexos).

Amplificación de gen <i>galU</i> con oligos galU 7 y galU 8 (30 ciclos)	
96°C	3 minutos
96°C	45 segundos
63°C	1 minuto
72°C	1 minuto 39 segundos
72°C	10 minutos

Tabla 1. Características de amplificación para gen *galU* utilizando los oligos galU7 y galU 8.

### **Esterilización de semillas de arroz**

Se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar. Las semillas peladas se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se dejaron reposar durante 30 minutos con la solución de hipoclorito. Pasado el tiempo se decantó la solución y se hicieron 4 enjuagues con agua destilada estéril o hasta no percibir olor a cloro.

### **Inoculación de semillas de arroz con cepas de *Pseudomonas stutzeri* A1501 silvestre (WT) y mutante en gen *galU***

Se realizaron cultivos masivos en placa con medio LB y agar al 1.5 % de las cepas de *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT y mutante por separado. Se añadieron 4 ml de agua destilada estéril en la superficie de la placa resuspendiendo el crecimiento bacteriano con ayuda de un asa estéril, una vez homogeneizado se pasan los 4 ml a un tubo Falcon de 50 ml estéril. Se tomaron 200 µl del homogeneizado bacteriano para realizar diluciones seriadas en proporción 1:10 y se usaron 20 µl de cada muestra para realizar una siembra por goteo en placa y determinar las unidades formadoras de colonias (UFC), como control y de prueba de esterilidad el mismo procedimiento se realizó con agua destilada estéril.

Se utilizaron 40 semillas esterilizadas superficialmente para cada tratamiento (con *P. stutzeri* A1501 WT, mutante y control con agua destilada estéril) y se colocaron en cada uno de los tubos Falcon con el homogeneizado del cultivo y se dejaron incubar durante 2h. Una vez terminado el tiempo de incubación se separaron 5 semillas de cada tratamiento que fueron utilizadas para realizar la prueba de adhesión y el resto se colocaron de forma espaciada en placas con agar agua al 1.5% para su germinación, se cubrieron al abrigo de la luz y se colocaron a 32°C durante 72h.

### **Evaluación de adhesión en semillas de arroz**

Se tomaron 5 semillas inoculadas con cada tratamiento y se colocaron en un tubo Falcon de 50ml con 2 ml de agua destilada estéril, se homogeneizó con el vórtex Mistral mixer durante 3 minutos a máxima velocidad. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada tratamiento y se realizaron 10 diluciones seriadas en proporción 1:10, se tomaron 20 µl de cada dilución y se realizó una siembra por goteo en placa. Las placas se incubaron a 32°C durante 24 h para conteo de UFC.

### **Montaje de sistema hidropónico**

Se preparó una solución hidropónica y se colocaron 15 ml de esta en un tubo de ensayo de 14.9cm de longitud x 1.7cm de diámetro, en el límite de la altura alcanzada por la solución hidropónica se colocó un microtubo de 1.5ml con la base cortada y el exterior del tubo se cubrió con papel aluminio. Para hacer el sistema cerrado el tubo se cubrió con un tubo de ensayo de 24.7 cm de longitud x 2.3 cm de diámetro y se esterilizaron a 10 lb durante 15 minutos (la temperatura debe mantenerse controlada para no dañar la integridad de la solución hidropónica). Después de 72h de incubación se realizó un conteo de semillas germinadas y se colocaron en el sistema hidropónico poniendo especial cuidado de que la dirección de la raíz fuera hacia la solución hidropónica. Se colocaron en una cámara ambiental a 23°C durante 10 días.

### **Evaluación de colonización de arroz**

En tubos Falcon de 50 ml se colocaron 2 ml de agua destilada estéril. Se utilizaron 4 plántulas de cada tratamiento. En la campana de flujo laminar se abrieron los tubos y se retiró la plántula con cuidado, se separó la raíz de la parte aérea. Las raíces de las 4 plántulas de cada tratamiento se colocaron en el tubo con agua estéril, se homogeneizaron con “vórtex” a máxima velocidad durante 6 minutos. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada tubo para realizar 10 diluciones seriadas en una proporción de 10:1 y se sembraron 20 µl de cada dilución por goteo en placa. Las placas se incubaron a 32°C durante 24 h para realizar un conteo de UFC.

### **Evaluación del crecimiento vegetal**

Para evaluar el desarrollo de las plantas estas se retiraron de los tubos con solución hidropónica y se colocaron sobre una superficie plana se midió la longitud de la fase aérea y la fase radicular. Posteriormente cada parte se pesó por separado y se colocaron en incubación a 45°C para deshidratarse para obtener su peso húmedo y seco. Para esta evaluación se utilizaron entre 7 y 12 réplicas.

### **Cuantificación de la producción de clorofila**

Para evaluar la producción de clorofila se separó la zona aérea de 4 plántulas por cada tratamiento, se pulverizaron con ayuda de un mortero y pistilo añadiendo de a poco 10ml de etanol al 80%. Una alícuota de la solución obtenida se colocó en celdas para espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 645 nm y 663 nm.

### **Purificación de DNA de gel de agarosa**

Se cortó la banda de DNA de interés del gel de agarosa y se pesó en un microtubo de 1.5ml, considerando que el peso del gel no debía ser mayor a 400 mg. Se añadieron 3 volúmenes de “buffer QG” a un volumen de gel. Se incubó a 50°C durante aproximadamente 10 minutos hasta que el gel se disolvió por completo y se homogeneizó con vórtex. Se agregó 1 volumen de isopropanol a la muestra, la mezcla se vertió en una columna “QAquick” con tubo de recolección, se centrifugó durante 1 minuto y se desechó el flujo continuo. Se realizaron 2 lavados con 500 µl de “buffer PE”, se dejó reposar en la columna durante 2 minutos y se centrifugó durante 1 minuto,

el flujo se desechó. Se colocó la columna en un microtubo de 1.5 ml, para eluir el ADN se agregaron 30 µl de “buffer EB” incubado a 37°C y se dejó reposando durante 2 minutos a 37°C. El producto de la extracción se utilizó de inmediato para llevar a cabo la ligación y el restante se almacenó a 4°C.

### **Evaluación de crecimiento bacteriano**

En dos tubos Falcon de 50 ml se inocularon 5 ml de medio MMAB a partir de una colonia aislada de las cepas de *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT o mutante y se colocaron en incubación con agitación a 32°C durante 16h. Se prepararon dos matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio MMAB cada uno, estos se inocularon con 1 ml del preinóculo y se incubaron con agitación a 32°C. Se tomaron dos alícuotas, durante cada hora hasta alcanzar 8 horas, de 1 ml para medir la absorbancia del cultivo a 600 nm y otra de 100 µl con la que se realizaron 10 diluciones seriadas con una relación 1:10 y a partir de cada dilución se tomaron 20 µl para sembrarlos por goteo en placas con medio LB y agar al 1.5%. Las placas se colocaron en incubación a 32°C durante 24h para realizar un conteo de UFC.

### **Evaluación de fenotipos en placa**

En dos tubos Falcon de 50 ml se inocularon 10 ml de medio MMAB con colonias aisladas de cultivos *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT y mutante, se colocaron en incubación con agitación a 32°C durante 8 h. Se prepararon placas Petri de 90 x 15 mm por duplicado de los siguientes medios: LGI, YMG, SOC, LB, rojo Congo y Mc Conkey. Una vez terminado el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 5 µl de cada cultivo y se sembraron por goteo en el centro de la placa de cada uno de los medios. Las placas se incubaron a 32°C.

### **Clonación de amplicones en pGEM T Easy**

A partir del producto de una PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción en un microtubo de 1.5 ml y se incubó durante 1h a 37°C.

2x Rapid Ligation buffer	5µl
T4 DNA ligasa	
pGEM T Easy vector	1µl
Producto de PCR	3 µl
T4 DNA ligasa	1 µl
Volumen total	10 µl

### **Transformación bacteriana**

Se utilizaron las células competentes almacenadas a - 80°C. Se precalentó el “termoblock” a 42°C y se prepararon placas con LB y agar al 1.5% y se colocaron en una incubadora a 37°C. En un baño de hielo se colocaron las células competentes, el vector recombinante producto de la ligación previa. En un microtubo para termociclador se colocaron 90 µl de células competentes + 10 µl del producto de la ligación, en otro microtubo 90 µl de células competentes y 10µl de agua

destilada estéril este segundo tubo se utilizó como control. Se homogeneizó la mezcla con pipeta y se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se colocaron a 42°C en el “termoblock” durante 1 minuto y se transfirieron inmediatamente a un baño de hielo. En dos microtubos de 1.5 ml se añadió 1ml de medio SOC y se colocaron en cada uno los dos tratamientos con células competentes, se mantuvieron en incubación con agitación orbital a 37°C durante una hora y posteriormente se tomaron alícuotas de 200 µl y se sembraron en placas de LB con agar al 1.5 % y el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

## RESULTADOS

### Caracterización de *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT y mutante *galU* mediante el marcador molecular que codifica para el 16S rRNA

Las colonias de las cepas WT y mutante de *Pseudomonas stutzeri* A1501 presentaron algunas diferencias morfológicas cuando se sembraron en medio LB con agar. En la cepa WT se observaron colonias redondas y exopolisacárido de apariencia suave y crecimiento concéntrico mientras que la cepa mutante presentó una forma irregular, colonias más anchas y un exopolisacárido menos denso y de forma también irregular (Figura 2. Cepas de *Pseudomonas stutzeri* A1501 sembradas en medio LB con agar al 1.5% en placa. Izq. cepa WT, derecha cepa mutante. Debido a estas diferencias fenotípicas se realizó una extracción de DNA cromosómico y a partir de éste se realizó una amplificación del gen que codifica para el RNAr 16S.

Debido a que en diversas especies de *Pseudomonas* el tamaño del amplicón puede ser muy semejante, se realizó un análisis bioinformático para predecir el perfil de restricción con la enzima *Sau3A1* y se comparó el perfil de ambas cepas para verificar que la cepa mutante viniera a partir de *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT.

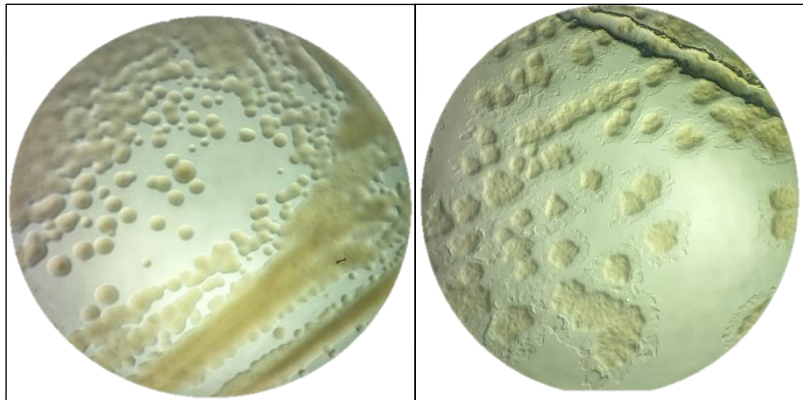


Figura 2. Cepas de *Pseudomonas stutzeri* A1501 sembradas en medio LB con agar al 1.5% en placa. Izq. cepa WT, derecha cepa mutante.

Para la amplificación del gen de RNA 16s se utilizaron los oligos universales UN27F 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3' (Biodiversa Inc., México). Una vez obtenidos los amplicones de 1391pb las muestras se corrieron en un gel de agarosa por electroforesis para verificar la integridad y tamaño del amplicón (Figura 3 A).

La predicción del perfil de restricción arrojó que se obtendrían fragmentos de 449, 448, 183, 96, 83, 77, 24, 12 y 11pb, lo cual se verifico por electroforesis (Figura 3 B).

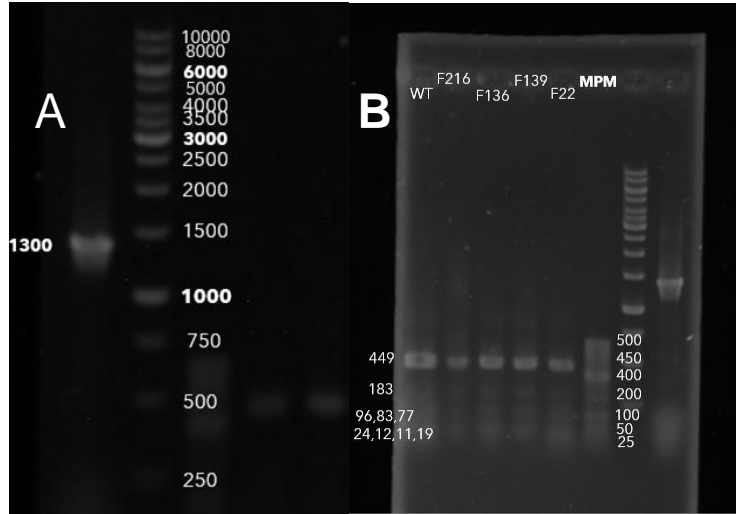


Figura 3 **A.** Carril 1: amplicón del gen del RNA 16s a partir del DNA cromosómico de *P. stutzeri* A1501; marcador de peso molecular: Gene Ruler 1kb Ladder. **B.** Perfil de restricción con la enzima *Sau3A1*. Carriles 1-4: restricciones realizadas a partir de DNA cromosómico de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante. Marcador de peso molecular: Gene Ruler 1kb Ladder.

### Evaluación de crecimiento bacteriano

Se realizó una comparativa de la forma en la que se lleva a cabo el crecimiento entre las cepas *P. stutzeri* A1501 WT y mutante para evaluar si la delección en el gen *galU* provoca algún cambio en el crecimiento de la bacteria. Para ello ambas cepas se sembraron en MMAB y se colocaron en incubación a 32°C durante 8 horas.

Se tomaron muestras aproximadamente cada hora, a partir de las cuales se midió la absorbancia a 600nm, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placa por goteo. Después de 24 horas de incubación a 32°C, se llevó a cabo el conteo de UFC. Dado que no se realizaron réplicas en los datos obtenidos, no fue posible aplicar pruebas estadística, sin embargo, se observa una tendencia a la ausencia de diferencias entre tratamientos.

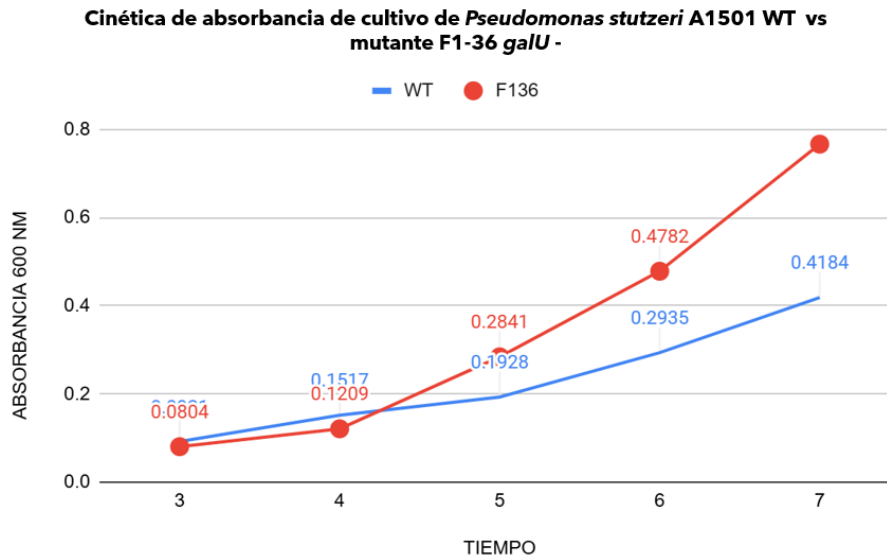


Figura 4. Relación entre el tiempo de cultivo de las cepas *P. stutzeri* WT y mutante F1-36 vs densidad óptica a 600nm.

Los datos obtenidos de los conteos de UFC permitieron determinar el tiempo de cultivo necesario para alcanzar la cantidad óptima de bacterias ( $1 \times 10^8$  UFC) para el inóculo destinado a las semillas de arroz.

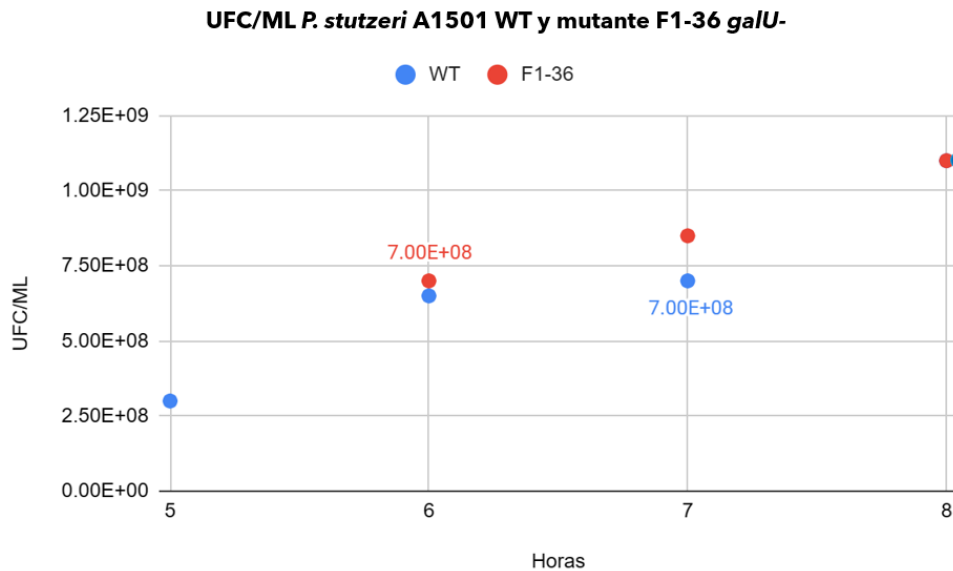


Figura 5. Conteo de UFC de *P. stutzeri* A1501 cepas WT y mutante F1-36 galU- a lo largo del tiempo de cultivo.

### Pruebas de adhesión *P. stutzeri*-arroz

Se realizaron inoculaciones de semillas de arroz con cultivo de *P. stutzeri* A1501 WT, mutante F1-36 *galU*- y un control con agua destilada estéril. Para cada tratamiento se utilizaron 5 semillas axénicas, para el caso de inoculación con *P. stutzeri* se utilizó  $1 \times 10^8$  UFC de cada tratamiento y se colocaron en un tubo con 2ml de agua destilada estéril, una vez homogeneizada la mezcla se tomaron alícuotas y se hicieron 10 diluciones seriadas para sembrar por goteo en placas con medio LB y agar al 1.5%. Estas pruebas se hicieron con el objetivo de evaluar si la delección del gen *galU* provoca un cambio en la capacidad de adhesión de *P. stutzeri* A1501. A partir de los datos recopilados se obtuvieron las medias de cada uno de los tratamientos y se graficaron como se presentan en la (Figura 6). Se observó una diferencia de un orden de magnitud en las unidades formadoras de colonias (UFC) entre las cepas WT y mutante F1-36 *galU*-. No se realizaron réplicas.

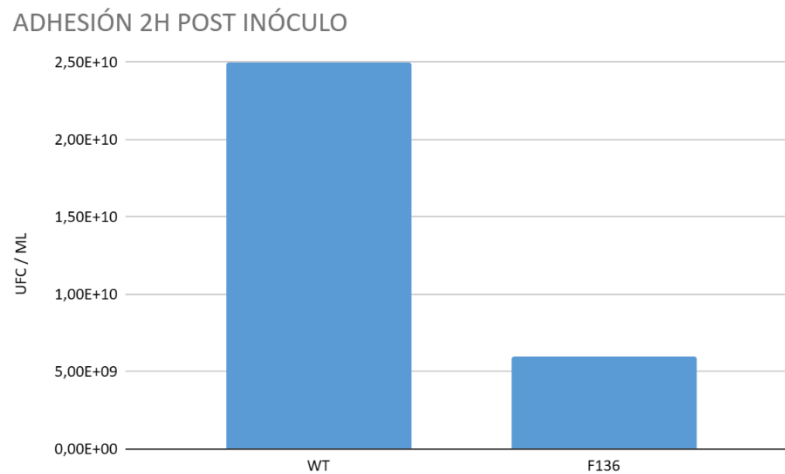


Figura 6. UFC cuantificadas en prueba de adhesión

### Porcentaje de germinación de arroz

Una vez transcurridas dos horas incubación de semillas axénicas inoculadas con  $1 \times 10^8$  UFC de cada tratamiento, se colocaron las semillas en placas de agar agua al 1.5%, dejando un espacio de aproximadamente 0.5 cm entre cada una, se cubrieron con papel aluminio, al abrigo de la luz, y se pusieron en incubación a 32°C durante 72h. Transcurrido el tiempo se contaron las semillas germinadas y se obtuvo el porcentaje de germinación de cada tratamiento. Los resultados se graficaron y se presentan en la 7. Se observó que el control inoculado con agua destilada mantuvo el mayor porcentaje de germinación mientras que las semillas inoculadas con la cepa mutante presentaron una disminución del 10 al 15%. La mayor pérdida de semillas viables se observó en el tratamiento con la cepa WT en donde el 40% de ellas no germinaron. No se realizaron réplicas.

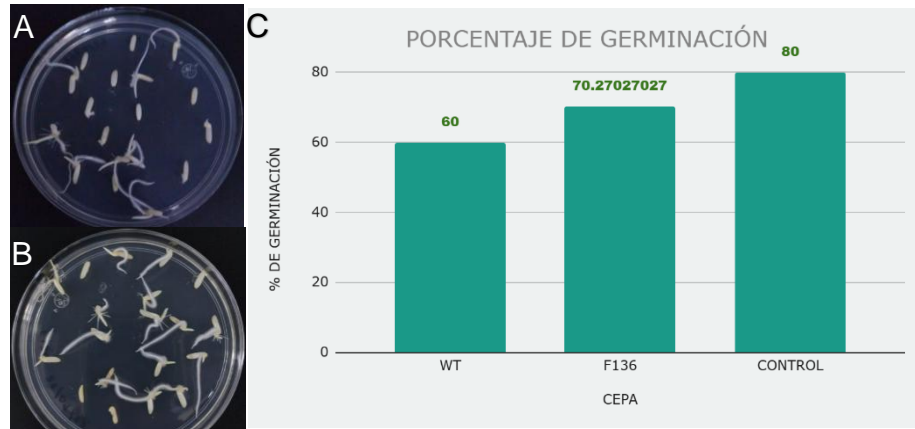


Figura 7. A. Semillas inoculadas con cepa WT B. Semillas inoculadas con cepa mutante F1-36. C. Tabla de porcentajes de germinación

### Colonización de arroz por *P. stutzeri*

El ensayo de colonización se realizó 3 y 4 días post inóculo de las semillas de arroz. Para ello se realizaron conteos de UFC de la zona radicular de dos plántulas inoculadas con las cepas WT y mutante por separado. Los resultados se graficaron y se muestran en la (Figura 8). Los conteos de UFC entre ambas cepas se mantuvieron en el mismo orden de magnitud en los días 3 y 4 post inóculo. No se realizaron réplicas.

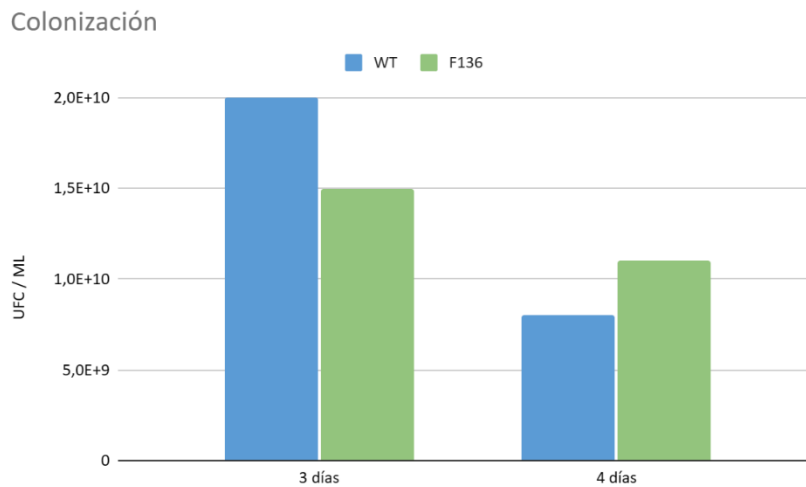


Figura 8.- Colonización de raíces de arroz por *P. stutzeri*.

### Evaluación de la promoción del crecimiento de arroz por *P. stutzeri*

Para las mediciones de longitud, las plántulas se colocaron sobre una superficie plana. Se utilizó un vernier para medir la longitud desde donde inicia la raíz hasta la punta superior de la plántula y desde el inicio de la raíz hasta la punta inferior de la raíz estirada. Debido a que los datos no presentaron una distribución normal las medidas de las plántulas con los diferentes tratamientos fueron evaluadas con la prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. La comparación de las longitudes de las plántulas (Figura 9) reveló una tendencia de la cepa WT a tener mayor longitud, mientras que entre la cepa mutante y el control solo hubo una diferencia de dos unidades. Ninguna de las relaciones mostró una diferencia significativa.

Para llevar a cabo las mediciones del peso fresco y seco de las plántulas se utilizó una balanza analítica. Para evaluar el peso seco se colocaron las plántulas en incubadora a 60°C durante 72 horas hasta peso constante. Las medidas obtenidas fueron analizadas mediante una prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Al realizar las comparaciones entre los grupos (Figura 10), se observó una tendencia de la cepa WT a promover un mayor peso en la zona aérea, tanto fresco como seco. Sin embargo, ninguno de los grupos comparados presentó diferencias significativas.

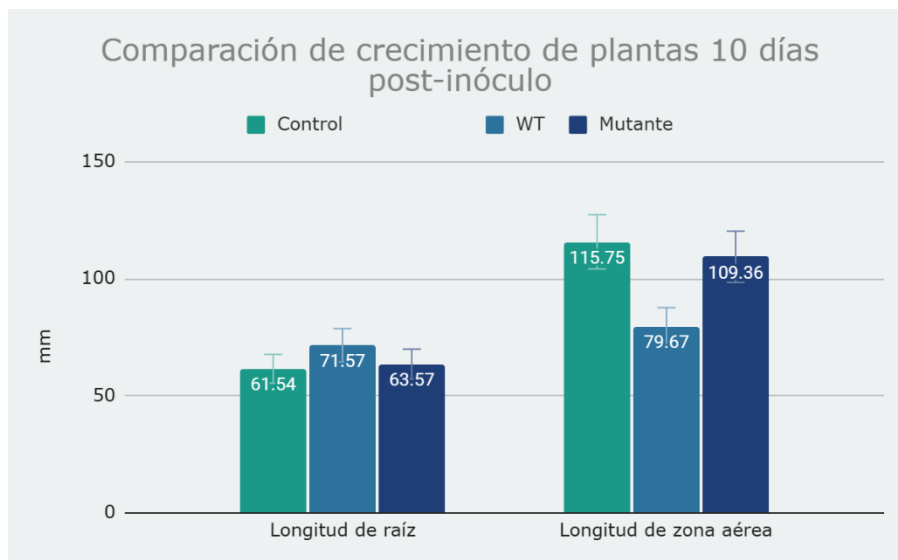


Figura 9 Comparación de longitud de raíz y de zona aérea de plántulas de arroz inoculadas con *P. stutzeri* WT y mutante F1-36 *galU*. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis

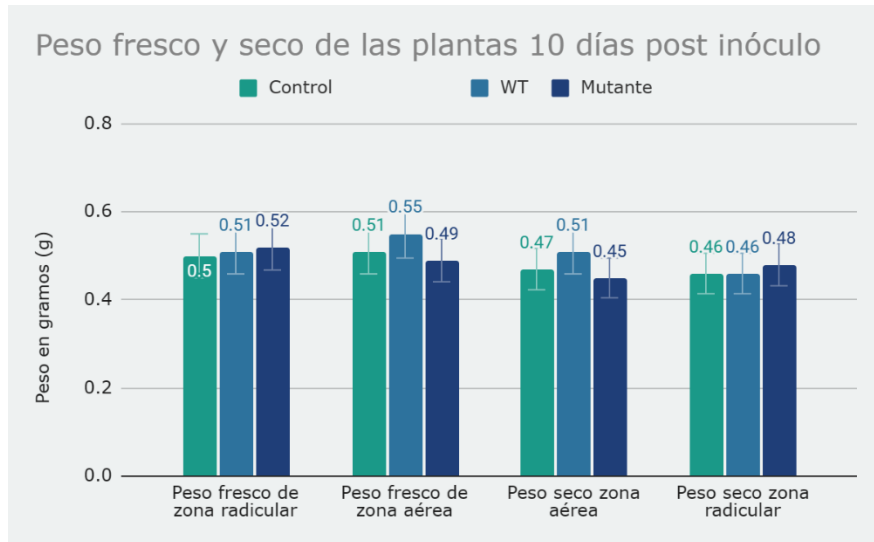


Figura 10 Comparación de Peso fresco y seco de plántulas de arroz inoculadas con *P. stutzeri* WT y mutante F1-36 *galU-*. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis

### Producción de clorofila de plántulas de arroz inoculadas con *P. stutzeri*

Se cuantificó el contenido de clorofila A y B de cuatro plántulas de cada tratamiento por medio de espectrofotometría, se calcularon las medias y los resultados se graficaron como se muestra en la (**Error! Reference source not found.**). En ambos tipos de clorofila (A y B) se observa que el control no inoculado produce menos clorofila. Para la clorofila A, se registró un incremento de casi el 4% entre las semillas control y las inoculadas con la cepa WT, y un 7% entre las semillas control y las inoculadas con la cepa mutante. En cuanto a la clorofila B, el aumento fue del 4% entre las semillas control y las inoculadas con la cepa WT, y del 29% entre las semillas control y las inoculadas con la cepa mutante. No se realizaron réplicas.

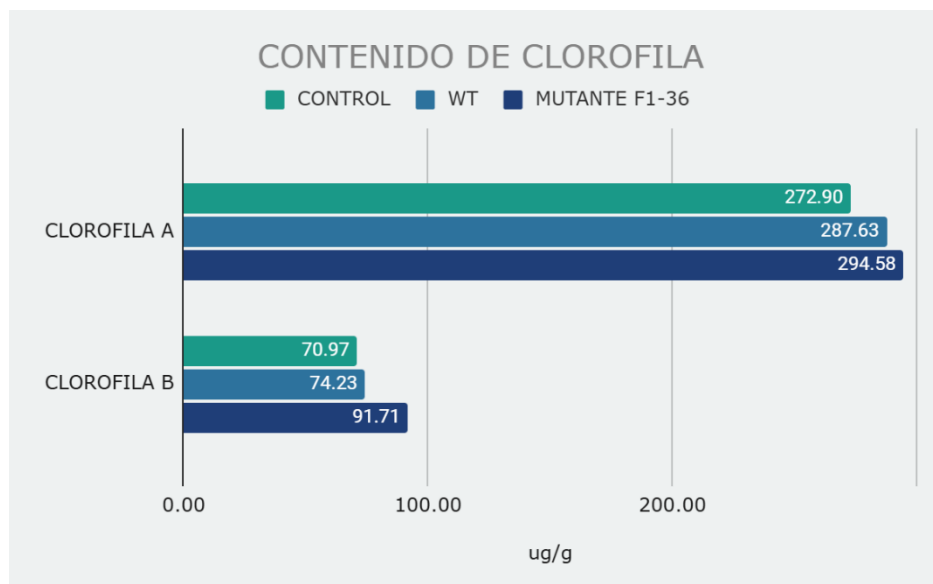


Figura 11. Contenido de clorofila de plántulas inoculadas con *P. stutzeri* WT y mutante F1-36 *galU*.

### Caracterización fenotípica de las colonias de *P. stutzeri* WT y mutante F1-36 *galU*-

Con el objetivo de evaluar los fenotipos de las colonias sembradas en placa de *Pseudomonas stutzeri* WT y mutante bajo distintas condiciones y con distintas fuentes de carbono, se prepararon los medios MMAB, YMG, Rojo Congo, Mc Conkey, LB, SOC y LGI con 1.5% de agar en placas Petri de 15 cm de diámetro. Se elaboró el preinóculo de ambas cepas en medio MMAB. y se sembraron 5 µl de cultivo en el centro de la placa.

Desde las primeras 24 horas hasta 192 h (dependiendo el medio de cultivo) se tomaron fotografías de las colonias y se midieron los diámetros de los halos formados por el crecimiento bacteriano.

#### Agar Mc Conkey

En los inóculos de ambas cepas se observó un polisacárido translúcido de baja viscosidad que formaba una capa delgada y extensa sobre la superficie de la placa. Sin embargo, a las 24 horas, se notó una diferencia significativa entre la cepa WT y la cepa mutante F1-36 *galU*-: en la cepa WT apareció un segundo exopolisacárido de mayor viscosidad y la colonia tenía en el centro un color rojo intenso (Figura 12A).

A las 48 horas, en la placa de la cepa F1-36 *galU*-, se comenzaron a observar pequeñas cantidades de un segundo exopolisacárido sobre el primero, con una ligera coloración rosácea (Figura 12B). A las 96 horas, el color rojo de la cepa WT aumentó en cantidad, al igual que el segundo exopolisacárido presente en la cepa F1-36 *galU*- (Figura 12D).

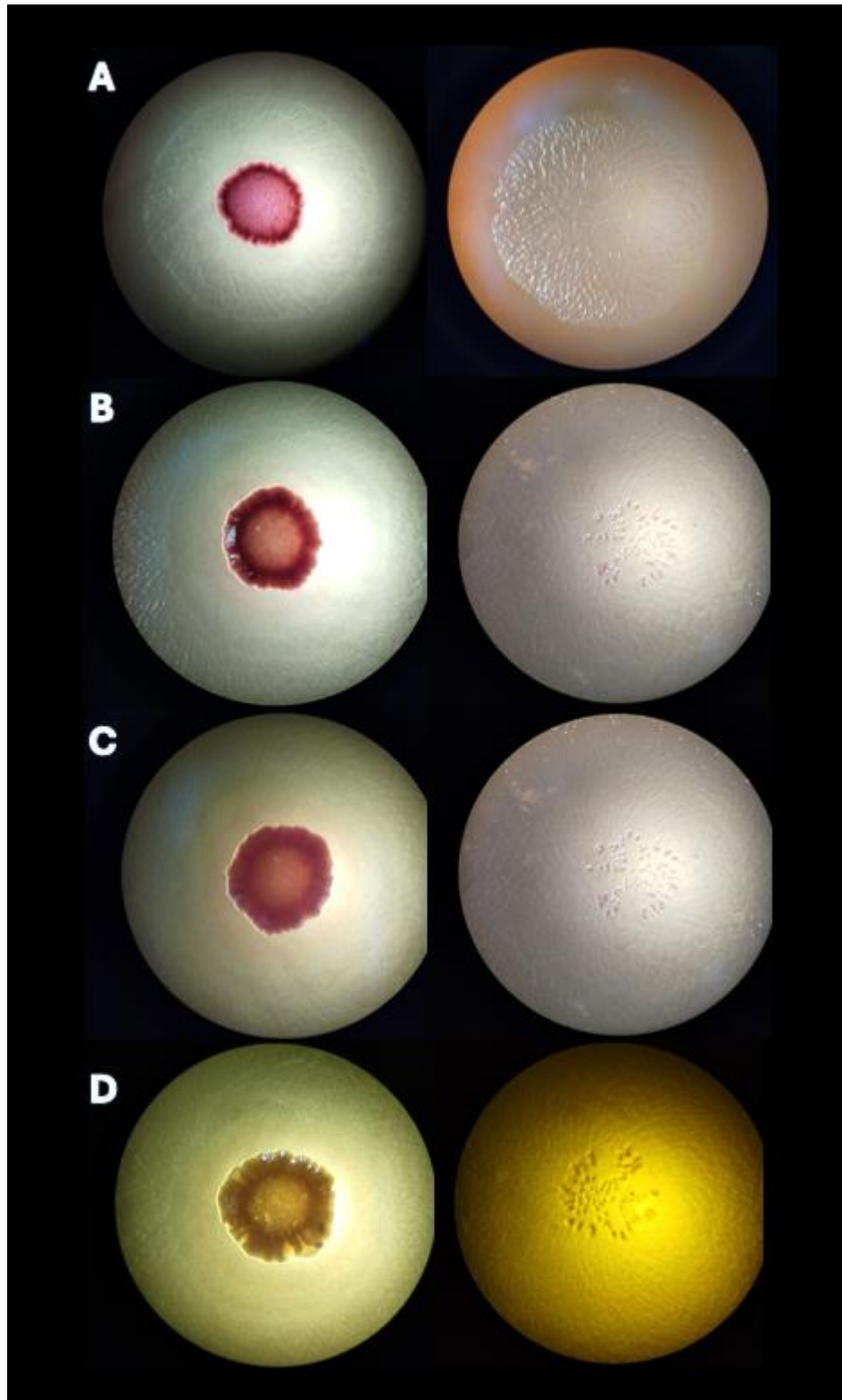


Figura 12 .Placas con medio de cultivo Mc Conkey. Lado izquierdo cepa WT, lado derecho cepa mutante F1-36 *galU*-. A) 24h, B) 48h, C) 72h, D) 96h.

Además de las observaciones sobre la morfología de las colonias y las características de los exopolisacáridos, se llevó a cabo una evaluación de la movilidad de tipo *swarming*. Se realizaron cuatro mediciones del diámetro de crecimiento de cada cepa, de las cuales se calcularon los promedios. Posteriormente, se aplicó una prueba T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 13). A partir de las 48 horas el diámetro de movilidad de la cepa WT fue mayor que el de la cepa mutante F1-36 mutante *galU*-, sin embargo, sólo hubo diferencias significativas a las 48\* y 72\*h. Después de 48 horas de cultivo, el diámetro de la cepa mutante F1-36 *galU*- fue de  $33.99 \pm 0.78$  mm, y tras 72 horas, alcanzó los  $41.45 \pm 1.49$  mm. En comparación con los diámetros de la cepa silvestre, los de la cepa mutante fueron menores en un 6.61% a las 48 horas y en un 10.51% a las 72 horas.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F136 *galU*- en medio Mc Conkey

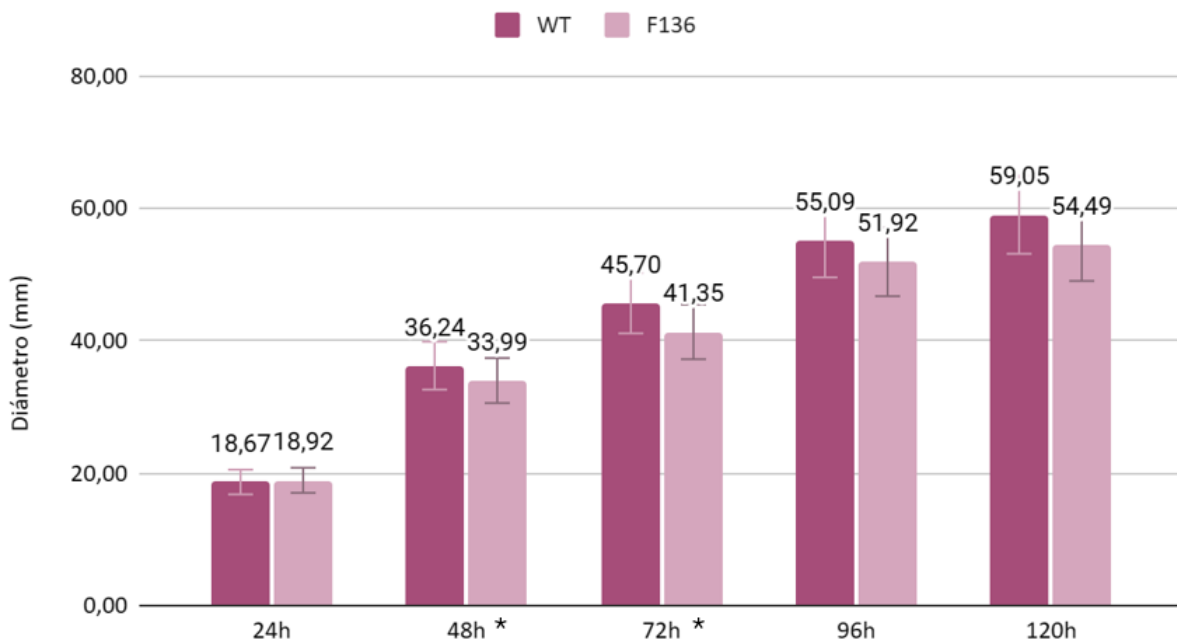


Figura 13. Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio Mc Conkey. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

## Medio LB

Desde las primeras 24 horas, la cepa WT produce un polisacárido distinto en densidad a la mutante F1-36 *galU*-, se extienden de manera diferente sobre la placa. El polisacárido producido por la cepa WT es más denso y está presente en mayor cantidad en comparación con el producido por la cepa mutante (Figura 14A). Tras 96 horas de incubación, la cepa mutante produce gránulos de un segundo polisacárido más denso (Figura 14D).

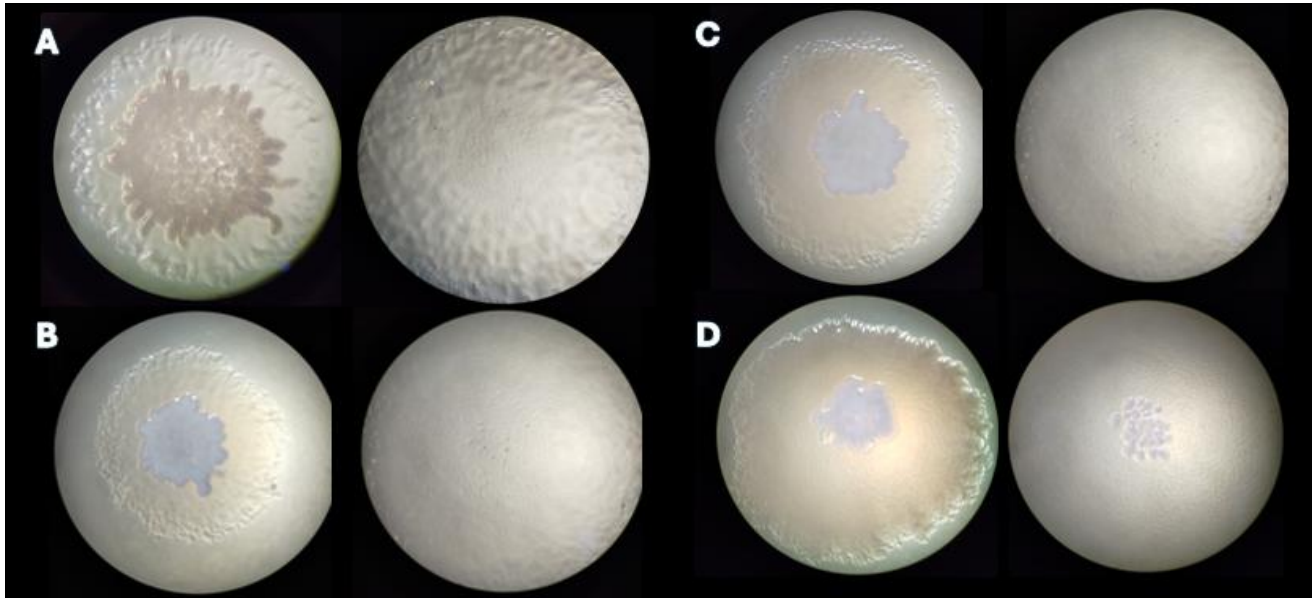


Figura 14. Placas con medio de cultivo LB. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*-. A) 24h, B) 48h, C) 72h, D) 96h.

Se realizaron 4 mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 15). Durante las primeras 24 horas, el diámetro de movilidad de la cepa WT fue de  $12.60 \pm 0.39$  mm, lo que representó un 48.40% más que el diámetro de movilidad de la cepa mutante F1-36 *galU*-, que alcanzó  $8.49 \pm 0.10$  mm. Sin embargo, a partir de las 48 horas, los diámetros de la cepa mutante comenzaron a superar a los de la cepa WT, presentando diferencias significativas a las 48, 72 y 120 horas. Las mediciones de los diámetros de movilidad de la cepa mutante fueron de  $23.25 \pm 0.67$  mm a las 48 horas,  $29.20 \pm 0.92$  mm a las 72 horas y  $41.69 \pm 0.79$  mm a las 120 horas, lo que representa un incremento del 80 al 95% en comparación con la cepa silvestre.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F1-36 *galU*- en medio LB

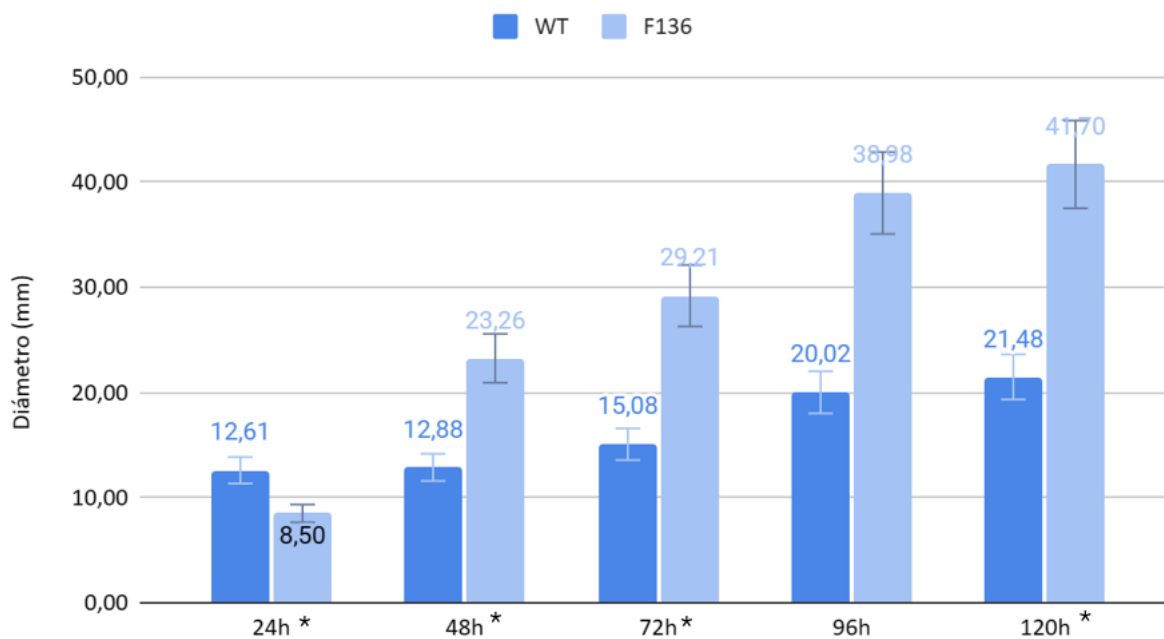


Figura 15 Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio LB. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

### Medio Rojo Congo

En las primeras 24 horas de cultivo, se observaron dos círculos concéntricos formados por exopolisacáridos de diferente viscosidad en ambas cepas. En el cultivo de la cepa silvestre (WT), se notó la presencia de gránulos densos y teñidos de rojo en la zona superior, con bordes irregulares (Figura. 16 A). A las 48 horas, la apariencia de la cepa WT se mantuvo similar, mientras que en la cepa mutante aparecieron gránulos de un polisacárido de mayor densidad y una ligera tonalidad rosácea (Figura. 16 B).

Al llegar a las 96 horas de cultivo, los gránulos de la cepa mutante comenzaron a adquirir un color rojizo, y se observaron nuevos gránulos en la circunferencia del polisacárido (Figura. 16 D). Con el paso de los días, el polisacárido producido por la cepa mutante fue adoptando una apariencia, color y densidad cada vez más similares a los de la cepa WT (Figura. 16 G).



Figura. 16 Placas con medio de cultivo Rojo Congo. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*-. A) 24h, B) 48h, C) 72h, D) 96h, E) 120h, F) 168h, G) 192h.

Se realizaron 4 mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 17). Los diámetros de crecimiento presentaron diferencias significativas desde las 24 hasta las 120 horas, las mediciones se realizaron cada 24 horas. En las primeras 24 horas, la cepa WT mostró un diámetro de crecimiento de  $7.48 \pm 0.21$  mm, un 23% superior al de la cepa mutante, que alcanzó  $6.05 \pm 0.29$  mm. Sin embargo, a partir de las 48 horas, la cepa mutante comenzó a superar al WT, llegando a un diámetro de  $10.50 \pm 0.38$  mm a las 120 horas, en comparación con los  $9.54 \pm 0.28$  mm de la cepa WT.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F136 *galU*- en medio Rojo Congo.

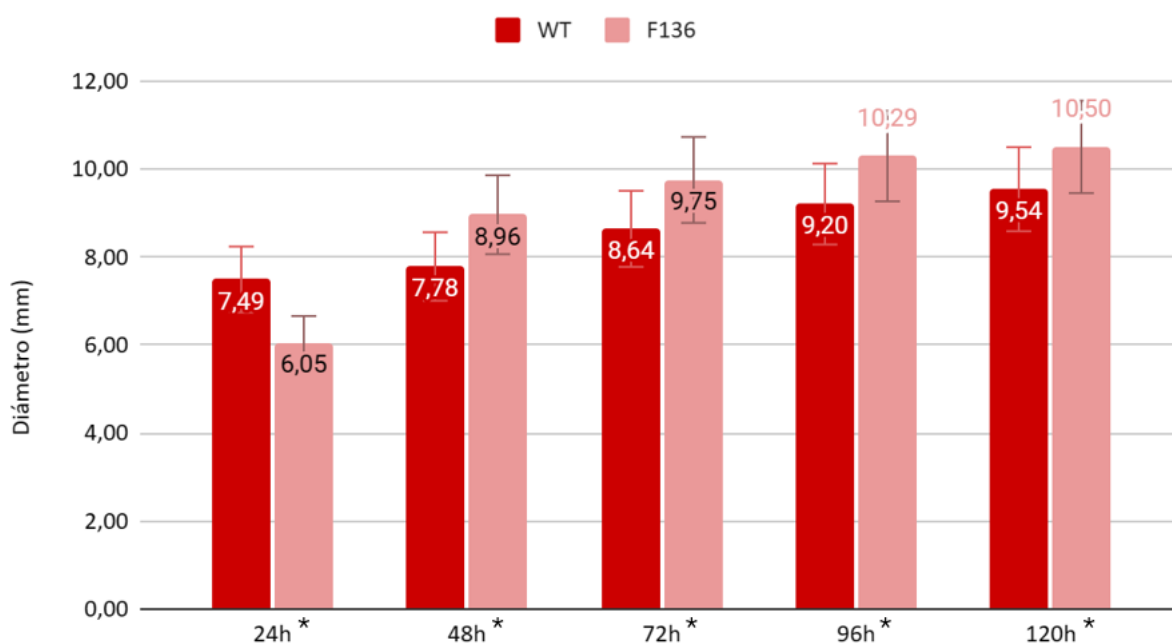


Figura 17 Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio Rojo Congo. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

### Medio YMG

Desde las primeras 24 horas de cultivo, las cepas WT y mutante F1-36 *galU*- produjeron dos tipos distintos de exopolisacáridos. Uno de ellos, de mayor diámetro, era translúcido y presentaba una capa delgada, mientras que el otro tenía una apariencia más densa y blancuzca. La diferencia más notable entre ambas cepas se observó en la cantidad del polisacárido más denso: en el cultivo de la cepa mutante, se podían distinguir espacios entre las microcolonias, que tenían la apariencia de gránulos, mientras que en la cepa WT no se apreciaban espacios en el centro de la placa (Figura 18 A).

A lo largo del tiempo, la apariencia del cultivo de la cepa WT se mantuvo casi sin cambios, aunque su coloración se volvió amarillenta. En contraste, la cepa mutante continuó aumentando la producción del polisacárido más denso en el centro de la placa, adquiriendo también una coloración amarilla y reduciendo el espacio entre las microcolonias (Figura 18 D).

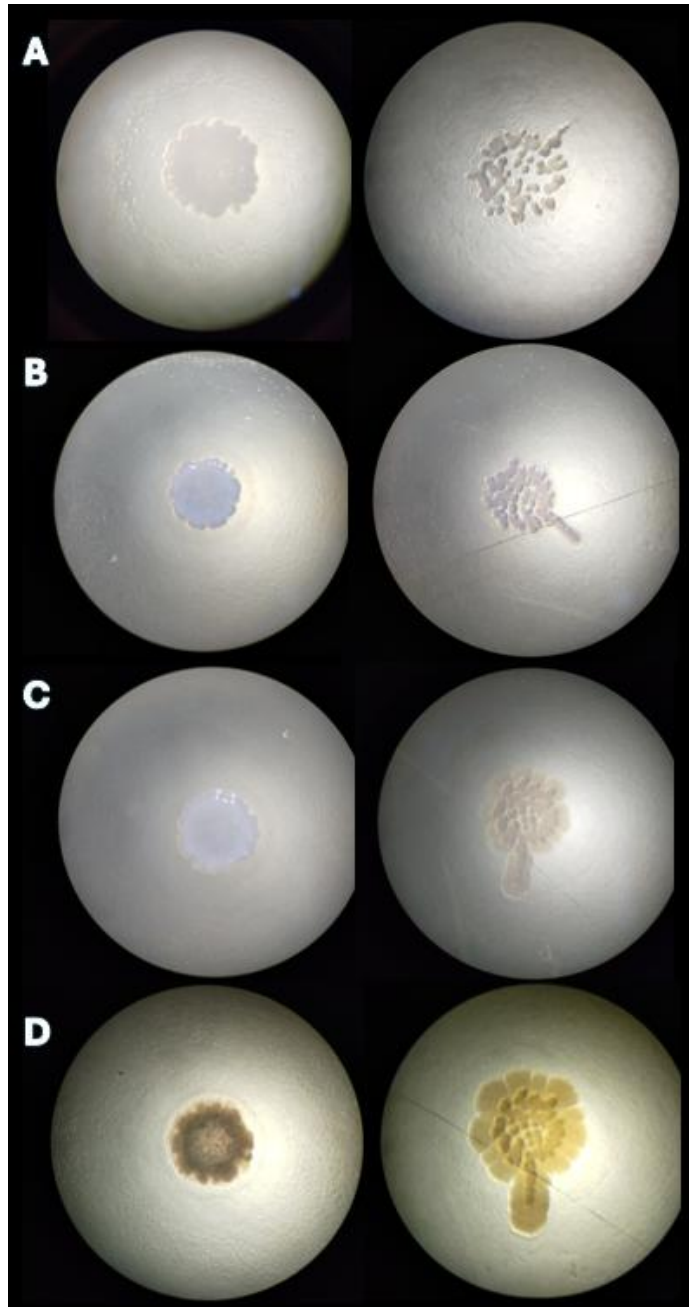


Figura 18. Placas con medio de cultivo YMG. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup>. A) 24h, B) 48h, C) 72h, D) 96h.

Se realizaron 4 mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 19). Los diámetros de crecimiento mostraron diferencias significativas entre las 48 y 120 horas de cultivo, con mediciones realizadas cada 24 horas. A las 48 horas, la cepa WT presentó un diámetro de  $33.13 \pm 1.36$  mm, un 11.66% superior al de la cepa mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup>, que alcanzó  $29.67 \pm 1.36$  mm. Esta diferencia porcentual siguió aumentando, alcanzando un 26.86% a las 120 horas, cuando la cepa WT llegó a un diámetro de  $62.90 \pm 1.81$  mm, mientras que la cepa mutante alcanzó  $49.58 \pm 3.63$  mm.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup> en medio YMG

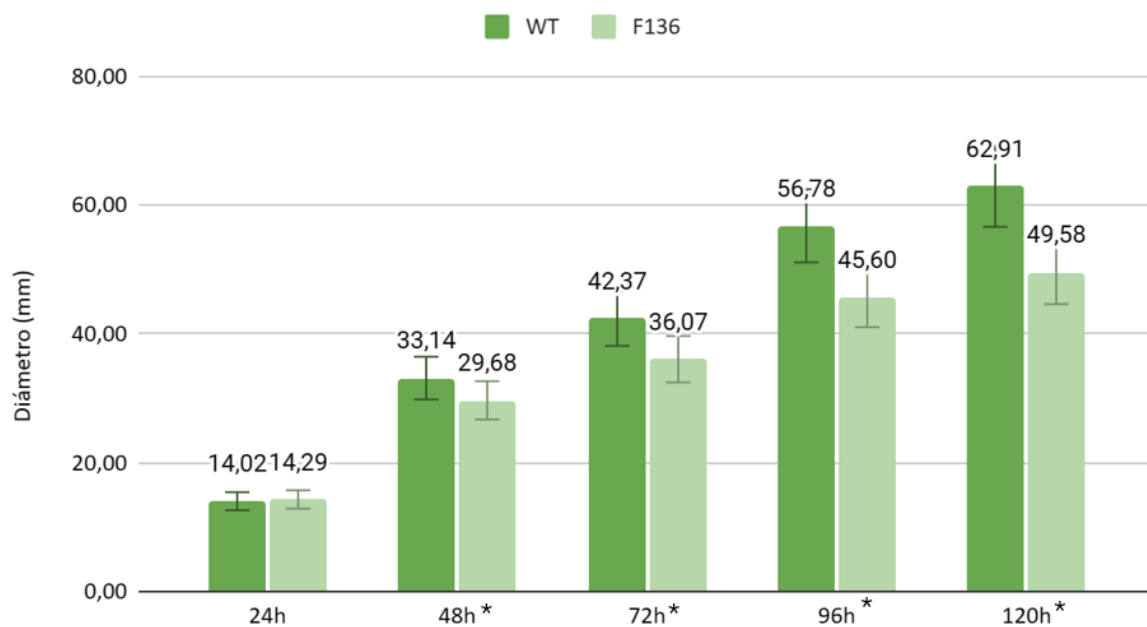


Figura 19. Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup> en medio YMG. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

## Medio SOC

Después de 24 horas de cultivo en medio SOC, la cepa mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup> produjo un exopolisacárido de apariencia acuosa, baja densidad, translúcido y con un amplio diámetro de movilidad. También se observaron gránulos blanquecinos en el centro de la placa. En contraste, la cepa WT presentó un polisacárido similar, pero de menor diámetro, junto a un segundo polisacárido de mayor densidad, con forma irregular y apariencia lechosa (Figura 20 A).

A las 48 horas, la cepa WT mostró un aumento notable en la cantidad de ambos polisacáridos. En la cepa mutante, el exopolisacárido en forma de gránulos también incrementó, presentando características más cercanas a las del WT, con mayor densidad y un tono blanquecino (Figura 20 B).

Finalmente, a las 72 horas de cultivo, el polisacárido de menor densidad en la placa inoculada con la cepa WT mostró un mayor diámetro de motilidad. Al mismo tiempo, las microcolonias que comenzaron a notarse a las 48 horas mostraron una reducción en el espacio entre ellas, y el polisacárido en el centro de la placa adquirió un tono parduzco (Figura 20 C).

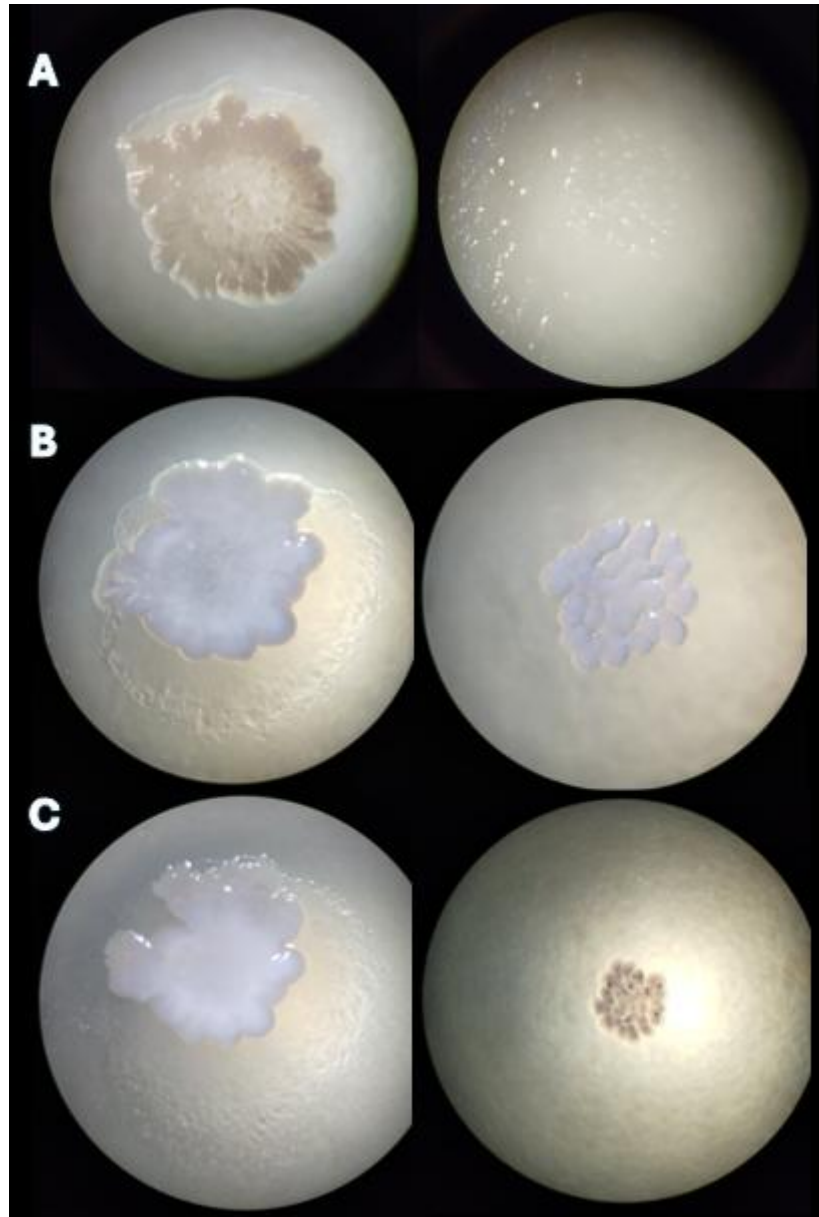


Figura 20. Placas con medio de cultivo SOC. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*. A) 24h, B) 48h, C) 72h.

Se realizaron 4 mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 21). Los diámetros de movilidad mostraron diferencias significativas a las 24 y 72 horas de cultivo. A las 24 horas, la cepa WT presentó un diámetro de  $11.76 \pm 0.91$  mm, lo que representa un 76.04% más que la cepa mutante, que alcanzó  $6.68 \pm 0.40$  mm. Sin embargo, a las 72 horas, la situación se invirtió: la cepa mutante alcanzó un diámetro de  $33.84 \pm 0.68$  mm, un 86.03% mayor que el de la cepa WT, que fue de  $18.19 \pm 0.19$  mm.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F136 *galU*- en medio SOC

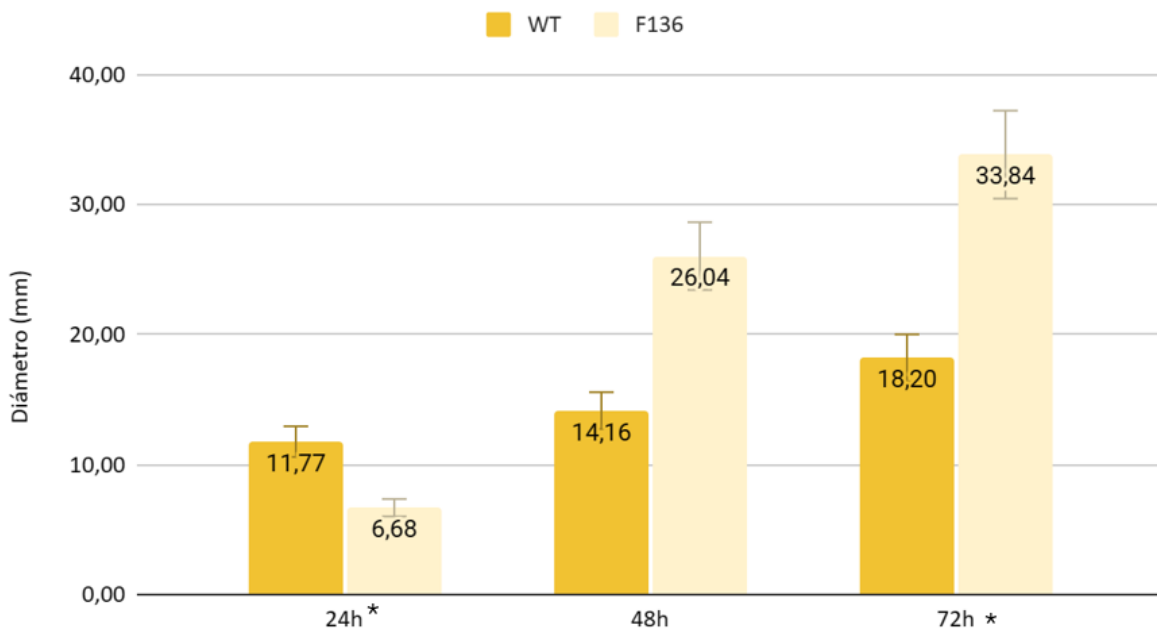


Figura 21. Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio SOC. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

### Medio LGI

Durante las primeras 24 horas, en la placa inoculada con la cepa WT se observó un polisacárido de baja densidad, translúcido y con apariencia rugosa en el centro, mientras que en el cultivo de la cepa mutante no se detectó crecimiento visible (Figura 22A). A partir de las 72 horas, ambas cepas mostraron características similares en sus polisacáridos; sin embargo, la cepa WT exhibió un crecimiento irregular, mientras que la cepa mutante presentó un patrón de crecimiento concéntrico (Figura 22 B). Estas características se mantuvieron hasta las 168 horas, con un ligero cambio en la coloración del anillo de crecimiento exterior (Figura 22 D).

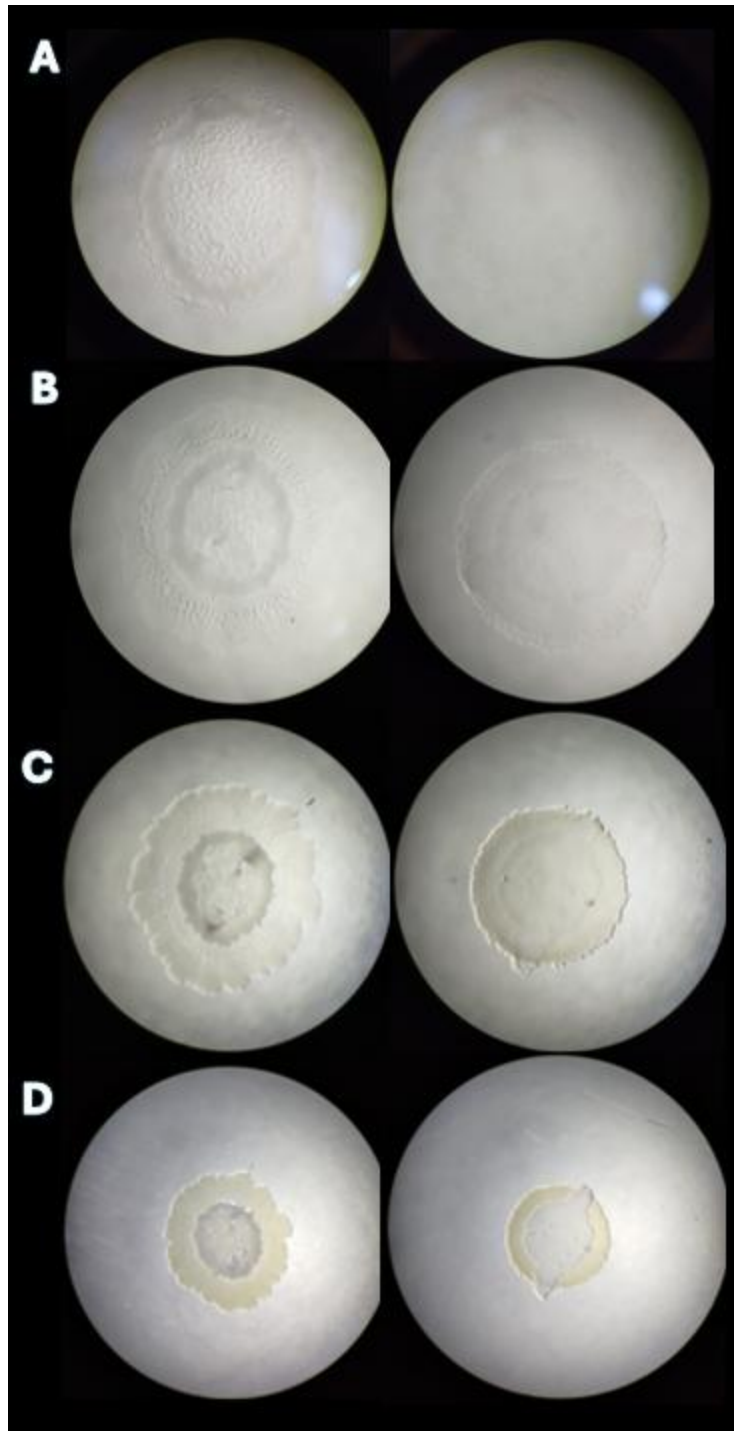


Figura 22. Placas con medio de cultivo LGI. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*<sup>-</sup>. A) 24h, B) 48h, C) 72h y D) 120h.

Se realizaron cuatro mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 23). En este medio, los diámetros de movilidad fueron mayores en el cultivo de la cepa WT en comparación con la mutante F1-36 *galU*-, aunque solo se observaron diferencias significativas a las 24, 96 y 120 horas, con mediciones realizadas cada 24 horas. A las 24 horas de cultivo, la cepa WT alcanzó un diámetro de movilidad de  $5.24 \pm 0.13$  mm, lo que representa un 46.77% más que la cepa mutante, que midió  $3.57 \pm 0.34$  mm. En las mediciones posteriores, el diámetro de la cepa WT se mantuvo entre un 25% y un 37% superior al de la cepa mutante, alcanzando  $8.14 \pm 0.59$  mm en la cepa WT y  $5.93 \pm 0.13$  mm en la cepa mutante a las 120 horas.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F136 *galU*- en medio LGI

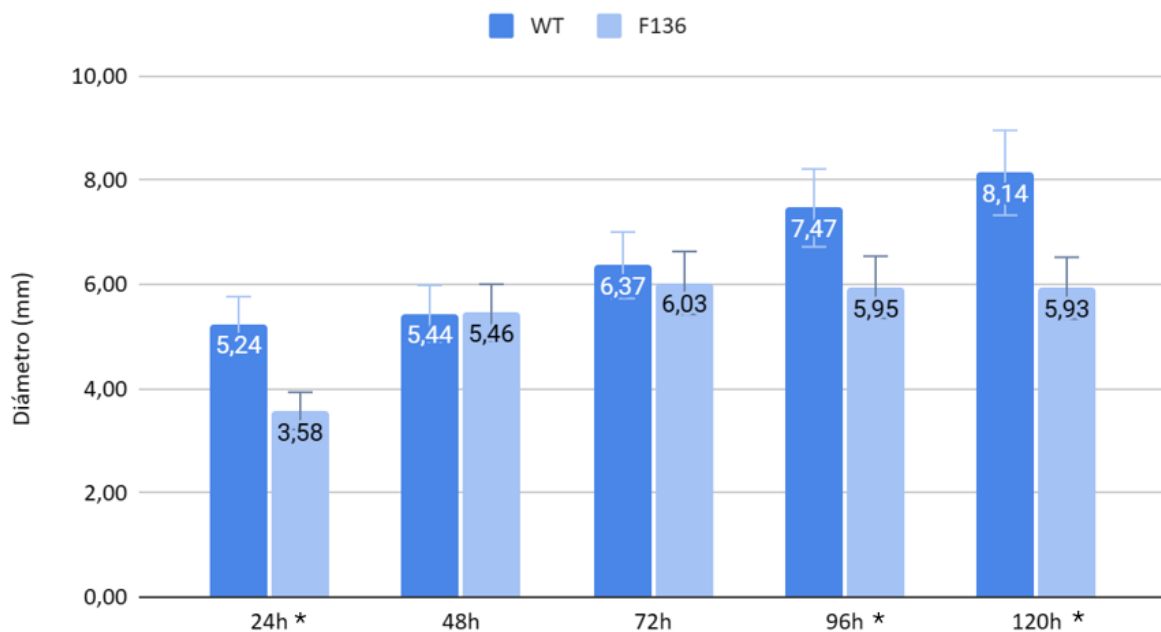


Figura 23. Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio LGI. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

### Medio MMAB

En este medio el crecimiento de ambas cepas fue muy similar, dos polisacáridos, uno de mayor densidad y apariencia rugosa en el centro de la placa y otro alrededor del perímetro del primero con menor viscosidad y translúcido (Figura 24 A). En ambos estas características se mantuvieron hasta alcanzar las 120 horas de cultivo en donde además hubo un cambio de coloración a amarillo pardo (Figura 24 D).

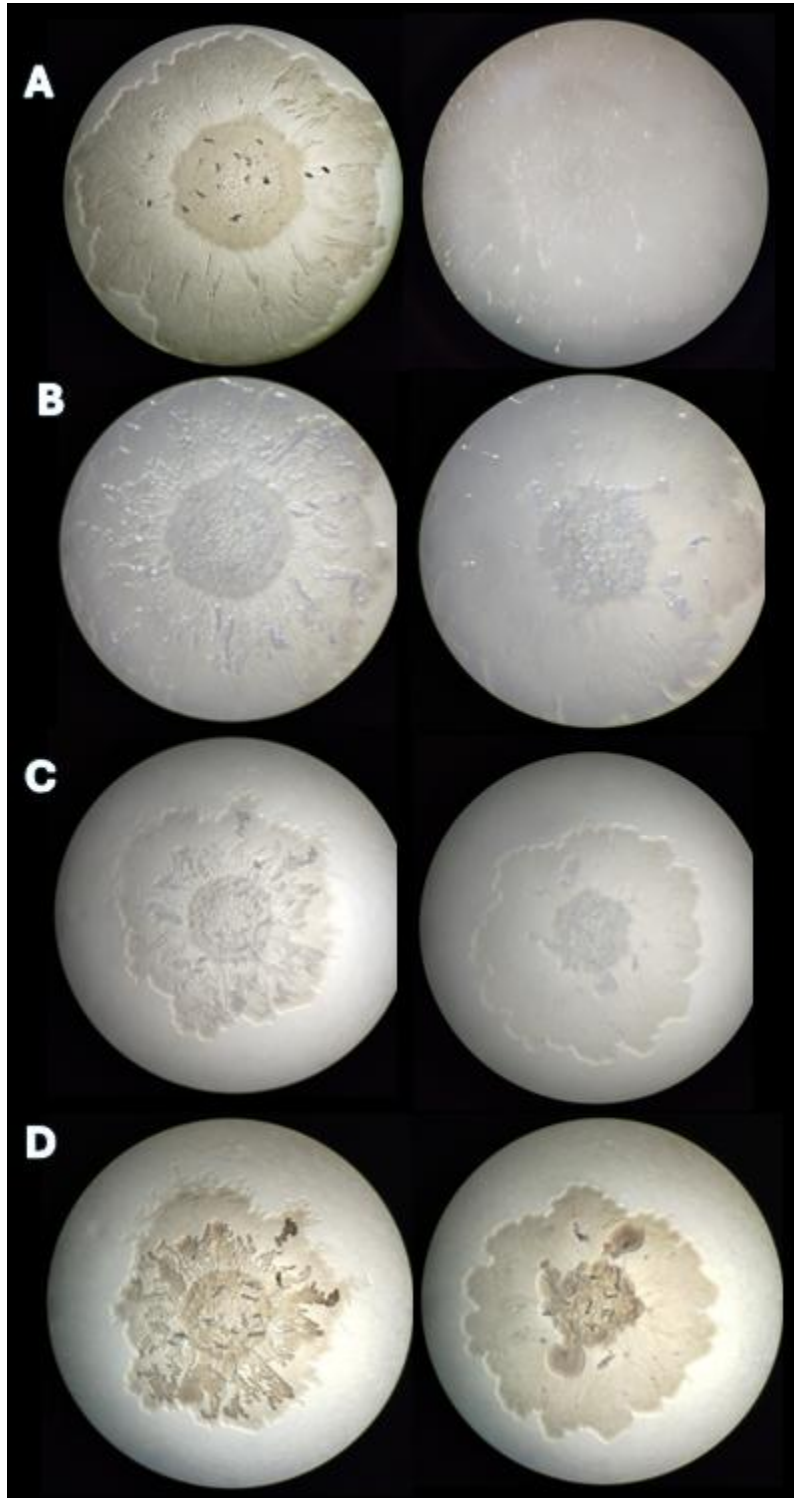


Figura 24. Placas con medio de cultivo MMAB. Lado izquierdo: cepa WT, lado derecho: cepa mutante F1-36 *galU*-. A) 24h, B) 48h, C) 72h y D) 120h.

Se realizaron 4 mediciones de los diámetros de crecimiento, se calcularon las medias y se realizó una T de Student para muestras independientes. Los resultados se presentan en la (Figura 25). En este medio durante las primeras horas de crecimiento el diámetro de movilidad de la cepa WT tuvo  $12.53 \pm 0.77$  mm de diámetro mientras que la cepa mutante tuvo  $11.62 \pm 0.46$  mm. Las mediciones se realizaron cada 24 horas hasta las 120 horas en donde la diámetro de movilidad de la cepa WT fue de  $13.57 \pm 0.56$  mm y la cepa mutante de  $13.38 \pm 0.56$  mm. No hubo diferencias significativas.

Diámetro de cultivos de *P. stutzeri* A1501 WT y mutante F136 *galU*- en medio MMAB

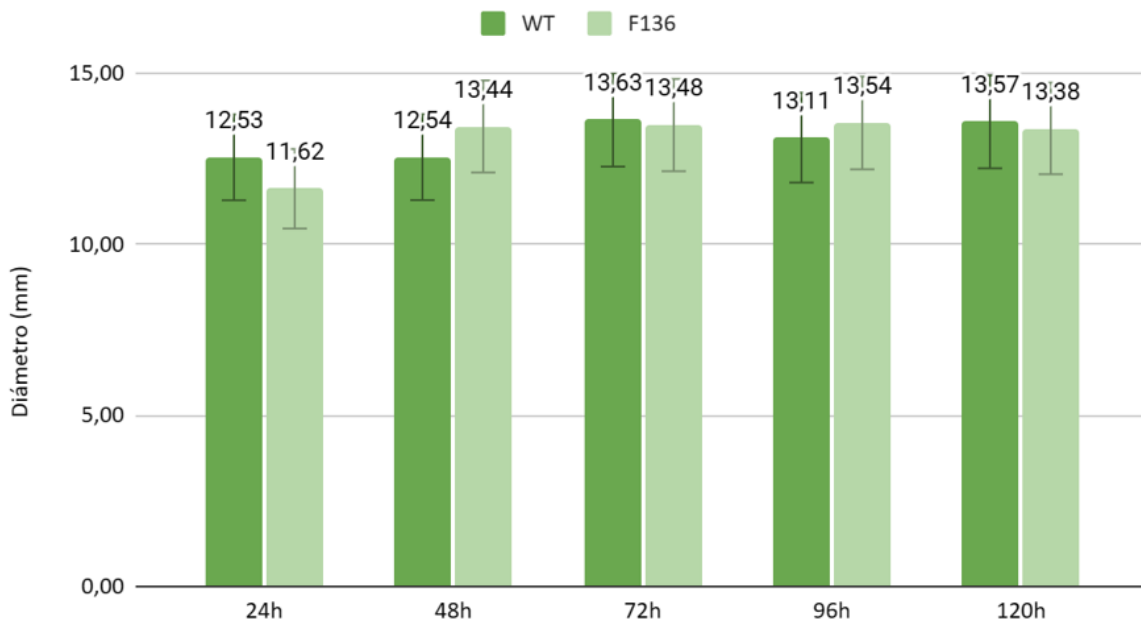


Figura 25. Comparativa de diámetros de cultivos de cepa WT y mutante F1-36 *galU*- en medio MMAB. Se realizó T de Student para muestras independientes. Sólo se muestran los datos con diferencias estadísticamente significativas. \* $p < 0.05$

## Amplificación del gen *galU*

Con la finalidad de en un futuro realizar la complementación genética de la mutante *galU*- se diseñaron los oligos *galU* 7 y *galU* 8 los cuales amplifican tanto la región promotora como la región estructural del gen *galU* (Figura 26). Se decidió conservar la región promotora con el propósito de evaluar, en estudios futuros, el nivel de expresión del gen en las cepas de tipo silvestre (WT), mutante y mutante complementada. El amplicón obtenido se corrió en una electroforesis en gel de agarosa y se comparó con un marcador de peso molecular 1 Kb (Figura 27).



Figura 26. Figura representativa del gen *galU*, su región promotora y oligos *galU* 7 y *galU* 8. Se indica el tamaño del amplicón (1449pb) que se obtendrá como resultado al utilizar estos oligos.



Figura 27 Gel de Electroforesis del amplicón del gen *galU* de *P. stutzeri* A1501 obtenido con los oligos *galU* 7 y *galU* 8. En el primer carril se observa el amplicón obtenido con un tamaño teórico de 1449pb. En el último carril se observa el marcador de peso molecular 1kb Ladder.

## Clonación del gen *galU* en pGEM T Easy

Después de verificar que el tamaño del amplicón y la calidad de la muestra de ADN fueran adecuados, se cortó la banda de ADN correspondiente al tamaño esperado del gen *galU* y se extrajo utilizando el “QAquick PCR Purification Kit”. El producto de la extracción se usó de inmediato para realizar la ligación con el vector pGEM-T Easy.

Se eligió este vector por su fácil manipulación, su alto número de copias y porque viene previamente linealizado. Además, en su extremo 3' tiene un excedente de timinas no apareadas, lo cual es compatible con los extremos 3' de desoxiadenosina que deja la Taq polimerasa al amplificar.

El sitio de clonación múltiple del vector se encuentra dentro de la región codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ - galactosidasa, cuando la ligación es exitosa este péptido queda inactivado por la inserción del nuevo fragmento lo que permite realizar una selección de colonias recombinantes blancas/ azules (Figura 19).

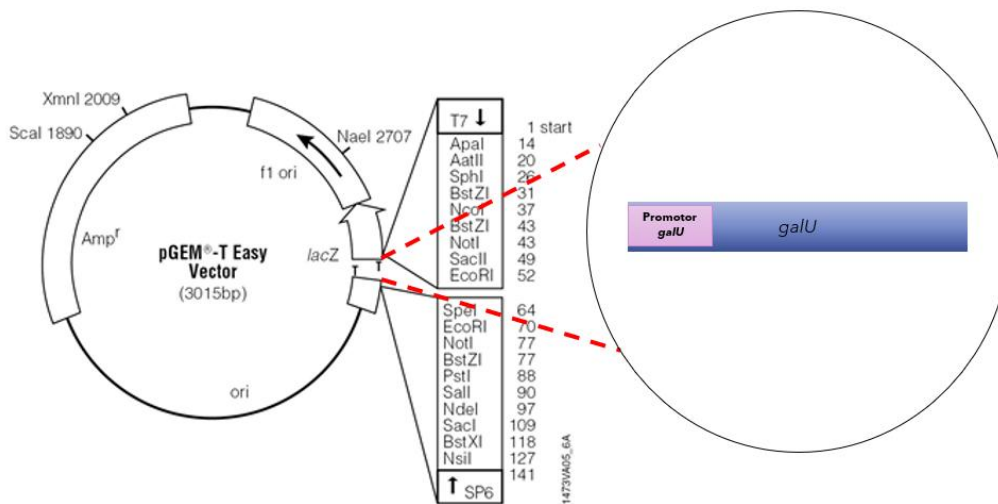


Figura 28. Esquema del inserto del amplicón *galU* + promotor de *galU* en el plásmido pGEM-T Easy

Con el producto de la ligación, el plásmido pGEM-T East + el amplicón del gen *galU*, se llevó a cabo la transformación bacteriana con células competentes de *E. coli* Dh5 $\alpha$ . La selección de colonias recombinantes se realizó eligiendo las colonias de color blanco, resistentes a Ampicilina. Posteriormente, cada una de las colonias candidatas seleccionadas se sembraron en placas individuales. Se extrajo ADN de cada cultivo y, finalmente, se efectuó una PCR con los oligonucleótidos galU7 y galU8 para verificar la presencia del inserto deseado en nuestras recombinantes de 1449pb.

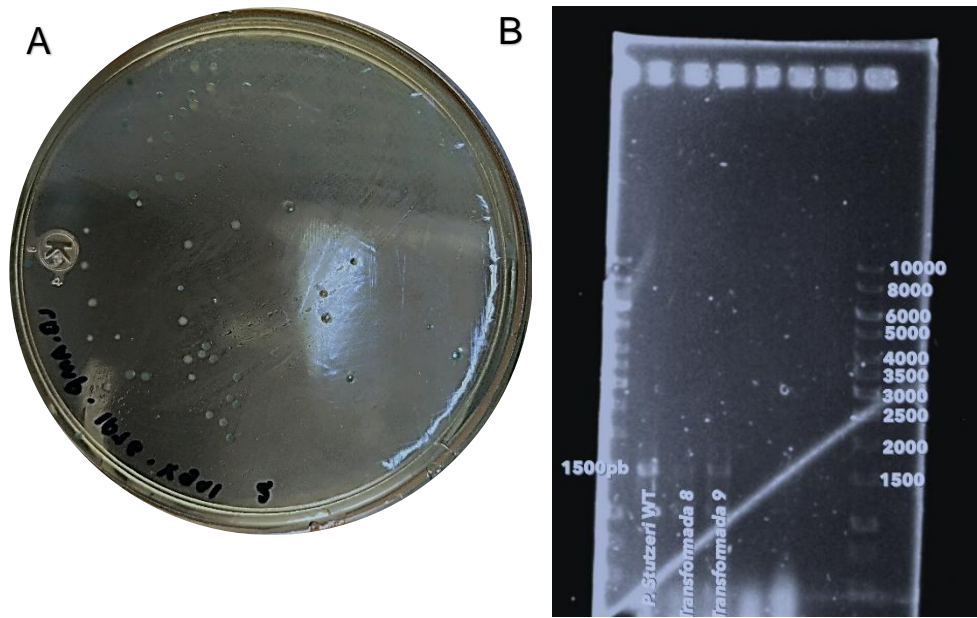


Figura 29. A Selección de colonias recombinantes que poseen el plásmido pGEM T Easy-*galU*  
B.- Electroforesis del amplicón *galU* obtenido con el plásmido purificado de colonias candidatas.

## DISCUSIÓN

### AMPLIFICACIÓN DEL GEN *galU*

El diseño de los oligos galu7 y galu8 se llevó a cabo con el objetivo de, en estudios posteriores, realizar la complementación genética del gen *galU* en la mutante F1-36 *galU*-. El objetivo de obtener una cepa mutante complementada es confirmar la participación del gen *galU* en los fenotipos evaluados. Para ello, se restaura la función del gen mutado, lo que debería conducir a la recuperación de los fenotipos afectados. Esta estrategia permite establecer de manera definitiva la relación causal entre la función del gen *galU* y los fenotipos observados, proporcionando evidencia sólida de su implicación en los procesos estudiados.

### CRECIMIENTO BACTERIANO

Se evaluó si la mutación del gen *galU* tendría un efecto en el crecimiento bacteriano. Además, que una vez obtenidos los resultados de los conteos de UFC de las cepas WT y mutante F1-36 *galU*- pudimos determinar el tiempo y características de cultivo para estandarizar el inóculo de los experimentos posteriores. Para comenzar se hizo una estandarización del grado de turbidez en distintas horas de cultivo ya que, a primera vista, la turbidez del cultivo de la cepa WT era mayor que el de la cepa mutante. Una vez alcanzadas las 7 horas de cultivo en medio líquido la relación de la absorbancia a 600nm entre las cepas fue casi del doble. En este punto necesitábamos discernir si esa diferencia en la turbidez estaba relacionada con el crecimiento bacteriano.

Al tiempo que se determinaban las absorbancias por cada hora de cultivo, se tomaron alícuotas de cada uno para realizar diluciones seriadas y posteriormente realiza el conteo de UFC. De acuerdo con la información recabada en los conteos no hubo diferencia en el crecimiento de las cepas ya que ambas se mantuvieron en el mismo orden de magnitud. Este resultado coincide con el reportado en (Meyer; et al 2015), en este estudio realizaron un knockout en el gen *galU* de una cepa uropatógena de *E. coli* en donde no se detectó ningún impedimento en el crecimiento de la cepa mutante. Se evaluó el ritmo de crecimiento del cultivo en medio LB y no hubo diferencias en los conteos de UFC entre las cepas WT y mutante en este experimento.

### PRUEBAS DE ADHESIÓN

La adhesión a superficies bióticas y abióticas es una característica importante de las bacterias, la participación del gen *galU* en este mecanismo se ha evaluado con anterioridad. Este tipo de interacción ha sido mayormente estudiada en microorganismos patógenos para los seres humanos y plantas, el mecanismo de interacción entre bacterias promotoras de crecimiento y plantas es poco conocido.

Estudios previos han demostrado que las cepas mutantes *galU* de *Escherichia coli* presentan una disminución significativa en la adhesión inicial en comparación con la cepa silvestre (WT). Tras 2 horas de inoculación en placas de poliestireno, las cepas mutantes mostraron un 37% menos de adhesión, y a las 3 horas, esta reducción fue del 35% (Genevaux; et al 1999). Este

fenómeno también ha sido evaluado en *Xanthomonas campestris* en donde la cepa mutante *galU*- presentó un 25% menos de adhesión que la cepa mutante en placas de poliestiereno (Tsao Liao; et al 2014). En ambos estudios la capacidad de adhesión fue en decremento, sin embargo, en un estudio donde se evaluó la capacidad de adhesión de cepas WT y mutante *galU*- de *Streptococcus pneumoniae* en líneas celulares de epitelio y en el modelo *G. mellonella* se reportó un aumento en la adhesión de la cepa mutante en células epiteliales en comparación con la cepa WT, así como disminución de la virulencia (Cools; et al 2018).

En este estudio, se evaluó la adhesión en semillas de arroz inoculadas con las cepas *Pseudomonas stutzeri* A1501 WT y la mutante F136 *galU*-. Dos horas después de la inoculación, se observó una disminución del 20% en las unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa mutante en comparación con la cepa WT. Estos resultados sugieren que la delección del gen *galU* afecta negativamente la adhesión de la cepa mutante en las semillas inoculadas. Sin embargo, es importante resaltar que, según la literatura, este comportamiento no solo depende del fenotipo asociado a este gen, sino también de las características de la superficie (biótica o abiótica) y de las interacciones entre los microorganismos y las superficies. Además de que para mejorar la validez de los resultados es necesario realizar las pruebas por triplicado.

## **GERMINACIÓN**

En esta prueba quisimos establecer si la interacción entre las cepas WT y mutante *Pseudomonas stutzeri* A1501 y las semillas de arroz es benéfica para la germinación. En un estudio previo se reportó que la presencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede inhibir la germinación de las semillas de trigo y maíz (Tiwari & Shankar, 2017). En los ensayos realizados con semillas de arroz y las cepas de *P. stutzeri* pudimos observar una disminución de entre el 10 y 15% en la germinación de las semillas inoculadas con la cepa mutante comparadas con las semillas control inoculadas con agua destilada estéril y una disminución del 20% en la germinación de las semillas inoculadas con la cepa WT en comparación con el control. Esto coincide con lo reportado en (Stefan; et al 2008) en donde se observó que semillas de soya (*Glycine max*) inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sufrieron un retraso en el proceso de germinación posiblemente causado por la competición de nutrientes entre las bacterias y el embrión. Aunque esto proporciona una visión preliminar importante, la falta de réplicas, limita la capacidad para sacar conclusiones definitivas.

## **PRUEBA DE COLONIZACIÓN**

Se ha observado en otros estudios que *Pseudomonas stutzeri* al interactuar con las plantas de arroz durante las primeras horas post inoculación la bacteria se encuentra distribuida de manera uniforme en el rizoplasma de las raíces y durante las siguientes 72 horas las bacterias han formado micro colonias particularmente en la zona basal de los pelos radicales (Mohiul; et al 2016). Cuando se han estudiado las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, se ha determinado que hay diferentes mecanismos que podrían influenciar el proceso de colonización como el estado inmunitario de la planta, la movilidad bacteriana y la formación de biopelícula (Liu; et al 2023).

En este trabajo optamos por realizar una evaluación de la colonización 72 y 96 horas post inóculo ya que, basados en lo reportado en la literatura, consideramos que las primeras horas después de la primera interacción bacteria-planta podrían ser cruciales para determinar la capacidad de colonizar las superficies. Luego de 72 horas la cepa mutante mostró un 75% de la capacidad de colonización comparada con la cepa WT y 24 horas después fue la cepa WT la que mostró estar a un 72% de la capacidad observada en la cepa mutante.

En un experimento realizado bajo condiciones similares en semillas de maíz inoculadas con cepas WT y mutante *galU*- de *Pseudomonas putida* se reportó que 48 horas después de la inoculación de las semillas la colonización de la cepa mutante se vio severamente afectada ya que el número de UFC recuperadas de la rizósfera fue dos órdenes de magnitud menor a las recuperadas de la cepa WT (Yousef-Coronado; et al 2008). Estos resultados son específicos de estas condiciones experimentales, será necesario realizar más réplicas para obtener conclusiones definitivas.

## **PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Se realizaron evaluaciones de la longitud, peso fresco y seco de plántulas de arroz tras 13 días de inoculación de semillas, considerando 72 horas de germinación antes de transferirlas a un sistema hidropónico y 10 días de crecimiento en una cámara ambiental. Se observó una tendencia de la cepa WT a promover un mayor peso en la parte aérea, tanto fresco como seco, en comparación con las semillas de control y aquellas inoculadas con la cepa mutante. Sin embargo, las diferencias observadas no fueron significativas.

En la literatura se reporta que *Pseudomonas stutzeri* A1501 se utiliza como inoculante en cultivos de arroz en China. En pruebas realizadas en invernadero, se ha observado que las plantas inoculadas con esta cepa presentan un aumento en la biomasa, incluso demostrando ser significativamente más efectivas que la fertilización química con nitrógeno. En esos estudios, la longitud de los brotes inoculados con la cepa fue 1.5 veces mayor que la de aquellos tratados con fertilizante químico, y el peso seco de las raíces fue tres veces mayor (Pham; et al 2107). Estos resultados destacan el potencial de *Pseudomonas stutzeri* A1501 como inoculante en cultivos de arroz, sin embargo, se han realizado pocos estudios en plántulas a nivel de invernadero y no se han reportado estudios con cepas mutantes *galU*-.

## PRODUCCIÓN DE CLOROFILA

La clorofila es una sustancia verde que cumple un rol importante en la fotosíntesis. El contenido de clorofila puede ser usado como un parámetro de referencia del crecimiento de las plantas y del rendimiento de los cultivos, a mayor cantidad de clorofila mayor será el potencial de rendimiento (Purbajanti; et al 2015). Debido a que en estudios previos se ha observado que la inoculación de plantas de arroz con la cepa *Pseudomonas stutzeri* A1501 le confiere a la planta un aumento en la biomasa, se decidió evaluar si el contenido de clorofila guarda alguna relación con este incremento.

Como se abordó en el apartado anterior no observamos diferencias significativas en la biomasa de las plántulas de arroz, sin embargo, se reportó un aumento en el contenido de clorofila A y B del 4% en las plantas inoculadas con la cepa WT y del 7% y 29% de las plantas inoculadas con la cepa mutante respectivamente. En primera instancia, de acuerdo con lo reportado con la literatura, existe una relación entre el contenido de clorofila en las hojas de las plantas y su contenido de nitrógeno lo cual no es sorprendente ya que este es un elemento estructural de la clorofila (Bojovic & Markovic , 2009). *Pseudomonas stutzeri* es una rizobacteria fijadora de nitrógeno así que el aumento en la producción de clorofila podría estar relacionado con una mayor proporción de nitrógeno en las plántulas, en cuanto a la relación entre la producción de clorofila y el gen *galU* aún no existen reportes en la literatura.

Para futuros experimentos será fundamental incrementar la cantidad de plántulas, lo que permitirá realizar un mayor número de réplicas y obtener resultados más confiables. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la producción de clorofila podría considerarse un indicador prometedor del rendimiento en cultivos de plantas inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento.

## ANÁLISIS DE FENOTIPOS

**Agar Mc Conkey:** La fuente de carbono del medio es la Lactosa y cuenta con un indicador (colorante rojo neutro), que en el caso de que las colonias presenten coloración roja nos indica actividad de fermentación de lactosa +, los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias translúcidas. En la cepa WT las bacterias utilizan esta azúcar como fuente de carbono produciendo ácido láctico. El rojo neutro es absorbido por las colonias que llevan a cabo la fermentación de la lactosa provocando una coloración rosa-roja.

En la cepa mutante se presume que al carecer de la enzima producida por *galU* el exceso de glucosa no uridilada esté causando la inhibición del operón *lac z* mediante una represión por catabolito (Görke & Stülke, 2008). Es interesante observar que una vez alcanzadas las 96 horas de cultivo las colonias de la cepa mutante adquirieron una coloración rosácea lo que parece indicar que, aunque tardía, se está llevando a cabo la fermentación de la lactosa.

En la bibliografía se ha reportado que la cepa *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705 crecida en un medio con lactosa como fuente de carbono produce un exopolisacárido compuesto de ramnosa, manosa y glucosa en un radio de 1:3, 26:4.97 respectivamente (Sudhamani, Tharanathan, & Prasad, 2004).

En los medios **LB** y **SOC** las bacterias tuvieron un comportamiento similar. En ambos casos en los cultivos de la cepa WT se observa un exopolisacárido de mayor densidad y apariencia mucosa en el centro de la placa y un segundo exopolisacárido con mayor diámetro de movilidad, de menor densidad y apariencia translúcida. Mientras que en la cepa mutante el polisacárido más denso sólo se presenta en forma de gránulos. Esta similitud parece deberse a que ambos medios comparten una composición muy similar con extracto de levadura como fuente de carbono.

(Maalej; *et al* 2014) reportó que durante una evaluación realizada con la cepa *Pseudomonas stutzeri* AS22 crecida en un medio con almidón y extracto de levadura como fuente de carbono el exopolisacárido producido por la cepa estaba compuesto por glucosa, ramnosa y manosa.

**YMG:** La fuente de carbono de este medio es el Manitol que puede ser metabolizado a través de vías que lo convierten en fructosa y posteriormente, en glucosa. Con la mutación en el gen *galU* la conversión de la glucosa-1-fosfato a UDP glucosa se ve afectada lo que puede explicar la menor producción de exopolisacárido y que la fuente de carbono no se esté aprovechando de manera eficiente.

**LGI:** La fuente de carbono en este medio es la sacarosa, que debe ser hidrolizada en glucosa y fructosa para ser metabolizada. Una vez que se produce la glucosa, esta puede ingresar a diversas rutas metabólicas. En el contexto de la cepa mutante *galU*-, durante las primeras horas de cultivo se observa una disminución considerable en la producción de exopolisacáridos, ya que no se está generando UDP-glucosa, que es el posible sustrato necesario para su síntesis.

**MMAB:** El malato presente en el medio desempeña un papel importante para la producción de glucosa a partir de precursores no carbohidratos. Aunque la cepa mutante presenta un crecimiento similar al de la cepa WT, en esta última, el exopolisacárido es más abundante y denso.

**ROJO CONGO:** Este medio es ampliamente utilizado para determinar la formación de biopelícula, gracias a su capacidad para unirse a los polisacáridos presentes en el biofilm, mostrando una mayor afinidad por los glucanos  $\beta$  1,3 y  $\beta$  1,4. Durante las primeras horas de cultivo, se observó un comportamiento particularmente interesante: el exopolisacárido de la cepa WT se tiñó de rojo oscuro mientras que el de la cepa mutante permaneció translúcido. Aunque la tinción del polisacárido es inespecífica, sugiere que el exopolisacárido producido por la cepa mutante presenta características distintas, posiblemente debido a la ausencia de formación de UDP-glucosa.

A partir de las 48 horas, la cepa mutante comienza a producir un exopolisacárido que también se tiñe de rojo. Aunque no podemos confirmar que sea el mismo que produce la cepa WT, su apariencia es muy similar. Esto podría indicar una compensación metabólica por parte de la cepa mutante, probablemente en respuesta a la delección del gen *galU*.

La composición del exopolisacárido producido por *Pseudomonas stutzeri* A1501 aún no ha sido determinada. En la literatura, los estudios más ampliamente documentados corresponden a cepas de *Pseudomonas* patógenas. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de secretar al menos tres exopolisacáridos bien caracterizados: alginato, Psl y Pel. Entre ellos, destaca el exopolisacárido Psl, cuya síntesis requiere la formación de azúcares nucleótido como precursores. El operón *psl*, que regula la producción de Psl, incluye únicamente la enzima PslB para la generación de estos precursores. Sin embargo, la síntesis de otros precursores esenciales depende de enzimas codificadas por los genes *algC*, *rmIC* y *galU* (Franklin; *et al* 2011). Esto sugiere que, al igual que en otras cepas de *Pseudomonas*, la producción de exopolisacáridos en *Pseudomonas stutzeri* A1501 depende de la fuente de carbono disponible en el medio. Además, la ausencia del gen *galU* en la mutante F1-36 *galU*- resulta en una disminución en la producción de exopolisacáridos, así como en la síntesis de exopolisacáridos con características distintas de las presentes en la cepa WT.

## Conclusiones.

- La delección del gen *galU* no afectó el crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en medio de cultivo estándar, indicando que *galU* no es esencial para la proliferación bacteriana en estas condiciones.
- La capacidad de adhesión en semillas se redujo un 20% en la cepa mutante *galU*<sup>-</sup>, lo que sugiere que los exopolisacáridos, posiblemente regulados por *galU*, son esenciales en este proceso de interacción bacteria-planta.
- La inoculación de las semillas produce un letargo en el proceso de germinación que puede deberse a la disponibilidad de agua y a la competitividad de nutrientes entre las bacterias y el embrión.
- Hubo una tendencia de la cepa WT a incrementar el peso de las plántulas, sin embargo, no se observaron diferencias significativas con las plantas inoculadas con la cepa mutante. Es necesario aumentar el tiempo de crecimiento y evaluación de las plántulas.
- Aunque se observó un aumento en la producción de clorofila, este no se tradujo en un incremento significativo en la biomasa de las plántulas. La cuantificación de clorofila podría ser una referencia de rendimiento en el crecimiento vegetal, sugiriendo la importancia de estudios adicionales.
- Los resultados mostraron variaciones fenotípicas importantes en *Pseudomonas stutzeri* WT y la mutante *galU*<sup>-</sup> en función del medio y la fuente de carbono, resaltando la influencia del gen *galU* en la síntesis de exopolisacáridos. La caracterización de estos exopolisacáridos es necesaria para entender a fondo las alteraciones metabólicas y de adhesión provocadas por la mutación en *galU*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo nos ofrecen un preámbulo para el montaje de futuros experimentos en donde se deberá considerar aumentar el número de réplicas para obtener resultados estadísticamente significativos y, en el caso de las evaluaciones en plántulas, aumentar el número de semillas inoculadas debido a las altas variaciones en la germinación así como extender el tiempo de evaluación de las plantas a un máximo de 15 días en cámara ambiental y escalar las pruebas a evaluar su crecimiento en invernadero.

## Perspectivas.

### Recomendaciones para futuros estudios:

1. **Complementación genética:**
  - Obtener la complementación genética de *Pseudomonas stutzeri* A1501 *galU*-.
2. **Evaluaciones experimentales:**
  - Incrementar el número de réplicas en las pruebas de crecimiento bacteriano, adhesión, colonización, germinación, cuantificación de clorofila y análisis de fenotipos.
  - Incluir en el análisis comparativo las cepas WT, mutante y mutante complementada.
3. **Caracterización de exopolisacáridos:**
  - Analizar los exopolisacáridos producidos por *Pseudomonas stutzeri* A1501 (WT y mutante F1-36 *galU*-) en diferentes medios de cultivo con diversas fuentes de carbono.
4. **Promoción del crecimiento vegetal:**
  - Extender el período de evaluación en sistemas hidropónicos hasta un máximo de 15 días.
  - Escalar los experimentos para evaluar el crecimiento en condiciones de invernadero.
5. **Pruebas de inoculación:**
  - Realizar pruebas de inoculación en semillas de arroz germinadas y en plántulas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achinas, S., Charalampogiannis, N., & Euverink, G. J. (2019). A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied Sciences*.
- Berbís, Á., Sánchez-Puelles, J., Cañada, J., & Jiménez-Bárbero, J. (2015). Structure and function of prokaryotic UDP-glucose pyrophosphorylase, a drug target candidate. *Current Medicinal Chemistry*.
- Böhringer, J., Daniela, F., Mosler, G., & Hengge-Aronis, R. (1995). UDP-Glucose Is a Potential Intracellular Signal Molecule in the Control of Expression of sigmaS y genes dependientes de sigmaS en Escherichia coli. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 413-422.
- Bojovic, B., & Markovic, A. (2009). Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L). *Kragujevac Journal of Science*, 69-74.
- Chan, Y.-K., Barraquio, W., & Knowles, R. (1994). N<sub>2</sub>-fixing pseudomonads and related soil bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 95-118.
- Cools, F., Torfs, E., Vanhoutte, B., Bidart de Macedo, M., Bonofiglio, L., Mollerach, M., . . . Cos, P. (2018). *Streptococcus pneumoniae* galU gene mutation has a direct effect on biofilm growth, adherence and phagocytosis in vitro and pathogenicity in vivo. *Pathogens and disease*.
- Deng, W.-L., Lin, Y.-C., Ling, R.-H., & Wei, C.-F. (2010). Effects of galU Mutation on *Pseudomonas syringae*-Plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Diallo, M., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T., De Lajudie, P., . . . Van der Gucht, K. (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology*.
- Feng, S., Lin, J., Zhang, X., Hong, X., Xu, W., Wen, Y., & She, F. (2023). Role of AlgC and GalU in the Intrinsic Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *Infection and Drug Resistance*.
- Flores, M., Alape, A., Persson, B., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., & Florin, I. (1997). Cellular UDP-Glucose Deficiency Caused by a Single Point Mutation in the UDP-Glucose Pyrophosphorylase Gene. *Journal of Biological Chemistry*.
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, T. J., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *frontiers in Microbiology*.
- Fukagawa, N., & Ziska, L. (2019). Rice: Importance for Global Nutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*.
- Genevaux, P., Bauda Pascale, DuBow, M., & Oudega, B. (1999). Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiology*.
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews, Microbiology*.

- Guo, L., Huilin, D., Feng, S., & Zhao, Y. (2023). Contribution of GalU to biofilm formation, motility, antibiotic and serum resistance, and pathogenicity of Salmonella Typhimurium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Holden, H., Rayment, I., & Thoden, J. (2003). Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*.
- Knutson, C., Pieper, M., & Barney, B. (2021). Gene fitness of Azotobacter vinelandii under diazotrophic growth. *Journal of Bacteriology*.
- Liu, Y., Xu, Z., Chen, L., Xun, W., Shu, X., & Chen, Y. (2023). Root colonization by beneficial rhizobacteria. *Microbiology Reviews*.
- Lovel, C., Piceno, Y., Quattro, J., & Bagwell, C. (2000). Molecular Analysis of Diazotroph Diversity in the Rhizosphere of the Smooth Cordgrass, Spartina alterniflora. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M., & Wozniak, D. (2007). Pseudomonas aeruginosa Psl Is a Galactose- and Mannose-Rich Exopolysaccharide. *Journal of bacteriology*.
- Maalej, H., Boisset, C., Hmidet, N., Buon, L., Heyraud, A., & Nasri, M. (2014). Purification and structural data of a highly substituted exopolysaccharide from Pseudomonas stutzeri AS22. *Carbohydrate Polymers*, 404-411.
- Mann, E., & Wozniak, D. (2011). Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *Federation of European Microbiological Societies*.
- Meyer, C., Hoffman, C., Haas, R., & Schubert, S. (2015). The role of the galU gene of uropathogenic Escherichia coli in modulating macrophage TNF- $\alpha$  response. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Mikkola, S. (2020). Nucleotide sugars in chemistry and biology. *molecules*.
- Mohiul, K., Zhang, T., Yan, Y., Zhang, W., Lin, M., & Lu, W. (2016). Transcriptional Analysis of Pseudomonas stutzeri A1501 Associated with Host Rice. *Advances in Microbiology*, 210-221.
- Mollerach, M., & García, E. (2000). The galU gene of Streptococcus pneumoniae that codes for a UDP-glucose pyrophosphorylase is highly polymorphic and suitable for molecular typing and phylogenetic studies. *Gene on Science Direct*, 77-86.
- Muñoz, R., López, R., De Frutos, M., & García, E. (2002). First molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in Streptococcus pneumoniae type 1. *Molecular microbiology*.
- Nesper, J., Lauriano, C., Kloser, K., Kapfhammer, D., Kraib, A., & Reidl, J. (2001). Characterization of Vibrio cholerae O1 El Tor galU and galE Mutants: Influence in Lypopolysaccharide Structure, Colonization and Biofilm formation. *Infection and Immunity*.
- Özen, A., & Ussery, D. (2012). Defining the Pseudomonas Genus: Where do we draw the line with Azotobacter? *Microbial Ecology*, 239-248.
- Pham, V., Rediers, H., Ghequire, M., Nguyen, H., De Mot, R., Vanderleyden, R., & Spaepen, S. (2107). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte Pseudomonas stutzeri A1501. *Archives of microbiology*, 513-517.
- Premed Village*. (14 de october de 2024). Obtenido de Integrated mcat: [https://www.integrated-mcat.com/organic-mechanisms/UDP-Glucose-Pyrophosphorylase/030211\\_b020](https://www.integrated-mcat.com/organic-mechanisms/UDP-Glucose-Pyrophosphorylase/030211_b020)

- Purbajanti, E. D., Kusmiyati, F., Slamet, W., & Adinurani, P. (2015). Chlorophyll, crop growth rate and forage yield of *Brachiaria* (*Brachiaria brizantha* Stapf) as the result of goat manure in various nitrogen dosage. *ADVANCES OF SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR SOCIETY*.
- Römling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology*, 205-212.
- Schmid, J., Sleber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial Exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *frontiers in Microbiology*.
- Stefan, M., Mihasan, M., & Dunca, S. (2008). Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the in vitro germination of *Glycine max* L. seeds. *Anales Científicos de la Universidad "Alexandru Ioan Cuza", Sección de Genética y Biología Molecular, TOM IX*.
- Sudhamani, S. R., Tharanathan, R. N., & Prasad, M. S. (2004). Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. *Carbohydrate Polymers*, 423-427.
- Tiwari, P., & Shankar, J. (2017). A plant growth promoting rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* strain inhibits seed germination in *Triticum aestivum* (L) and *Zea mays* (L). *Microbiology Research*.
- Tsao Liao, C., Chiao Du, S., Hsia-Lo, H., & Hsia, Y.-m. (2014). The galU gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is involved in bacterial attachment, cell motility, polysaccharide synthesis, virulence, and tolerance to various stresses. *Archives of Microbiology*, 729-738.
- Vermeiren, H., Willems, A., Schoofs, G., De Mot, R., Keijers, V., Hai, W., & Vanderleyden, J. (1999). The Rice Inoculant Strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a Nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and applied microbiology*, 215-224.
- Wang, D., Anming, X., Elmerich, C., & Ma, L. (2017). *Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing*. *The ISME Journal*.
- You, C., & Zhou, F. (1989). Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M., & Espinosa-Urgel, M. (2008). Different overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *Microbiology Letters*, 118-124.
- Zeng, Z., Zeng, X., Guo, Y., Wu, Z., Cai, Z., & Pan, D. (2022). Determining the Role of UTP-Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase (GalU) in Improving the Resistance of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to Freeze-Drying. *Foods*.

## ANEXOS

### Medios de cultivo

- Todos los medios de cultivo se esterilizan a 15 psi por 15 minutos y se conservan a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.
- Para preparar placas con agar de los medios mencionados se añadió la proporción de agar necesaria para una concentración del 1.5% a excepción del medio Mc Conkey.

#### LB

	g/L
NaCl	10
Triptona	10
Extracto de levadura	5

#### SOC

	g/100ml
NaCl	0.058
Triptona	2
Extracto de levadura	0.5
KCl	0.018
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0.203
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	0.246
<i>Glucosa</i>	0.360

#### MC Conkey

	g/L
Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	5
NaCl	5
<i>Rojo neutro</i>	0.075
<i>Agar</i>	12

**LGI**

	g/L
$K_2HPO_4$	0.2
$KH_2PO_4$	0.6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.01
Azúcar de caña	100

**MMAB**

	g/L
Fuente de carbono	
Malato 50mM	
$K_2HPO_4$	3
$NaH_2PO_4$	1
$NH_4Cl$	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3
$KCl$	0.15
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0025

## Microelementos (100x)

$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.25g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.07g
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0.014g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0125g
$H_3BO_3$	0.003g
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.05g

- Los Microelementos se preparan por separado y se esterilizan a 5psi durante 10 minutos.
- Se preparan soluciones stock de los demás elementos, se esterilizan a 10psi durante 10 minutos.
- La fuente de carbono se prepara antes de usarse, se ajusta el pH entre 6.8 y 7 con KOH y se esteriliza a 10psi durante 10 minutos.
- Las soluciones de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y  $KCl$  deben añadirse frías.

### **YMG**

	g/L
Manitol	2
Extracto de levadura	4
$K_2HPO_4$	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
Glicerol	1.2
$FeCl_3$	0.001% p/v
$KNO_3$	0.8
$(NH_4)_2HPO_4$	0.3

### **Rojo Congo**

	g/L
Malato	5
$K_2HPO_4$	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.5
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0015
$KOH$	4.8
Solución de rojo Congo 1%	

## **Soluciones Miniprep**

### **Solución 1.**

Glucosa/ destroza 50mM	9g/L
EDTA 10mM	3.3g/L
Tris 25mM	3g/L

Ajustar pH a 8,0 con HCl y esterilizar a 10 psi durante 15 minutos.

### **Solución 2.**

SDS 10%	100 µL
NaOH 2N	100 µL
Agua	800 µL

### **Solución 3.**

Acetato de potasio 294,42 g/L

Ajustar pH a 5,5 con ácido acético, agregar agua para ajustar a la cantidad deseada y esterilizar a 15 psi durante 20 minutos.

### **New Wash 10x**

Tris 200mM	24.228g/l
NaCl 1M	5.839 g/l
Agua	1L

Ajustar pH a 8,0 con HCl y esterilizar a 15 psi por 15 minutos.

### **New Wash 1x**

New Wash 10x	2ml
Etanol 100%	10ml
Agua	8ml

### **CTAB**

CTAB (10% en H <sub>2</sub> O)	3ml
NaCl 5M	2.8ml
Tris 1M	1ml
EDTA 0.5M	0.4ml
B-mercaptoetanol	0.02ml
PVP	0.3ml
Agua	2.48ml

Esterilizar a 15 psi durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer TE (50:20)**

Tris 50mM 6.057g/L

EDTA 20mM 7.448g/L

Agua 1L

Ajustar pH a 7,5 con ácido acético y esterilizar a 15 psi por 20 minutos.

**Buffer TAE 50X**

Disolver 24,2 g de Tris y 1,86 g de EDTA en 50 mL de agua tridestilada. Agregar ácido acético hasta ajustar a pH 8,0. Aforar a 100 mL.

Esterilizar a 15 psi por 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente. Posteriormente debe diluirse con agua tridestilada hasta una concentración de TAE 0.5x.