

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXCRECIÓN DE RIBOFLAVINA POR BACTERIAS ASOCIADAS A
PLANTAS EN VIDA LIBRE Y EN RIZÓSFERA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

SHAMAYIM TABITA RAMÍREZ PUEBLA

TUTORA

Dra. Ma. Esperanza Martínez Romero

Ciudad Universitaria
México, D. F.
2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SOLI DEO GLORIA

**A mis padres
A mis hermanos**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esperanza Martínez, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo.

A la Dra. Mónica Rosenblueth, por su amistad, confianza y paciencia.

A mis sinodales, Dr. Juan Miranda, Dr. Alfonso Vilchis, Biól. Martha L. Guerrero, cuyos útiles consejos contribuyeron para la mejora de esta tesis.

A mis amigos, que no menciono por nombre por temor a omitir a alguno, pero que me apoyan con su cariño.

Profundamente a mi familia por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional.

*No os conforméis a este siglo,
sino transformaos por medio de la
renovación de vuestro entendimiento*

Rom. 12: 2

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>Ramírez Puebla Shamayim Tabita 56 58 31 85 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300109418</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombres (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra María Esperanza Martínez Romero</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra Mónica Teresa Rosenblueth Laguette</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>M en C Alfonso José Vilchis Peluyera</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dr Juan Miranda Díaz</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Biól Martha Guadalupe Guerrero López</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año</p>	<p>Excreción de riboflavina por bacterias asociadas a plantas, en vida libre y en rizósfera 60 p. 2009</p>

ÍNDICE

Página

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
I.1. Importancia de la riboflavina.....	2
I.2. Ruta de síntesis de la riboflavina.....	3
I.3. Interacciones entre plantas y bacterias rizosféricas.....	7
I.3.1. El papel de los exudados en las interacciones de plantas con bacterias.....	8
I.3.2. Moléculas de Quorum sensing liberadas por las plantas.....	9
I.3.3. Moléculas liberadas por bacterias rizosféricas involucradas en la interacción con plantas.....	10
II. ANTECEDENTES.....	11
II.1. Participación de la riboflavina en interacciones simbióticas.....	11
II.1. 2. Participación en interacciones con plantas.....	11
II.1. 3. Participación en interacciones con animales.....	12
II.2. Participación de la riboflavina en la obtención de hierro.....	13

III. OBJETIVOS.....	14
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	14
V. HIPÓTESIS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
VI.1. Bacterias utilizadas.....	16
VI.2. Plantas utilizadas y esterilización de semillas.....	18
VI.3. Inoculación directa de plantas.....	20
VI.4. Obtención e inoculación de exudados	21
VI.5. Cultivo de bacterias.....	22
VI.5.1. En medios con distintas fuentes de nitrógeno.....	22
VI.5.2. En medios con distintas fuentes de carbono.....	23
VI.5.3. En medios con distintas concentraciones de hierro.....	23
VI.5.4. En medio con inhibidores de bombas de extrusión.....	24
VI.6. Asimilación de riboflavina excretada por <i>M. mesophilicum</i>	24
VI.7. Cromatografía en capa fina.....	25
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VII.1. Presencia de riboflavina en exudados de diferentes especies.....	28
VII.2. Presencia de riboflavina en exudados de plantas cultivadas en medio adicionado con antibióticos.....	29

VII.3. Presencia de riboflavina en plantas y exudados inoculados.....	32
VII.4. Presencia de riboflavina sobrenadantes de bacterias cultivadas en medio mínimo	39
VII.5. Presencia de riboflavina en sobrenadantes de bacterias cultivadas en medio con distintas fuentes de carbono y nitrógeno.....	41
VII.6. Efecto del hierro en la excreción de riboflavina.....	45
VII.7. Efecto de la reserpina en la excreción de riboflavina.....	46
VII.8. Asimilación de riboflavina excretada por <i>Methylobacterium mesophilicum</i>	48
VII.9. Determinación del compuesto mediante el factor de retención....	50
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. PERSPECTIVAS.....	53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

EXCRECIÓN DE RIBOFLAVINA POR BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS EN VIDA LIBRE Y EN RIZÓSFERA

RESUMEN

La riboflavina o vitamina B₂, es esencial para los organismos ya que las flavocoenzimas derivadas de ella, FAD (Flavina Adenina Dinucleótido) y FMN (Flavina Mononucleótido), son los cofactores más versátiles químicamente y están implicadas en una gran cantidad de procesos metabólicos, sin embargo, se conoce poco acerca de su participación en las interacciones planta-bacteria. Mediante cromatografía de capa fina se analizaron sobrenadantes de diferentes especies de bacterias y se determinó su capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono (glucosa, manitol, metanol o sacarosa) y nitrógeno (ácido glutámico, nitrato de amonio o prolina), en la síntesis y excreción de riboflavina; concentraciones de hierro mayores a 10 µM disminuyen la excreción. Comparando exudados de *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Oryzae sativa* y *Oryzae indica* inoculados contra no inoculados se observó riboflavina sólo en el primer caso, lo que sugiere que está relacionada con la interacción entre estos organismos.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Importancia de la riboflavina

Gran parte de las bacterias rizosféricas la sintetizan y mutantes que la sobreproducen colonizan más las raíces, comparadas con la cepa silvestre. El lumicromo, producto de la degradación de la riboflavina, incrementa la respiración radicular y estimula el desarrollo de la planta; ambos compuestos estimulan receptores de quorum sensing en bacterias asociadas a plantas.

La riboflavina o vitamina B₂, juega un papel importante en el metabolismo de los seres vivos ya que es el componente central de las flavocoenzimas FAD (Flavina Adenina Dinucleotido) y FMN (Flavina Mononucleotido), que participan en reacciones de la degradación oxidativa del piruvato, metabolismo de ácidos grasos, en metabolismo de aminoácidos y en el transporte de electrones. Además, participa en procesos como percepción de la luz (Briggs et al, 1999; Salomon et al, 2001; Vogl et al. 2007), fotoreparación de DNA, ciclos circadianos y luminiscencia bacteriana (Fischer et al. 2004). Como muchas otras vitaminas, es fotolábil y tiene la propiedad de fluorescer en luz uv. Los vertebrados carecen de las enzimas para sintetizarla, pero plantas y microorganismos lo hacen a partir de GTP y ribulosa 5 fosfato. Su estructura consiste en una cadena lateral ribitil ligada a un anillo aromático de isoaloxacina (fig. 1).

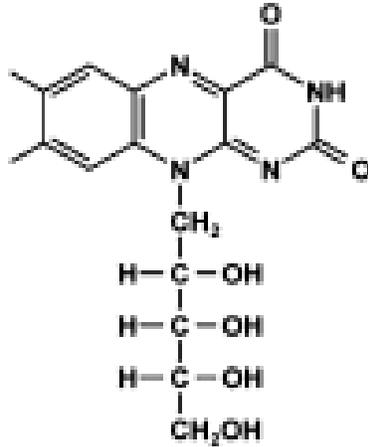


Fig. 1. Estructura de la riboflavina

I.2. Ruta de síntesis de la riboflavina

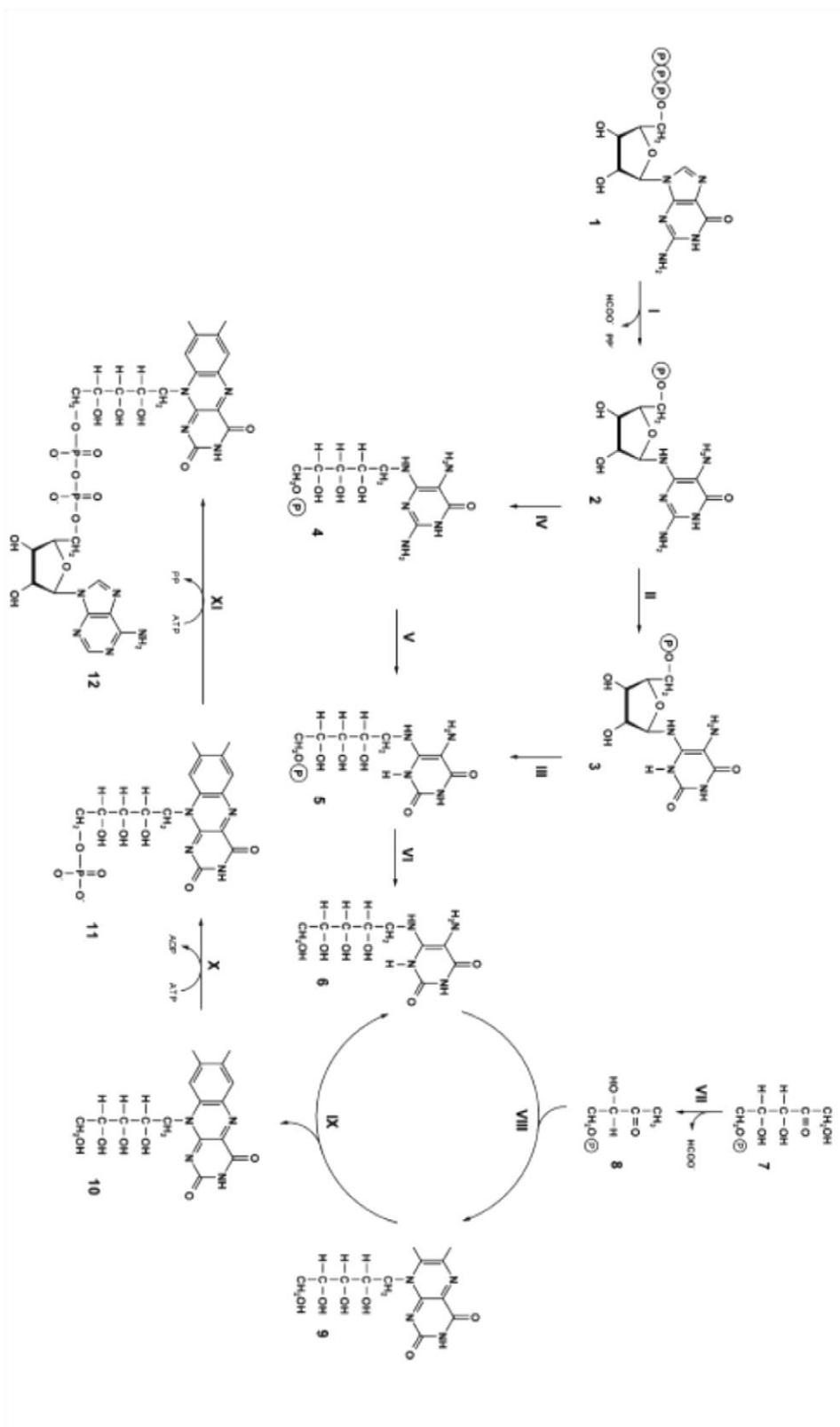
Debido a la complejidad de algunas reacciones, la ruta de biosíntesis de la riboflavina permanece sin ser entendida completamente, sin embargo, ha sido revisada repetidamente. A continuación se presentan los principales pasos de esta vía (fig. 2).

El primer paso de la ruta ocurre cuando el anillo imidazol del GTP se abre hidrolíticamente convirtiéndolo a 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona. Esta reacción es catalizada por GTP ciclohidrolasa II (ver I fig. 2). El producto, 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinediona 5-fosfato (ver 2 fig. 2) es convertido a 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona 5-fosfato (ver 3 fig. 2). La secuencia de estas reacciones varía en diferentes organismos. En levaduras y hongos, la reducción precede a la deaminación. Más específicamente, el primer intermediario 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3H)-pirimidinediona (ver 2 fig. 2), es reducido y después deaminado. En eubacterias y plantas, la deaminación precede a

la reducción de la cadena lateral. El fosfato 5 de 5-amino-6-ribitilamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona 5 fosfato no puede servir como sustrato para 6,7-dimetil-8-ribitil lumazin sintasa (ver VIII fig. 2), por lo tanto, el compuesto debe ser desfosforilado previo a su conversión. Aun se desconoce cómo es liberado el residuo fosfato en 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona 5 fosfato. Sin embargo, es claro que la desfosforilación es obligatoria para que ocurra la reacción catalizada por 6,7-dimetil-8-ribitil lumazin sintasa (ver VIII fig. 2), por la cual ocurre la condensación de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona desfosforilado con 3,4-dihidroxi-2-butanona 4 fosfato (ver 8 fig. 2) que es obtenido por una compleja secuencia de rearrreglo y eliminación a partir de ribulosa 5-fosfato (ver 7 fig. 2) que implica la pérdida del carbono 4 mediante un rearrreglo intramolecular, aunque hasta el momento este proceso sólo se conoce parcialmente. El paso final en la biosíntesis de riboflavina involucra una dismutación muy inusual. De manera más precisa, dos moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitil lumazina (ver 9 fig. 2) intercambian una unidad de 4 carbonos, de esta manera una de ellas se transforma en riboflavina y la otra en 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H, 3H)-pirimidinediona (ver 6 fig. 2). La reacción es catalizada por riboflavina sintasa (ver IX fig. 2). El segundo producto de la dismutación es reciclado en la ruta biosintética como sustrato para la lumazin sintasa. El anillo xileno de la riboflavina es generado a partir de dos equivalentes molares del carbohidrato precursor, 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (ver 8 fig. 2). Dado que solamente una unidad de cuatro carbonos puede ser condensada con 5-amino-6-ribitilamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona (ver 6 fig. 2) por lumazin sintasa, la reacción estequiométrica requiere que la unidad de cuatro carbonos sea expuesta dos veces a la acción catalítica de lumazin sintasa. De esta manera, la mitad de las moléculas GTP llevan a cabo la ruta completa hasta riboflavina (ver 10 fig. 2) en su primer paso. La otra mitad debe pasar

por, al menos, un ciclo adicional de consumo/regeneración bajo la influencia catalítica de lumazina sintasa y riboflavina sintasa. De hecho, una fracción de moléculas de pirimidina completará varios ciclos más de consumo/regeneración antes de alcanzar el nivel de riboflavina (Bacher et al., 2000; Fischer & Bacher, 2008). La riboflavina es fosforilada para dar lugar a Flavina Mononucleótido (FMN) por riboflavina cinasa (ver X fig. 2) y FMN subsecuentemente es convertido a Flavina adenina dinucleótido (FAD) por FAD sintetasa (ver XI fig. 2).

Fig. 2. Ruta de síntesis de la riboflavina y flavocoenzimas. **Enzimas:** I:GTP ciclohidrolasa II; II: 2,5-diamino-6-ribodilamino-4-(3H)-pirimidinona 5 fosfato deaminasa; III: 5-amino-6-ribosilamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona 5 fosfato reductasa; IV: 2,5-diamino-6-ribodilamino-4-(3H)-pirimidinona 5 fosfato reductasa; V: 2,5-diamino-6-ribitolamino-4-(3H)-pirimidinona 5 fosfato deaminasa; VI: fosfatasa hipotética; VII: 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa; VIII: 6,7-dimetil-8-ribitol lumazina sintasa; IX:riboflavina sintasa; X: riboflavina cinasa; XI: FAD sintetasa. **Intermediarios y precursores:** 1: GTP; 2: 2,5-diamino-6-ribosilamino-4-(3)-pirimidinona 5 fosfato; 3: 5-amino-6-ribosilamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona 5 fosfato; 4: 2,5-diamino-6-ribitolamino-4-(3H)-pirimidinona 5 fosfato; 5: 5-amino-6-ribitolamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona 5 fosfato; 6: 5-amino-6-ribitolamino-2,4-(1H, 3H)-pirimidinediona; 7: ribulosa 5 fosfato; 8: 3,4-dihidroxi-2-butanona 4 fosfato; 9: 6,7-dimetil-8-ribitol lumazina; 10: riboflavina; 11: FMN; 12: FAD (Fischer & Bacher, 2008).



I.3. Interacciones entre plantas y bacterias rizosféricas

Simbiosis se refiere a cualquier asociación que se establezca entre organismos de distintas especies y de acuerdo al tipo de efecto que tienen sobre éstos se puede dividir en tres tipos: *comensalista*, que es aquella en la que uno de los participantes obtiene un beneficio sin afectar al otro; *parasítica*, en la cual uno de los implicados obtiene un beneficio causándole daño al otro y *mutualista*, en la cual los involucrados obtienen beneficios, directa o indirectamente. En cada tipo de interacción influye una gran cantidad de mecanismos en ambos organismos.

La rizósfera se refiere a los milímetros que circundan las raíces de las plantas por lo que las bacterias que se encuentran asociadas a ella son conocidas como rizobacterias. En esta zona ocurren complejos procesos biológicos que involucran distintos mecanismos de señalización concebidos como un diálogo molecular (Cooper, 2007), dinámico y recíproco, entre plantas y microorganismos.

Los exudados son todos los compuestos liberados por las plantas a través de sus raíces; representan una fuente de nutrientes para las bacterias que se encuentran en la rizósfera y activan genes microbianos responsables del reconocimiento e iniciación de interacciones simbióticas (Sullivan, 2004). A su vez, las bacterias liberan moléculas que les permiten interactuar con las plantas y con otras bacterias de esa comunidad.

1.3.1. El papel de los exudados en las interacciones de plantas con bacterias

Las raíces exudan un amplio rango de compuestos como azúcares, vitaminas, compuestos solubles en agua, aminoácidos, enzimas y reguladores del crecimiento vegetal; además, incluyen productos de lisis celular, paredes celulares, células de borde y gases como CO₂ y etileno (Sullivan, 2004). La liberación de estos compuestos genera un gradiente de concentración que influye en la presencia de poblaciones microbianas, que incrementa en las regiones más cercanas a las raíces (Sullivan, 2004); además, en los exudados se encuentran moléculas que inducen o reprimen la activación de genes bacterianos que están relacionados con metabolismo o simbiosis.

Los isoflavonoides, compuestos exudados por las leguminosas, son conocidos por activar los genes *nod* en bacterias rizosféricas. En ocasiones, esta activación ocurre de forma especie-específica como en el caso de la soya (*Glycine max*), y sus bacteria asociada *Bradyrhizobium japonicum*. La soya libera daidzeina y genisteina, flavonoides que inducen los genes *nod* de *B. japonicum* y que son necesarios para la formación de nódulos donde ocurre fijación biológica de nitrógeno, pero al mismo tiempo inhiben la expresión de estos mismos genes en *Sinorhizobium meliloti* (Bais, 2006). Además de inducir expresión de los genes *nod*, los flavonoides activan genes de quimiotaxis (Bais, 2006).

En concentraciones entre 10⁻² a 10⁻³, algunos aminoácidos liberados por las raíces como glutamina, treonina, serina y arginina atraen a *Pseudomonas lachrymans* y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias que también se asocian a plantas (Overbeek & Elsas, 1994). Exudados de trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*) y pasto (*Lolium perenne*), inducen

actividad β -galactosidasa en mutantes de *P. aeruginosa* que contienen *lacZ* como gen reportero (Overbeek, 1995).

1.3.2. Moléculas de quorum sensing liberadas por las plantas

El Quorum Sensing es un mecanismo de señalización intercelular que permite la comunicación entre bacterias de la misma o de diferentes especies. Para que este evento ocurra, las bacterias involucradas sintetizan y excretan ciertas moléculas que se van acumulando en el medio hasta que alcanzan un umbral para que las otras bacterias reconozcan la molécula como una señal. Esto induce la expresión de genes que pueden estar implicados en virulencia, formación de biopelículas o simbiosis. Las plantas son capaces de secretar compuestos semejantes a señales de Quorum sensing, lo que les permite manipular la expresión de genes en bacterias que son regulados mediante este mecanismo (Rajamani, 2008).

El lumicromo, producto derivado de la riboflavina, es capaz de estimular al receptor LasR de *P. aeruginosa*, el cual está involucrado en eventos de Quorum sensing. Este receptor reconoce N-3-oxo-dodecanoil homoserin lactona, una molécula señal involucrada en eventos de quorum sensing (Rajamani, 2008).

I.3.3. Moléculas liberadas por rizobacterias, involucradas en la interacción con plantas

El pensamiento predominante es que las plantas ejercen control sobre las comunidades microbianas que se encuentran en la rizósfera, pero hoy en día algunos investigadores exploran la idea de que la comunidad microbiana es la que conduce la estructura y dinámica de la comunidad vegetal (Sullivan, 2004). Aunque este concepto no ha sido demostrado, es indudable que las rizobacterias y las plantas interactúan dando forma a la comunidad. Las bacterias influyen en el desarrollo en las plantas mediante la liberación de moléculas que funcionan como reguladores de crecimiento vegetal, entre los que se encuentran citocininas, ácido indolacético (Lidstrom & Chistoserdova, 2002) o factores de nodulación como lipoquilo-oligosacáridos (López-Lara, 1995) y en 2004 Phillips reportó que la exudación de aminoácidos por las raíces es influenciada por la presencia de bacterias de la rizósfera. El eflujo de aminoácidos ocurre pasivamente debido a una diferencia de concentración entre el interior (10 mM) y exterior (0.1-10 μ M) de las células de la raíz, mientras que el influjo ocurre mediante bombas de protones. La idea es que las plantas compiten con las bacterias de la rizósfera para recuperar los aminoácidos liberados, pero en ausencia de microorganismos, el nivel de influjo de 16 aminoácidos excede el de eflujo entre 5% y 545% en *Medicago truncatula*, alfalfa (*Medicago sativum*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*). Además, estas 4 especies vegetales son sensibles a compuestos de origen microbiano que incrementan el eflujo de aminoácidos (Phillips et al., 2004). El lumicromo, producto de degradación de la riboflavina por la luz, promueve el desarrollo de soya (*Glycine max*), sorgo y maíz (*Zea mays*) cuando es añadido en concentraciones entre 5 y 50 nM (Dakora, 2204).

II. ANTECEDENTES

II.1. Participación de la riboflavina en interacciones simbióticas

Se ha observado que la riboflavina sintetizada por bacterias está involucrada en interacciones simbióticas mutualistas entre éstas y sus hospederos eucariotas, aunque no se conoce con precisión cuál es el papel que juega en el proceso.

II.1.2. Participación de la riboflavina en interacciones con plantas

La excreción de riboflavina por la mayoría de las rizobacterias sugiere que esta molécula tiene un papel significativo en las interacciones entre plantas y bacterias, por ejemplo, cepas de *Sinorhizobium meliloti*, modificadas genéticamente para sobreproducirla colonizan más las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*), en comparación con la cepa silvestre (Phillips et al., 2002). También está asociada con la efectividad de la simbiosis de *Rhizobium trifolii* con trébol (*Trifolium pratense* y *T. repens*), ya que mutantes auxótrofos de riboflavina forman nódulos, pero en éstos no ocurre fijación de nitrógeno (Pankhurst et al., 1974).

La inoculación de trébol (*T. repens*), con una variante de *Pseudomonas fluorescens* más *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24.1, auxótrofas de vitaminas del complejo B, resultó en un decremento en los parámetros simbióticos en comparación con la inoculación de la cepa silvestre de *P. fluorescens* más *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 24.1 (Marek-Kozaczuk y Skorupska, 2001).

II.1.3. Participación de la riboflavina en interacciones con animales

Por muchos años se ha reconocido que varios grupos de bacterias del intestino sintetizan vitaminas que su hospedero eucarionte aprovecha. Aunque las bacterias contienen una cantidad considerable de flavocoenzimas, la síntesis de riboflavina puede exceder la cantidad necesaria para esas proteínas (McCormick, 1989 en Phillips, 2001). En *Escherichia coli*, la proporción de riboflavina entre el interior y el exterior de la célula varía entre 0.8 y 8.0, valor mucho mayor que para otros metabolitos como aminoácidos que es de 0.01 (Wilson y Pardee, 1962 en Phillips, 2001). Posiblemente, este exceso de riboflavina beneficia a sus hospederos humanos.

También se ha observado que roedores libres de bacterias requieren que su alimento sea suplementado con vitaminas del grupo B en cantidades mucho mayores que sus contrapartes que sí poseen bacterias (Hooper, 2002). Esto sugiere que las bacterias proveen de vitaminas a sus hospederos.

En 1999, Nakabachi e Ishikawa, reportaron que la bacteria endosimbionte *Buchnera* provee de riboflavina a su hospedero, el áfido *Acyrtosiphon pisum*. Se generaron áfidos aposimbióticos, es decir, sin bacterias simbiotas y fueron alimentados con dietas sintéticas que estaban o no adicionadas con riboflavina. Después de 27 días, su peso corporal fue comparado con el de áfidos simbióticos, es decir, que sí tenían bacterias endosimbiontes. Se observó que los áfidos simbióticos alimentados con dietas sin riboflavina eran significativamente más pesados que los áfidos simbióticos y áfidos aposimbióticos alimentados con dietas adicionadas con la vitamina. Los áfidos aposimbióticos alimentados con dietas sin

riboflavina no sobrevivieron. Estos resultados sugieren que los áfidos son provistos con suficiente riboflavina por sus bacterias endosimbiontes.

II.2. Participación de la riboflavina en la obtención de hierro

El hierro es un factor limitante para el crecimiento de las bacterias que viven en el suelo ya que la mayoría de las veces se encuentra en su forma insoluble no reducida Fe^{3+} , por lo que su obtención involucra la reducción a Fe^{2+} soluble mediante la acción de enzimas reductasas; se ha propuesto que las flavocoenzimas actúan como donadoras de electrones en este proceso (Crossley, 2007). La capacidad para adquirir hierro contribuye en el éxito de la colonización de bacterias patógenas. En *Helicobacter pylori*, patógeno de humanos, aumenta la producción de riboflavina cuando la disponibilidad de hierro es limitada (Worst, 1998), y en *Campylobacter jejuni*, la síntesis es regulada por una caja FUR (del inglés Fe uptake regulator), lo indica la relación entre estas moléculas.

III. OBJETIVOS

Determinar si bacterias asociadas a plantas excretan riboflavina en vida libre y en rizósfera y si existen diferencias en relación a estas condiciones.

Determinar si *A. thaliana*, *Medicago truncatula*, *Oryzae sativa* y *Oryzae indica* excretan riboflavina en sus exudados cuando no son inoculadas.

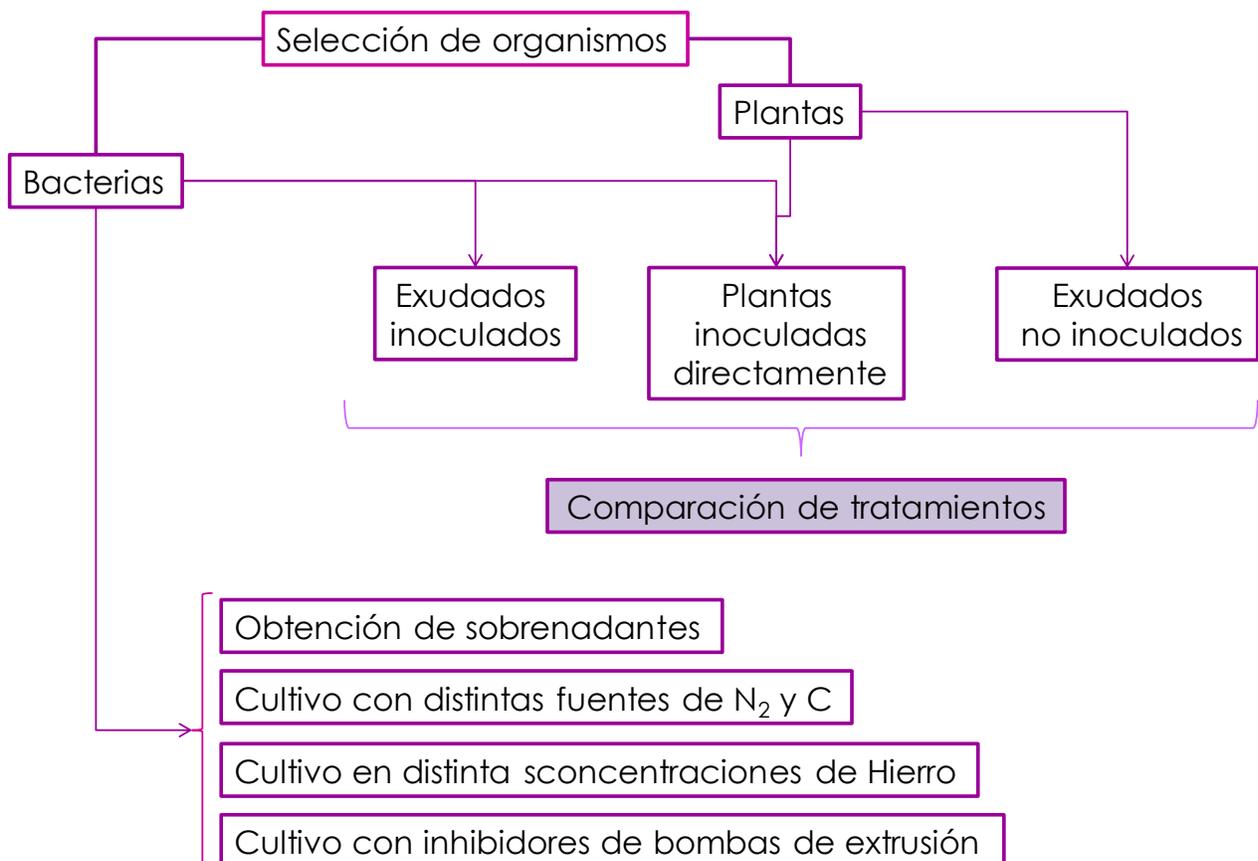
Conocer si la riboflavina excretada por las bacterias participa en la interacción con la planta.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Determinar presencia de riboflavina en los exudados de *A. thaliana*, *M. truncatula*, *Oryzae indica*, *Oryzae sativa* mediante cromatografía de capa fina (del inglés Thin Layer Chromatography- TLC).
2. Obtener exudados de *A. thaliana*, *M. truncatula*, *Oryzae indica*, *Oryzae sativa* e inocularlos y determinar diferencias con tratamientos no inoculados.
3. Inocular directamente *A. thaliana*, *M. truncatula*, *Oryzae indica*, *Oryzae sativa* para comparar con los tratamientos anteriores y determinar diferencias.

4. Cultivar a las bacterias en medios adicionados con distintos compuestos de carbono y nitrógeno, con el fin de conocer su capacidad para sintetizar riboflavina a partir de diferentes fuentes.
5. Cultivar a las bacterias en medios con diferentes concentraciones de hierro para conocer el efecto de éste en la síntesis y excreción de riboflavina.
6. Cultivar a las bacterias en medios adicionados con reserpina, un inhibidor de bombas de extrusión, para inferir posibles transportadores de la riboflavina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



V. HIPÓTESIS

Las bacterias son capaces de excretar riboflavina en vida libre y en presencia de planta, pero existen diferencias entre estas condiciones debidas a la influencia de la planta por la relación simbiótica que mantienen estos organismos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Bacterias utilizadas

Las especies bacterianas utilizadas se encuentran enlistadas abajo. Las cepas de *Bacillus*, *Lactobacterium*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, se cultivaron en cajas petri que contenían PY (Peptona- extracto de levadura). Dicho medio contenía (por litro): 5 g de peptona de caseína; 3 g de extracto de levadura; 1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En algunas ocasiones, las cepas de *Methylobacterium* se cultivaron en medio Agar-peptona- Metanol, el cual contiene (por litro): 15 g de agar; 10 g de peptona; metanol 50 mM.

Las cepas de Lactobacterias y *Lactococcus* fueron provistas por la Dra. Carmen Wachter del Departamento de Biotecnología y Alimentos de Facultad de Química, UNAM.

Tabla 1. Cepas utilizadas

Especie	Origen
<i>Bacillus</i> sp. CCGE 2311	Endófito de maíz
<i>Bacillus thuringensis</i> JM1A	Endófito de maíz
<i>Lactococcus lactis</i> SnC23	Muestra de pozol
<i>Lactobacterium plantarum</i> L39	Aislada de clavel

<i>Methylobacterium extorquens</i> am1	Rizósfera de arroz
<i>Methylobacterium fujisawense</i>	Rizósfera de arroz
<i>Methylobacterium medicae</i> SKL10	Endófito de <i>M. truncatula</i>
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Aislada de soya
<i>Methylobacterium oryzae</i>	Rizósfera de arroz
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	Aislada de <i>Oryzae sativa</i>
<i>Paenibacillus</i> sp. JM11-A	Endófito de maíz
<i>Rhizobium etli</i> Ch24-10	Endófito de maíz
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	Aislada de frijol
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Aislada de alfalfa

VI.2. Plantas utilizadas y esterilización de semillas

Especies vegetales utilizadas:

- *Arabidopsis thaliana*
- *Medicago truncatula*
- *Oryzae indica* IRRI
- *Oryzae sativa japonica*
- *Phaseolus vulgaris* (Negro Jamapa)
- *Zea mays*

Arabidopsis thaliana.

1. Colocar en agua estéril durante 15 minutos para hidratarlas
2. Dejar sedimentar. Vortexear rápidamente. Retirar agua
3. Colocar en etanol 70% durante 1 minuto. Retirar etanol y vortexear
4. Colocar en cloralex 50% durante 8 minutos. Retirar cloro
5. Enjuagar 5 veces con agua esterilizada
6. Enjuagar en tiosulfato de sodio al 2% 2 veces
7. Enjuagar en agua esterilizada 2 veces

Frijol, Maíz, Oryzae indica y Oryzae sativa.

Para *Oryzae spp.* se debe retirar previamente la sarcotesta.

1. Colocar en etanol durante 1 minuto. Retirar etanol
2. Colocar en cloro 25% durante 25 minutos. Retirar cloro
3. Si es necesario, retirar con pinzas estériles las semillas amarillas
4. Enjuagar con agua estéril 5 veces
5. Enjuagar con tiosulfato de sodio al 2%.
6. Enjuagar con agua estéril 2 veces

Medicago truncatula.

1. Colocar en H₂SO₄ concentrado durante 8 minutos. Escurrir
2. Enjuagar 5 veces
3. Colocar en cloro concentrado durante 2 minutos
4. Enjuagar en agua estéril 5 veces
5. Colocar en agua estéril y dejar en agitación durante 60 minutos
6. Colocar en cloro 10% durante 30 segundos
7. Enjuagar con agua estéril 5 veces
8. Enjuagar con tiosulfato de sodio al 2%.
9. Enjuagar con agua estéril 3 veces

VI.3. Inoculación directa de plantas

Una vez estériles, las semillas se colocaron en cajas petri que contenían medio agar-agua y se incubaron a 29°C en oscuridad durante 4 días. Los germinados se colocaron en condiciones hidropónicas con 5 ml de solución nutritiva para plantas Fahraeus. Una vez en este medio, las plantas fueron inoculadas con las cepas enlistadas en la tabla 2 a una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Se colocaron en oscuridad a 29 °C durante 24h. Transcurrido este tiempo se retiraron las plantas y la solución fue filtrada como se menciona anteriormente.

Tabla2. Cepas inoculadas en dos especies de plantas.

<i>Medicago truncatula</i>	<i>Oryzae indica</i>
<i>M. extorquens</i>	<i>Bacillus sp. CCGE 2311</i>

<i>M. fujisawense</i>	<i>Bacillus thuringensis</i> JM1-A
<i>M. medicae</i>	<i>M. mesophilicum</i>
<i>M. mesophilicum</i>	<i>M. oryzae</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>Paenibacillus</i> JM11-A
<i>M. radiotolerans</i>	<i>R. etli</i> CE3 pd-
<i>R. etli</i> Ch24-10	<i>R. etli</i> Ch24-10
<i>R. tropici</i> CIAT 899	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021

VI.4. Obtención e inoculación de exudados

Para obtener los exudados, semillas de las especies vegetales enlistadas previamente, se esterilizaron y colocaron en cajas petri que contenían medio agar-agua (7g agar/litro) e incubadas durante 4 días a 29 °C en oscuridad. Una vez germinadas se colocaron en condiciones hidropónicas durante 24h en 5ml solución nutritiva para plantas *Fahraeus* que contiene (por litro): CaCl₂ 10 ml; Fe 0.5, 1 ó 2 µl/ml; KH₂PO₄ 5ml; MgSO₄ 10 ml; NaHPO₄ 5ml; Trazas (H₃BO₃; MnSO₄; ZnSO₄; CuSO₄; H₂Mo₄) 1 ml. Transcurrido este tiempo se retiraron las plantas para obtener solo los exudados. Para evitar cualquier tipo de contaminación, la solución se filtró con MILLEX®GP (MILLIPORE) de 0.22 µm y en caso de ser necesario, almacenada en frío entre 4-8 °C.

Para conocer el efecto de distintos antibióticos en la excreción de riboflavina en plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Zea mays*, germinados de éstas se colocaron en condiciones hidropónicas en 5 ml de solución Fahraeus con los siguientes tratamientos: rifampicina 10 mg/L; ampicilina 30 mg/L ó rifampicina+ ampicilina 10 mg/L y 30 mg/L, respectivamente. Finalmente, se filtraron como se menciona en secciones anteriores.

Exudados de *Medicago truncatula* y *O. indica* se inocularon a una densidad óptica de 0.3 (600 nm) con las cepas enlistadas en la tabla 2. Posteriormente, se colocaron en condiciones de oscuridad, en agitación a 29°C durante 24h. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron y filtraron como se menciona en anteriormente.

VI.5. Cultivo de bacterias

VI.5.1. En medios con distintas fuentes de nitrógeno

Para evaluar la capacidad de las bacterias para producir y excretar riboflavina utilizando distintas fuentes de nitrógeno, se cultivaron a 29°C en agitación y condiciones de oscuridad durante 24h a una densidad óptica de 0.3 (600 nm). Como medio de cultivo se usaron 5ml de solución Fahraeus adicionada con sacarosa al 0.2% y alguno de los siguientes compuestos:

- Ácido glutámico 0.178 μ M
- Nitrato de amonio 0.1 mM
- Prolina 0.26 μ M

Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se filtraron como se menciona anteriormente.

VI.5.2. En medios con distintas fuentes de carbono

Para evaluar la capacidad de las bacterias para producir y excretar riboflavina utilizando distintas fuentes de carbono, se cultivaron a 29°C en agitación y en condiciones de oscuridad durante 24 horas, en 5 ml de solución Fahraeus adicionada con prolina 0.26 μ M (30 μ g/ml) como fuente de nitrógeno y alguno de los siguientes compuestos como fuente de carbono:

- Manitol 30 μ g/ml
- Metanol 50mM
- Glucosa 30 μ g/ml

Transcurridas 24h las muestras se centrifugaron y filtraron como se menciona anteriormente.

VI.5.3. En medios con distintas concentraciones de hierro

Con el fin de conocer la influencia del hierro en la excreción de riboflavina, bacterias de *Sinorhizobium meliloti* y *Methylobacterium mesophilicum* se cultivaron a 29°C en agitación y condiciones de oscuridad durante 24h. El medio utilizado fue 5 ml de solución Fahraeus

adicionada con prolina como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de carbono. Se realizaron distintos tratamientos con las siguientes concentraciones de hierro: sin Fe; 1.0265 μM ; 2.0413 μM ó 10.2065 μM .

Para obtener los sobrenadantes, las muestras se centrifugaron y filtraron como se menciona anteriormente y almacenadas en frío entre 4-8°C.

VI.5.4. En medio con inhibidores de bombas de extrusión

Se cultivaron bacterias de *M. mesophilicum* y *Sinorhizobium meliloti* en 5 ml de solución Fahraeus adicionada con reserpina disuelta en cloroformo en alguna de las siguientes concentraciones: 0 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ y cloroformo 20 $\mu\text{l/ml}$, éste último para descartar resultados falsos positivos.

VI.6. Asimilación de riboflavina excretada por *M. mesophilicum*

Para saber si otras bacterias toman la riboflavina excretada por *M. mesophilicum*, esta cepa fue cultivada en solución nutritiva Fahraeus adicionada con prolina y sacarosa como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. Se colocaron en condiciones de oscuridad y agitación a 29°C durante 24h. Se obtuvieron sobrenadantes como se menciona en secciones anteriores y se inocularon con las siguientes cepas:

1. *Bacillus* sp. CCGE 2311
2. *Lactococcus lactis* SnC23
3. *Lactobacterium plantarum* L39
4. *Paenibacillus* sp. JM11-A
5. *Rhizobium etli* Ch24-10

Una vez inoculados, se colocaron nuevamente en condiciones de oscuridad y agitación a 29°C durante 24h. Transcurrido este tiempo, centrifugaron y filtraron como se menciona anteriormente.

VI.7. Cromatografía en capa fina (TLC- Thin Layer Chromatography)

Una placa de TLC es una lámina de vidrio cubierta con una capa fina de un compuesto absorbente como sílica o aluminio. Una pequeña cantidad de la muestra que se quiere analizar es colocada cerca del final de la placa. Posteriormente, la placa es colocada dentro de una cámara que contiene una mezcla de solventes. Éstos, al entrar en contacto con la sílica, suben lentamente por la placa por acción capilar arrastrando y separando los componentes de la muestra (fig.3).

Una vez obtenidos los sobrenadantes y exudados, se prepararon para cromatografía en capa fina (TLC), eluyéndolos con columnas sep pack® cartridge (MILLPORE), que se encuentran unidas a una jeringa de 100 ml y un soporte (fig. 3). Estos cartuchos funcionan como un filtro que permite limpiar la muestra de los compuestos no deseados. El protocolo empleado comprende los siguientes pasos:

1. Pasar 10 ml de metanol a través del cartucho sep pack
2. Pasar 10 ml de agua filtrada estéril a través del cartucho (2 veces)
3. Descargar la muestra (sobrenadante o exudado) a través del cartucho
4. Pasar 10 ml de agua filtrada estéril
5. Eluir la muestra en 1.5 ml de metanol

Posteriormente, los eluidos se evaporaron por centrifugación en vacío con concentrator 5301® (Eppendorf) y almacenados a -20 °C para concentrarlos.

Este procedimiento fue realizado en condiciones de oscuridad.

Para llevar a cabo la cromatografía en capa fina se utilizaron placas TLC plate- silica gel de J.T. BAKER Inc. de 20x20 cm con poros de 250 µm. los eluidos previamente evaporados, se resuspendieron en 20 µl de metanol para cargarlas en la placa que posteriormente se colocó en una cámara para cromatografía con un sistema de solventes compuesto por cloroformo (17.5): metanol (12.5): agua (1.5) durante 40 a 60 minutos en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se retiró para secarla y finalmente, se observó en 2UV™ transilluminator UVP a 365 nm.

Se preparó un stock de Riboflavina (SIGMA, Aldrich) disuelta en metanol para usarlo como control en cada placa de TLC.

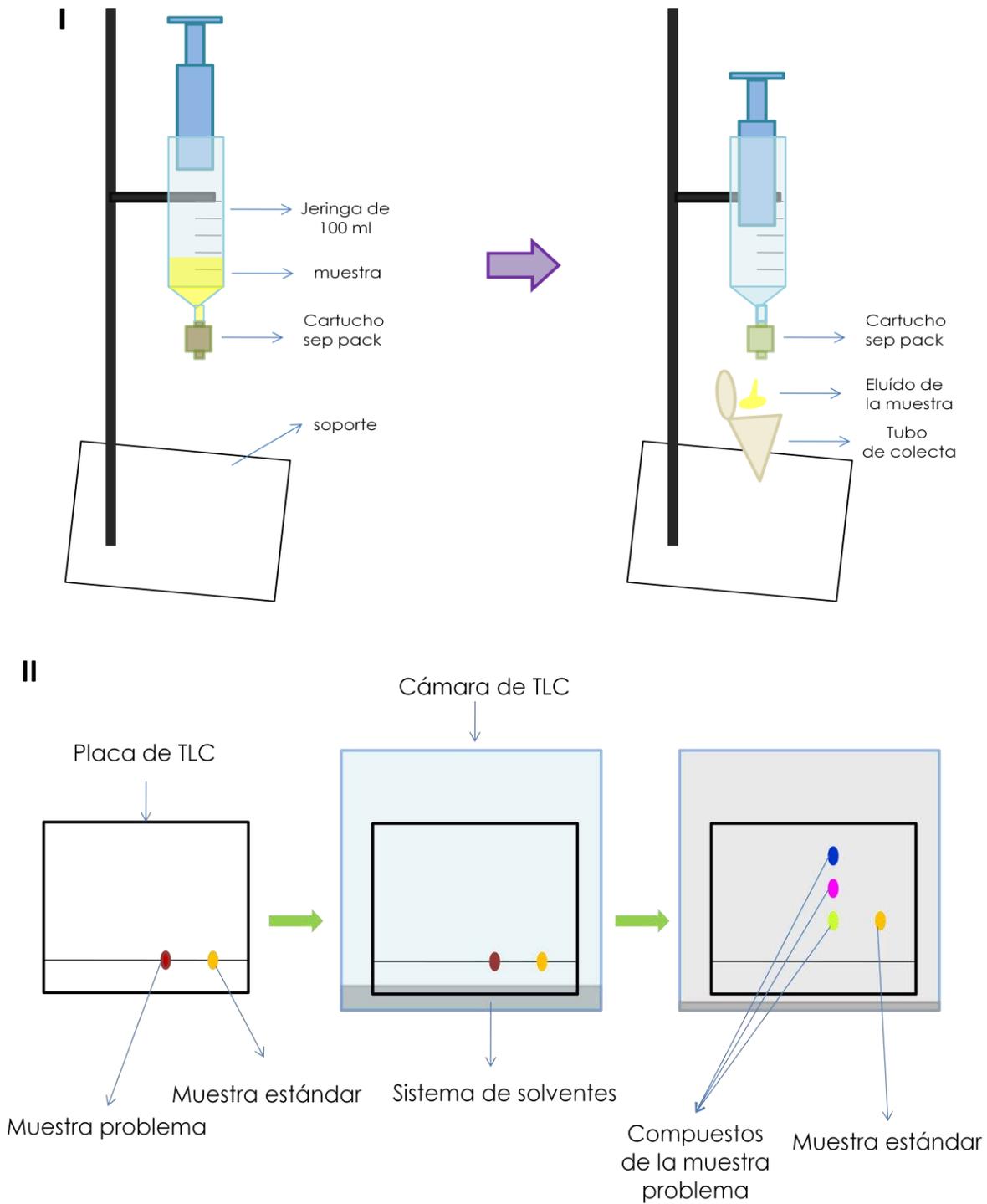


Fig. 3. Preparación de muestras y cromatografía en capa fina. I: Limpieza de las muestras con cartuchos sep pack; II: tratamiento de las muestras en TLC.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Presencia de riboflavina en exudados de diferentes especies

Se cree que cuando las plantas establecen interacciones con bacterias les proporcionan nutrientes como vitaminas y aminoácidos (Phillips et al., 2004), sin embargo, solo dos de las seis especies analizadas en este estudio excretan riboflavina en sus exudados, frijol (*Phaseolus vulgaris*), y maíz (*Zea mays*), mientras que las cuatro restantes, *A. thaliana*, *M. truncatula*, *O. indica* y *O. sativa* no lo hacen (fig. 4).

Tabla 3. Presencia de riboflavina en exudados de plantas. Presente: +; ausente: -.

Especie	Excreción
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-
<i>Medicago truncatula</i>	-
<i>Oryzae indica</i> IRRI	-
<i>Oryzae sativa japonica</i>	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	+
<i>Zea mays</i>	+



Fig. 4. Exudados de 1: *Medicago truncatula*; 2: *Medicago truncatula* inoculados con células muertas de *Methylobacterium medicae*; 3: *Oryzae indica*; 4: *Oryzae sativa*; 5: *Zea mays* (maíz); 6: *Phaseolus vulgaris* (frijol); control riboflavina 0.01%. La flecha roja indica la altura de la riboflavina en la placa.

Estos resultados sugieren que *A. thaliana*, *M. truncatula*, *O. indica* y *O. sativa* no proveen riboflavina a las bacterias, a pesar de asociarse a ellas.

VII. 2. Presencia de riboflavina en exudados de plantas cultivadas en medio adicionado con antibióticos

La mayoría de las plantas se encuentran asociadas a bacterias; aun en semillas esterilizadas de frijol se hallan bacterias endófitas, es decir, aquellas que se encuentran dentro de los tejidos de las plantas (López-López, resultados no publicados).

Con el fin de inhibir los endófitos para saber si aportan la vitamina de los exudados, se cultivó *Z. mays* y *P. vulgaris* en medio adicionado con antibiótico. No se apreció una disminución en la intensidad de la banda de riboflavina de los tratamientos respecto al control sin antibiótico (fig. 5). Es posible que la cantidad de riboflavina sintetizada por los endófitos sea poca en comparación con la sintetizada por la planta y que éstos no la aporten a los exudados.

Por otro lado, las bacterias que colonizan e interior de las plantas suelen ser resistentes a muchos compuestos y esto ocasionaría que no fueran afectadas por los antibióticos utilizados.

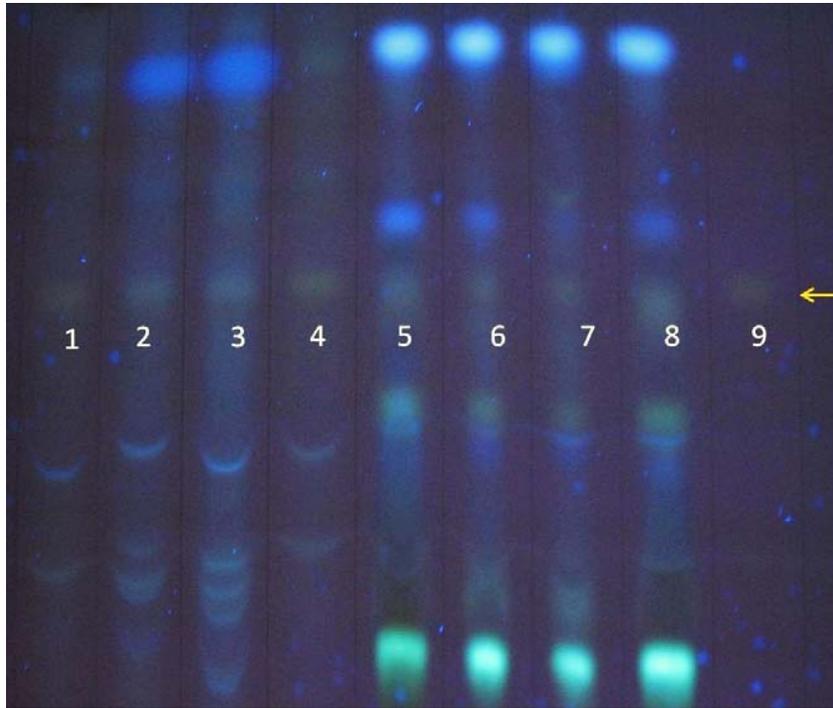


Fig. 5. Presencia de riboflavina en exudados de maíz y frijol cultivadas con antibióticos.1: maíz -rifampicina; 2: maíz - rifampicina + ampicilina; 3: maíz + ampicilina; 4: maíz sin antibiótico; 5: frijol-rifampicina +ampicilina; 6:frijol-rifampicina +ampicilina; 7: frijol-rifampicina; 8: frijol sin antibiótico; 9: control riboflavina. La flecha indica la altura de la de riboflavina en la placa.

VII.3. Presencia de riboflavina en plantas y exudados inoculados

Plantas inoculadas directamente

Hay riboflavina en exudados de *A. thaliana* *M. truncatula*, *O. indica*, *O. sativa* inoculadas directamente (ver tabla 4 y figs. 6, 7 y 8).

Tabla 4. Presencia de riboflavina en plantas inoculadas. Presente: •; ausente: °; no analizado: /.

Cepa	<i>M. truncatula</i>	<i>O. indica</i>	<i>O. sativa</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>M. extorquens</i> am1	•	/	/	/
<i>M. fujisawense</i>	•	/	/	/
<i>M. medicae</i> SKL10	•	/	/	/
<i>M. mesophilicum</i>	•	/	/	•
<i>M. Oryzae</i>	•	•	•	/
<i>M. radiotolerans</i>	•	/	/	/
<i>R. etli</i> Ch24-10	•	•	/	/
<i>R. tropici</i> CIAT 899	•	/	/	/
<i>S. meliloti</i> 1021	•	•	/	/
Sin inóculo	°	°	°	°



Fig. 6. Riboflavina en exudados de *O. indica* y *O. sativa* inoculadas directamente. (Izquierda) 1: *O. indica* inoculada con *M. oryzae*; 2: exudados de *O. indica* no inoculados; 3: riboflavina 5ng/ml. (Derecha) 1: *O. sativa* inoculada; 2: exudados de *O. sativa* no inoculados; 3: riboflavina 5ng/ml.



Fig. 7. Plantas de *M. truncatula* inoculadas con 1: *R. tropici* CIAT 899 put A; 2: sin inocular; 3: *R. etli* Ch24-10; 4: *R. tropici* CIAT 899; 5: *R. etli* Ch24-10; 6: control de riboflavina 0.1 %. La flecha indica la altura de la riboflavina en la placa.

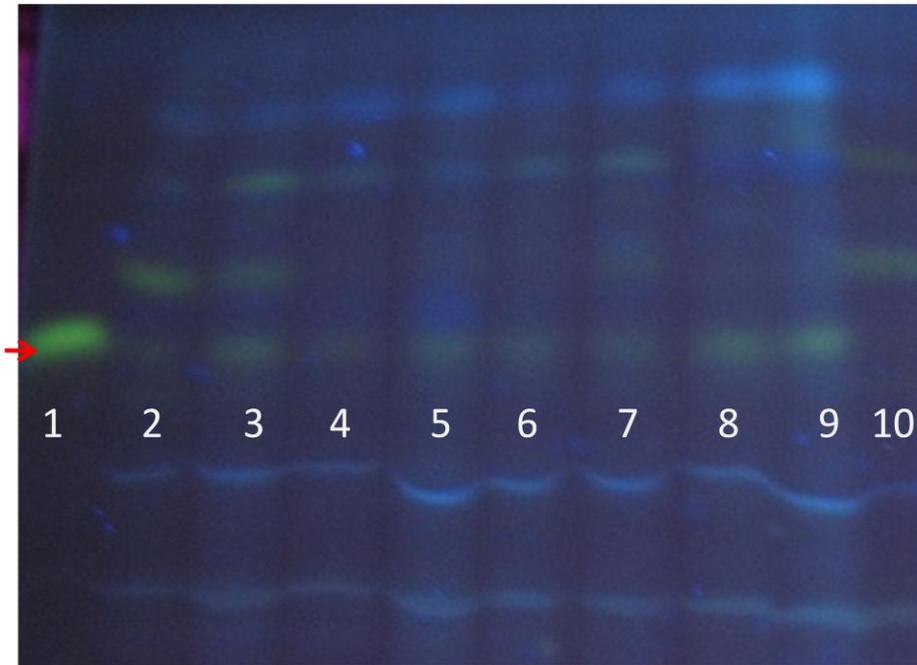


Fig. 8. Plantas de *M. truncatula* inoculadas. 1: riboflavina 10 ng/ml; inoculadas con: 2: *M. extorquens*; 3: *M. fujisawense*; 4: *M. medicae*; 5: *M. mesophilicum*; 6: *M. Oryzae*; 7: *M. radiotolerans*; 8 y 9: *R. etli* Ch24-10; 10: Planta sin inocular. La flecha indica el nivel de riboflavina en la placa.

Exudados inoculados

En los exudados de las plantas se pueden encontrar más de 100000 metabolitos (Salomon, 2004), lo que representa una fuente de azúcares y aminoácidos para las bacterias; todas las bacterias cultivadas en exudados de *O. indica* excretaron riboflavina, con excepción de *Paenibacillus* sp. JM11-A (fig. 11), lo que apunta a que las bacterias hallaron los nutrientes necesarios para su desarrollo en los exudados. Sin embargo, cuando *M. extorquens*, *M. fujisawense*, *M. medicae*, *M. oryzae* se cultivaron en exudados de *M. truncatula* disminuyeron notablemente la excreción en comparación con las demás especies (fig. 9).

Exudados de *M. truncatula* inoculados con células muertas de *M. mesophilicum* no presentaron riboflavina (fig. 4), lo que muestra que las bacterias efectivamente la excretan y descarta la posibilidad de que sea un producto de lisis celular

Tabla 5. Excreción de riboflavina en exudados. ●: excreta; ○: no excreta; /: no analizado.

Cepa	<i>M. truncatula</i>	<i>O. indica</i>	<i>O. sativa</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>Bacillus</i> sp. CCGE 2311	/	●	/	/
<i>B. thuringensis</i> JM1A	/	●	/	/
<i>L. lactis</i> SnC23	/	/	/	/
<i>L. plantarum</i> L39	/	/	/	/
<i>M. extorquens</i> am1	●	/	/	/
<i>M. fujiawense</i>	●	/	/	/
<i>M. medicae</i> SKL10	●	/	/	/
<i>M. mesophilicum</i>	●	/	/	●
<i>M. Oryzae</i>	●	●	●	/
<i>M. radiotolerans</i>	●	/	/	/
<i>Paenibacillus</i> sp. JM11-A	/	○	/	/
<i>R. etli</i> Ch24-10	●	●	/	/
<i>R. tropici</i> CIAT 899	●	/	/	/
<i>S. meliloti</i> 1021	●	●	/	/
Sin inóculo	○	○	○	○

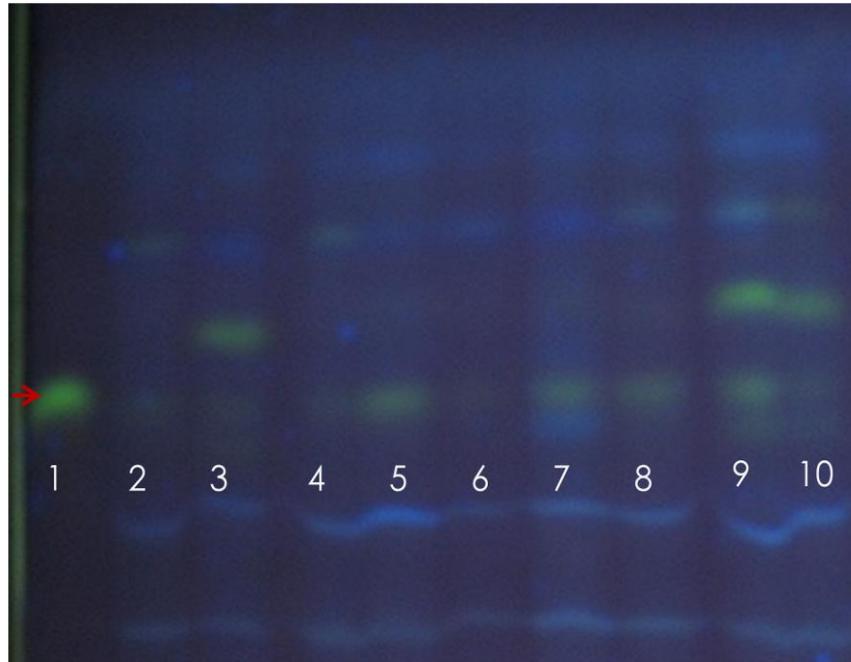


Fig. 9. Exudados de *M. truncatula* inoculados. 1: riboflavina 10 ng/ml; 2: *M. extorquens*; 3: *M. fujisawense*; 4: *M. medicae*; 5: *M. mesophilicum*; 6: *M. oryzae*; 7: *M. radiotolerans*; 8 y 9: *R. etli* Ch24-10; 10: exudados sin inocular.

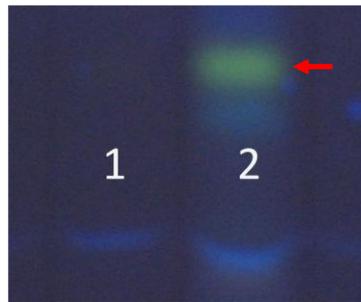


Fig. 10. Exudados de *M. truncatula* inoculados. 1: sin inóculo; 2: inoculados con *M. mesophilicum*. La flecha indica el nivel de riboflavina en la placa.

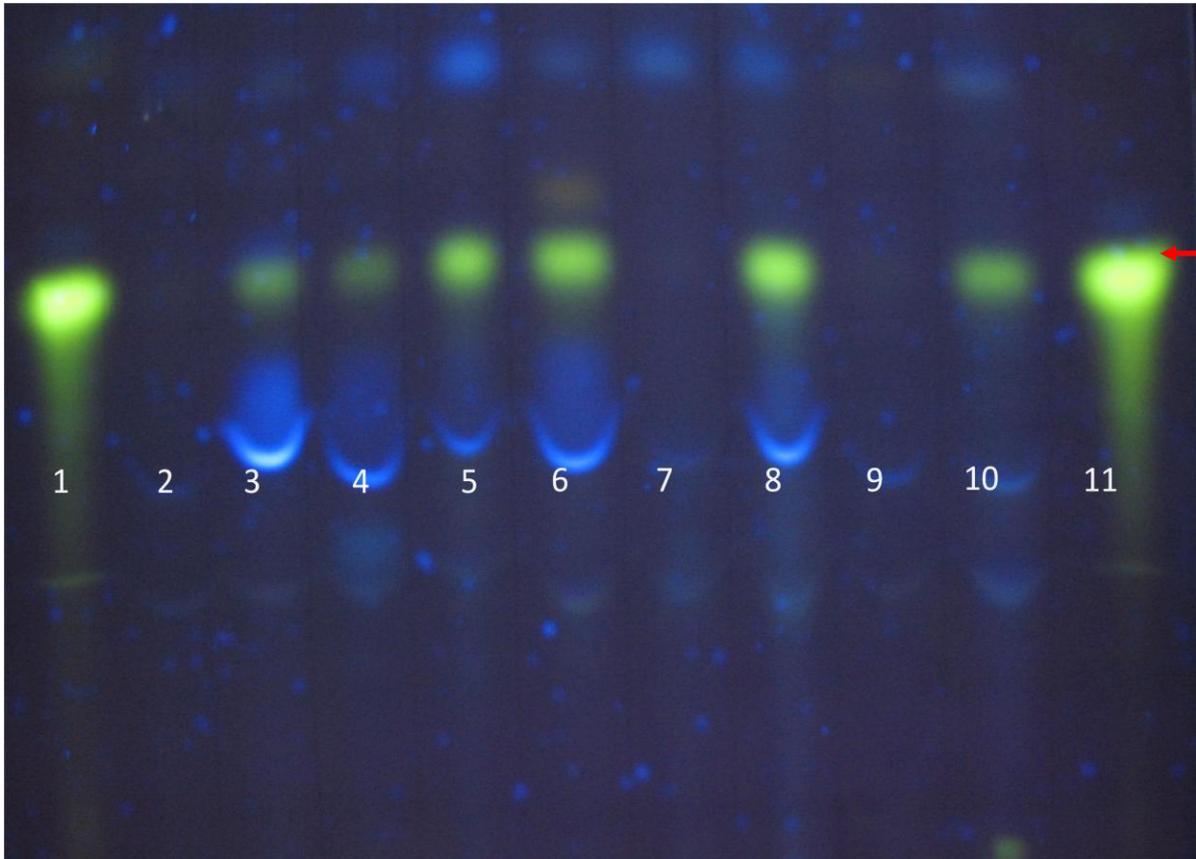


Fig. 11. Exudados de *O. indica* inoculados. 1: control de riboflavina 1μg/ml; 2: exudados sin inocular; exudados inoculados con: 3; *M. mesophilicum*; 4: *R. etli* Ch24-10; 5: *S. meliloti* 1021; 6: *Bacillus thuringensis* JM1-A; 7: *Paenibacillus* sp. JM11-A; 8: *Bacillus* sp. CCGE 2311; 9: sin inóculo; 10: *R. etli* CE3 pd-; 11: riboflavina 5μM.

A. thaliana, *M. truncatula*, *O. indica* y *O. sativa* no excretan riboflavina en sus exudados cuando no están inoculadas, lo que indica que al establecer interacciones con bacterias el aporte de la vitamina es realizado por estas últimas. Bacterias de la microbiota intestinal como *E. coli*, sintetizan riboflavina en niveles que sobrepasan los necesarios para su sobrevivencia y el excedente lo proporcionan a su hospedero (Phillips et al., 2002), de la misma manera, las bacterias podrían sintetizar más riboflavina de la que necesitan para proveer a las plantas y recibir un beneficio de forma indirecta.

Todas las bacterias examinadas en presencia de *M. truncatula* excretan riboflavina y las diferencias que se observan en los casos de *M. extorquens*, *M. fujisawense*, *M. medicae*, *M. oryzae* cuando son cultivadas en exudados revela que, a pesar de que encuentran los nutrientes requeridos para desarrollarse, es necesario que la planta esté presente para inducir la excreción de riboflavina (fig. 12). *M. truncatula* podría estar exudando un inductor para la síntesis y excreción de la vitamina, ya que al establecer interacciones, es común que las plantas excreten moléculas que son reconocidas por las bacterias y esto da lugar a procesos como la colonización de las raíces para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Bais, et al., 2006). También podría ocasionarlo de manera indirecta induciendo la excreción, esto da lugar a que las bacterias excreten más y esta riboflavina activa receptores de quorum sensing (Rajamani et al., 2008), activando genes relacionados con procesos de este tipo, algunos de los cuales se conocen por estar relacionados con simbiosis, por ejemplo la colonización (Sanchez-Contreras et al., 2007).

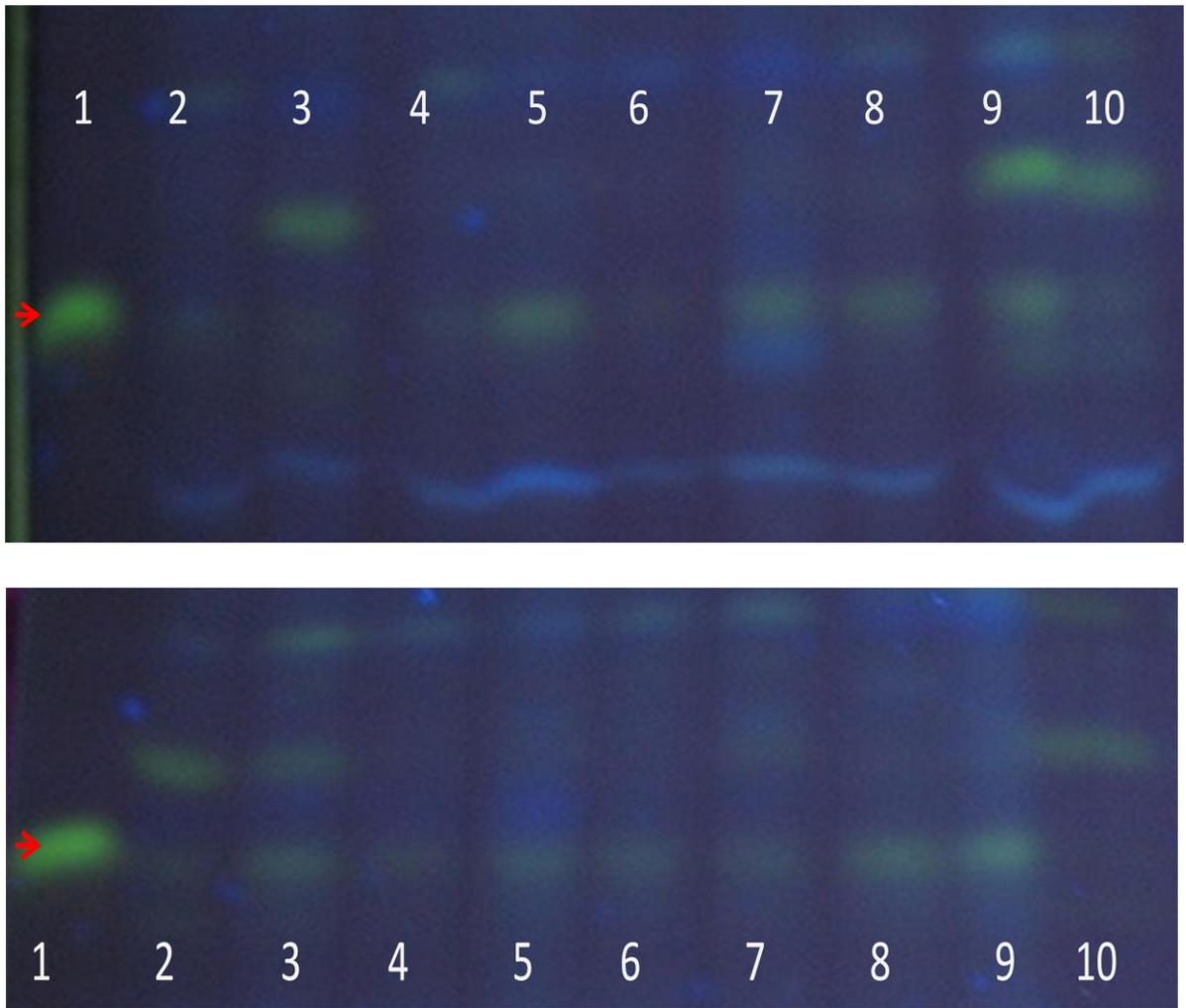


Fig. 12. **Arriba:** 1: riboflavina 10 ng/ml; exudados de *M. truncatula* inoculados con: 2: *M. extorquens*; 3: *M. fujisawense*; 4: *M. medicae*; 5: *M. mesophilicum*; 6: *M. oryzae*; 7: *M. radiotolerans*; 8 y 9: *R. etli* Ch24-10; 10: Exudados sin inocular. **Abajo:** 1: riboflavina 10 ng/ml; plantas de *M. truncatula* inoculadas con: 2: *M. extorquens*; 3: *M. fujisawense*; 4: *M. medicae*; 5: *M. mesophilicum*; 6: *M. oryzae*; 7: *M. radiotolerans*; 8 y 9: *R. etli* Ch24-10; 10: control sin inocular. La flecha indica las bandas de riboflavina.

VII.4. Presencia de riboflavina en sobrenadantes de bacterias cultivadas en medio mínimo

En los ensayos de excreción de riboflavina en medio mínimo se observó que todas las bacterias excretaron riboflavina siendo *Bacillus* sp. CCGE 2311 la que excretó más (ver tabla 4 y fig. 20).

Tabla 4. Excreción de riboflavina en solución Fahraeus. La intensidad de la banda de riboflavina se representa, de mayor a menor, con los siguientes

símbolos: ■ < ■ < □; /: No excreta

Cepa	Excreción	Cepa	Excreción
<i>Bacillus</i> sp. CCGE 2311	■	<i>M. medicae</i> SKL10	■
<i>B. thuringensis</i> JM1-A	■	<i>M. mesophilicum</i>	■
<i>L. lactis</i> SnC23	□	<i>M. Oryzae</i>	■
<i>L. plantarum</i> L39	■	<i>M. radiotolerans</i>	■
<i>M. extorquens</i> am1	□	<i>Paenibacillus</i> sp. JM11-A	/
<i>M. fujisawense</i>	□	<i>R. etli</i> Ch24-10	■

La capacidad de sintetizar riboflavina es común entre los microorganismos, sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos para excretarla; posiblemente *Paenibacillus* JM11-A carece de los transportadores necesarios o la cantidad que sintetiza es muy poca para ser detectada.

Los endófitos son más competentes para colonizar a las plantas; la capacidad de *Bacillus* sp. CCGE 2311 de excretar visiblemente más riboflavina que el resto de las bacterias evaluadas (fig. 20), explica la ventaja en este sentido y porqué fue aislado como endófito y respalda la relación de esta vitamina en dicho proceso.

VII.5. Presencia de riboflavina en sobrenadantes de bacterias cultivadas en medio con distintas fuentes de carbono y nitrógeno

Existen diferencias entre las cepas en relación a su capacidad para utilizar las fuentes de carbono y nitrógeno.

Aunque la mayoría utiliza las tres fuentes de nitrógeno hay diferencias en la intensidad de las bandas de riboflavina lo que sugiere que las cepas aprovechan mejor unas que otras (ver tabla 5), en algunos casos no se observó la vitamina como en *M. extorquens* cultivada con ácido glutámico o *M. oryzae* cultivada con nitrato de amonio (figs. 13 y 14). Si la bacteria no puede metabolizar el compuesto esto se convierte en un factor limitante para su crecimiento, lo que explica una baja en la población y como resultado menos riboflavina excretada al medio.

Las 5 especies de *Methylobacterium* analizadas son capaces de utilizar y excretar riboflavina con las 3 fuentes de carbono: glucosa, manitol y metanol, pero las bandas de *M. medicae* las más intensas, lo que indica

que aprovecha igual todos los compuestos probados; en otros casos, aprovechan mejor una de las fuentes como ocurre con *M. mesophilicum* +glucosa y *M. radiotolerans* +metanol.

R. etli, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Sinorhizobium* fueron probadas solo en medios adicionados con glucosa (ver tabla 5 y fig. 15).

Tabla 5. Excreción en medios con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono. •: Utiliza el compuesto; ◦: no utiliza el compuesto; /: condición no analizada.

Cepa	Ácido glutámico	Nitrato de amonio	Prolina	Glucosa	Manitol	Metanol
<i>Bacillus sp. CCGE 2311</i>	/	/	•	•	/	/
<i>B. thuringensis JM1A</i>	/	/	•	•	/	/
<i>L. lactis SnC23</i>	/	/	•	•	/	/
<i>L. plantarum L39</i>	/	/	•	•	/	/
<i>M. extorquens am1</i>	◦	•	•	•	/	/
<i>M. fujisawense</i>	•	•	•	•	•	•
<i>M. medicae SKL10</i>	•	•	•	•	•	•
<i>M. mesophilicum</i>	•	•	•	•	•	•
<i>M. oryzae</i>	◦	◦	•	•	•	•
<i>M. radiotolerans</i>	◦	•	•	•	•	•
<i>Paenibacillus sp. JM11-A</i>	/	/	•	•	/	/
<i>R. etli</i> Ch24-10	•	•	•	•	/	/
<i>S. meliloti</i> 1021	/	/	•	•	/	/

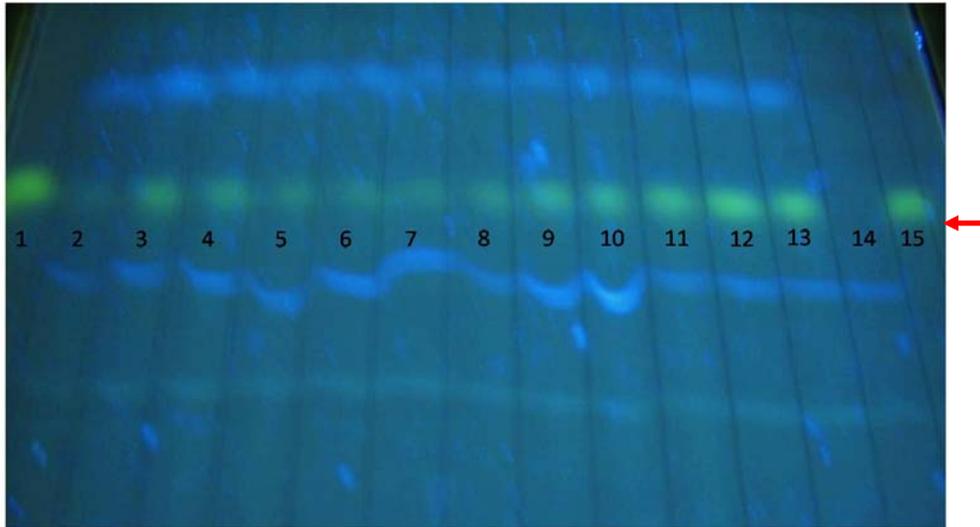


Fig. 13. Cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno. 1: riboflavina 5ng/ml; 2: *M. extorquens* +a. glutámico; 3: *M. extorquens* +n. amonio; 4: *M. extorquens* +prolina ; 5: *M. fujisawense* +a. glutámico; 6: *M. fujisawense* +n. amonio; 7: *M. fujisawense* +Prolina; 8: *M. medicae* +a. glutámico; 9: *M. medicae* +n. amonio; 10: *M. medicae* +Prolina; 11: *M. mesophilicum* +a. glutámico; 12: *M. mesophilicum* +n. amonio; 13: *M. mesophilicum* +Prolina; 14: Control sin inocular; 15: Riboflavina 2.5ng/ml

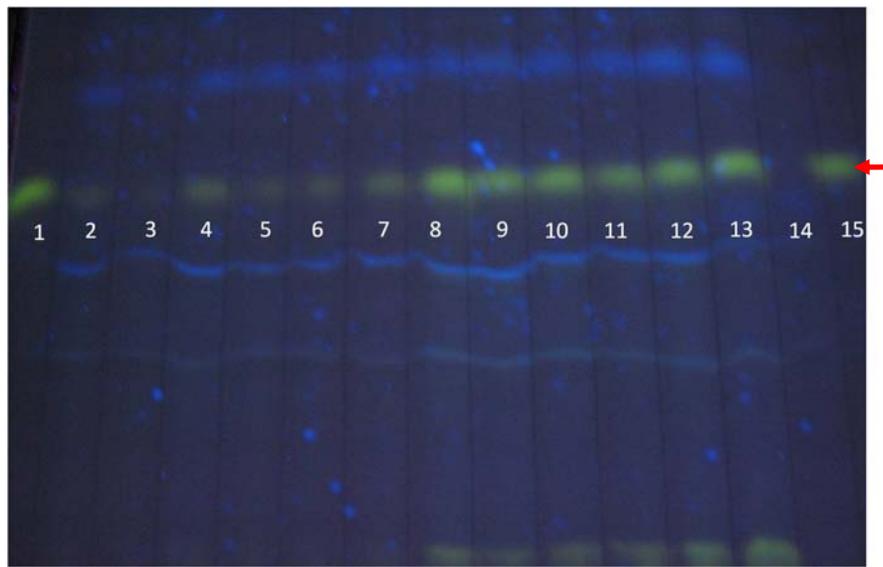


Fig. 14. Cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno. 1: riboflavina 5ng/ml; 2: *M. oryzae* +a. glutámico; 3: *M. oryzae* +n. amonio; 4: *M. oryzae* +Prolina; 5: *M. radiotolerans* +a. glutámico; 6: *M. radiotolerans*+ n. amonio; 7: *M. radiotolerans* +Prolina; 8 y 11: *Ch 24-10* +á. glutámico; 9 y 12: *Ch 24-10*+n. amonio; 10 y 13: *Ch24-10* +Prolina; 14: Control sin inocular; 15: riboflavina 5ng/ml.

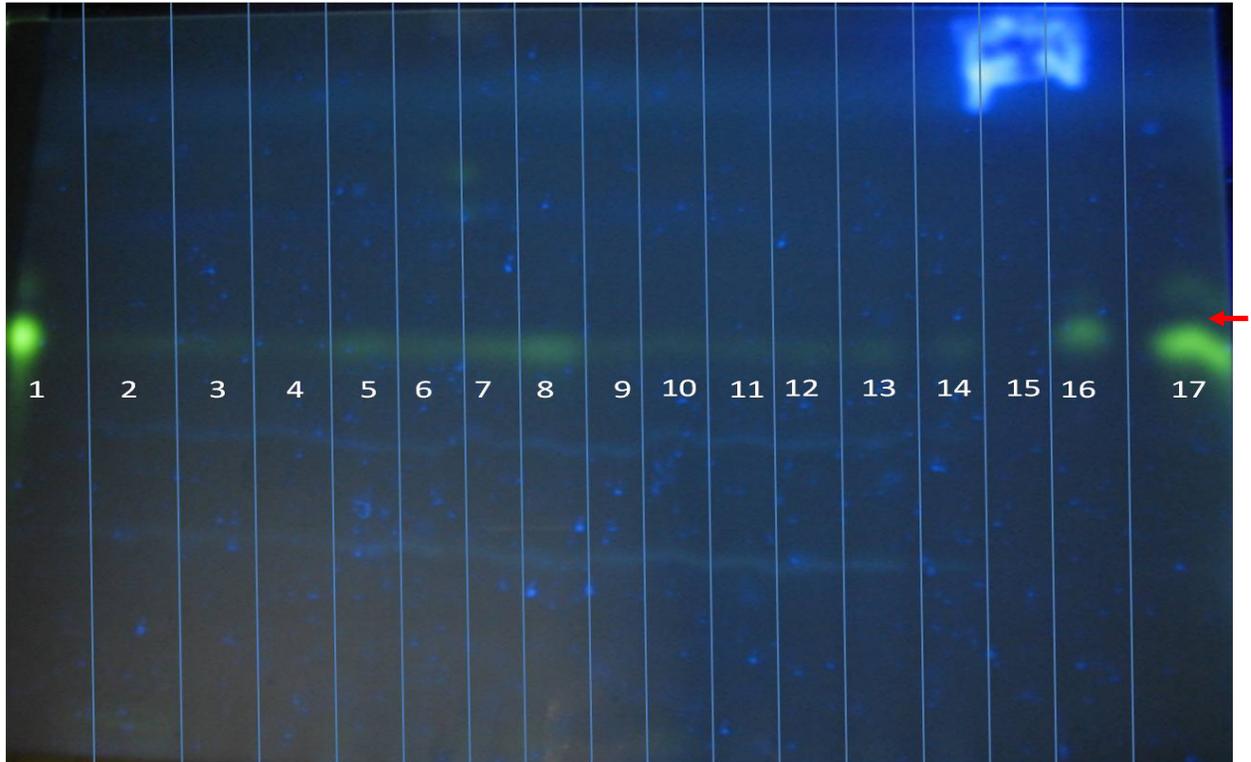


Fig. 15. Especies de *Methylobacterium* cultivadas en diferentes fuentes de carbono. 1: control de riboflavina 1%; 2: *M. fujisawense* + glucosa; 3: *M. fujisawense* + manitol; 4: *M. fujisawense* + metanol; 5: *M. medicae* + glucosa; 6: *M. medicae* + manitol; 7: *M. medicae* + metanol; 8: *M. mesophilicum* + glucosa; 9: *M. mesophilicum* + manitol; 10: *M. mesophilicum* + metanol; 11: *M. oryzae* + glucosa; 12: *M. oryzae* + manitol; 13: *M. oryzae* + metanol; 14: *M. radiotolerans* + glucosa; 15: *M. radiotolerans* + manitol; 16: *M. radiotolerans* + metanol; 17; control de riboflavina 0.01 %.

El suelo es un sistema muy complejo en el cual muchos nutrientes se encuentran en sus formas no reducidas o en complejos que las bacterias con incapaces de asimilar por lo que la capacidad que muestran para sintetizar y excretar riboflavina utilizando distintas fuentes de carbono y nitrógeno refleja la diversidad metabólica que poseen estos organismos.

VII.6. Efecto del hierro en la excreción de riboflavina

Patógenos como *H. pylori* y *C. jejuni*, quienes necesitan hierro para la colonización del intestino de mamíferos y aves, adquieren dicho metal por la acción de enzimas que reducen Fe^{3+} insoluble a Fe^{2+} soluble usando flavinas como donadoras de electrones (Velayudhan et al., 2000; Crossley et al., 2007). Debido a esto, la síntesis de riboflavina disminuye cuando aumenta la concentración de hierro, como ocurre con *M. mesophilicum* (fig. 17). Bacterias que establecen tipos distintos de simbiosis poseen mecanismos semejantes para interactuar con sus hospederos, por lo que, igual que *H. pylori* y *C. jejuni*, la riboflavina que excreta *M. mesophilicum* además de otras funciones, participa en la adquisición de hierro para la colonización.

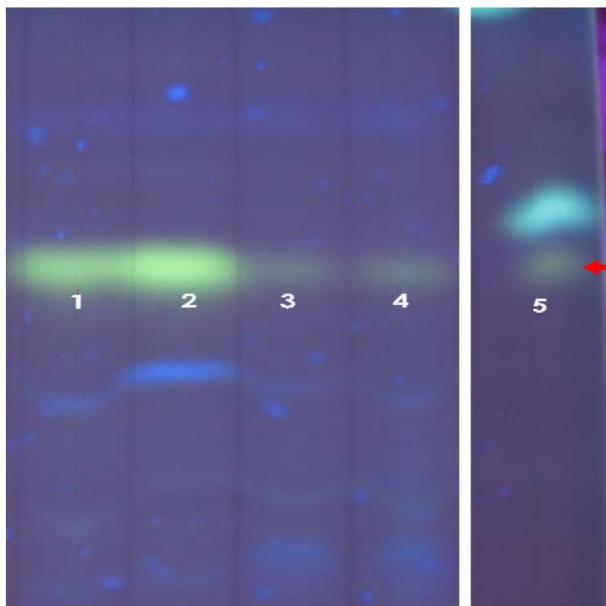


Fig. 16. *M. mesophilicum* en diferentes concentraciones de hierro. 1: Sin Fe; 2: Fe 1.0265 μM ; 3: 2.0413 μM ; 4: 10.2065 μM ; 5: riboflavina 10 ng/ml. La flecha indica la altura de la riboflavina en la placa.

VII.7. Efecto de la reserpina en la excreción de riboflavina

Aunque no se conocen con precisión los mecanismos mediante los cuales las bacterias excretan riboflavina, en otros organismos se ha demostrado la participación de transportadores transmembranales de la familia ABC (Herwaarden, et al., 2007), los cuales tienen un amplio rango de sustratos y pueden ser abolidos con inhibidores de bombas de extrusión. En el caso de *M. mesophilicum* sólo se observa una ligera disminución cuando es cultivada con un inhibidor de este tipo, reserpina (fig. 18).

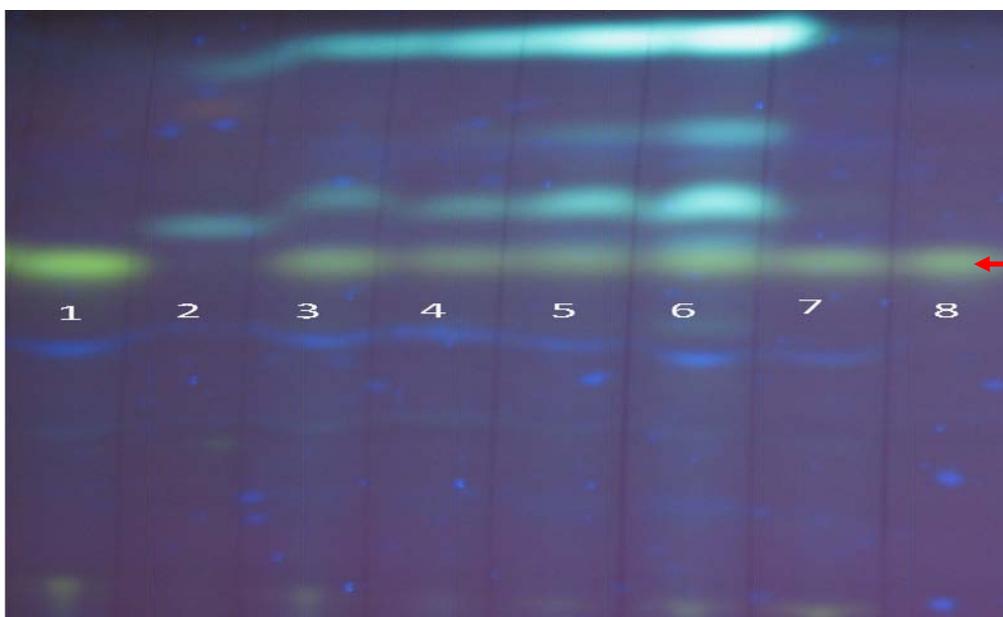


Fig. 18. *M. mesophilicum* cultivada en medios con reserpina. 1: sobrenadante de *M. mesophilicum*; 2: reserpina 1 µg/ml sin inóculo; 3: *M. mesophilicum* + reserpina 1 µg/ml; 4: *M. mesophilicum* + reserpina 2 µg/ml; 5: *M. mesophilicum* + reserpina 5 µg/ml; 6: *M. mesophilicum* + reserpina 20 µl/ml; 7: *M. mesophilicum* + cloroformo 20 µl/ml; 8: riboflavina 10 ng/ml. La flecha indica la altura de la riboflavina en la placa.

De la misma manera, la disminución en la excreción en *S. melloti*, no está en proporción a la concentración de reserpina.



Fig. 19. *S. melloti* cultivada en medios con reserpina. 1: sobrenadante de *S. melloti*; 2: *S. melloti* + reserpina 1 $\mu\text{g/ml}$; 3: *S. melloti* + reserpina 2 $\mu\text{g/ml}$; 4: *S. melloti* + reserpina 5 $\mu\text{g/ml}$; 5: *S. melloti* + reserpina 20 $\mu\text{g/ml}$; 6: reserpina 5 $\mu\text{g/ml}$; 7: *S. melloti* + cloroformo 20 $\mu\text{l/ml}$

Cuando sólo se adicionó cloroformo se observó la misma disminución que cuando las bacterias se cultivan con reserpina sugiriendo que es el solvente el que afecta la excreción de riboflavina en concentraciones mayores a 2 $\mu\text{g/ml}$. Otra causa puede ser que la reserpina sólo inhibe algunos de los transportadores, pero otros siguen funcionando, aunque la cantidad total de la vitamina excretada es menor; esto implica que los

transportadores de la vitamina no son de un solo tipo y por lo tanto, tampoco son específicos.

VII.8. Asimilación de riboflavina excretada por *M. mesophilicum*

Es común que cuando las bacterias tienen una fuente exógena de algún nutriente interrumpen la síntesis de éste para ahorrar energía; *L. lactis*, al percibir que existe riboflavina en el medio, detiene la excreción y consume la disponible, debido a lo cual no hay riboflavina cuando *L. lactis* es cultivada en sobrenadantes de *M. mesophilicum*.

Cuando *Bacillus* sp. CCGE 2311 y *L. plantarum* son cultivadas en sobrenadantes de *M. mesophilicum* la intensidad de la banda es la misma que la de los que no se inocularon (carriles 1, 2, 3 y 5 en fig. 20), este resultado muestra que no consumen la riboflavina excretada por *M. mesophilicum*.

Bacillus sp. CCGE 2311, además de no consumir la riboflavina de *M. mesophilicum*, excreta más cuando no es cultivada en sobrenadantes, lo que refleja que detiene la excreción. En comportamientos regulados por quorum sensing, al percibir que son suficientes, las bacterias suspenden la síntesis de las moléculas señal e inician procesos como colonización y virulencia; si la riboflavina funciona como una señal de este tipo es posible que *Bacillus* sp. CCGE 2311 detenga la síntesis porque ha percibido la excretada por *M. mesophilicum*.

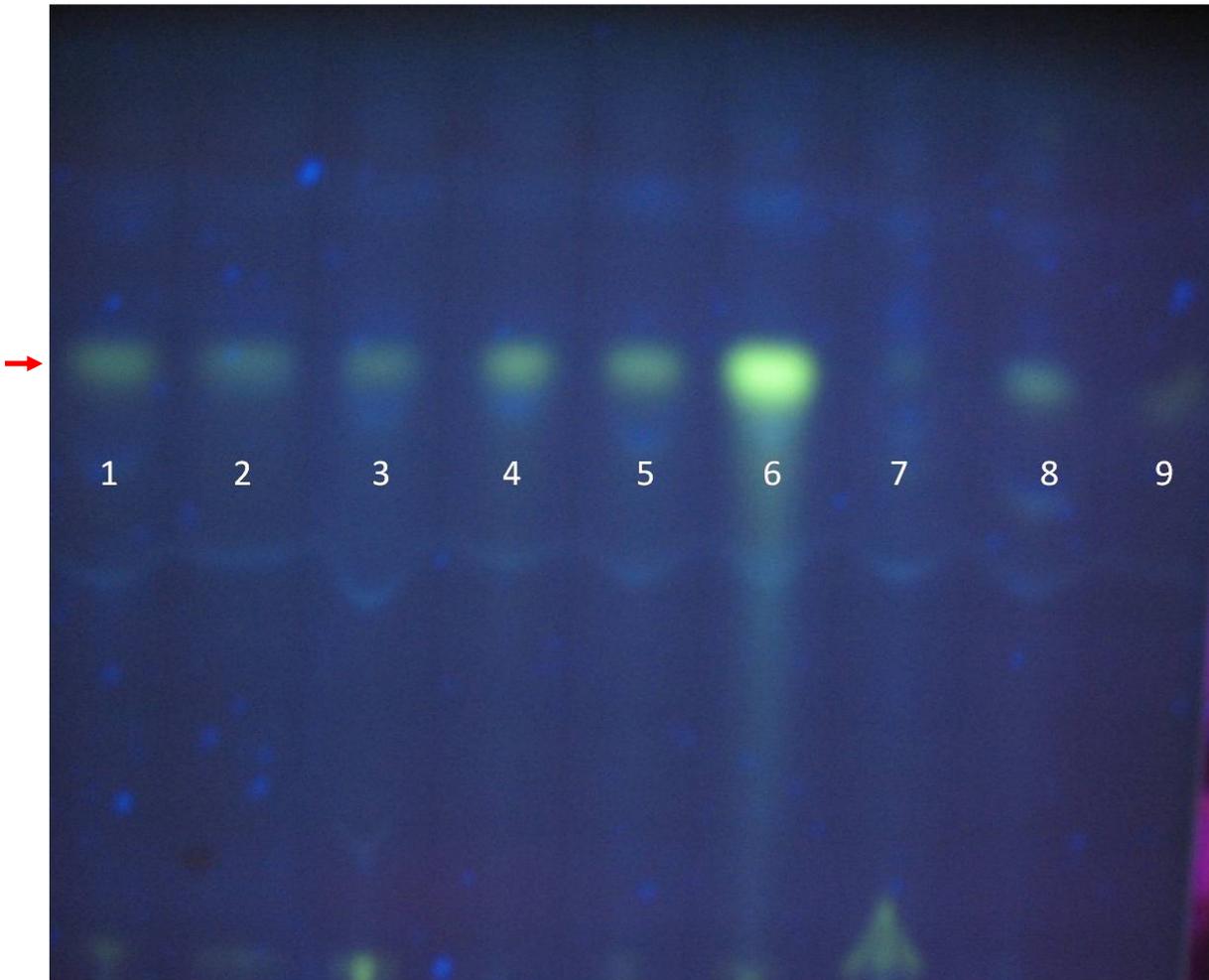


Fig. 20. Bacterias cultivadas en sobrenadantes de *M. mesophilicum*. 1 y 2: sobrenadantes *M. mesophilicum*; 3: *L. plantarum* en sobrenadantes de *M. mesophilicum*; 4: sobrenadantes *L. plantarum*; 5: *Bacillus* sp. CCGE 2311 en sobrenadantes de *M. mesophilicum*; 6: sobrenadantes *Bacillus* sp. CCGE; 7: *L. lactis* en sobrenadantes de *M. mesophilicum*; 8: sobrenadantes *L. lactis*; 9: riboflavina 5 ng/ml. La flecha indica la altura de la riboflavina en la placa.

VII.9. Determinación del compuesto mediante el factor de retención

La cromatografía en capa fina, además de permitir determinar cuántos compuestos contiene una muestra, es un procedimiento útil para confirmar la identidad de éstos en base a su factor de retención, el cual se define como la distancia que recorre sobre la placa dividida entre la distancia que recorre el solvente (fig. 21); este valor es comparado con el factor de retención de un estándar que es analizada en la misma placa bajo las mismas condiciones que la muestra problema. Si los valores de los factores de retención son los mismos se puede decir que se trata del mismo compuesto.

El valor se determina según la siguiente fórmula:

$R_f = \text{distancia que recorre el compuesto} / \text{distancia que recorre el solvente}$

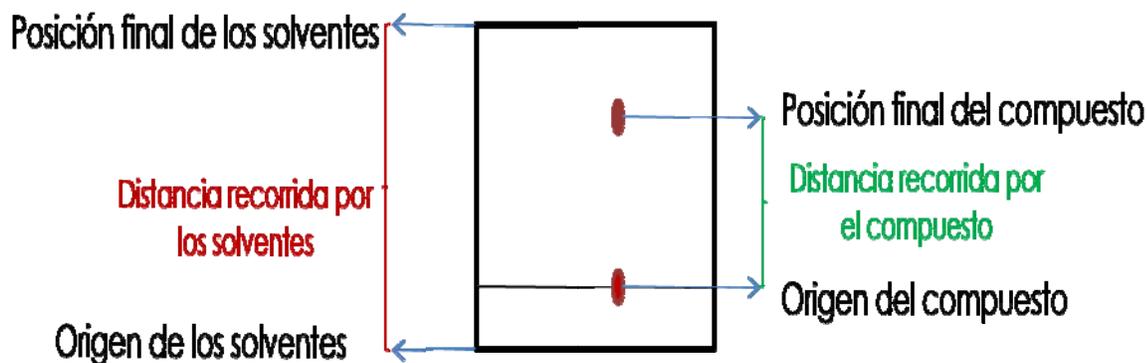


Fig. 21. Distancias recorridas por muestras y solventes en una placa de TLC.

El valor del factor de retención del estándar de riboflavina y de las muestras fue igual en todos los ensayos de TLC.

VIII. CONCLUSIONES

El compuesto amarillo fluorescente observado en las placas de TLC es riboflavina, dado que el valor del factor de retención del estándar y de éste fue igual en todos los ensayos.

Las plantas de las especies *A. thaliana*, *M. truncatula*, *O. indica* y *O. sativa* no excretan riboflavina cuando no están inoculadas, por lo tanto, es posible que no al establecer interacciones con bacterias la vitamina de los exudados sea aportada por estas últimas.

Los exudados de *M. truncatula*, a pesar de ser una fuente de nutrientes que permite el desarrollo de las bacterias, no inducen la excreción de riboflavina en bacterias de las especies *M. extorquens*, *M. fujisawense*, *M. medicae*, *M. oryzae*.

La presencia de *M. truncatula* induce la síntesis y excreción de riboflavina en las especies evaluadas de *Methylobacterium*.

Las bacterias poseen una amplia capacidad metabólica ya que sintetizan y excretan riboflavina utilizando distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

El hierro es un factor determinante para el metabolismo de riboflavina, ya que se observa que a mayor concentración de éste en el medio, menor excreción de riboflavina por las bacterias.

La reserpina no detiene totalmente la excreción de riboflavina, lo que sugiere que existen otros tipos de transportadores que la conducen fuera de la bacteria, además de los que son inhabilitados por inhibidores de bombas de extrusión.

Bacterias que establecen tipos distintos de simbiosis poseen mecanismos semejantes para interactuar con sus hospederos; la riboflavina que excreta *M. mesophilicum* podría participar en la colonización como ocurre con patógenos como *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*. La excreción de riboflavina podría estar proporcionando beneficios a *Bacillus* sp. CCGE 2311 para la colonización y funcionar como una señal de quorum sensing.

Hacen falta más análisis para comprobar el papel que juega la riboflavina en la interacción planta- bacteria.

IX. PERSPECTIVAS

La cromatografía en capa fina es un método que permite la identificación de sustancias, sin embargo, para respaldar mejor los resultados presentados en este estudio se debe analizar el compuesto por técnicas más sensibles como HPLC o espectrometría de masas.

La cromatografía en capa fina no permite la cuantificación de las muestras, por lo que se debe emplear algún otro método que permita realizarla.

La generación de mutantes incapaces de sintetizar o excretar riboflavina permitirá analizar si efectivamente la síntesis y excreción de esta vitamina influye en la relación con la planta, ya sea en procesos como colonización, promoción de crecimiento o indirectamente mediante la interacción con otras bacterias.

Marcar la riboflavina sintetizada por las bacterias con un isótopo radiactivo permitirá saber si ésta es ingresada a las plantas.

Realizar pruebas con bacterias sobreproductoras de riboflavina para conocer su efecto en la competencia para colonizar las plantas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bais H., Weir T., Perry L., Gilroy S., Vivanco J. 2006. The role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 57 pp. 233-266.

Briggs, W. R., and Huala, E. 1999. *Annual Review of Cell Dev. Biol.* Vol. 15 pp. 33-62

Cooper, J. E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 103 pp. 1355-1365

Crossley, R., Gaskin, D., Holmes, K., Mulholland, F., Wells, J., Kelly, D., van Vliet, A., Walton, N. 2007. Riboflavin Biosynthesis Is Associated with Assimilatory Ferric Reduction and Iron Acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 73 pp. 7819-7825

Dakora, F., Matiru, V. 2004. The rhizosphere signal molecule lumichrome alters seedling development in both legume and cereals. *New Phytology*. Vol. 166 pp. 439-44

Fischer M., Romisch W., Saller S., Illarionov B., Richter G., Rohdich F, Eisenreich W., Bacher A. 2004. Evolution of Vitamin B2 Biosynthesis: Structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279 pp. 36299-36308,

Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J., Rosing, H., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H. 2007. Multidrug Transporter ABCG2/Breast Cancer

Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B2) into Milk. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 24 No. 4 pp. 1247–1253

Hooper L V, Midtvedt T, Gordon J I. 2002. How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine. *Annual Reviews of Nutrition*. Vol 22 pp. 283–307

Lidstrom M., Chistoserdova L. 2002. Plants in the Pink: Cytokinin Production by *Methylobacterium*. *Journal of Bacteriology* Vol. 184 p. 1818

Lopez-Lara IM, van Der Drift KKMGM, van Brussel AAN, Haverkamp J, Lugtenberg BJJ, Thomas-Oates JE, Spaink HP. 1995. Induction of nodule primordial on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Molecular Biology*. Vol. 29: 465–477.

Marek-Kozaczuk M. Skorupska A. 2001. Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biol Fertil Soils* vol. 33 pp. 146–151

McCormick, D. B. 1989. Two interconnected B vitamins: Riboflavin and pyridoxine. *Physiol. Rev.* Vol. 69 pp. 1170-1198.

Nelson D., Cox M. Lehninger, Principles of Biochemistry. ed. 5. Ed. W. H. FREEMAN AND COMPANY. New York, USA. 1158 pp. 2008.

Overbeek LS, Elsas J.D. 1995. Root Exudate-Induced Promoter Activity in *Pseudomonas fluorescens* Mutants in the Wheat Rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* vol. 61 pp. 890–898

Pankhurst, C. E. Schwinghamer, E. A. Thorne, S. W. Bergensen, F. J. 1974. The Flavin Content of Clovers Relative to Symbiosis with a Riboflavin-requiring Mutant of *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 53, 198-205

Phillips, D. et al. 1999. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 96 No. 22 12275-80

Phillips et al. 2002. Roles for Riboflavin in the *Sinorhizobium*-alfalfa association. *Mol Plant-Mic Int* vol. 15 No. 5 pp. 456-62

Phillips, D. et al. 2004. Microbial Products Trigger Amino Acid Exudation from Plant Roots. *Plant Physiol.* Vol. 136 pp. 2887-94

Salomon, M., Eisenreich, W., Durr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rudiger, W., Muller, F., Bacher, A., and Richter, G. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 98*, pp. 12357–12361

Sanchez-Contreras, M., Bauer W., Gao M., Robinson J. B., Downie J. A. 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* Vol. 362 pp. 1149–1163.

Sullivan, T. 2004. Interactions between Soil Microbial Communities and Plant Roots: A Minireview. *Soil and Crop Sciences*, Colorado State University.

Velayudhan, J., Hughes, N. J., McColm, A., Bagshaw, J., Clayton, C., Andrews, S., Kelly, D. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Molecular Microbiology* Vol. 37 No. 2 pp. 274-286

Wilson, A. C., and Pardee, A. B. 1962. Regulation of flavin synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Genetic Microbiology.* Vol. 28 pp. 283-303.