



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

**“Evaluación de la actividad ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa
en *Pseudomonas* sp. UW4 y su efecto en la interacción con plantas
sometidas a estrés salino”**

TESIS DE MAESTRÍA

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta

Q.F.B. Elizabeth Zetter Salmón

Director

D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Morelia, Michoacán, febrero 2018

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al D.C. Gustavo Santoyo Pizano, director de esta investigación, gracias a usted por la paciencia, la orientación, supervisión y motivación; agradezco también a los doctores en ciencias: Eduardo Valencia, Homero Reyes, Josué Altamirano y Ernesto García, por el apoyo recibido a lo largo de esta investigación.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por las instalaciones y material educativo y a CONACYT por la beca otorgada.

Dedico este trabajo a mi querida hija Elizabeth por tu paciencia y comprensión, gracias por ser siempre mi mayor motivación, eres la razón por la que cada día me levanto con ganas de ser una mejor persona. Y como en todos mis logros, en este estuviste presente en cada momento, sin la inspiración que levantas en mí, esto no hubiera sido posible.

Gracias a mis padres Cecilia Salmón Waldrop y Mario Zetter Arguello por su incondicional apoyo en mis decisiones académicas, por la constante motivación sobre todo en momentos de desilusión, y de reconocimiento en casos de éxito, porque siempre tienen una alternativa para apoyarme y ser el mayor pilar de la familia gracias por creer en mis capacidades, sin duda son un ejemplo de lucha y trabajo. A mis hermanos Mario y Eduardo por estar siempre pendiente de mi bienestar, a Mario por sus grandes conocimientos en temas de investigación, en pasarme siempre los mejores consejos, por siempre tener las mejores palabras de aliento en momentos difíciles y sobre todo por enseñarme el mundo de la ciencia. Y a Eduardo por siempre tener el mejor sentido del humor, cuando necesitaba un buen

consejo o apapacho siempre estuviste presente, gracias por enseñarme que solo se vive una vez, pero si lo haces de la manera adecuada, una vez es suficiente.

Gracias a mi pareja Mauricio Suarez por su sacrificio y esfuerzo, por creer en mí y a pesar de vivir momentos difíciles y de mucho estrés siempre tuve tu comprensión, cariño y amor para que cada instante fuera más ligero, siempre teniendo lo mejor de ti para lizzie y para mí, y hacerme disfrutar de las cosas sencillas de la vida.

Gracias al laboratorio de diversidad genómica y al laboratorio de ecología microbiana por el material de trabajo para que este proyecto se realizara con éxito, también al laboratorio de biotecnología microbiana en especial al D.C. Jesús Campos por la amable atención y apoyo en una parte del proyecto.

Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio. Chio, Julie, Cristina, Idolina, kassandra, Martha, Aurora, Luz, Miguel, Dani, Adrián, Vicente, Christian, Ernesto, y Ramiro. Gracias especialmente y sin que importe el orden en que los nombres; a Cristina por ser mi jedi, siempre escucharme y tener el consejo más objetivo; a Daniel porque con sus enojos, berrinches y mala música siempre nos hace pasar un buen momento; a Miguel por siempre desesperarme, ayudarme con las concentraciones y ser un buen consejero en temas de medicina, química, plomería, ventas, estrategias de mecánica, etc; A Chio por su serenidad e inteligencia; a Julie por sus ocurrencias y buenos consejos; A Christian por siempre aparte de buen amigo ser un apoyo académico incondicional; a Ramiro por los chistes y críticas “constructivas”. ¡Gracias! Han hecho de esto una experiencia inolvidable.

Gracias especiales para Gustavo Ravelo por ser un amigo incondicional en mis mejores y mis peores momentos durante la maestría.

Gracias a mis compañeros de generación, por el apoyo y la amistad brindada; Alberto, Lupis, Pau, Ale, Belem, Iván, Richy y Pedro.

Índice

1. Introducción	10
2. Antecedentes	13
2.1 La salinidad en los suelos.....	13
2.2 ¿Cómo afecta la sal a las plantas?	16
2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	18
2.4 Actividad ACC desaminasa	19
2.5 Trehalosa	22
2.6 <i>Pseudomonas</i> sp. UW4.....	26
3. Justificación	28
4. Hipótesis	29
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos particulares:	30
6. Materiales y métodos	31
6.1 Cepas bacterianas.....	31
6.2 Tolerancia a la sal de las cepas bacterianas	32
6.3 Producción de ACC deaminasa.....	32
6.4 Acumulación de trehalosa	34

6.5 Esterilización de semillas de jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	35
6.6 Evaluación de la resistencia a NaCl en plantas de jitomate en interacción con <i>Pseudomonas</i> sp. UW4 y sus mutantes	35
6.7 Análisis estadístico	36
7. Resultados	37
7.1 Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrexpresante con y sin estrés salino	37
7.2 Actividad ACC desaminasa	40
7.3 Acumulación de trehalosa	41
7.3 Efecto de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4 sus mutantes isogénicas y la sobrexpresante en la germinación de semillas de jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	42
7.4 Promoción de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4 sus mutantes isogénicas y la sobrexpresante en plantas de jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	44
8. Discusión	50
9. Resumen de resultados	56
10. Conclusión	57
11. Bibliografía	58

Índice de tablas

Tabla 1. Área de salinización y alcalinización en suelos cultivables y no cultivables.	13
--	----

Índice de figuras

Figura 1. Modulación del etileno en plantas por bacterias promotoras del crecimiento vegetal.	20
Figura 2. Estructura de la molécula de trehalosa.	22
Figura 3. Vías de síntesis de trehalosa	23
Figura 4. Mapa del genoma circular de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4	26
Figura 5. Supervivencia de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrepresante sin estrés salino.	38
Figura 6. Supervivencia de <i>Pseudomonas</i> sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrepresante sometidas a estrés salino	39
Figura 7. Actividad ACC desaminasa	40
Figura 8. Acumulación de trehalosa	41
Figura 9. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate	43

Figura 10. Longitud y peso fresco de la raíz.....	45
Figura 11. Longitud y peso fresco de la parte aérea.....	47
Figura 12. Concentración de clorofila y biomasa total	48

Resumen

La salinidad en los suelos cultivables es uno de los factores abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, limitando el rendimiento y productividad de los cultivos. Las plantas sometidas a niveles elevados de cloruro de sodio (NaCl) responden al estrés osmótico de diferentes maneras, una de ellas es el aumento en la síntesis de etileno. Rizobacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* pueden reducir los niveles de etileno en plantas. En particular, la cepa UW4 de *Pseudomonas* sp. tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino, a través de la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor inmediato en la síntesis de etileno. Además, la cepa UW4 produce trehalosa, un disacárido osmoprotector.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar las actividades ACC desaminasa y la acumulación trehalosa en *Pseudomonas* sp. UW4, así como caracterizar las mutantes isogénicas *acdS*, *treS*, *treS/acdS* y la sobreexpresante *treS* (*Ovx treS*) durante la sobrevivencia en medios con NaCl y durante la interacción con plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) sometidas a estrés salino.

En ensayos para determinar sobrevivencia a la salinidad de la cepa UW4 y sus mutantes, las cepas UW4 *treS* y UW4 *acdS* exhibieron un menor crecimiento comparado con la UW4. El crecimiento de la doble mutante *treS/acdS* se afectó más que las mutantes individuales y la WT, lo que indica un efecto aditivo de ambas actividades. Durante la interacción de las cepas bacterianas con plantas de jitomate en invernadero, se observó una disminución significativa en el crecimiento de plantas bajo estrés salino inoculadas con *treS*, *acdS* y *treS/acdS*. Por el contrario, fue interesante notar un efecto benéfico sobre diversos parámetros (biomasa total y concentración de clorofila) en las plantas sometidas a estrés salino, inoculadas con la cepa silvestre UW4. Estos resultados sugieren que la enzima ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa juegan un papel benéfico y aditivo durante la interacción de *Pseudomonas* sp. UW4 con plantas de *L. esculentum* sometidas a estrés salino.

Palabras clave: ACC desaminasa, Trehalosa, PGPBs, estrés, salinidad.

Abstract

Salinity in crop soils is one of the abiotic factors that affect the growth and development of plants, limiting the yield and productivity of crops. Plants subjected to high levels of sodium chloride (NaCl) respond to osmotic stress in different ways, one of which is the increase in ethylene synthesis. Rhizobacteria belonging to the genus *Pseudomonas* can reduce ethylene levels in plants. In particular, the strain UW4 of *Pseudomonas* sp. has the ability to promote plant growth in conditions of salt stress, through the degradation of 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid (ACC), an immediate precursor in the synthesis of ethylene. In addition, strain UW4 produces trehalose, an osmoprotective disaccharide.

Therefore, the aim of this work was evaluate the ACC deaminase activity and trehalose accumulation in *Pseudomonas* sp. UW4, as well as characterize the survival of isogenic mutants in *acdS*, *treS*, *treS / acdS* and *treS* overexpressant (Ovx *treS*) in NaCl media and during interaction with plants (*Lycopersicon esculentum*) subjected to salt stress.

In the tests to determine the salinity survival of strain UW4 and its mutants, UW4 *treS*- and UW4 *acdS*- strains exhibited lower growth compared to UW4. The *treS*- / *acdS*- double mutant was more affected than the individual mutants and the WT, indicating an additive effect of both activities. In the greenhouse conditions, the growth of tomato plants inoculated with bacterial strains (*treS*-, *acdS*- and *treS*- / *acdS*), showed a growth significant decrease under salt condition stress. In other hand, it was observed a beneficial effect on various growth parameters (total biomass and chlorophyll concentration) in plants subjected to salt stress, when were inoculated with the wild type strain UW4. These results suggest that the enzyme ACC deaminase and the accumulation of trehalose play a beneficial and additive role during the interaction of *Pseudomonas* sp. UW4 with *L. esculentum* plants under salt stress.

1. Introducción

La salinidad en suelos agrícolas es uno de los factores abióticos que afectan el crecimiento de diversas especies de plantas, limitando el rendimiento y productividad de los cultivos. En general, las plantas sometidas a niveles elevados o tóxicos de salinidad, pueden experimentar diferentes tipos de estrés, como son: (I) la deshidratación y la pérdida de turgencia; (II) la deficiencia de iones, y (III) daño celular y variaciones en la eficiencia fotosintética y respiratoria, (Munns, 2002). La consecuencia más grave en los suelos salinos es que pueden hacer los suelos improductivos; la salinización se divide en primaria o natural, la cual es causada por efectos naturales del medio ambiente como la acumulación de sal por el agua de lluvias, por aguas subterráneas, entre otras. La salinización secundaria o inducida por el hombre se da cuando hay malas prácticas de riego, drenaje insuficiente entre otros (FAO, 2016).

La utilización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPBs por sus siglas en inglés) es una estrategia novedosa que puede mitigar el daño causado por la salinización de los suelos agrícolas y que no afecte colateralmente el medio ambiente. Las PGPBs las podemos encontrar distribuidas en la parte del suelo inmediata a la raíz (rizósfera) o dentro de la planta (endófito) y éstas aportan un beneficio para la planta por diferentes mecanismos que pueden ser directos o indirectos; un mecanismo de promoción directa es cuando las PGPBs facilitan la adquisición de los nutrientes, incluyendo nitrógeno, fósforo y hierro, también influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas (Ortíz-Castro, et al., 2008) o etileno. Y la promoción indirecta es cuando la PGPB limita el daño a la planta por diferentes tipos de estrés como la producción de antibióticos que degradan la pared celular, produciendo enzimas que disminuyan los niveles de etileno en la planta, induciendo la resistencia sistémica, disminuyendo la cantidad de hierro disponible a los

patógenos, y la síntesis de compuestos volátiles inhibidores de patógenos (Santoyo, et al., 2016). En los siguientes párrafos hablaremos más a detalle de estos mecanismos.

Una de las enzimas que participan en el desarrollo directo e indirecto, modulando los niveles de etileno, es conocida como 1-aminociclopropano carboxílico desaminasa (ACC desaminasa); la respuesta de muchas plantas al estrés salino es el aumento en la síntesis de etileno, una hormona vegetal asociada al estrés que inicia procesos como la senescencia, clorosis, abscisión, y hasta la muerte de la planta (Glick, 2005) La reducción de los niveles de etileno nocivos en las plantas a través de la actividad de la ACC desaminasa (codificada por el gen *acdS*), que escinde el ACC (precursor del etileno) en α -cetobutirato y amonio, puede ser una alternativa para ayudar a las plantas sometidas a estrés y así superar los efectos negativos causados por la salinidad (Brígido, et al., 2013).

Por lo tanto, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que contengan la enzima ACC deaminasa al estar en contacto con la planta en desarrollo, puede actuar como un mecanismo para proteger a las plantas estresadas y evitar los efectos deletéreos del etileno (Cheng, et al., 2007); (Glick, 2005).

La bacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas* sp. UW4, aislada de la rizósfera de canola en un campus de la Universidad de Waterloo, Canadá, tiene efectos promotores del crecimiento vegetal; así como de tolerancia a diferentes tipos de estrés, incluyendo inundaciones, altas concentraciones de sal, frío, metales pesados, sequía y resistencia a fitopatógenos (Glick, et al., 1995).

Al secuenciar y estudiar el genoma completo de *Pseudomonas* sp. UW4 se encontraron genes involucrados en la promoción del crecimiento vegetal y la resistencia a través de mecanismos como: (I) ACC deaminasa, producción de (II) sideróforos, (III) ácido indo acético (AIA), (IV) sistemas de secreción, tipo Sec, Tat, tipo I, II, III, V y VI (V) resistencia a metales pesados, (VI) degradación de

compuestos aromáticos, (VII) polihidroxicanoatos, (VII) compuestos antimicrobianos y la resistencia a antibióticos, como ampicilina, la eritromicina y la novobiocina (VIII) síntesis de acetoina y (IX) trehalosa (Duan, et al., 2013).

La trehalosa es un disacárido, formado de dos moléculas de glucosa donde la unión glucosídica de tipo α (1-1) involucra los grupos OH de los dos carbonos anoméricos (no reductor). Las propiedades físico-químicas de la trehalosa hacen que el compuesto sea un protector excepcional de las células, y ayuda a soportar tensiones fisiológicas extremas, tales como la deshidratación, altas concentraciones de sal, calor y la congelación en diferentes organismos (Schwarz & Van Dijck, 2017). El genoma de UW4, tiene dos vías de síntesis de trehalosa, la vía TreS y TreY-TreZ. La vía TreS implica la conversión de maltosa a la trehalosa por la trehalosa sintasa (TreS), en la vía TreY-TreZ, la maltodextrina se convierte primero en maltooligosiltrehalosa por maltooligosiltrehalosa sintasa (TreY), y luego a la trehalosa por trehalohidrolasa maltooligosiltrehalosa (TreZ) (Duan, et al., 2013).

Aun cuando se han estudiado algunas características benéficas de la PGPB *Pseudomonas* sp. UW4. se desconocen muchos otros mecanismos que podrían estar involucrados en la promoción del crecimiento de plantas de interés agrícola. Tampoco se ha estudiado la acción conjunta entre la enzima ACC deaminasa y la acumulación del azúcar no reductor trehalosa durante la interacción con plantas sometidas a estrés salino (NaCl).

2. Antecedentes

2.1 La salinidad en los suelos

La salinidad y la sodicidad de los suelos cultivables se encuentran entre los principales problemas que limitan el crecimiento y la productividad de las plantas. Desde los años 70's se han estudiado las condiciones de salinidad de los suelos, y utilizando el mapa de suelos de la FAO / UNESCO se estimó que la superficie total de suelos salinos que fue aproximadamente 397 millones de hectáreas y de suelos sódicos 434 millones de hectáreas, la diferencia entre suelos salinos y suelos sódicos son el incremento de las sales hidrosolubles en el suelo las cuales son potasio, magnesio, calcio, cloruro, sulfato, carbonato y bicarbonato (salinización) y alto contenido de sodio (sódificación) respectivamente.

Tabla 1. Área de salinización y alcalinización en suelos cultivables y no cultivables.

Regiones	Área total (millones de has)	Suelo Salino (millones de has)	%	Suelos sódicos (millones de has)	%
África	1899.1	38.7	2	33.5	1.8
Asia el pacífico y Australia	3107.2	195.1	6.3	248.6	8
Europa	2010.8	6.7	0.3	72.7	3.6
América latina	2038.6	60.5	3	50.9	2.5
Este	1801.9	91.5	5.1	14.1	0.8
Norte américa	1923.7	4.6	0.2	14.5	0.8
Total	12781.3	397.1	3.1	434.3	3.4

Según la base de datos de la FAO Aquastat indican que en algunas regiones el área afectada por la salinidad es de más del 50 % (tabla 1). Por ejemplo, en el continente americano y el caribe las tierras son muy pobres y la tendencia es a deteriorarse (FAO, 2016).

La salinidad en una solución de suelo generalmente se mide como conductividad eléctrica (CE), que se basa en el hecho de que la corriente eléctrica transmitida entre dos electrodos y la conductividad aumenta conforme hay un incremento de sales iónicas solubles y viceversa, en la agricultura, la CE generalmente es baja; por lo tanto, la unidad deciSiemens por metro (dS m^{-1}) es ampliamente utilizado (Rhoades, 1990).

La salinización, así como la sodicación tienen un efecto negativo en la producción agrícola y por lo tanto en la vida de los agricultores, afecta el equilibrio de los ecosistemas y la calidad de los recursos naturales. Este tipo de suelos suele ser propenso a la degradación, se afecta negativamente el vigor de las plantas y través de sus escorrentías contamina a los suelos contiguos. (FAO, 2017).

Las causas de la salinidad son dos; las naturales y las antropogénicas. La salinidad primaria o natural es cuando las sales naturales de las tierras se van acumulando en la superficie, también por la deposición de sal marina transportada por el viento, la evaporación de del agua de lluvia y la sal de los océanos que se disemina a las tierras cultivables; la salinidad secundaria o antropogénica, resulta de la actividad humana, es decir, el uso indiscriminado de fertilizantes, y un mal sistema de riego (Mirza, et al., 2011).

La afectación en los cultivos debido a este tipo de estrés abiótico es principalmente por estrés osmótico y al exceso de toxicidad de los iones (Parvaiz, 2010), a través del aumento de las especies reactivas de oxígeno, incluido el oxígeno libre, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, todos ellos son

altamente reactivos y pueden causar daño celular a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Mirza, et al., 2011).

De igual manera, la salinidad afecta el transporte de cationes y aniones a través de las membranas plasmáticas de las células de la raíz, el transporte a través de las membranas vacuolares, el transporte de iones a larga distancia mediante xilema y floema, la excreción sal y la acumulación por las células especializadas (glándulas de sal o vejigas) (Volkov & Beilby, 2017).

Por otro lado, se ha informado que niveles bajos de etileno disminuyen el estrés abiótico, Sin embargo, cuando se produce etileno por encima de un nivel umbral, se conoce como "estrés por etileno" y esta condición limita la proliferación de la raíz, así como los brotes, por lo que la planta tiene dificultades para su crecimiento y desarrollo. Una vez iniciado el estrés la síntesis de etileno tiene dos máximos, el primero es menor ($0.05 \mu /L$) y es responsable de la transcripción de los genes que codifican las proteínas protectoras de las plantas y el segundo máximo de etileno mucho más grande es denominado "estrés por etileno", es perjudicial para el crecimiento de la planta e inicia procesos como la senescencia temprana, la clorosis y la abscisión de la hoja (Glick , et al., 2007).

Un primer paso importante al diseñar la agricultura en tierras salinas es elegir especies de cultivo con suficiente tolerancia a la sal que puedan cultivarse con un beneficio. Además, el uso de PGPB como bioinoculantes en diversos cultivos agrícolas puede adicionalmente atenuar dicho estrés y mejorar la producción en suelos salinos (Glick, et al., 1998)

2.2 ¿Cómo afecta la sal a las plantas?

La salinidad en el suelo es uno de los factores ambientales que más limita la producción vegetal. Una alta concentración de sales ocasiona un desequilibrio iónico y estrés osmótico. Cuando las plantas se encuentran sometidas a este tipo de estrés se rompe la homeostasis del potencial hídrico y hay un desequilibrio en la distribución de iones (Alcaraz Ariza, 2012)

Podemos mencionar diferentes procesos de la planta para adaptarse al estrés por Salinidad:

- Prevenir o reparar el daño o detoxificar.
- Control de la homeostasis iónica y osmótica.
- Control del crecimiento, que debe reanudarse, pero con una tasa reducida

Durante la detoxificación las plantas incrementan los metabolitos como polioles, también osmolitos como manitol, glicinbetaína, fructanos y prolina, con esto la planta logra eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el exceso de iones acumulados. Las enzimas que requieren K^+ como cofactor son particularmente sensibles a altas concentraciones de Na^+ o altas proporciones de Na^+ / K^+ (Chaves, et al., 2009). En el control de la homeostasis es importante para prevenir la entrada del sodio al citoplasma ya que este provoca inhibición de la mayoría de las enzimas. Las plantas utilizan dos mecanismos para evitar la entrada de iones; aquellos que minimizan la entrada de sal en la planta y aquellos que minimizan la concentración de sal en el citoplasma. En el primero en este caso las halófitas “excluyen” la sal que inevitablemente ingresa, a esto se le conoce como “exclusión de sal” (la vía SOS da como resultado la exclusión del exceso de iones Na^+ de la célula a través del antiportador Na^+ / H^+ de la membrana plasmática y ayuda a restablecer la

homeostasis de iones celulares) y es llevada a cabo en las raíces de las plantas (Türkan & Demiral, 2009), sin embargo las hojas no pueden excluir indefinidamente, por lo que empiezan a verse afectadas, esto debido a que las sales son transportadas en el sentido de la transpiración y entonces se acumulan en las hojas, por lo tanto, las hojas más viejas son las más afectadas y en estas, la concentración es tan elevada que es suficiente para matar a las células, por otra parte; Si Na^+ y Cl^- son secuestrados en la vacuola de una célula, el K^+ y los solutos orgánicos deberían acumularse en el citoplasma para posteriormente, los orgánulos para equilibrar la presión osmótica de los iones en la vacuola. (Munns, 2002).

El estrés salino también reduce el crecimiento debido a los cambios en la bioquímica de las hojas que dan lugar a una regulación negativa del metabolismo fotosintético, pueden ocurrir en respuesta a la disminución del sustrato de carbono bajo estrés prolongado (Flexas, et al., 2006) esto debido al cierre estomático como consecuencia, la disminución en la entrada de CO_2 . (Charle, et al., 2007)

Las plantas se distinguen por una adaptación morfológica y fisiológica celular, como retraso en la germinación y/o maduración, engrosamiento de cutículas para hacer descender la transpiración, selectividad a iones específicos para compensar desequilibrios, disminución del tamaño foliar para hacer descender la transpiración, acumular y aislar sales para evitar toxicidad, compensar diferencias de presión osmótica con suelo, reducción en número de estomas y el control de apertura de los poros microscópicos en la superficie de la hoja (Charle, et al., 2007).

2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPBs) han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para mejorar la salud y el desarrollo de las plantas. Las PGPBs pueden tener un origen rizosférico, endófito o filosférico. Las actividades positivas que ejercen en las plantas pueden incluir aquellas que son de interés agrícola, incrementando la producción y reduciendo costos, además de no causar daños al ambiente o la salud humana (Rojas-Solís, et al., 2015).

Las PGPB utilizan diferentes mecanismos para promover el crecimiento vegetal y estos pueden ser directos e indirectos, los mecanismos de promoción directos es cuando la bacteria facilita la adquisición de nutrientes como nitrógeno, hierro y fosforo y también facilitando o modulando los niveles hormonales como auxinas, etileno, citoquininas o giberelinas, y la promoción indirecta es cuando las PGPBs limitan los nutrientes disponibles para patógenos, como también disminuir los daños ocasionados por los patógenos en diferentes tejidos (Santoyo, et al., 2016).

2.4 Actividad ACC desaminasa

La mayoría de las plantas responden al estrés produciendo o incrementando los niveles de etileno. El etileno es una hormona vegetal de la cual se sabe su efecto desde hace muchos años, por ejemplo, en la antigua Grecia la usaban para la maduración de los higos, hacían muescas en cualquier órgano de una planta, y de esta forma las heridas estimulan la producción del etileno por parte de los tejidos y los frutos maduraban rápidamente; no fue hasta el siglo XIX que al utilizarse como un gas para el alumbrado público empezaron a notar que las hojas de los árboles aledaños tenían una aceleración en el proceso de abscisión, en 1901 Dimitry Neljubow descubrió que la molécula que afectaba este proceso era el etileno (Bakshi, et al., 2015).

El etileno es un importante modulador del crecimiento normal de la planta y una molécula indicadora de estrés. Muchos aspectos del crecimiento de los tejidos vegetales, tales como raíces, tallos, hojas, flores y frutas, así como todas las etapas de desarrollo de la planta están afectadas por etileno. Una variedad de otros procesos de la planta implica la síntesis de etileno, como la nodulación de leguminosas, enraizamiento de los esquejes, así como la interacción benéfica con hongos micorrícicos (Glick, 2014).

El etileno, es un hidrocarburo no saturado C_2H_4 que, en condiciones fisiológicas de temperatura y presión, es un gas incoloro con un ligero olor dulce. El sitio de síntesis y acción del etileno es en cualquier tejido vegetal y debido a su naturaleza gaseosa es difundido a través de los espacios intercelulares (Esquivel-Cote, et al., 2013). En plantas superiores, el etileno se sintetiza a partir del aminoácido L-metionina que se encuentra en los exudados de la raíz, la metionina es activada por el ATP y se convierte en S-adenosil metionina (SAM) por la reacción catalizada por la enzima SAM sintasa, SAM es convertida en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

mediante la enzima ACC sintasa, dicha enzima es estimulada por fitohormonas como las auxinas (AIA) y por el propio etileno. Finalmente, a partir del ACC el etileno es sintetizado por la enzima, ACC oxidasa (fig. 1) (Glick, et al., 1998).

Hace relativamente poco tiempo se identificó a la enzima ACC desaminasa la cual escinde el precursor inmediato del etileno (ACC) en amonio y α -cetobutirato, las PGPB que tienen dicha actividad son capaces de crecer en medios con ACC como única fuente de nitrógeno (Glick, et al., 1994).

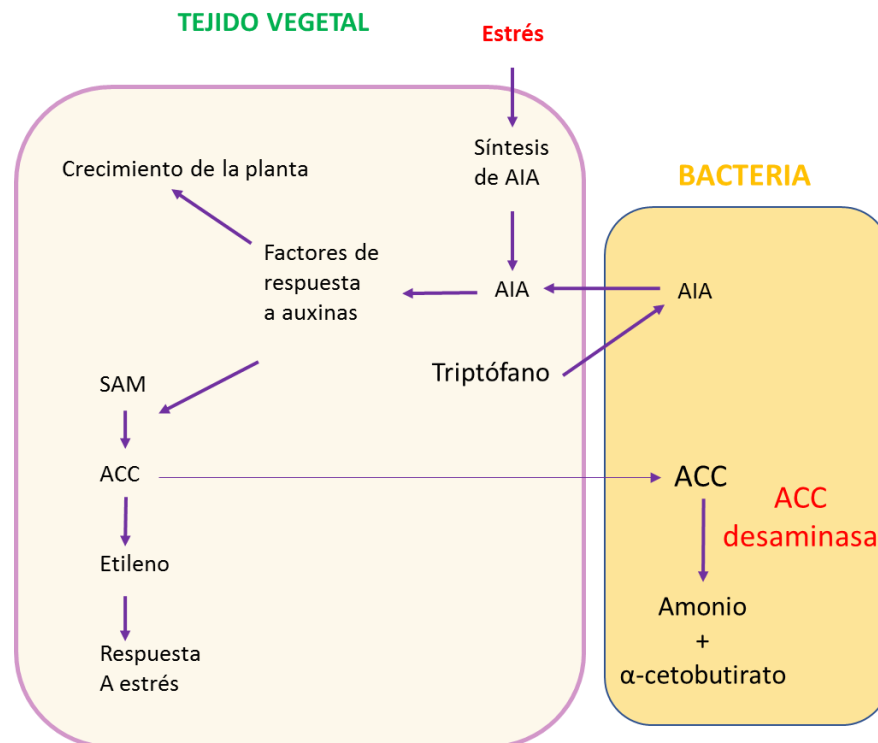


Figura 1. Modulación del etileno en plantas por bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Uno de los muchos trabajos en donde se analiza la actividad de la enzima ACC desaminasa es el de Brígido y colaboradores (2013) donde analizan dos cepas de

Mesorhizobium ciceri, una cepa sensible a la salinidad y otra cepa tolerante a la sal, ambas expresan de manera exógena el gen *acdS*, esto, en interacción con plantas de garbanzo sometidas a 0.15% de NaCl, se observó que el peso seco del brote fue significativamente mayor en plantas inoculadas con la cepa sensible a la sal *transformada* con *acdS* en comparación con las plantas inoculadas con la cepa nativa en presencia de sal. Por otra parte, los efectos negativos del estrés salino también se redujeron en la nodulación cuando se usaron cepas transformadas con *acdS* en comparación con las cepas de tipo silvestre. También analizaron la capacidad de formar nódulos en las plantas sometidas a estrés, y reportaron que la cepa que expresa el gen *acdS* tiene la misma capacidad de nodular tanto en condiciones control como de salinidad. Estos resultados sugieren que la modificación genética de una cepa de *Mesorhizobium* puede mejorar su rendimiento simbiótico bajo estrés salino e indican que la ACC desaminasa puede desempeñar un papel importante en facilitar la interacción planta- *Rhizobium* en condiciones de salinidad (Brígido, et al., 2013).

Esta enzima también fue evaluada en plantas de *Lycopersicon esculentum* en interacción con rizobacterias que presentan actividad ACC desaminasa sometidas a estrés por inundación, esto debido a que este tipo de estrés abiótico también incrementa los niveles de etileno. Se evaluó su actividad inoculando las bacterias en la semilla y observaron que el crecimiento de raíces y brotes, la curvatura epinástica en los pecíolos de las hojas, la actividad de la ACC desaminasa, la producción de etileno y la concentración de clorofila foliar mejoraron significativamente (Grichko & Glick, 2001).

Por lo tanto, utilizar bacterias promotoras de crecimiento vegetal con actividad ACC desaminasa mejora el crecimiento en condiciones de estrés, modulando los niveles elevados de etileno (Yang, et al., 2009).

2.5 Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor de la glucosa unido por un enlace α -1-1-glucosídico (fig. 2) que tiene una función en organismos vivos. Se encuentra distribuido en todos los reinos y su estudio comenzó en organismos anhidrobiontes, levaduras, hongos, bacterias y posteriormente en plantas superiores (Elbein, et al., 2003).

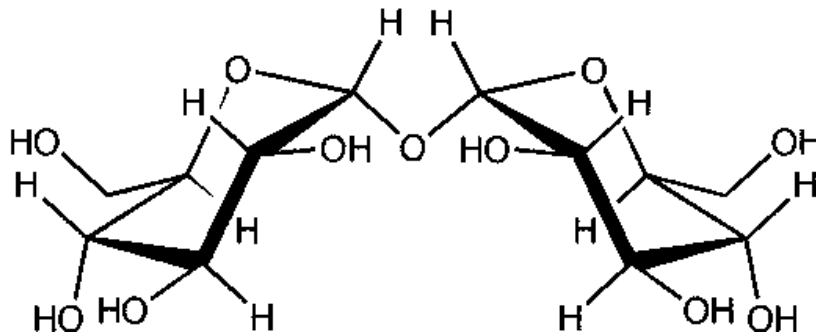


Figura 2. Estructura de la molécula de trehalosa.

Esta recurrencia entre diferentes organismos demuestra su amplia distribución y sugiere un papel muy importante en el mundo biológico. Existen 5 Vías metabólicas identificadas para la síntesis de la trehalosa (fig. 3), la única vía de síntesis de trehalosa que ha sido la descrita en plantas es la TPS-TPP (fig. 3, recuadro azul). La vía TPS-TPP se encuentra en diversos organismos eucariotas y procariontes. Las vías alternativas de síntesis de trehalosa presentes en otros organismos son TreT, TreY-TreZ y TS las cuales se han descrito sólo en los organismos procariontes. TreP está restringido a hongos y bacterias. Existe una ruta de degradación de trehalosa en la cual la trehalasa escinde la trehalosa en dos moléculas de glucosa (fig. 3, recuadro amarillo) (Olivier Fernandez, 2010).

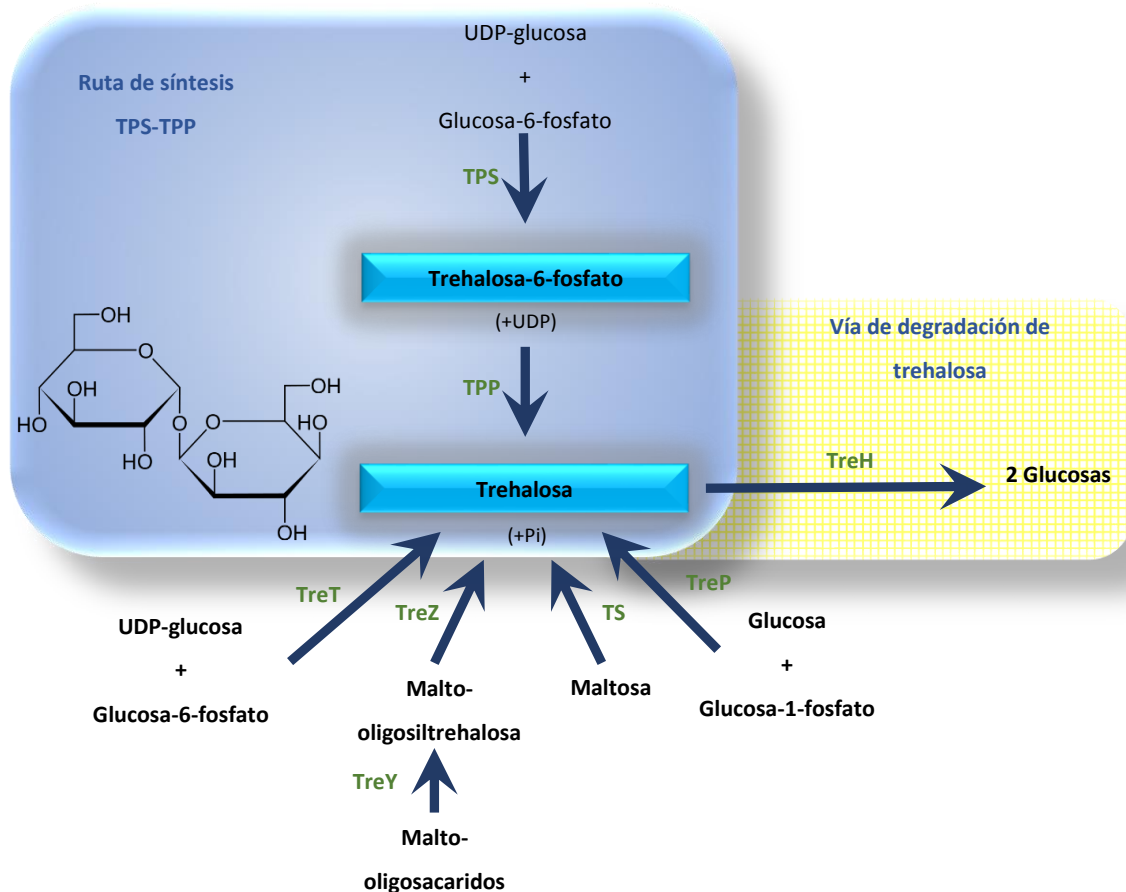


Figura 3. Vías de síntesis de trehalosa; TPS, Trehalosa-6-fosfato sintasa; TPP, Trehalosa-6-fosfato fosfatasa; TreH, Trehalasa; TreY, Maltooligosil-trehalosa sintasa; TreZ, trehalohidrolasa de maltooligosiltrehalosa; TS, trehalosa sintasa; TreT, trehalosa Glicosiltransfererasa sintasa; TreP, Trehalosa fosforilasa; UDP, Difosfato de Uridina (Fernandez, et al., 2010)

A este azúcar se le atribuyen diferentes propiedades como (I) reserva de energía y carbono, (II) Estabilizador y protector de proteínas y membranas, (III) compuesto de detección y/o regulador del crecimiento, (IV) Componente estructural de la pared celular bacteriana, y (V) osmoprotector (Elbein, et al., 2003).

En plantas es reciente su descubrimiento excluyendo a plantas de la resurrección *S. lepidophylla* donde se sabe la importancia de la acumulación de trehalosa para soportar condiciones extremas. Actualmente se sabe que todas las plantas donde se ha investigado cuentan con esta ruta de síntesis TPS TPP para producir trehalosa, pero, las plantas superiores no la acumulan, por lo que se sugiere que el papel de este disacárido en plantas es de señalización (Avonce, et al., 2004), esto se probó realizando diferentes mutantes principalmente en TPS, y mediante la introducción de los genes que codifican para TPS y TPP en plantas, pero estas no alcanzaron o no acumularon más trehalosa, esto debido a la actividad de la enzima trehalasa la cual, escinde la trehalosa en dos glucosas, pero, se logró acumular cuando se administró validamicina A, la cual inhibe la actividad de la trehalasa; ya que la planta acumuló este disacárido, mostró fenotipos diferentes, como un crecimiento atrofiado y la formación de hojas en forma de lanceta por las plantas de tabaco (*N. tabacum*); esto sugiere un efecto negativo de la acumulación de la trehalosa en el desarrollo de la planta (Goddijn, et al., 1997).

Por otra parte, se estudió el efecto de la mutación del gen *TPS* en plantas de *Arabidopsis* y estas exhiben un efecto retardado en el crecimiento, un acortamiento de la raíz, y por último retrasa la transición al estado de floración (Van Dijken, et al., 2004).

En otro trabajo se observó que la sobreexpresión de los genes *OtsA* y *OtsB* (homólogos a TPS-TPP), que están involucrados en la síntesis de trehalosa, efectivamente conducen a una acumulación de trehalosa en *Azospirillum brasilense* que al estar en interacción con plantas de maíz, le conferirle tolerancia al estrés (Rodríguez-Salazar, et al., 2009); En plantas de arroz transgénicas que acumulan trehalosa comparadas con plantas no transformadas, mantienen el crecimiento, hay menos daño oxidativo y el equilibrio mineral es favorable en

condiciones de estrés, por lo que es una alternativa para la tolerancia de la planta ante el estrés osmótico (Garg, et al., 2002).

Aunque esto aún no es un mecanismo dilucidado del todo, se sugiere en varios trabajos que la TPS tiene un papel importante en el metabolismo de carbohidratos en plantas, específicamente afecta la actividad de la hexoquinasa en la regulación de la glucólisis, mientras que muchos otros autores proponen a la trehalosa como un carbohidrato que ayuda a enfrentar diferentes tipos de estrés, como la salinidad o la sequía.

2.6 *Pseudomonas* sp. UW4

Pseudomonas sp. UW4 fue aislada de la rizosfera de canola, aunque también es una bacteria que puede colonizar los tejidos internos de la planta y sobrevivir como endófito. Su genoma está secuenciado y tiene un único cromosoma circular de 6,183,388 pb (fig. 4).

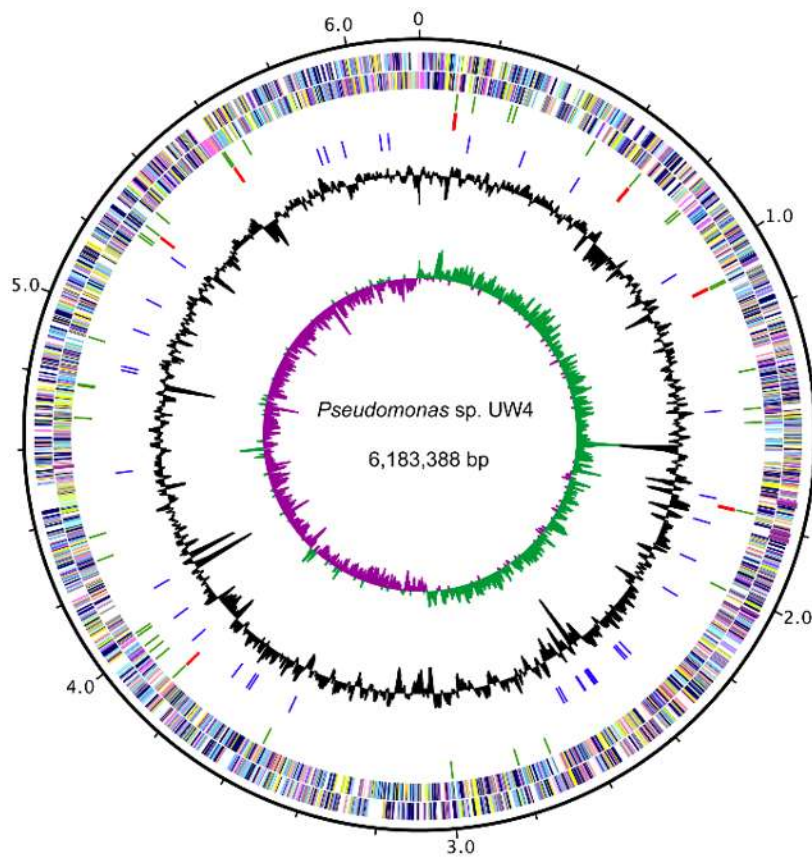


Figura 4. Mapa del genoma circular de *Pseudomonas* sp. UW4

Contiene genes involucrados en promoción de crecimiento como los que codifican para la enzima ACC desaminasa, producción de ácido indol acético con dos

posibles vías, el indol-3-acetamida (IAM) y las vías de indol-3-acetonitrilo (IAN); producción de sideróforos como producción de pioverdina; también acetoina que promueve el crecimiento de plantas mediante la estimulación de la formación de raíces; compuestos anti-microbianos y de resistencia a antibióticos como el 4-hidroxibenzoato; polihidroxicarbonatos, que son compuestos de energía y de almacenamiento de carbono; degradación de compuestos aromáticos por ejemplo para la degradación de tolueno y resistencia a metales pesados como genes de resistencia a níquel, cobre, cadmio, zinc, cobalto, molibdeno, cromato y arsenato. También tiene dos vías para la síntesis de trehalosa, la vía treS la cual como ya se mencionó a partir de maltosa se obtiene trehalosa, y la vía treY/treZ la cual a partir de maltodextrina es primero convertido a la maltooligosiltrehalosa por maltooligosiltrehalosa sintasa (treY) y luego a trehalosa por la trehalohidrolasa maltooligosiltrehalosa (treZ) (Duan, et al., 2013)

Los antecedentes sobre esta bacteria la hacen el modelo óptimo para los fines de esta investigación debido a que se ha estudiado el efecto de la enzima ACC desaminasa en plantas sometidas a estrés salino y por otra parte el papel de la acumulación de trehalosa en plantas sometidas a estrés, pero el efecto combinado de estas dos moléculas durante la interacción con plantas se desconoce.

3. Justificación

Existe evidencia de que la actividad de la enzima ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, constituyen mecanismos de resistencia a diversos tipos de estrés, incluyendo la salinidad. Ambas funciones se han estudiado por separado; sin embargo, su efecto biológico combinado durante la interacción planta-bacteria se desconoce.

4. Hipótesis

Las actividades ACC desaminasa y la acumulación trehalosa en *Pseudomonas* sp. UW4 actúan de forma aditiva durante la sobrevivencia en medios con NaCl, además de ser importantes para promover el crecimiento vegetal bajo estrés salino.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar si la actividad ACC desaminasa y la acumulación trehalosa participan en la sobrevivencia de *Pseudomonas* sp. UW4, las mutantes *acdS*, *treS*, *treS/acdS* y *Ovx treS* en medios con NaCl y durante la interacción con plantas (*Lycopersicum esculentum*) sometidas a estrés salino.

5.2 Objetivos particulares:

- Analizar la tolerancia al estrés salino (NaCl) en *Pseudomonas* sp. UW4 y las mutantes *acdS*, *treS*, *treS/acdS* y *Ovx tres*.
- Determinar la actividad de la enzima ACC desaminasa y acumulación de trehalosa en *Pseudomonas* sp. UW4 y las mutantes *acdS*, *treS*, *treS/acdS* y *Ovx treS*.
- Determinar el efecto conjunto de la actividad de la enzima ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa de *Pseudomonas* sp. UW4 y las mutantes *acdS*, *treS*, *treS/acdS* y *Ovx treS* sobre el sobre el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicum esculentum*) sometidas a estrés salino *in vitro* y en invernadero.

6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismo y cepas

Pseudomonas sp. UW4 fue aislada de la rizosfera de canola con base en su capacidad para utilizar ACC como única fuente de nitrógeno (Glick, 1995). Esta cepa promueve el crecimiento de las plántulas de canola y aumenta la tolerancia al estrés ambiental en plantas, mediante la modulación de los niveles de etileno a través de la síntesis de la enzima ACC desaminasa (Jiping Li, 2000). Una mutante de UW4 en el gen codificante para ACC desaminasa (*acdS*⁻) fue obtenida con la inserción de un gen de resistencia a tetraciclina en la región codificante del gen correspondiente a la ACC desaminasa bacteriana, del mismo modo una mutante en el gen codificante para la trehalosa sintasa (*treS*⁻) fue obtenida con la inserción de un gen de resistencia a cloranfenicol y una doble mutante (*acdS*⁻ / *treS*⁻) con gen de resistencia a tetraciclina y cloranfenicol, finalmente la cepa sobreexpresante de trehalosa se obtuvo por transformación con el vector de expresión multicopia pBBR1MCS-2 con promotor constitutivo y como medio selectivo se usó canamicina. Todas estas cepas donadas amablemente por la D.C. Ma. del Carmen Orozco Mozqueda.

Pseudomonas sp. UW4 se cultivó en agar nutritivo suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) a 28 °C.

Pseudomonas sp. UW4 (*acdS*⁻) se cultivó en agar nutritivo suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) y tetraciclina (20 µg mL⁻¹) a 28°C.

Pseudomonas sp. UW4 (*treS*⁻) se cultivó en agar nutritivo suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) y cloranfenicol (100 µg mL⁻¹) a 28°C.

Pseudomonas sp. UW4 (*treS*⁻ / *acdS*⁻) se cultivó en agar nutritivo suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹), tetraciclina (20 µg mL⁻¹) y cloranfenicol (100 µg mL⁻¹) a 28°C.

Pseudomonas sp. UW4 (sobreexpresante en *treS*) en agar nutritivo suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) y canamicina (100 µg mL⁻¹).

6.2 Tolerancia a la sal de las cepas bacterianas

Pseudomonas sp. UW4 y sus mutantes se cultivaron en caldo nutritivo con los antibióticos correspondientes, y ya que se llega una densidad óptica de 0.4 los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 adicionado glicerol al 4 % y concentraciones de NaCl de 0 a 0.8 M. Se dejaron crecer toda la noche, para posteriormente hacer diluciones para calcular las unidades formadoras de colonias o UFC (10⁻⁴ y 10⁻⁶). De estas soluciones se tomaron 100 µl y se suspendieron en cajas Petri con sus respectivos antibióticos donde con un asa estéril de vidrio se distribuye la muestra por toda la caja, se dejaron crecer y posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

6.3 Producción de ACC deaminasa

Se caracterizaron las cepas con base en su capacidad de crecer en medios con ACC como única fuente de nitrógeno y la cantidad de ACC deaminasa producida por colonia bacteriana como lo establece el protocolo de (Penrose & Glick, 2003) en donde las bacterias se cultivaron primero en medio rico y luego se transfieren a un medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno. Las células bacterianas se

cultivan hasta la fase logarítmica en 15 mL de medio rico (caldo nutritivo) y se dividió entre dos tubos: cada tubo se inoculó con 5 μ L de la cepa apropiada. Los cultivos se incubaron durante toda la noche en agitación a 200 rpm a temperatura de 28°C. La biomasa acumulada se cosechó por centrifugación a 8000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y las células se lavaron con 5 mL de medio mínimo de sales DF. Después de una centrifugación adicional durante 10 minutos a 8000 g a 4 ° C, las células se suspendieron en 7.5 mL de medio mínimo de sales DF en un tubo de cultivo nuevo. Justo antes de la incubación, se añadieron 45 μ L de la solución de ACC 0.5 M a la suspensión celular para obtener una concentración final de ACC 3.0 mM. Las células bacterianas se regresaron a agitación a 200 rpm durante 24 horas a 28°C. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 8000 g durante 10 min a 4 ° C. Se eliminó el sobrenadante, y las células se lavaron, suspendiendo el sedimento celular en 5 mL Tris-HCl, pH 7.6. Después de la centrifugación a 8000 g a 4 ° C durante 10 min, el sobrenadante se desechó. El procedimiento de lavado se repitió dos veces para garantizar que el sedimento esté libre del medio de crecimiento bacteriano.

La actividad ACC desaminasa se midió en extractos bacterianos preparados de la siguiente manera: los sedimentos de células bacterianas, preparados como se describe anteriormente, se suspendieron cada uno en 1 mL de Tris-HCl 0,1 M, pH 7.6, y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL. El contenido del eppendorf de 1.5 mL se centrifugó a 16 000 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se suspendió en 600 μ L de Tris-HCl 0,1 M, pH 8.5. Se añadieron treinta microlitros de tolueno a la suspensión celular y se agitó en vortex al máximo ajuste durante 30 s. La suspensión celular toluenizada restante se analiza inmediatamente para determinar la actividad de la ACC desaminasa.

Los micromoles de α -cetobutirato producido por esta reacción se determina comparando la absorbancia a 540 nm de una muestra con una curva estándar de α -cetobutirato que varía entre 0.1 y 1.0 μ mol. Se prepara una solución madre de 100 mM de α -cetobutirato en Tris-HCl 0,1 M pH 8.5 y se almacena a 4 ° C. Justo antes de su uso, la solución madre se diluye con el mismo tampón para hacer

una solución de 10 M a partir de la cual se genera una curva de concentración estándar. Cada una de una serie de concentraciones conocidas de α -cetobutirato se prepara en un volumen de 200 μ L, 300 μ L del reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0.2% de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2 M) (Sigma-Aldrich Co.), y los contenidos se agitaron en vortex y se incubaron a 30 ° C durante 30 minutos, tiempo durante el cual el α -cetobutirato se derivatiza como una fenilhidrazona. El color de la fenilhidrazona se desarrolla mediante la adición de 2,0 ml de NaOH 2 M; después del mezclado, la absorbancia de la mezcla se midió a 540 nm.

6.4 Acumulación de trehalosa

Para analizar la acumulación de trehalosa en las cepas *Pseudomonas* sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobreexpresante de trehalosa se llevó a cabo el siguiente protocolo.

Se preparó un cultivo celular de 250 ml en medio mínimo M9 adicionado con glicerol al 4%, el cultivo se dejó 48 horas en agitación a 30°C y se realizó según el protocolo de (Suárez, et al., 2009). Posterior a que se tiene el sobrenadante del medio se filtra y se añaden 1.5 ml de agua desionizada estéril; la trehalosa se determinó por HPLC con una columna Aminex HPX-87C (flujo de 0.7 ml/seg a 60°C y una presión de inicio de 72 atm) la cual es específica para separar di-, tri-, y tetrasacaridos; utilizando un estándar de trehalosa al 0.05% como referencia para identificar el pico de trehalosa, que se detectó a los 6.6 minutos. Los resultados representan el área bajo la curva de los picos correspondientes

6.5 Esterilización de semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

Con el objetivo de analizar si las bacterias tenían un efecto sobre la germinación de la semilla de jitomate, se siguió el siguiente protocolo.

Las semillas de jitomate se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril por dos minutos, se agregó alcohol al 70% por cinco minutos, se agitó y decantó, se enjuagó con agua desionizada estéril dos veces, posteriormente se agregó hipoclorito de sodio al 5%, y se agitó durante 6 minutos. Por último, se enjuagaron seis veces con agua desionizada estéril y se colocaron a 4°C durante 24 horas cubiertas de la luz.

Las semillas que se utilizaron para el ensayo de germinación *in vitro* se colocaron después de la vernalización en un cultivo bacteriano a D.O. 1 por toda la noche a 30 °C. En el ensayo en invernadero las semillas no tuvieron tratamiento solo fueron desinfectadas.

6.6 Evaluación de la resistencia a NaCl en plantas de jitomate en interacción con *Pseudomonas* sp. UW4 y sus mutantes

La finalidad del experimento en invernadero es analizar el efecto que tiene la cepa UW4, sus mutantes isogénicas y la sobreexpresante de trehalosa en plantas de jitomate, en condiciones control y sometidas a estrés salino, por lo que se llevó a cabo el siguiente protocolo.

Una mezcla de peat moss más perlita se humedeció y esterilizó en autoclave durante dos horas, posteriormente se distribuyó en pozos de germinación, la semilla se colocó a 3 mm de profundidad. Después de dos semanas de haber germinado, las plántulas se pasaron a pozos de 6 x 7 cm, cada grupo contiene de 12 a 14

plántulas y se inocularon alrededor de la raíz con la solución bacteriana (4 ml con D.O de 1) y posteriormente a los 8 días se hizo una segunda inoculación. Un grupo se regó con agua salina (0.2 M) y otro grupo con agua estéril cada tercer día durante 5 semanas. Al término de las 5 semanas, las plantas se retiraron de los pozos y se midieron diferentes parámetros: peso fresco y longitud de raíz, peso fresco y longitud de la parte aérea, la concentración de clorofila con el equipo OPTI-SCIENCES CCM-200 y el peso seco total el cual, se calculó dejando las plantas en un sobre de papel y en incubadora a 70°C se pesaron hasta obtener un peso constante.

6.7 Análisis estadístico.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias significativas se compararon con la prueba de Duncan con una $p \leq 0.05$. Para los datos en invernadero se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y las diferencias significativas se compararon con la prueba de Duncan con una $p \leq 0.05$.

Se utilizó la prueba no paramétrica de X^2 (chi cuadrada) seguido de un análisis de proporciones; la cual se utilizó para conocer diferencias en el porcentaje de germinación. Todos los datos fueron analizados usando el paquete estadístico STATISTICA versión 10.

7. Resultados

7.1 Crecimiento de *Pseudomonas* sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrexpresante con y sin estrés salino.

Debido a que se desconoce el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas* sp. UW4, las mutantes sencillas *acdS*, *treS*, la doble mutante (*treS/acdS*) y sobrexpresante (*Ovx treS*) en condiciones control, las cepas crecieron en medio M9 suplementado con 0.4% de glicerol. Partiendo de la misma concentración bacteriana se observa que la cepa silvestre incrementó su crecimiento a las 48 horas, la mutante sencilla en *acdS* mantiene su viabilidad celular, así como la mutante sencilla en *treS* y la doble mutante *acdS/treS* que, aunque no hubo un incremento en las unidades formadoras de colonia mantuvo la sobrevivencia. Por último, la cepa sobrexpresante en *treS* tiene un crecimiento parecido al del control (fig. 5). La bacteria silvestre crece e incrementa las unidades formadoras de colonia, así como la mutante *acdS* y la sobrexpresante, pero la mutante sencilla en *treS* aunque no disminuyó el número de UFC fue incapaz de crecer. Lo anterior sugiere que, aunque existe un crecimiento disminuido en la mutante *tres* y la doble mutante, sigue una sobrevivencia de células a las 36 y 48 hrs de crecimiento. Estos resultados se compararon con el crecimiento de las cepas en condiciones de salinidad, como se detalla a continuación.

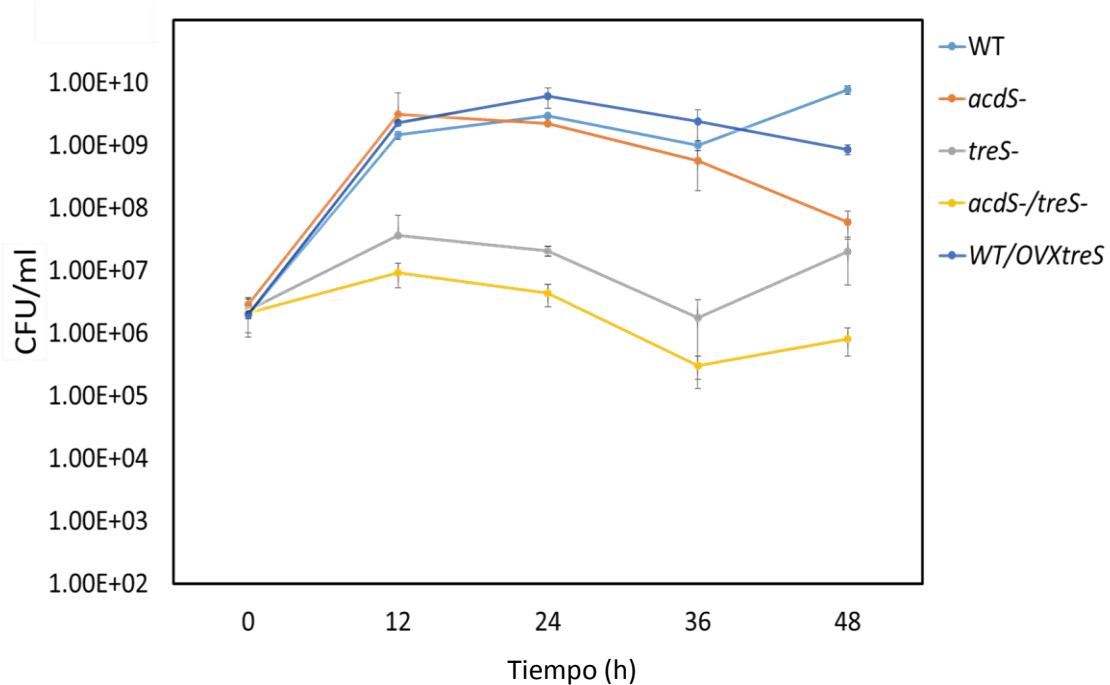


Figura 5. Supervivencia de *Pseudomonas* sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrepresante sin estrés salino. Unidades formadoras de colonia de las 0 a las 48 horas. En azul claro *Pseudomonas* sp. UW4; en anaranjado mutante sencilla en *acdS*; en gris mutante sencilla en *treS*; en amarillo doble mutante en *acdS/treS*; azul oscuro sobrepresante de *treS*.

Se sometieron las diferentes cepas bacterianas a condiciones de salinidad en medio mínimo M9 en 0.8 M de NaCl (fig. 6). Se pudo observar que la cepa silvestre tolera la salinidad y mantiene su viabilidad celular durante las 48 horas, mientras que la cepa mutante sencilla en *acdS* muestra una disminución en la viabilidad celular desde el inicio del contacto con la sal, la cepa mutante *treS* tiene también una disminución en la supervivencia, de la misma manera que la mutante en *acdS*, pero observamos que la doble mutante tiene un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad celular comparada con las mutantes sencillas. Por otra parte, la cepa sobrepresante de trehalosa, mantiene su crecimiento en condiciones de salinidad, incluso es aún mayor comparado con la cepa silvestre.

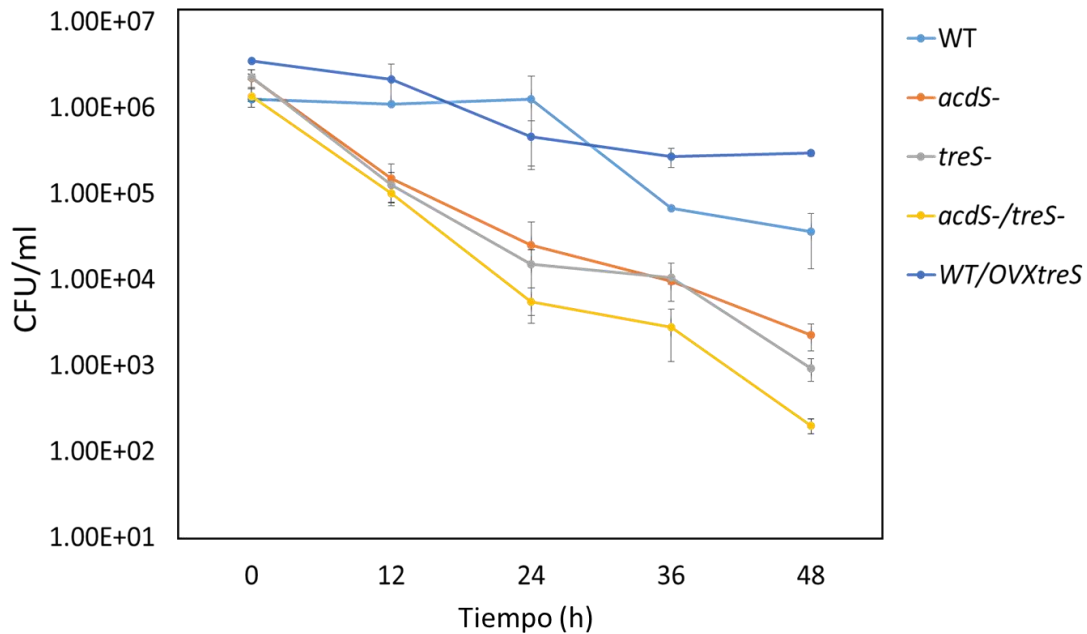


Figura 6. Supervivencia de *Pseudomonas* sp. UW4, sus mutantes isogénicas y la sobrepresante sometidas a estrés salino. Unidades formadoras de colonia de las 0 a las 48 horas en medio mínimo con 0.8M de NaCl. En azul claro *Pseudomonas* sp. UW4; en anaranjado mutante sencilla en *acdS*; en gris mutante sencilla en *treS*; en amarillo doble mutante en *acdS/treS*; azul oscuro sobrepresante de *treS*.

Estos datos sugieren un papel importante de la trehalosa y ACC desaminasa en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. UW4 cuando se encuentran sometidas a estrés salino. También se observa que la sobrepresión de trehalosa mitiga los efectos del estrés y el crecimiento se incrementa durante el estrés.

7.2 Actividad ACC desaminasa

La bacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas* sp UW4 tiene actividad ACC desaminasa (Li, et al., 2000). Por lo que en este ensayo corroboramos dicha actividad no sólo en la WT, sino también en las de las diferentes cepas mutantes tanto sencillas (*treS*) como dobles (*acdS/treS*), así como la cepa sobrepresante.

Se puede observar que la cepa silvestre UW4, la mutante sencilla en trehalosa y la cepa sobrepresante no se ven afectadas en la actividad ACC desaminasa, sin embargo, la mutante sencilla y la doble mutante no presenta actividad (fig. 7). Por lo que concluimos en este ensayo que la mutación en el gen *treS* y su sobrepresión, no afectan la actividad ACC desaminasa.

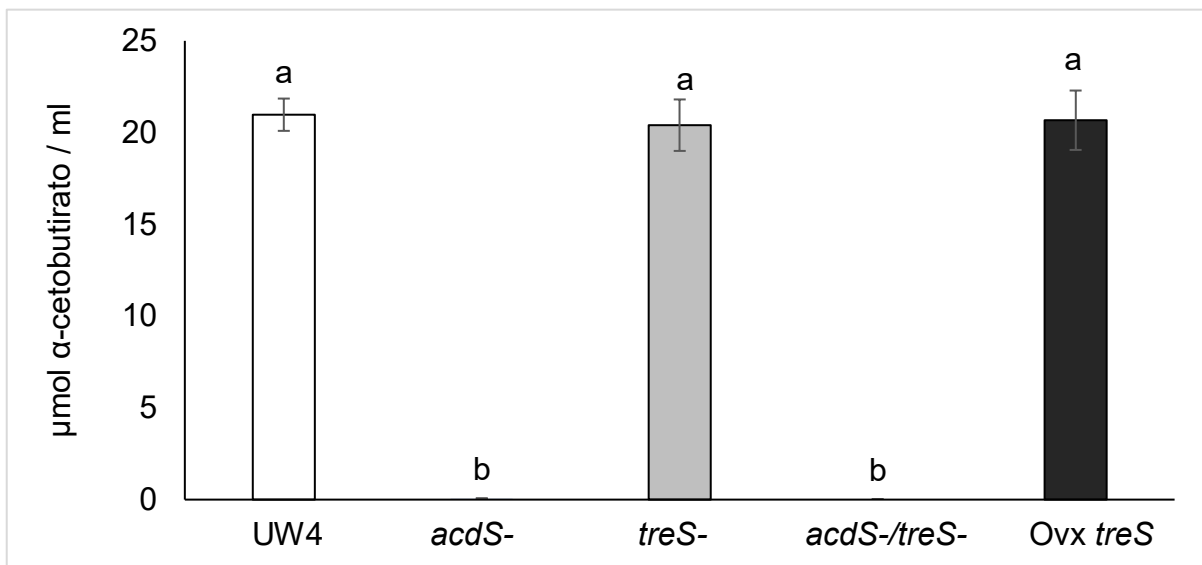


Figura 7. Actividad ACC desaminasa. Producción de α -cetobutirato por ml de muestra de las cepas UW4, *acdS*-, *treS*-, *acdS*-/*treS*-, *ovx treS*. Anova de una vía con prueba de Duncan; n=3; ($p \leq 0.05$) \pm EE.

7.3 Acumulación de trehalosa

Se sabe que la acumulación de trehalosa es importante en organismos que pueden mitigar los efectos del estrés osmótico (osmoprotector) por lo que se decidió analizar que tanto se acumula en la bacteria silvestre UW4, si tiene algún efecto en el crecimiento de las cepas mutantes, y cuanto más se acumula en la cepa sobrepresante. Se midió la acumulación de trehalosa por HPLC con un índice de refracción utilizando una columna HPX-87C, y posteriormente al inyectar la muestra el pico encontrado en el tiempo de retención (6.6 min) corresponde al disacárido trehalosa (fig. 8). Los valores se obtienen haciendo una relación entre el peso seco del pellet y el área bajo la curva del pico de trehalosa.

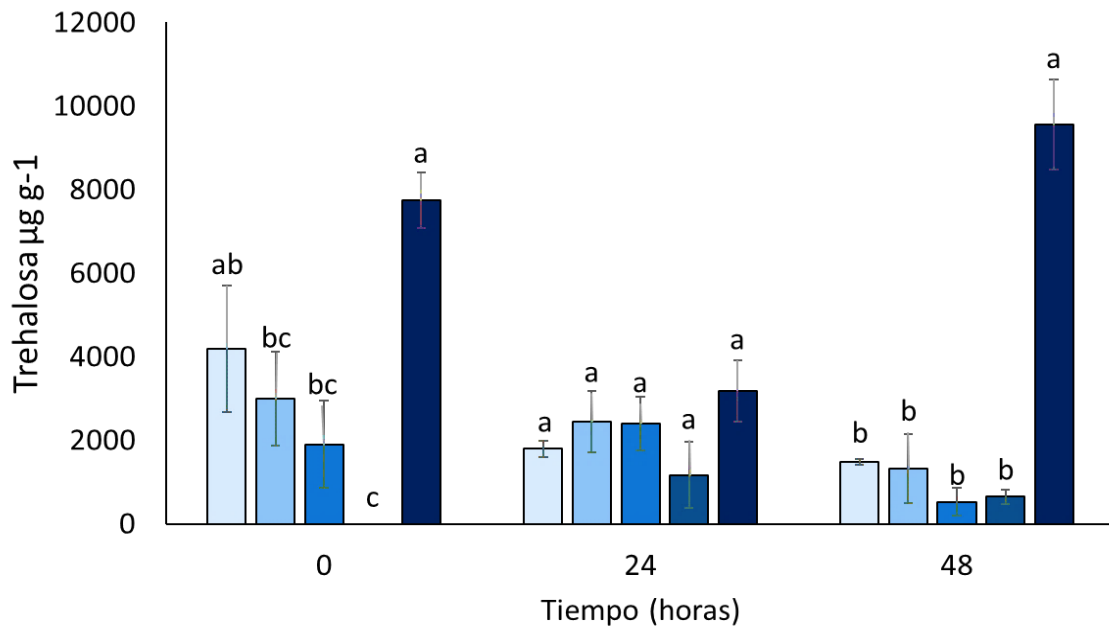


Figura 8. Acumulación de trehalosa. Las cepas se sometieron a 200 mM de NaCl y se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas, ■ UW4; ■ acdS-; ■ treS-; ■ acdS-/treS-; y ■ ovx treS. Anova de una vía con prueba de Duncan; n=3; ($p \leq 0.05$) \pm EE.

Podemos observar que a las 0 horas hay mayor acumulación de trehalosa en la cepa silvestre comparado con las mutantes sencillas y la doble mutante, pero la cepa sobreexpresante tiene un incremento significativo comparado con todas las cepas. A las 24 horas no hay diferencia en la acumulación de trehalosa entre las cepas, a las 48 horas vemos un incremento significativo de más de 6 veces comparado con la cepa silvestre y las mutantes sencillas, así como la doble mutante. En general se puede observar que la sobreexpresante acumula más trehalosa comparado con las demás cepas.

7.3 Efecto de *Pseudomonas* sp. UW4 sus mutantes isogénicas y la sobreexpresante en la germinación de semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

Decidimos analizar el efecto en el porcentaje de germinación de semillas de jitomate inoculadas con las cepas UW4, *acdS*⁻, *treS*⁻, *acdS*/*treS*⁻, *ovx treS* (fig. 9) y lo que observamos fue claramente que la cepa silvestre UW4 mejora un 16 % el porcentaje de germinación comparado con las semillas control sin inoculo. Las mutantes sencillas y la doble mutante tuvieron una disminución significativa comparada con *Pseudomonas* sp. UW4, en este parámetro concluimos que la cepa UW4 mejora el porcentaje de germinación y para que esto se lleve a cabo es necesaria la actividad ACC desaminasa y la producción de trehalosa ya que, al disminuir los porcentajes, indican un papel muy importante para mejorar la germinación.

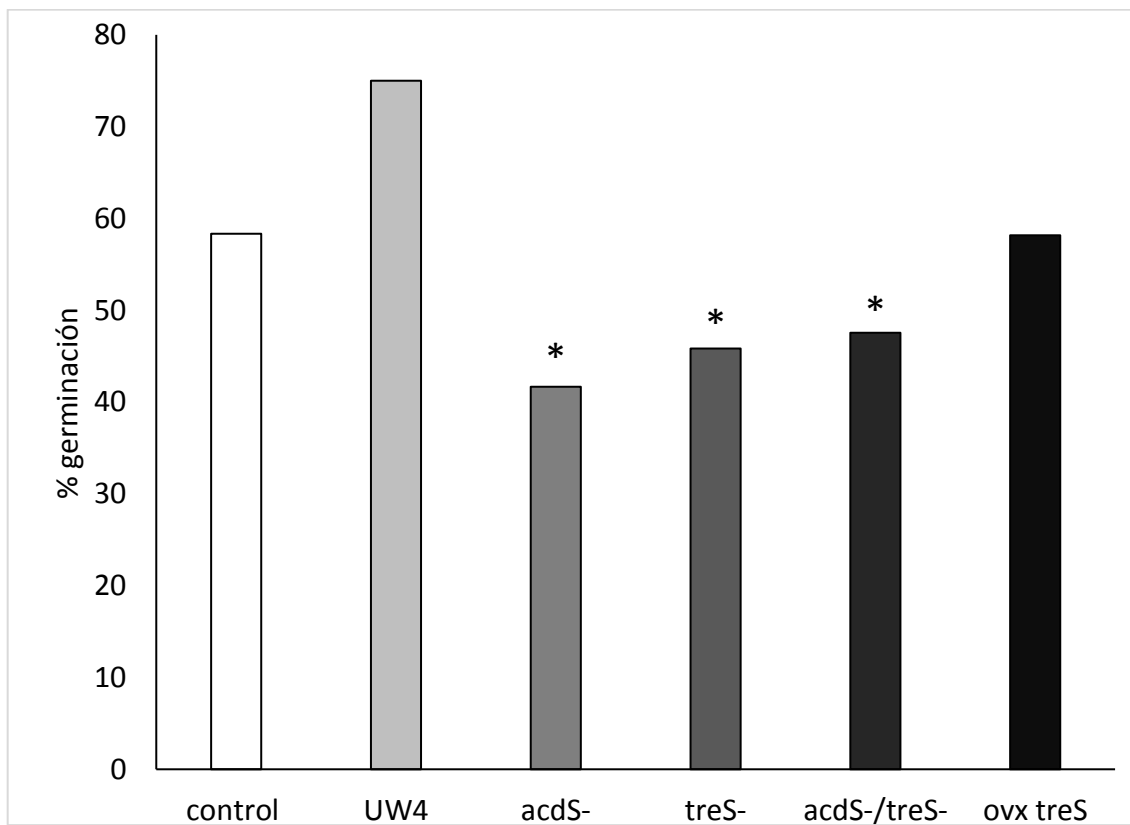


Figura 9. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate. Semillas de jitomate previamente esterilizadas e inoculadas con las diferentes bacterias, en barras blancas las semillas control esterilizadas y sin inóculo. * indica diferencia significativa respecto a la cepa UW4 según prueba de X^2 seguido de análisis de proporciones con una $n=24$.

7.4 Promoción de crecimiento de *Pseudomonas* sp. UW4 sus mutantes isogénicas y la sobrepresante en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

Para conocer el efecto de la actividad ACC desaminasa y acumulación de trehalosa en la PGPB *Pseudomonas* UW4 durante su interacción con plantas de jitomate se llevaron a cabo experimentos en invernadero. Tales experimentos incluyeron tratamientos bajo estrés salino a 200 mM de NaCl.

En los parámetros analizados en la raíz (fig. 10) podemos observar que en los controles que son plantas sin inóculo, hay una disminución significativa del 25 % en el peso fresco y del 20% para la longitud de la raíz, y es interesante mencionar que en las plantas en interacción con la cepa UW4 y sometidas a estrés no se afectan y crecen sin diferencia significativa a las plantas sin estrés, y con un incremento del 29% en la longitud de la raíz y un 26% en el peso fresco de la raíz comparada con las plantas sin inóculo y afectadas por la salinidad, lo que sugiere que la cepa UW4 mitiga los efectos dañinos del estrés en la raíz. Las mutantes sencillas en el peso fresco de las plantas sometidas a estrés, no mostraron diferencias comparadas con el control (sin inóculo). Lo anterior nos sugiere un papel muy importante de la enzima ACC desaminasa y la producción de trehalosa en contrarrestar los efectos de la salinidad en la raíz de plantas de jitomate.

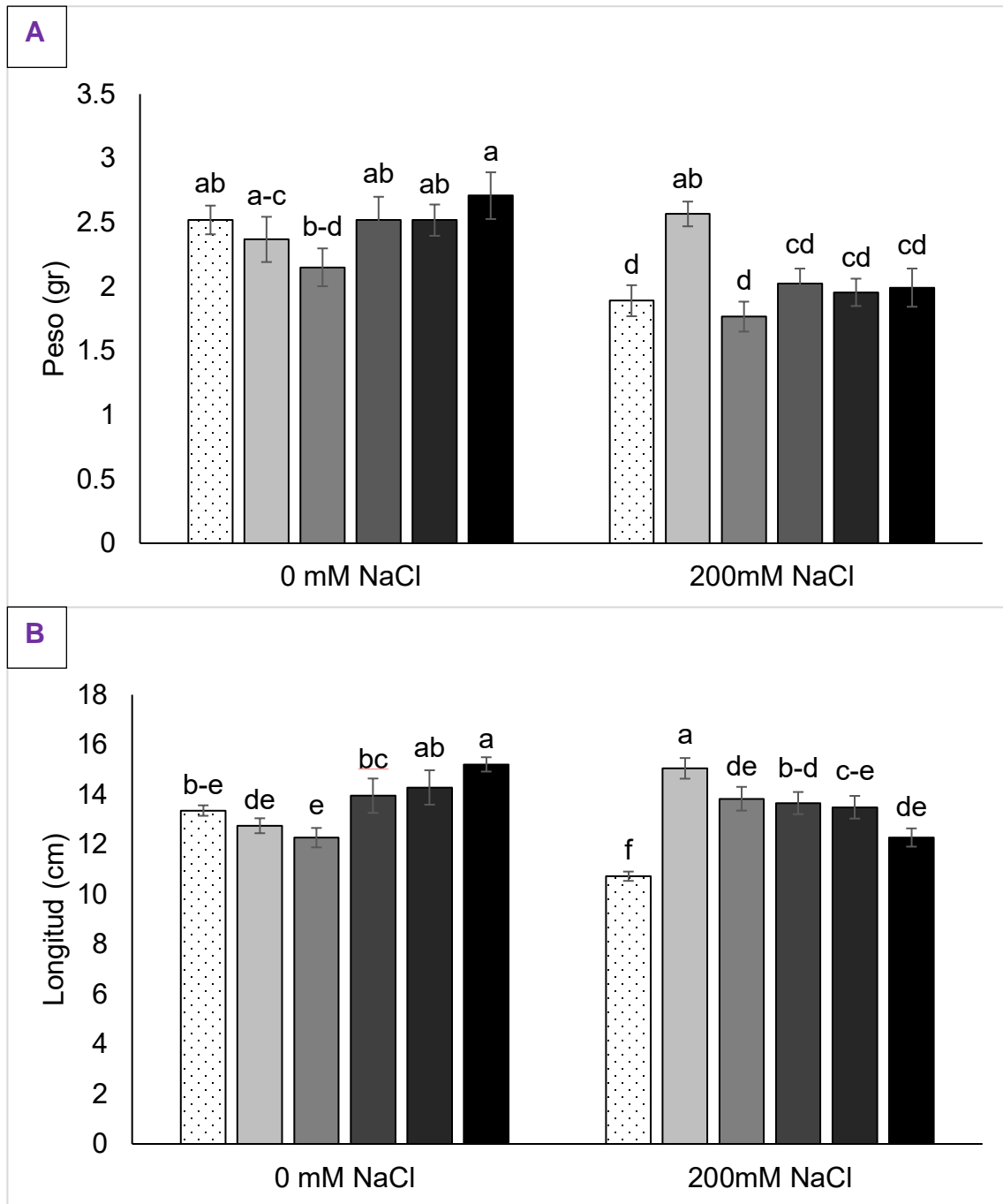


Figura 10. Longitud y peso fresco de la raíz. panel A, peso fresco de la raíz; panel B, longitud de la raíz; en barras con trama, plantas de *Lycopersicon esculentum* sin inocular y en el orden de gris más claro a gris más oscuro las cepas UW4, *acdS*⁻, *treS*⁻, *acdS*⁻/*treS*⁻ y *ovx treS*. Anova factorial con prueba de Duncan; n=12; ($p \leq 0.05$) \pm EE.

En el peso fresco (fig. 11B) de la parte aérea podemos observar que las plantas inoculadas con la cepa UW4 y sometidas a estrés salino incrementan un 16% su peso comparado con las plantas sin inóculo, en las cepas mutantes, así como la sobreexpresante no se encontró diferencia entre los tratamientos, lo que nos indica que estas funciones son importantes para promover el crecimiento cuando las plantas se encuentran bajo estrés, en este caso salino. En condiciones control observamos un dato interesante ya que las plantas en interacción con la doble mutante, disminuye significativamente.

En la longitud de la parte aérea (fig. 11A) observamos que en condiciones control no hay diferencias significativas entre tratamientos con bacterias, aunque si lo hubo en las plantas de jitomate en interacción con la mutante sencilla en *treS*-, hay una disminución significativa que se discutirá en “discusión de resultados”. En las plantas sometidas a estrés salino podemos ver que hay una disminución del 16.5% comparado con las plantas control sin inóculo, pero las plantas en interacción con UW4 y sometidas a estrés no se ven afectadas, y crecen sin diferencia significativa a las plantas sin estrés, en las mutantes sencillas, la doble mutante, y la sobreexpresante ocasionó una disminución significativa del 27% (*acdS*-), 19.3% (*treS*-), 21.6% (*acdS*-/*treS*-) y 13.8% (*ovx treS*) comparándolas con las plantas inoculadas con la cepa UW4 y la cepa UW4 tiene un incremento significativo del 16.5 % comparándolo con las plantas sometidas a estrés y sin inóculo.

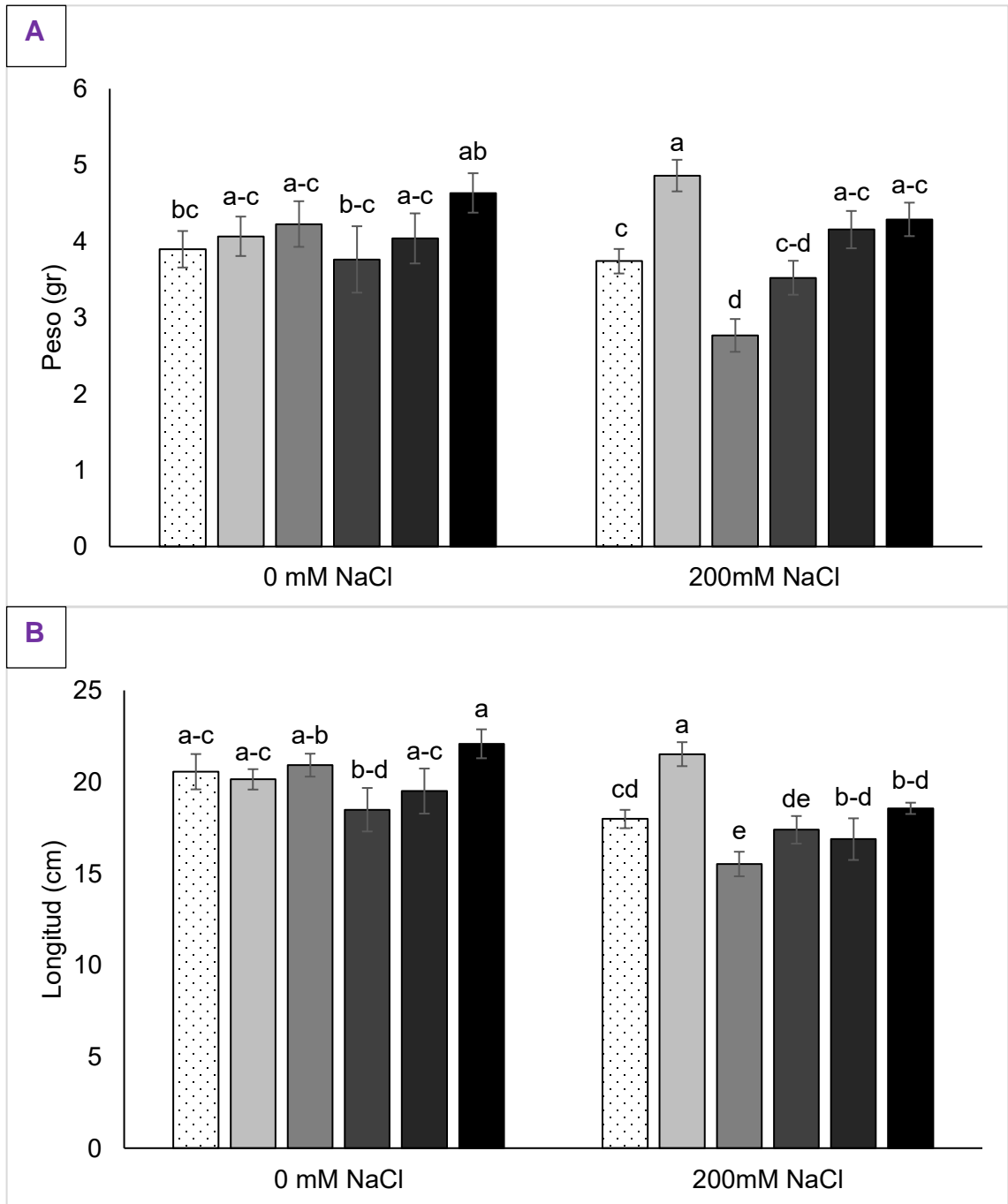


Figura 11. Longitud y peso fresco de la parte aérea. panel A, peso fresco de la parte aérea; panel B, longitud de la parte aérea; en barras con trama, plantas de *Lycopersicon esculentum* sin inoculo y en el orden de gris más claro a gris más oscuro las cepas UW4, *acdS*⁻, *treS*⁻, *acdS*/*treS*⁻ y *ovx treS*⁻. Anova factorial con prueba de Duncan; n=12; ($p \leq 0.05$) \pm EE.

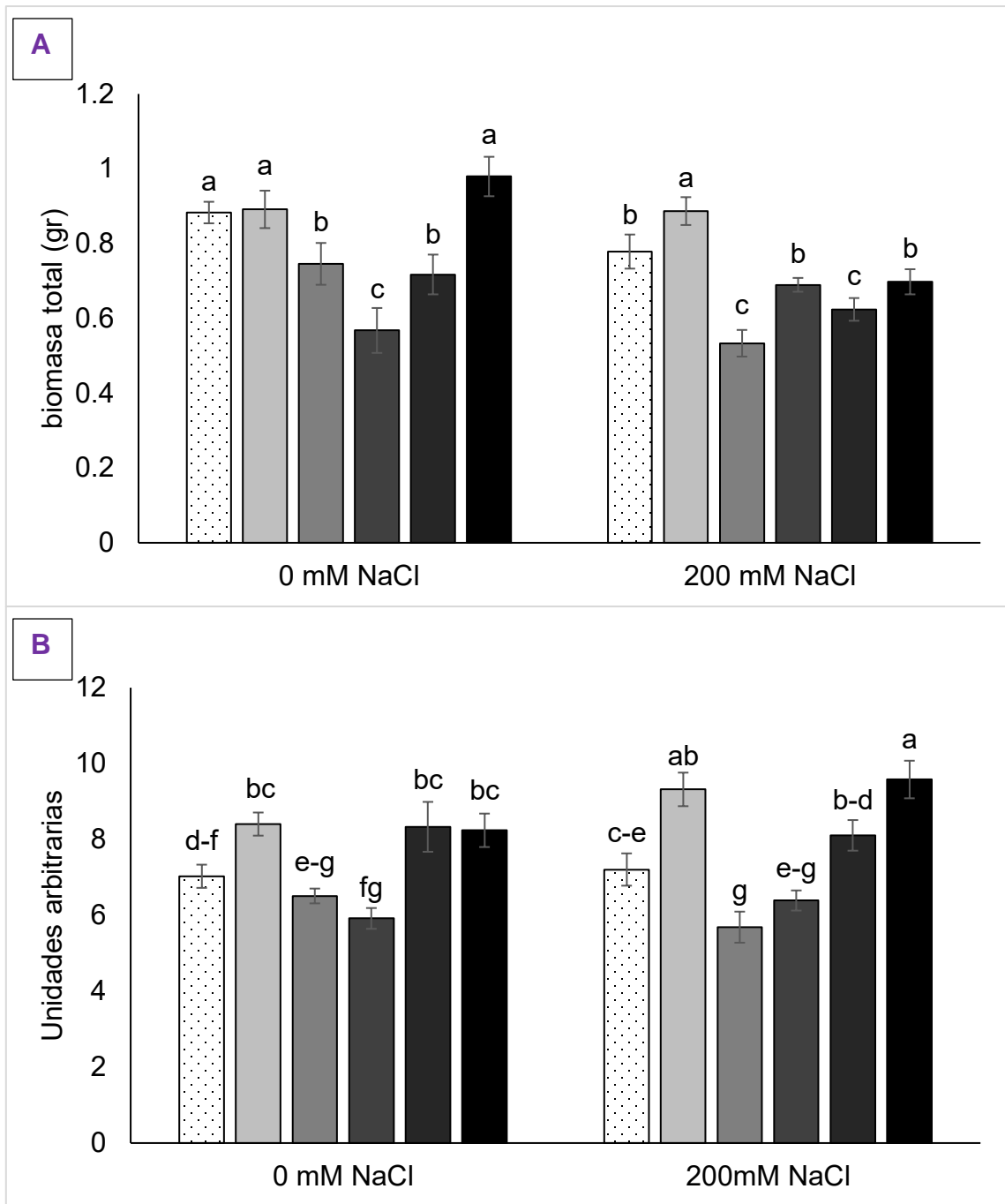


Figura 12. Concentración de clorofila y biomasa total. panel A, concentración de clorofila; panel B, biomasa total; en barras con trama, plantas de *Lycopersicon esculentum* sin inoculo y en el orden de gris más claro a gris más oscuro las cepas UW4, *acdS*-, *treS*-, *acdS*-/*treS*- y *ovx treS*. Anova factorial con prueba de Duncan; n=12; ($p \leq 0.05$) \pm EE.

Posteriormente en la biomasa total, o peso seco total (fig. 12A), observamos que en condiciones de salinidad la cepa silvestre mejora significativamente el peso de la planta en un 12.6% comparada con las plantas sometidas a estrés y sin inóculo; en las mutantes sencillas, doble y sobreexpresante, hay una disminución en condiciones de estrés. Por último, se obtuvo la concentración de clorofila y la biomasa total (fig.12B); podemos ver que, en la concentración de clorofila, las plantas inoculadas con la cepa silvestre, la doble mutante y la cepa sobreexpresante, mejoran significativamente este parámetro.

En conjunto estos resultados sugieren que la actividad ACC desaminasa y la producción de trehalosa son importantes no solo para mitigar los efectos dañinos del estrés sino también para promover el crecimiento de la planta en condiciones de estrés salino y en condiciones control.

8. Discusión

La actividad ACC desaminasa en PGPBs es una función que ayuda a disminuir los niveles de etileno, los cuales se pueden ver incrementados en plantas sometidas a diversos tipos de estrés, incluyendo la salinidad (Tavares, et al., 2018). En este mismo sentido, la acumulación de trehalosa ha sido un mecanismo que incrementa los niveles de osmoprotección en bacterias y que, a su vez, al interactuar con plantas, pueden lograr mejorar su crecimiento y sobrevivencia en dichas condiciones adversas (Chen, et al., 2017). Sin embargo, no existe evidencia de que ambos mecanismos actúen de forma sinérgica o aditiva durante el crecimiento de PGPBs en condiciones de salinidad; así como los efectos observados en interacción con plantas.

Por lo tanto, en el presente trabajo se analizó el papel de la actividad ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa en la bacteria *Pseudomonas* sp. UW4 durante la interacción con plantas sometidas a estrés salino (NaCl). Los resultados generales observados demostraron que la cepa silvestre UW4 es capaz de mantener la viabilidad celular en medios hasta una concentración de 0.8M de NaCl, para que esto se mantenga son necesarios los genes *acdS* y *treS* ya que la viabilidad celular de las cepas mutantes se ve afectada; la doble mutante tiene un efecto aditivo comparado con las mutantes sencillas. Además, los datos sugieren que el papel de la sobreexpresión de *treS* es mantener la viabilidad celular y el crecimiento en altas concentraciones de sal. Este resultado coincide con otros trabajos, donde se ha reportado que la trehalosa confiere mayor tolerancia a la sequía o estrés osmótico en microorganismos como *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis*, cuando estos crecen con trehalosa, las células permanecen viables aun después de 5 días después del estrés (Leslie, et al., 1995), evitando la agregación de proteínas (Singer & Lindquist, 1998). Cabe mencionar que la mayoría de los reportes en donde analizan el papel de la trehalosa es a partir de la

vía TPS-TPP, y en el presente trabajo se analizó la vía TreS por lo que se sugiere que la síntesis de trehalosa a partir de la ruta TreS es relevante y actúa de manera similar a la vía TPP-TPS durante la sobrevivencia en medios con NaCl.

Otro dato muy interesante es el hallazgo de que la enzima ACC desaminasa es importante para el crecimiento de *Pseudomonas* sp. UW4 en medios salinos, ya que hasta ahora lo que se sabe sobre la actividad ACC desaminasa es durante la interacción con plantas y no el efecto en la bacteria (Sarkar, et al., 2018), (Heydarian, et al., 2016). Al analizar la producción y acumulación de trehalosa, observamos que se fue modificando conforme pasaban las horas, a las 0 horas es mayor la acumulación en la cepa sobrepresante de casi el doble comparado con la cepa silvestre y más del doble comparado con las mutantes y la doble mutante, este resultado es esperado debido a que la sobrepresión se realizó en un plásmido de expresión constitutiva, con bajo número de copias, se utilizó este vector por su amplia utilidad en bacterias gram-negativas gracias a la resistencia a varios antibióticos (Kovach, et al., 1995), posteriormente a las 24 horas después de estar sometidas las células a 0.2M de NaCl, no existe diferencia significativa entre todas las cepas, y esto puede ser debido a que la bacteria este utilizando la trehalosa para alguna función, ya sea en forma de reserva energética o para preservar la estructura y función tanto de las membranas como de las proteínas; vemos que la cepa mutante en *treS* acumula trehalosa esto es algo esperado ya que *Pseudomonas* sp. UW4 cuenta con otra vía para la síntesis de trehalosa (TreY-TreZ) y aunque la vía TreS es la vía principal (Orozco Mosqueda *comp.pers.*) en condiciones de estrés es evidente que la bacteria utilizara ésta vía (TreY-TreZ) para sobrevivir en medios con NaCl. Con esto se evidencia la importancia de este compuesto en condiciones de estrés osmótico. Por último, a las 48 horas vemos un incremento significativo de más de 6 veces en la cepa sobrepresante comparado con la cepa silvestre y las diferentes mutantes, esto puede ser debido a que ya no está utilizando la acumulación de trehalosa para mitigar los efectos del estrés, sino que se encuentra totalmente estable, esto se correlaciona con lo reportado por (Streeter, 2003), donde

sugiere que la concentración citoplasmática de trehalosa es más crítica para mejorar la supervivencia durante la desecación comparado con la trehalosa periplasmática. Es por esta razón también que la viabilidad celular en medios con NaCl es mayor en la cepa sobreexpresante. La cepa silvestre, las mutantes sencillas y la doble mutante no tienen diferencia significativa entre ellas. Estos resultados indican que la cepa sobreexpresante sí podría acumular más trehalosa intracelular y que la mutación en ACC desaminasa no afecta la producción de trehalosa.

Es importante mencionar que la doble mutante es incapaz de producir trehalosa a las 0 horas, lo que nos indica que, aunque la mutante sencilla *TreS* tiene una disminución en la producción, la doble mutante se ve totalmente afectada. Así que al igual que en el ensayo de viabilidad, en la acumulación de trehalosa, la cepa doble mutante tiene un efecto aditivo.

Por otra parte, una alta concentración de sal puede inducir un desequilibrio de nutrientes y los incrementos en los niveles de etileno en plantas, lo que resulta en una disminución del crecimiento, sin embargo estos procesos pueden ser minimizados utilizando bacterias promotoras de crecimiento vegetal y que cuenten con actividad de la enzima ACC desaminasa y así el ACC que de otro modo se usaría como sustrato para la producción de etileno inducida por estrés se desvía a la bacteria sirviendo como nutriente para el crecimiento bacteriano. La salinidad implica deshidratación celular, pérdida de turgencia y acumulación de especies reactivas de oxígeno, que afectan las estructuras subcelulares y la actividad enzimática.

Bajo la exposición al estrés osmótico, las plantas exhiben una amplia gama de mecanismos adaptativos bioquímicos y moleculares estos comprenden cambios en la morfología y desarrollo como la inhibición del crecimiento radicular, el transporte iónico y los ajustes metabólicos, que implican la síntesis de solutos compatibles (osmoprotectores) que contrarrestan la deshidratación al reducir el potencial osmótico y proteger las membranas, enzimas y otras estructuras subcelulares

contra daños irreversibles, desnaturalización y agregación de proteínas sin alterar el rendimiento fisiológico (Rodríguez-Salazar, et al., 2009).

Entre los diferentes osmoprotectores, la trehalosa es una de las más efectivas para contrarrestar varios tipos de estrés abiótico. En este trabajo también se analizó la interacción de la cepa silvestre UW4 productora de ACC desaminasa y trehalosa, así como las diferentes mutantes en ACC desaminasa, trehalosa, una doble mutante en ACC desaminasa y trehalosa y una cepa sobrepresante de trehalosa para evaluar el efecto de promoción durante la interacción con plantas de jitomate en condiciones control y sometidas a estrés salino.

Los resultados muestran claramente que la cepa silvestre UW4 mitiga los efectos del estrés salino, hay un aumento en el porcentaje de germinación, en el peso fresco y longitud tanto de la raíz como de la parte aérea, así como el incremento en la concentración de clorofila. El aumento general en estos parámetros muestra los beneficios de promoción de crecimiento de la cepa UW4, y podemos entender que tanto la enzima ACC desaminasa como la síntesis de trehalosa son indispensables para que la bacteria pueda ejercer un efecto benéfico en la planta en condiciones de estrés.

Los resultados obtenidos de la interacción de la mutante sencilla en *acdS* con plantas de jitomate sometidas a estrés, fueron los esperados ya que se sabe que la mutación en ACC desaminasa de las PGPBs no mitiga los efectos del estrés pero tampoco afecta el alargamiento de la raíz comparado con las plantas sin inoculo (Belimov, et al., 2001), mientras que el efecto de promoción del crecimiento fue evidente para la cepa que si utiliza ACC.

El papel de la trehalosa en plantas no está del todo dilucidada, pues se creía que la función principal era la de osmoprotector por los descubrimientos en plantas de la resurrección *Selaginella lepidophylla* (Adams, et al., 1990), fue hasta 1998 que se

informó por primera vez la existencia de genes involucrados para la síntesis de trehalosa, quedando claro el papel omnipresente en las plantas (Blázquez, et al., 1998), pero, se carece de información sobre el papel fisiológico de la ruta de la trehalosa fuera de las especies de plantas de la resurrección, para responder estas dudas se han hecho diferentes estudios en donde se ha encontrado que en *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa la trehalosa-6-fosfato (T6P) tiene claros efectos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, también se supo que los niveles de T6P regulan la utilización de carbohidratos para el crecimiento (Schluepmann, et al., 2003). Sabiendo esto, se hicieron estudios en levadura en donde al estar mutada la vía de síntesis de trehalosa en *tps1* se acumulan intermediarios respiratorios en respuesta a la alimentación de glucosa, esto es debido al secuestro de fosforo inorgánico resultante por lo que se inhibe la síntesis de ATP y, por lo tanto, el crecimiento (Hohmann, et al., 1996). En esta investigación se sugiere que el gen *treS* tiene el mismo funcionamiento que TPS debido a que los efectos pleiotrópicos al estar mutada la vía TreS tanto en la bacteria como en la planta son parecidos. La cepa mutante en trehalosa (*treS-*) provocó una disminución significativa en los parámetros medidos en la parte aérea (fig. 11) esto abre la posibilidad de especular diferentes alternativas ya que no se conocía tal efecto en las plantas, 1.- la vía TreS está involucrada en algún sistema de comunicación microorganismo-planta. 2.- la vía TreS es necesaria para colonizar a la planta. 3.- el umbral necesario para que la bacteria tuviera un efecto en la planta fue insuficiente. 4.- La planta percibe a la bacteria como patógena.

La cepa sobreexpresante es de mucho interés ya que se pensaba que la trehalosa no se podía acumular debido a las trehalasas que tiene la planta y entonces se añadía Validamicina A para inhibir la actividad de dicha enzima, sin embargo posteriormente se caracterizó la sobreexpresión de TPS en plantas de jitomate donde no se usó Validamicina, estas plantas mostraron alteraciones en la morfología, como crecimiento atrofiado, normal o mayor que las plantas de control, brotes gruesos con entrenudos cortos, nervios pronunciados en hojas rígidas de color

verde oscuro con protuberancias en ellos y ramas erigidas (Cortina & Culiáñez-Macià, 2005), y es lo que se nota en las plantas inoculadas con la cepa sobreexpresante de *treS*, se observa un crecimiento atrofiado que se refleja en la longitud de la raíz y parte aérea (fig.10 y 11) igual a las plantas control pero menor a las plantas inoculadas con la cepa silvestre (en condiciones de salinidad). También se relaciona con los brotes gruesos, las hojas rígidas y una mayor turgencia con el peso fresco tanto de la parte aérea como de la raíz (fig. 10 y 11) otro dato muy interesante es la acumulación de clorofila en plantas que sobreexpresan TPS y que coinciden con nuestros resultados en la (fig. 12A) donde observamos un incremento en la concentración de clorofila cuando se sobreexpresa el gen *treS* esto sugiere fuertemente que la función de la enzima TreS es similar a TPS.

En la doble mutante no vemos una diferencia significativa con respecto a las mutantes sencillas. Esto puede ser por diferentes razones; pudo ser que la bacteria al estar sometida a estrés no haya resistido dichas concentraciones de sal, pero también existe la posibilidad de que la cantidad de inóculo no haya llegado al umbral necesario para llevar a cabo algún efecto.

Por lo tanto, se sugiere continuar con esta línea de investigación para evaluar otras condiciones de crecimiento e inoculación de las plantas para determinar un efecto más claro del papel de la ACC desaminasa y acumulación de trehalosa en *Pseudomonas* sp. UW4.

9. Resumen de resultados

-La actividad ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa muestran un efecto aditivo en *Pseudomonas* sp. UW4 para mitigar el estrés salino.

-Las cepas mutantes *acdS*- y *acdS*-/*treS*- carecen de actividad ACC desaminasa, mientras que en la mutante *treS*- y *OvxtreS* no se afectan en dicha función.

-La acumulación de trehalosa fue mayor en la cepa sobrepresante comparado con la WT a las 48 horas de estar sometidas a estrés salino.

-La cepa silvestre UW4 en interacción con plantas de jitomate promueve su crecimiento en invernadero, con o sin estrés salino.

-La actividad ACC desaminasa y la producción de trehalosa son importantes para promover el crecimiento vegetal en condiciones de salinidad.

10. Conclusión

La actividad ACC desaminasa y la acumulación de trehalosa en *Pseudomonas* sp. UW4 actúan de forma aditiva para sobrevivir en medios con NaCl, además de ser relevantes para promover el crecimiento de *L. esculentum* en invernadero bajo condiciones de estrés salino.

Coautoría



***Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects**

Daniel Rojas-Solís¹, **Elizabeth Zetter-Salmón**¹, Miguel Contreras-Pérez¹, Ma del Carmen Rocha-Granados³, Lourdes Macías-Rodríguez¹ and Gustavo Santoyo^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. ³Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, México.

Corresponding author: Gustavo Santoyo E-mail: gsantoyo@umich.mx

11. Bibliografía

Adams, R. P., Kendall, E. & Kartha, K., 1990. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Volumen 18, pp. 107-110.

Alcaraz Ariza, F. J., 2012. *programa de teoría de geobotánica*. [En línea] Available at: <http://www.um.es/docencia/geobotanica/teoria.html>

Avonce, N. y otros, 2004. The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *plant physiology*, Volumen 136, pp. 3649-3659.

Bakshi, A., Shemansky, J. M., Chang, C. & Binder, B. M., 2015. History of Research on the Plant Hormone Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, Volumen 34, pp. 809–827.

Belimov, A. A. y otros, 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, Volumen 47, pp. 642-652.

Blázquez, M. A. y otros, 1998. Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *the plant journal*, Volumen 13, pp. 685–689.

Brígido, C. y otros, 2013. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Mesorhizobium* spp. reduces the negative effects of salt stress in chickpea. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 349, pp. 46-53.

Charle, I., Strawtn, V. D. & dominique, 2007. REGULATING PLANT WATER STATUS. En: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. West Lafayette, U.S.A.: springer, pp. 819.

Chaves, M. M., Flexas, J. & C., P., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *annals of botany*, Volumen 103, pp. 551–560.

Cheng, Z., Park, E. & Glick, B. R., 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, Volumen 53, pp. 912-918.

Chen, X. y otros, 2017. A trehalose biosynthetic enzyme doubles as an osmotic stress sensor to regulate bacterial morphogenesis. *PLOS Genetics*, Volumen 13, pp. 1-19.

Cortina, C. & Culiáñez-Macià, F. A., 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, Volumen 169, pp.75-82.

Duan, J. y otros, 2013. The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLOS one*, Volumen 8, pp. 1-19.

Elbein, A. D., Pan, Y., Pastuszak, I. & Carrol, D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *glycobiology*, Volumen 13, pp. 17R.29R.

Elbein, A., Pastuszak, I. & Carroll, D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *glycobiology*, Volumen 13, pp. 27-37.

Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. & Huante, P., 2013. Agrobiotechnological importance of the ACC deaminase in rhizobacteria, a review. *revista fitotécnica mexicana*, Volumen 36, pp. 251 - 258.

FAO, 2016. *organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura*. [En línea]

Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5126s.pdf>

FAO, 2017. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea]

Available at: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/en/>

Fernandez, O. y otros, 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science*, Volumen 15, pp. 409-417.

Flexas, J. y otros, 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration.. *New Phytologist*, Volumen 172, pp. 73–82.

Garg, A. K. y otros, 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volumen 99, pp. 15898-15903.

Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. & Pasternak, J., 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Canadian Journal of Microbiology*, Volumen 40, pp. 911-915.

Glick, B. R., Karaturović, D. M. & Newell, P. C., 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, Volumen 41, pp. 533-536.

Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Volumen 41, pp. 109-117.

Glick, B. R., Penrose, D. M. & Li, J., 1998. A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant. *Journal of Theoretical Biology*, Volumen 190, pp. 63-68.

Glick, B., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 251, pp. 1-7.

Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J. & Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, Volumen 119, pp. 329–339.

Glick, B. R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, pp. 30-39.

Glick, B. R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, Volumen 169, pp. 30-39.

Goddijn, O. y otros, 1997. Inhibition of Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants. *plant physiology*, Volumen 113, pp. 181-190.

Grichko, V. & Glick, B. R., 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volumen 39, pp. 11-17.

Heydarian, Z. y otros, 2016. Inoculation of Soil with Plant Growth Promoting Bacteria Producing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase or Expression of the Corresponding *acdS* Gene in Transgenic Plants Increases Salinity Tolerance in *Camelina sativa*. *frontiers in Microbiology*, Volumen 7, pp. 1-17.

Hohmann, S. y otros, 1996. Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *molecular microbiology*, Volumen 20, p. 981–991.

Korte Jan, A. M. , T. C. M. , S. K. , K.-B. H. , D. R. , K. K. A. D. M. H. T. J. J. W. R. , B. S. , I. T. R. E. S. K. R., 2016. Trehalose-6-Phosphate-Mediated Toxicity Determines Essentiality of OtsB2 in *Mycobacterium tuberculosis* In Vitro and in Mice. *PLOS Pathogens*, pp. 1-22.

Kovach, M. E. y otros, 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *gene*, Volumen 166, pp. 175-176.

Leslie, S. B. y otros, 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.. *Applied and Environmental Microbiology*, Volumen 61, pp. 3592-3597.

Li, J., Ovakim, D. H., Charles, T. C. & Glick, B. R., 2000. An ACC Deaminase Minus Mutant of *Enterobacter cloacae* UW4. *Current Microbiology* , pp. 101–105.

Lugtenberg, B. & Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* , pp. 541-556.

Luján, A. M., Gómez, P. & Buckling, A., 2018. Siderophore cooperation of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil. *biology letters* , pp. 1-4.

Mirza, H., Mohammad Hossain, A. & Masayuki, F., 2011. Selenium-Induced Up-Regulation of the Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification System Reduces Salinity-Induced Damage in Rapeseed Seedlings. *Biological Trace Element Research*, Volumen 143, p. 1704–1721.

Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, Volumen 25, pp. 239-250.

Nikos Hontzeas, J. Z. B. R. G. M. M. A.-O., 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, pp. 11-19.

Olivier Fernandez, L. B. A. Q. R. S. S. C. C., 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science*, Volumen 15, pp. 409-417.

Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E. & López-Bucio, J., 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior*, Volumen 3, pp. 263-265.

Parvaiz, A., 2010. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, Volumen 56, pp. 575-588.

Penrose, D. M. & Glick, B. R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, Volumen 118, pp. 10-15.

Rhoades, J. D., 1990. Determining soil salinity from measurements of electrical conductivity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Volumen 21, pp. 1887-1926.

Rodríguez-Salazar, J., Suarez, R., Caballero-Medallo, J. & Iturriaga, G., 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *Microbiology Letters*, Volumen 296, pp. 52–59.

Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E. & Santoyo, G., 2015. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Volumen 22, pp. 45-57.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. & Bhatti Ahmad, S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Industrial Microbiology & Biotechnology*, pp. 635–648.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. d. C. & Glick, B. R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, Volumen 183, pp. 92-99.

Sarkar, A. y otros, 2018. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Research in Microbiology*, Volumen 169, pp. 20-32.

Schluepmann, H. y otros, 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, Volumen 100, pp. 6849–6854.

Schwarz, S. & Van Dijck, P., 2017. Trehalose metabolism: A sweet spot for *Burkholderia pseudomallei* virulence. *Virulence*, Volumen 8, pp. 5-7.

Serrano, R., Culiañz-Maciá, F. A. & Moreno, V., 1998. Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae*, pp. 261-269.

Singer, M. A. & Lindquist, S., 1998. Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo. *Molecular Cell*, Volumen 1, pp. 639–648.

Streeter, J., 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Applied microbiology*, Volumen 95, pp. 484–491.

Suárez, R. y otros, 2009. Improvement of Drought Tolerance and Grain Yield in Common Bean by Overexpressing Trehalose-6-Phosphate Synthase in Rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, pp. 958–966.

Tavares, M. J., Nascimento, F. X., Glick, B. R. & Rossi, M. J., 2018. The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF1 promotes the early nodulation and growth of common bean. *Applied Microbiology*, Volumen 66, pp. 1-20.

Türkan, I. & Demiral, T., 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, Volumen 67, pp. 2-9.

Van Dijken, A. J., Schlupepmann, H. & Smeekens, S. C., 2004. Arabidopsis Trehalose-6-Phosphate Synthase 1 Is Essential for Normal Vegetative Growth and Transition to Flowering. *plant physiology*, Volumen 135, pp. 969-977.

Volkov, V. & Beilby, M. J., 2017. Editorial: Salinity Tolerance in Plants: Mechanisms and Regulation of Ion Transport. *plant physiology*, Volumen 8, pp. 1795.

Yang, J., Kloepper, J. W. & Ryu, C.-M., 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, Volumen 14, pp. 1-4.