

EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON MUTANTES DE *Rhizobium etli* SOBREPDUCTORAS DE TREHALOSA EN *Phaseolus vulgaris*

Bárbara Nova-Franco, Luis Enrique Hernández Téllez, Gabriel Iturriaga y Ramón Suarez, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, rsuarez@buzon.uaem.mx

Palabras clave: trehalosa, Rhizobium etli, Phaseolus vulgaris.

Introducción. La trehalosa tiene la propiedad de proteger a las membranas y proteínas del estrés osmótico o de temperaturas extremas. Basándose en este mecanismo biológico, varios grupos de investigación en el mundo incluyendo nuestro laboratorio (CeIB, UAEM) han utilizado a la trehalosa y su metabolismo para realizar trabajos de ingeniería genética y sobreproducir este azúcar para generar organismos transgénicos con tolerancia al estrés abiótico. Anteriormente nuestro grupo reportó una cepa recombinante de *Rhizobium etli*, que sobreproduce la trehalosa, (denominada Sobreexpresante o SE) y que al ser inoculada en plantas de frijol les confiere mayor rendimiento y tolerancia al estrés por sequía (1).

El presente trabajo, plantea como principal objetivo, generar cepas mutantes de *Rhizobium etli* sobreproductoras de trehalosa por mutagénesis química, para lograr un fenotipo similar al de la cepa SE pero estas cepas no se considerarían recombinantes y su liberación al campo sería relativamente fácil.

Metodología. Se mutagenizó la cepa CE3 de *R. etli* con EMS, y se seleccionaron en dos agentes osmóticos (NaCl y sorbitol). En las cepas mutantes se cuantificó el contenido de trehalosa por HPLC, y se evaluó su fenotipo simbiótico con *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de riego normal y de estrés por sequía, analizando parámetros simbióticos, rendimiento y tolerancia al estrés.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 60 colonias de *R. etli* en los 3 diferentes tiempos de mutagénesis (30', 60' y 90'). Los datos de cuantificación de trehalosa de las mutantes obtenidas mostraron que estas sintetizan diferencialmente el disacárido, indicando que su acumulación, es de entre 3 y 5 veces superior a lo previamente reportado para *Rhizobium*. En la simbiosis, se determinó que solamente el 30% de las mutantes tuvieron la capacidad de nodular. De las mutantes que nodularon (denominadas 30.4, 30.8 y 30.16), la 30.8 fue la que presentó menor número de nódulos aunque estos fueron de mayor tamaño y en peso fresco son similares a la SE (1) y la actividad de nitrogenasa se incrementó 3 veces con respecto a la cepa WT. Una parte importante del trabajo fue la evaluación de la tolerancia a sequía de las plantas inoculadas con la mutantes y lo que se obtuvo fue una supervivencia del 100%, 25% y 0% de las plantas

inoculadas con las mutantes 30.16, 30.8 y 30.4 respectivamente. Esto puede ser debido a que al existir una sobreacumulación de trehalosa en los nódulos esta pueda exportarse a diferentes partes de la planta y producir un efecto protector contra la sequía. Además, se evaluó, en condiciones de riego normal y de estrés por sequía, el comportamiento del rendimiento de las plantas de frijol inoculadas y lo que se observó fue que la mutante 30.4 le confiere a la planta un incremento en grano del 50%, la 30.8 del 25% y la 30.16 tuvo un incremento del 65%. En condiciones de estrés por sequía las plantas inoculadas con la mutante 30.16 mostraron un rendimiento similar a lo previamente reportado con la cepa SE (1) (Fig. 1). Esto es una ventaja desde el punto de vista aplicado, ya que las plantas no solo toleran episodios de sequía sino además son capaces de producir grano después del estrés por sequía.

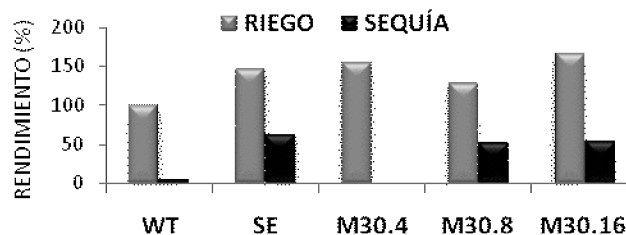


Fig. 1 Porcentaje de rendimiento de grano en plantas de frijol inoculadas con las diferentes cepas en condiciones de riego normal y de estrés por sequía.

Conclusiones. De las 60 mutantes generadas el 30% nodula. La mutante 30.4 le confiere a las plantas inoculadas un aumento en el rendimiento, mientras que la 30.16 confiere un aumento tanto en el rendimiento como en la tolerancia a la sequía y la 30.8 produjo solamente un incremento en la actividad de nitrogenasa.

Agradecimiento. Financiado por CYTED, España, proyecto 107PIC0312.

Bibliografía.

- Suárez, R, Wong, A, Ramírez, M, Barraza, A, Orozco, M del C, Cevallos, MA, Lara, M, Hernández G, Iturriaga G. (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(7):958-66.