



## EFFECTO DE LA MUTACIÓN Y LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN DE LA TREHALOSA-6-FOSFATO SINTASA DE *RHIZOBIUM ETLI* (*ReOtsA*) EN VIDA LIBRE Y EN SIMBIOSIS CON *PHASEOLUS VULGARIS*.

Arnoldo Wong<sup>1</sup>, Aarón Barraza<sup>1</sup>, Ma. Carmen Orozco<sup>1</sup>, Miguel A. Cevallos<sup>2</sup>, Miguel Lara<sup>2</sup>, Gabriel Iturriaga<sup>1</sup> y Ramón Suárez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Depto. Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. Fax 01-777-3297030. <sup>2</sup>Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, México

*Palabras clave:* trehalosa, *Rhizobium*, frijol.

**Introducción.** Uno de los factores más limitantes en la producción agrícola es el estrés abiótico (sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas). El ajuste osmótico y la acumulación de solutos compatibles es una respuesta común en plantas. La trehalosa, considerada uno de los osmoprotectores más efectivos, es un disacárido no reductor que se encuentra en diferentes especies de bacterias, hongos, invertebrados y plantas. Este azúcar es sintetizado también por bacterias de la familia de las *Rhizobiaceae* y ha sido encontrado en los nódulos (1, 2). Diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*, muestran altos niveles de trehalosa en los nódulos, mismos que manifiestan también, tolerancia a la sequía (3).

**Metodología.** Se generó una mutante *otsA*<sup>-</sup> (trehalosa-6-fosfato sintasa) de *Rhizobium etli* CE3, así como una cepa sobreexpresante de este gen fue obtenida a partir de la clonación de la secuencia completa del gen *otsA* por PCR. Con ambas cepas y utilizando la cepa silvestre como control, se realizaron experimentos en *R. etli* y vida libre sometiendo a la bacteria a diferentes tipos de estrés abiótico con el fin de determinar su tolerancia y el contenido de trehalosa. Además, plantas de frijol, fueron inoculadas con estas 3 cepas bacterianas con el fin de determinar su comportamiento en la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Las plantas inoculadas fueron crecidas tanto en condiciones normales de suministro de agua, así como sometiendo las plantas a estrés por sequía. Parámetros como la tolerancia al estrés, número de nódulos, actividad de nitrogenasa, biomasa, rendimiento y contenido de trehalosa fueron evaluados y comparados en los distintos tratamientos.

**Resultados y Discusión.** La mutante *otsA*<sup>-</sup> es sensible a NaCl y no acumula trehalosa. Las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con la mutante *otsA*<sup>-</sup> poseen nódulos pequeños y de color café (Figura 1A) y la parte aérea de las plantas resultó ser más pequeñas y con aspecto clorótico (Figura 1B). Por otro lado la sobreexpresión del gen *otsA*, en *R. etli* le confirió tolerancia a salinidad, frío y calor, y los niveles de trehalosa se incrementaron significativamente. Las plantas de frijol en simbiosis con la cepa sobreexpresante de *R. etli*, mostraron tolerancia a la sequía (Figura 2), el número de nódulos y la actividad de nitrogenasa se incrementó, lo cual sugiere que este fenotipo es conferido por la acumulación de trehalosa en *R. etli*.

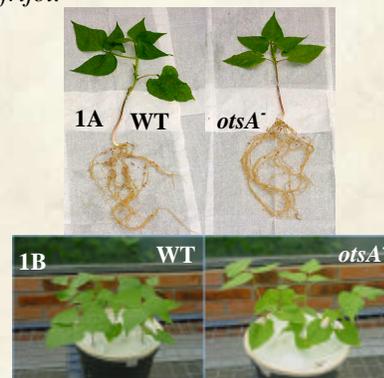


Figura 1. Plantas de frijol inoculadas con *R. etli* 21 días post-inóculo. 1A aspecto de las raíces noduladas, 1B plantas en maceta.

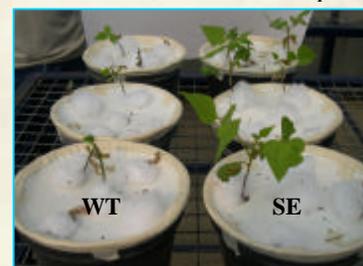


Figura 2. Tolerancia a la sequía de plantas de frijol inoculadas con *R. etli* 21 días post-inóculo con la cepa silvestre (WT) y la sobreexpresante (SE).

### Conclusiones.

La sobrevivencia de *R. etli* en condiciones de estrés salino, calor y congelamiento en vida libre, aumenta al tener sobreexpresado el gen *ReotsA*.

El número de nódulos es mayor en las plantas inoculadas con la cepa sobreexpresante.

En estrés hídrico, las plantas inoculadas con la cepa sobreexpresante, toleraron mejor el estrés.

### Agradecimiento.

El presente trabajo fue financiado con fondos SEP-PROMEP proyecto PTC-137 y por la Unión Europea proyecto ICA4-CT2000-30041.

### Bibliografía.

1. Streeker, JG. (1980). Carbohydrates in soybean nodules II. Distribution of compounds in seedlings during the onset of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 66(3):471-476.
2. Müller, J, Boller, T y Wiemken, A. (2001). Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules; *J. Exp. Botany.* 52: 943-947.
3. Fariás-Rodríguez, R, Mellor, RB, Arias, C y Peña-Cabrales JJ. (1998). The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plant.* 102: 353-359.