



UNIVERSIDAD
NACIONAL +
DE TUCUMÁN



SECRETARÍA DE
RELACIONES
INTERNACIONALES

Módulo UNT

JJI AUGM 2024

Jornada de Jóvenes Investigadores
Asociación Universidades Grupo Montevideo

25 de Octubre de 2024

Horco Molle - Tucumán - Argentina

González, Silvia

Módulo UNT - JJI AUGM 2024: libro de trabajos completos aprobados por la UNT / Silvia González; Compilación de Carlos Gusils. - 1ra. Ed. compendiada. - San Miguel de Tucumán: Maria de los Ángeles Peral, 2024.

Libro digital, DOCX

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-631-00-5934-1

1. Proyectos de Investigación. I. Gusils, Carlos, comp. II. Título. CDD 378



Fecha de catalogación: 25/10/2024

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita del titular del *copyright*, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimientos, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos.

Derechos exclusivos de esta primera edición reservados para todo el mundo.

Edición: Octubre de 2024

Impreso en San Miguel de Tucumán
Tucumán. República Argentina

ISBN: 978-631-00-5934-1



© Universidad Nacional de Tucumán – UNT – Ayacucho 491
(4000) San Miguel de Tucumán – República Argentina

Diseño de Portada: Carlos Gusils y Silvia González
Versión Digital – San Miguel de Tucumán.

5 Desarrollo regional

Potencial interacción interkingdom en la promoción del crecimiento de maíz bajo estrés salino

Autor: Lacosegliaz, Mariano. marianolaco03@gmail.com

Orientadores: Nieto Peñalver, Carlos. carlos.nietopenalver@fbqf.unt.edu.ar
de Cristóbal, Dr. Ricardo. ricardo.decrisobal@fbqf.unt.edu.ar Universidad Nacional de
Tucumán / Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Resumen

Año tras año se pierde entre el 1 y el 2 % del área cultivable debido al aumento de la salinidad del suelo. Frente a esta problemática global, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se han posicionado como una respuesta prometedora. Los objetivos de este trabajo consisten en analizar el efecto del estrés salino y del sistema de Quorum Sensing (QS) sobre características bioquímicas de *Pseudomonas capeferrum* WCS358 y su relación con la promoción del crecimiento vegetal en plantas de maíz. Se emplearon dos cepas transconjugantes: WCS358 (pME6863) y WCS358 (pME6000). En el vector pME6863 se encuentra clonado el gen *aiiA* que codifica la lactonasa AiiA que permite degradar las moléculas acil homoserina lactona atenuando el sistema de QS. El vector pME6000 es el respectivo control. Se analizó la producción de sideróforos, de auxinas y la solubilización de fosfato en condiciones de estrés salino (200 mM NaCl). Se evaluó el efecto promotor del crecimiento de plantas de maíz con semillas inoculadas con suspensiones de WCS358 (pME6000) y WCS358 (pME6863). Finalmente, se analizó la actividad enzimática de las raíces del maíz sobre las AHL.

Bajo estrés salino, ambas transconjugantes aumentaron la producción de sideróforos y disminuyeron la de auxinas. WCS358 (pME6000) mostró la mayor solubilización de fosfato en control. WCS358 (pME6863) promovió más el crecimiento de maíz, siendo más marcado el efecto bajo estrés salino. Se evidenció la degradación de AHL por el extracto de las raíces, lo que sugiere una interacción interkingdom entre las rizobacterias y las plantas.

Palabras clave: Quorum sensing, estrés salino, promoción del crecimiento vegetal

Introducción

Según la FAO, se necesita un aumento del 70% en la producción agrícola para 2050 a fin de satisfacer la demanda mundial. Sin embargo, la mala gestión de la tierra y el cambio climático están reduciendo las tierras agrícolas en un 1-2% anual (www.fao.org). La salinización del suelo, que afecta al 7% de la tierra global, es particularmente grave en Eurasia y América del Sur (Pennock and McKenzie 2015).

Como alternativa, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) han mostrado resultados prometedores en la mejora de cultivos de interés agronómico (De Andrade et al., 2023). Estos microorganismos colonizan la rizósfera, aprovechando los nutrientes de los exudados radiculares, y mejoran la absorción de agua y nutrientes, además de proteger a las plantas del estrés biótico y abiótico (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Estos mecanismos incluyen la modulación de la conductancia estomática, la absorción de agua y nutrientes, el transporte de iones, el remodelado de raíces y la producción de exopolisacáridos (EPS) que retienen agua y atrapan cationes, entre otros (De Andrade et al., 2023).

Los sistemas de quorum sensing (QS) están

presentes en diversos géneros bacterianos, se basan en la producción de moléculas de señal que se acumulan en el medio extracelular. Al alcanzar una concentración específica, los receptores especializados las detectan, desencadenando una respuesta fisiológica en toda la población (Abisado et al., 2018). En *P. capeferrum* WCS358, el sistema QS regula actividades clave como la producción de sideróforos, que protegen a la planta hospedera de patógenos (Berendsen et al., 2015; Rampioni et al., 2012).

En el suelo, los microorganismos están expuestos a fluctuaciones en la disponibilidad de agua y nutrientes, especialmente en áreas afectadas por salinidad. En este contexto, las bacterias forman biofilms insaturados, un tipo de estructura que se desarrolla en entornos donde el agua no está siempre presente en exceso. Estos biofilms permiten a las bacterias organizarse en microcolonias que se adaptan a las variaciones de agua y nutrientes. Esta estructura protectora no solo facilita la supervivencia de las bacterias, sino que también mejora su interacción con las raíces de las plantas, lo que es crucial para la promoción del crecimiento vegetal bajo estrés abiótico (Auerbach et al., 2000).

Este conjunto de interacciones entre las PGPR y las condiciones ambientales

adversas, como la salinidad, subraya la importancia de profundizar en el estudio de los mecanismos que permiten a las bacterias mejorar la adaptación de las plantas a su entorno. El conocimiento detallado de estos procesos es fundamental para desarrollar soluciones biotecnológicas sostenibles que permitan aumentar la productividad agrícola en suelos degradados y con alto contenido salino.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar el impacto del estrés salino y del sistema de QS en las características bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de *Pseudomonas (P.) capeferrum* WCS358.
2. Evaluar cómo el estrés salino y el sistema de QS afectan la interacción entre WCS358 y las plántulas de maíz.
3. Investigar la actividad enzimática de las raíces del maíz en la degradación C6-AHL.

Materiales y métodos

1. Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos transconjugantes de *P. capeferrum*: WCS358 (pME6863) y WCS358 (pME6000). WCS358 (pME6863) contiene el gen *aiiA* en el vector pME6863, que codifica para la enzima lactonasa AiiA, responsable de degradar moléculas de acil homoserina lactona (AHL), atenuando así el sistema de QS (Reimann et al., 2002). El vector pME6000 fue utilizado como control correspondiente (Maurhofer et al., 1998). Los microorganismos se almacenaron a -80 °C en una solución de glicerol al 20%.

El medio de cultivo utilizado fue AREs (Artificial Root Exudates) compuesto por: glucosa 18,4 mM, fructosa 18,4 mM, sacarosa 9,2 mM, alanina 18,4 mM, ácido glutámico 18,4 mM, glicina 18,4 mM, ácido aspártico 18,4 mM, ácido cítrico 9,2 mM, ácido fumárico 18,4 mM, ácido láctico 18,4 mM, ácido succínico 13,4 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, MgSO₄•7H₂O 0,6 mM, CaCl₂•H₂O 0,6 mM, FeSO₄•7H₂O 0,027 mM, MnSO₄•7H₂O y KH₂PO₄ 79 mM (Schmidt et al., 2011). El medio se suplementó con tetraciclina a 15 µg mL⁻¹. Cuando fue necesario, se añadió NaCl a 200 mM como factor estresante. Los cultivos se realizaron en un modelo de biofilm insaturado. Los precultivos de las cepas transconjugantes se prepararon en 5 mL de medio AREs líquido e incubaron a 30 °C y

180 rpm durante la noche. Posteriormente, los inóculos se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 (DO600) y se inocularon 50 µL en membranas esterilizadas con etanol al 70% durante 2 minutos, secadas en condiciones estériles, y colocadas en medio AREs solidificado. Los biofilms insaturados se incubaron a 30 °C durante 72 horas, siguiendo protocolos descritos previamente (Auerbach et al., 2000; Chen et al., 2011; Steinberger et al., 2002).

2. Ensayo de tolerancia a NaCl

La tolerancia al estrés salino se evaluó en placas de AREs suplementadas con concentraciones crecientes de NaCl. Las cepas transconjugantes se cultivaron en triplicado y el crecimiento se evaluó mediante UFC mL⁻¹ tras 72 horas de incubación.

3. Producción de sideróforos

Para evaluar la producción de sideróforos, el contenido de hierro del medio de cultivo se redujo a un 20% para estimular su producción (FeSO₄·7H₂O 0,0054 mM). Los biofilms insaturados se cultivaron en presencia y ausencia de NaCl a 200 mM. Tras la incubación, se recolectaron los biofilms y el medio de cultivo subyacente para medir los niveles de fluorescencia de pioverdina, siguiendo el protocolo descrito en (Filloux &

Ramos, 2014)

4. Producción de indoles totales

Los biofilms insaturados se cultivaron en medio AREs suplementado con 5 mM de L-triptófano, con y sin NaCl. Tras la incubación, se tomaron muestras del medio para determinar la producción de indoles mediante el método colorimétrico de (Glickmann & Dessaux, 1995). Se mezclaron 160 µL del reactivo de Salkowski (FeCl₃ 12,5 g; H₂SO₄ 7,5 M) con 40 µL de sobrenadante en microplacas. La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos y la densidad óptica se midió a 540 nm. La concentración de indoles totales (µg mL⁻¹) se estimó con una curva patrón de ácido indol acético.

5. Solubilización de fosfato

La solubilización de fosfatos por *P. capeferrum* WCS358 se evaluó, en ausencia o presencia de NaCl a 200 mM. Las membranas que contenían los biofilms insaturados se transfirieron a placas con medio SRSM modificado (Santos et al., 2023) y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, se observaron los halos de color amarillo dorado que indicaban la disminución del pH, asociada a la solubilización de fosfato. Se midieron los diámetros de los halos y se normalizaron

respecto al logaritmo de las unidades formadoras de colonias (log UFC mL⁻¹).

6. Promoción del crecimiento en maíz

Las semillas de maíz DK72-10 se sumergieron en una suspensión bacteriana (10⁸ UFC mL⁻¹) durante 10 segundos y se transfirieron a macetas con 0,5 kg de sustrato Growmix. Los tratamientos incluyeron condiciones salinas y no salinas, regando con una solución de NaCl a 200 mM o agua destilada, respectivamente. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 25 °C y 80% de humedad relativa. Doce días después de la inoculación, se midieron la longitud de los brotes y raíces, peso fresco y seco, tasa de germinación (GR%) (Gholami et al., 2009). El experimento se realizó con 20 semillas por tratamiento, repitiéndose tres veces.

7. Determinación de la actividad de Quorum Quenching de las raíces de maíz

Las semillas de maíz se germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) durante 48 horas a 25 °C en oscuridad. Diez plántulas germinadas se transfirieron a frascos con 30 mL de medio MS líquido y se incubaron durante seis días. Posteriormente, se maceraron las raíces según el protocolo de

(Kim et al., 2013). La capacidad del extracto crudo de las raíces para degradar la AHL C6-HSL (N-hexanoil homoserina lactona) se evaluó mediante un ensayo biosensor utilizando la cepa *Chromobacterium subtsugae* CV026, una mutante que no produce AHLs pero que responde a ellas produciendo el pigmento violaceína (McClellan et al., 1997).

8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Minitab. Se empleó un ANOVA de dos vías para evaluar la influencia de dos factores independientes sobre las variables de respuesta. Los factores considerados en el análisis fueron la actividad de QS y la presencia de NaCl, analizando sus efectos principales e interacciones.

Resultados y Discusión

Se determinó que la concentración inhibitoria mínima del NaCl fue superior a 500 mM. Se estableció como concentración de trabajo de NaCl de 200 mM. Esta concentración no afecta significativamente el crecimiento del biofilm insaturado de las cepas de WCS transconjugantes.

Actividad QS y salinidad sobre características promotoras del crecimiento vegetal

El incremento en la producción de sideróforos observado en *P. capeferrum* WCS358 bajo estrés salino es un hallazgo significativo. Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro que las bacterias utilizan para obtener hierro en condiciones donde este nutriente es limitado, como en suelos salinos (Sultana et al., 2021). La salinidad no solo limita la disponibilidad de hierro, sino que también puede afectar la movilidad de otros micronutrientes esenciales para las plantas

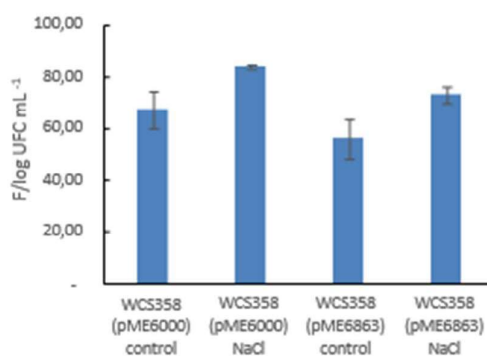


Fig. 1. Media de fluorescencia de pioverdina normalizada con el log UFC mL⁻¹.

Como se puede ver en la Figura 1, hay un aumento significativo, del 24.4 % en WCS (pME6000) y del 30.4 % en WCS (pME6863) bajo estrés salino con respecto a los

controles, lo que indica que este estrés presenta una influencia positiva en la variabilidad de los datos, sugiriendo que *P. capeferrum* WCS358 responde adaptativamente a la escasez de hierro mediante la sobreproducción de sideróforos, lo que es coherente con la necesidad de asegurar la supervivencia bacteriana en condiciones adversas. En contraste, Silambarasan y col., observaron que la producción de sideróforos en *P. citronellolis* SLP6 disminuyó bajo estrés salino, con una reducción del 8–35 % en función de la concentración de NaCl (Silambarasan et al., 2020). Este resultado destaca una diferencia notable en las respuestas de ambas especies de *Pseudomonas* al estrés salino.

El estrés salino provocó una disminución del 20 % en la producción de indoles totales en ambos transconjugantes de *P. capeferrum* (Fig. 2), es decir, tiene una influencia negativa en la variabilidad de los datos, mientras que la actividad del sistema de QS no presenta influencia sobre la variabilidad de los datos obtenidos. Este resultado es consistente con el trabajo de Silambarasan y col. en el que también observaron una reducción en la producción de indoles en *P. citronellolis* bajo estrés salino, con una disminución del 8–20 % según la concentración de NaCl

(Silambarasan et al., 2020). En ambos estudios, el estrés salino parece interferir con la ruta biosintética de indoles, lo que afecta la capacidad de estas bacterias para promover el desarrollo radicular y el crecimiento de las plantas.

La reducción de indoles totales bajo condiciones de estrés abiótico podría estar vinculada a un redireccionamiento de recursos metabólicos hacia la adaptación celular frente a la salinidad. En este sentido, tanto *P. capeferrum* como *P. citronellolis* muestran una limitación en la producción de auxinas bajo estrés salino, lo que puede reducir su eficacia como promotoras del crecimiento vegetal en suelos salinos.

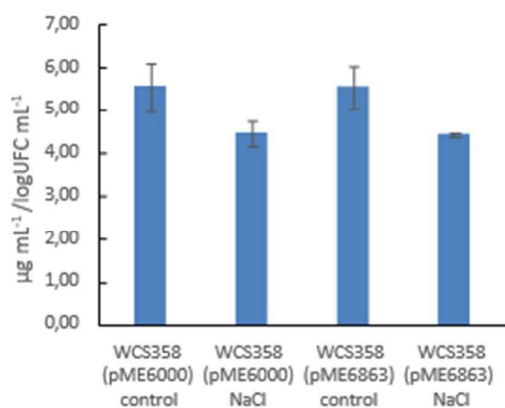


Fig. 2: Medidas de producción de indoles totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$) normalizada con el log UFC mL^{-1} .

La solubilización de fosfatos es un proceso

fundamental para la nutrición de las plantas, especialmente en suelos donde el fósforo está presente en formas insolubles que las raíces no pueden absorber directamente. En condiciones de estrés salino, tanto WCS358 (pME6000) como WCS358 (pME6863) mostraron una reducción significativa en su capacidad para solubilizar fosfatos, con disminuciones con respecto a los controles, del 29.8 % y del 22.5 %, respectivamente, lo que indica que el estrés salino presenta una influencia negativa en la variabilidad de los datos (Fig. 3). Anteriormente, se reportó una disminución en la capacidad de solubilización de fosfatos en *P. citronellolis* SLP6 bajo estrés salino (Silambarasan et al., 2020). El sistema de QS parece jugar un papel importante en la modulación de las actividades promotoras del crecimiento vegetal en *P. capeferrum* WCS358. Nuestros resultados mostraron que, en ausencia de estrés salino, la cepa con QS activo (WCS358 pME6000) tuvo una mayor capacidad para solubilizar fosfatos y producir sideróforos en comparación con la cepa con QS atenuado (WCS358 pME6863), lo que indica que el sistema de QS activo tiene influencia positiva en la variabilidad de los datos. Esto sugiere que el QS regula positivamente estas actividades, probablemente al coordinar la expresión de