

ESTUDIO DE LA CEPA DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 COMO PROMOTORA DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE

ADRIANA CAROLINA ROJAS ARIAS

Asesor externo de la Universidad Antonio Nariño

SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS

Asesor externo de la Universidad Antonio Nariño



JOVANNA ACERO GODOY

Asesor Interno

Presentado por:

YUDI CAROLINA RODRIGUEZ MIRQUE



Introducción

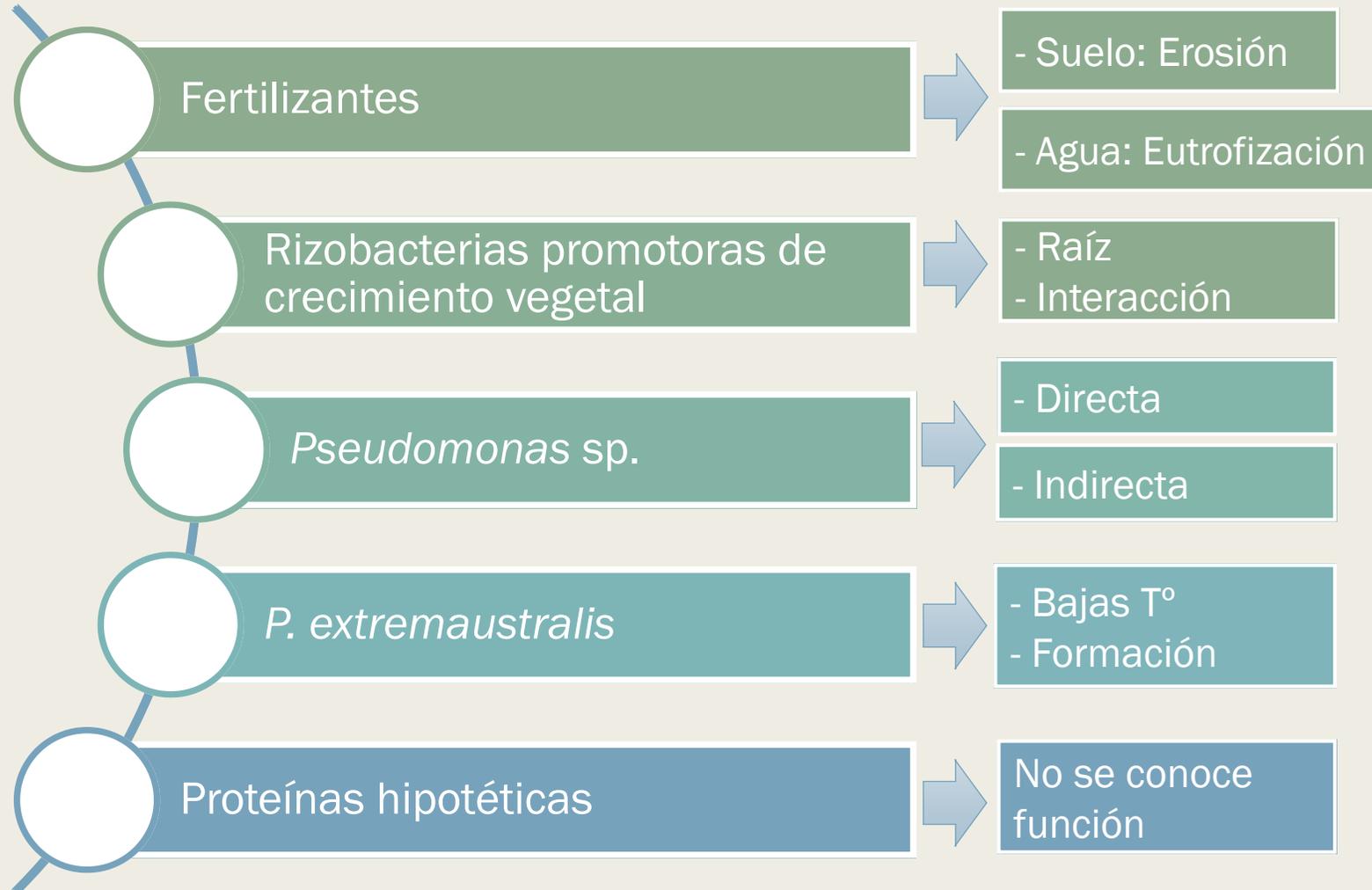
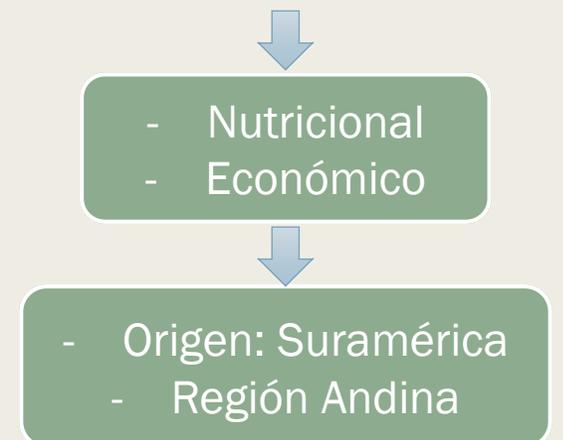


Figura 1. fotografía de planta de tomate.

<https://co.pinterest.com/pin/361625045070619125/>



JUSTIFICACIÓN



Figura 8. planta de tomate.
Tomada por la autora.

Elementos para una colonización eficiente:

Sobrevivir después de la inoculación

Crecer en la esfermosfera

Fijarse en la superficie de las primeras raíces

Colonizar todo el sistema radicular

Mejores resultados en los cultivos

Antecedentes

Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos

✉ Guillermo Carrillo-Castañeda,¹ Juana Juárez Muñoz,¹
Dionicio Ruiz Landa,² Rafael Müller García²

¹Colegio de Postgraduados. Montecillo, México 56230, México. E-mail: carrillo@colpos.colpos.mx

²Unidad de Capacitación para el Desarrollo Rural SEP-DGTA Coatepec, Ver. México.

Carrillo et al. Plantas de tomate inoculadas con *P. fluorescens*: *augmentaron* hasta 45% la producción, mayor altura iniciaron la floración 6 días antes.

2000

2005

Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* as plant growth-promoting rhizobacteria in West Africa

ANTHONY O. ADESEMOYE^{1,3} & ESTHER O. UGOJI²

¹Department of Microbiology, Adekunle Ajasin University, Nigeria, ²Department of Botany and Microbiology, University of Lagos, Akoka, Nigeria, and ³Department of Entomology and Plant Pathology, Auburn University, Auburn, USA

(Received 22 December 2005)

Adesemoye y Ugoji. *P. aeruginosa* en comparación con el control, podría haber mejorado el sistema de adsorción del agua y nutrientes. Aumenta el crecimiento, fructificación temprana y aumento de la biomasa seca.

Catone. Algunas de sus proteínas hipotéticas son homologas con genes estructurales relacionado con la producción de alginato.

Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Mariela Verónica Catone

2013

2015

INOCULACIÓN AL SUELO CON *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* Y MICROORGANISMOS DE MONTAÑA (MM) Y SU EFECTO SOBRE UN SISTEMA DE ROTACIÓN SOYA-TOMATE BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Leida Castro Barquero¹*, Mariana Murillo Roos²*, Lidieth Uribe Lorío³*, Rafael Mata Chinchilla⁴*

Palabras clave: *Azospirillum oryzae*; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; microorganismos de montaña (MM); inoculación.

Keywords: *Azospirillum oryzae*; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; microorganismos de montaña (MM); inoculation.

Recibido: 10/04/15

Aceptado: 01/06/15

Marco teórico

Nombre Científico:	<i>Solanum lycopersicum</i>
Familia:	Solanáceas
Género:	<i>Solanum</i>
Variedad:	<i>lycopersicum</i>

Tabla 1: información taxonómica tomate (*Solanum lycopersicum*)

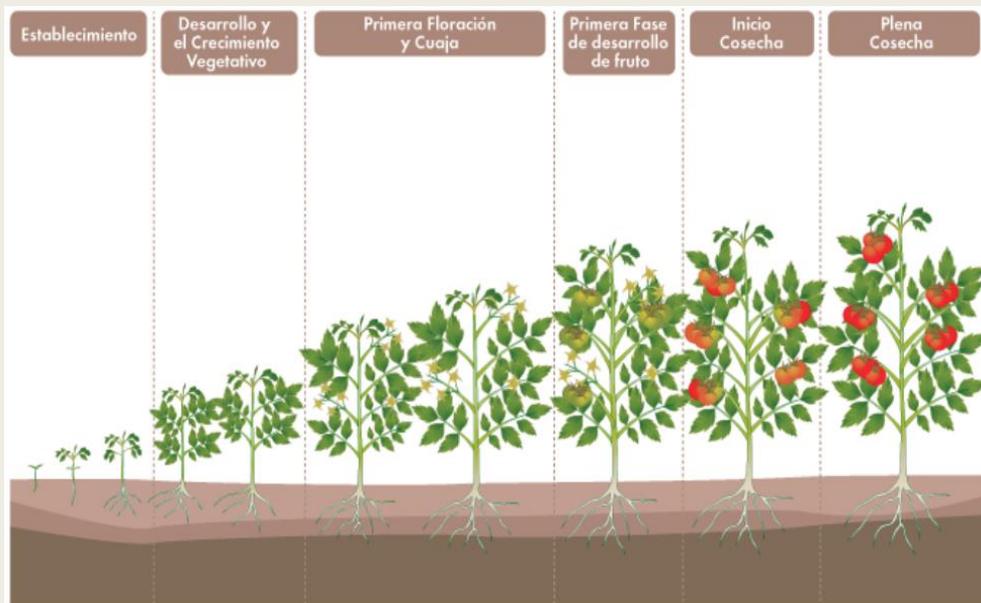


Figura 2. Ciclo fenológico de tomate.2015.

Producción de tomate en 2016
632.268 t

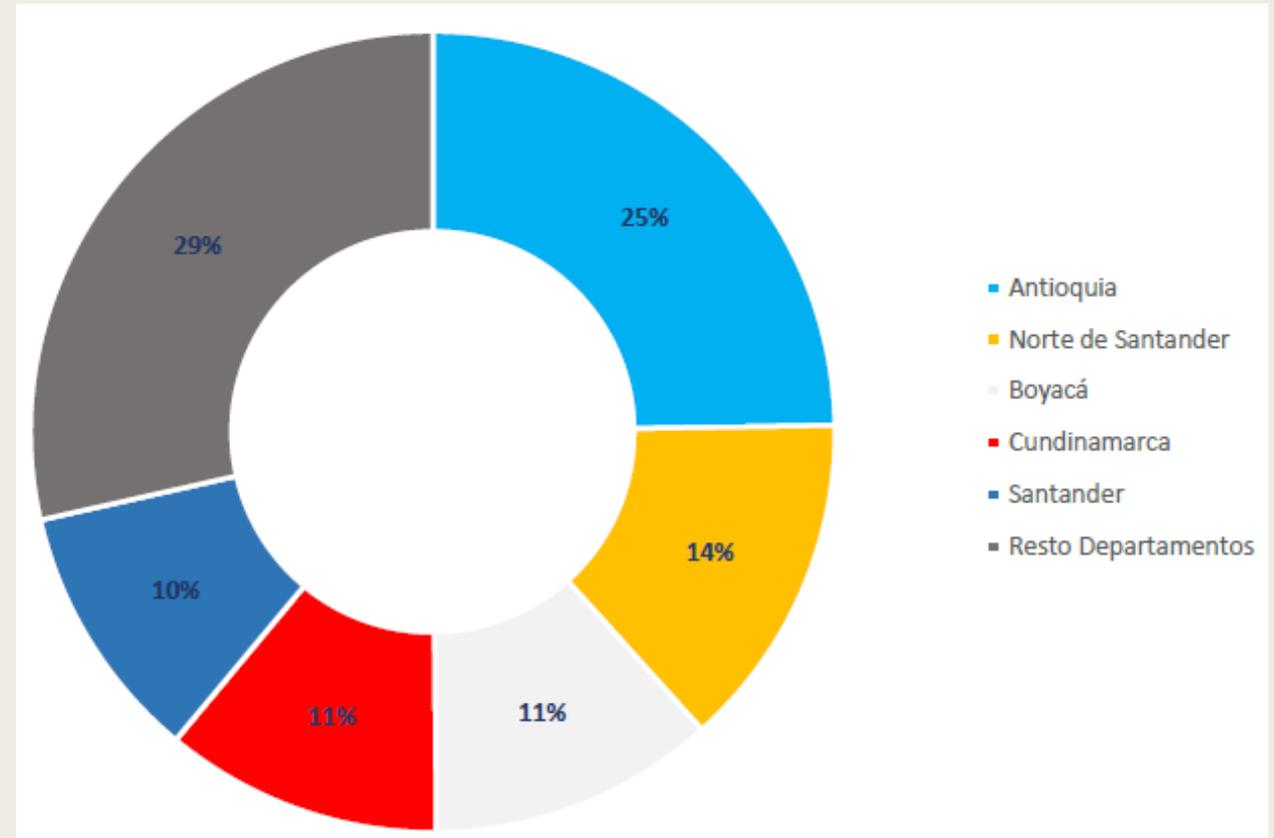


Figura 3. Principales departamentos productores de tomate. 2016.

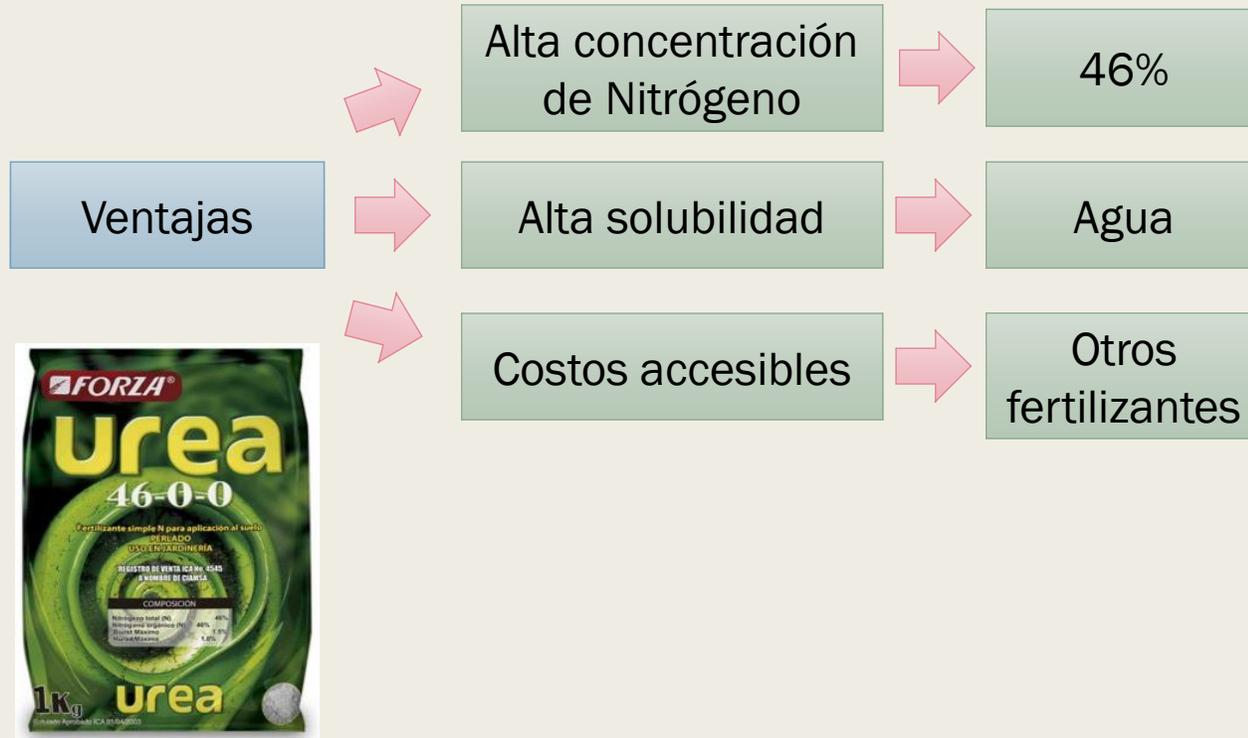
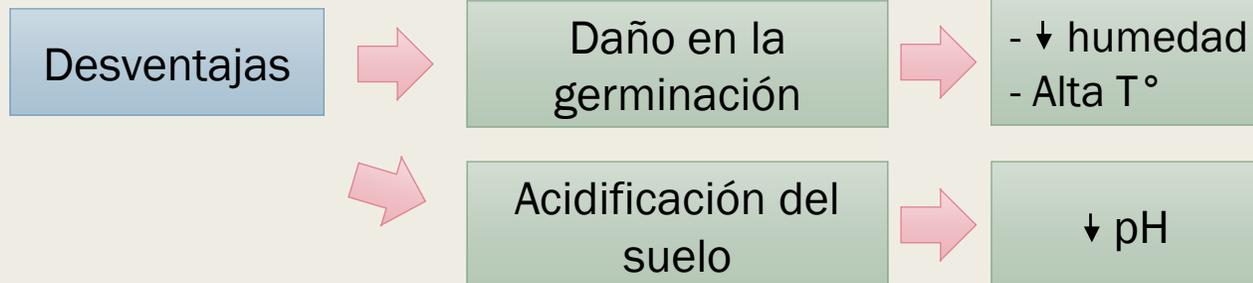


Figura 3. Fertilizante

urea.

<https://sembramos.com.co/fertilizante-urea-x-1-kg.html>



Biorremediación

ENTRE LOS GÉNEROS DE BACTERIAS QUE FORMAN PARTE DEL GRUPO DE PGPR SE PUEDE ENCONTRAR A:

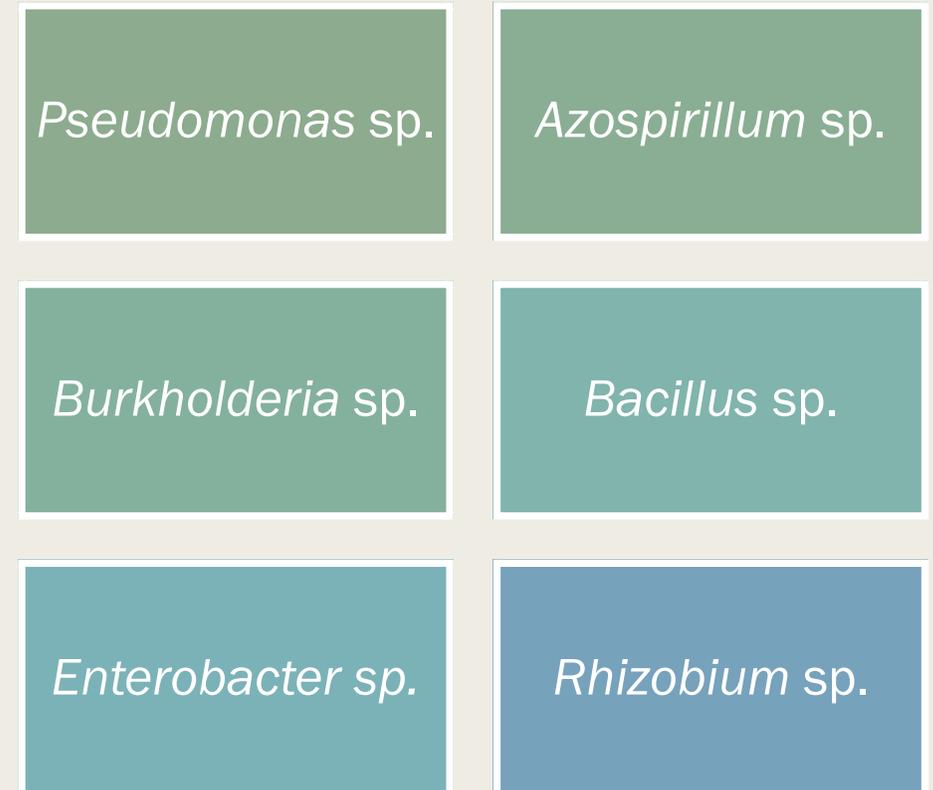


Figura 4. Algunos géneros de bacterias que forman parte de PGPRS.(8)

P. extremaustralis

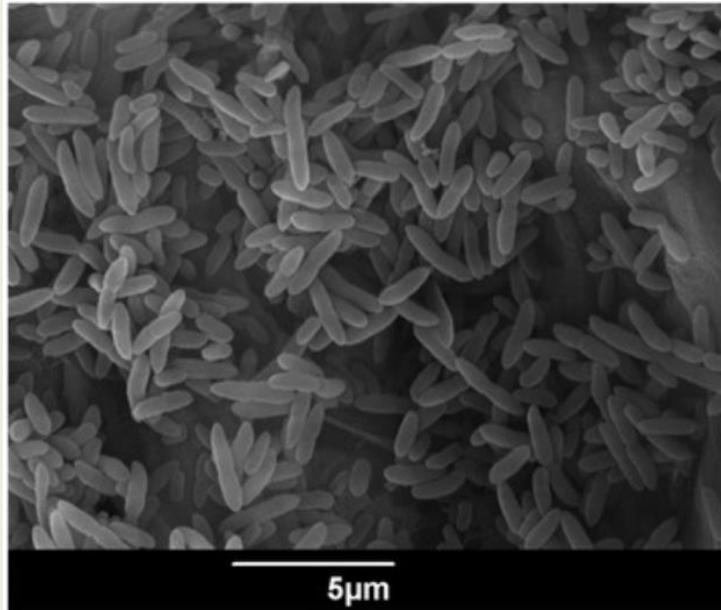


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de *P. extremaustralis* USBA-GBX-515. 2017.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731063/>

- Bacilo
- Gram negativo
- Móvil
- No forma esporas
- Aerobio
- 4 - 35 °C

La cepa CMPUJU 515 fue aislada en 2010 en:

La Olleta, Suelo de Superpáramos dentro de Parque Natural Nacional de Nevados. > 4000 msnm

La cepa CMPUJU 515 presenta características como:

- Resistencia al frío.

- Producción de altos niveles de polihidroxibutirato (PHB)

Tolera y degrada hidrocarburos

Biorremediación de hidrocarburos

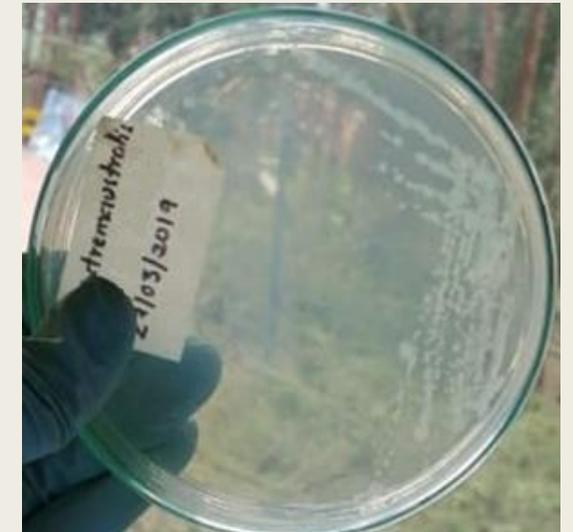


Figura 6. *P. extremaustralis*. Medio Luria Bertani. Tomado por la autora

Proteínas Hipotéticas



In situ



Se conoce su secuencia pero no su función



Pueden representar hasta la mitad de las regiones que componen el genoma.

Dominios de función desconocida (DUF)



Familias de proteínas no caracterizadas



ORFs



Codificadores de proteínas que no se parecen a ninguna otra base de datos

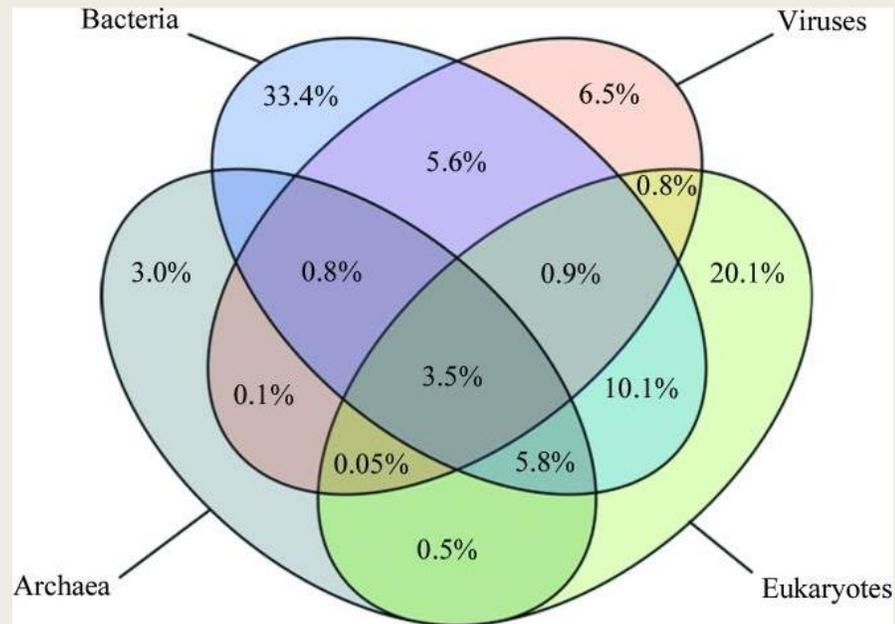


Figura 7. Distribución de familias DUF y no DUF en diferentes especies.

Pregunta Problema

¿Es posible que *P. extremaustralis* promueva el crecimiento en tomate, y que existan proteínas hipotéticas relacionadas con este efecto?

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 para promoción de crecimiento en tomate, e identificar proteínas hipotéticas relacionadas

Objetivos específicos

Analizar el efecto de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 sobre el crecimiento en plantas de tomate *in vivo*.

Desarrollar una clasificación funcional de proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.

Caracterizar proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 relacionadas con promoción de crecimiento en tomate.

DISEÑO METODOLÓGICO

Universo: Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

Población: Bacterias del género *Pseudomonas* sp. con capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

Muestra: *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJU 515 con posible actividad promotora de crecimiento vegetal en tomate.

Indicadores

- Medidas de longitud de tallo, hojas y raíz.
- Peso húmedo de tallo y raíz.
- Peso seco de tallo y raíz.
- Secuencias de proteínas hipotéticas.

Dependientes

- Factores genéticos asociados a proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 relacionada con la promoción de crecimiento en plantas de tomate.

Independientes

- Mecanismos de promoción de crecimiento para plantas de tomate debido al efecto de inoculación de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.

METODOLOGÍA



Se realizaron 4 clases de bioensayos:

1. *P. extremaustralis* CMPUJU 515.
2. *P. aeruginosa* PA01
3. Fertilizante (0,017 gr)
4. Control

Se analizaron los resultados de las plantas en el programa ANOVA

Se determinó el área foliar en el programa Image J

Análisis bioinformático

Analizar genoma *P. extremasutralis*, NCBI

Anotar Proteínas hipotéticas

Comparar proteínas hipotéticas con la base de datos de NCBI.

Comparar proteínas hipotéticas con proteínas relacionadas con Fijación de nitrógeno y de AIA



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Identidad: > 40%
- cobertura: >80%
- valor E: cercano a 0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Objetivo 1:** Analizar el efecto de *P. extremaustralis* CMPUJU 515 sobre el crecimiento en plantas de tomate *in vivo*.



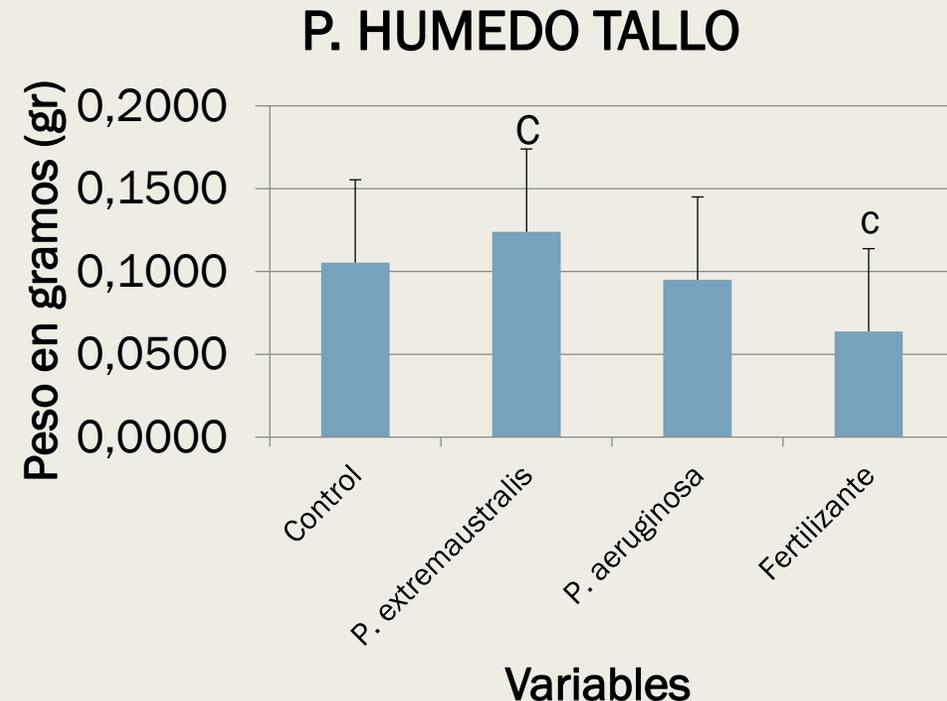
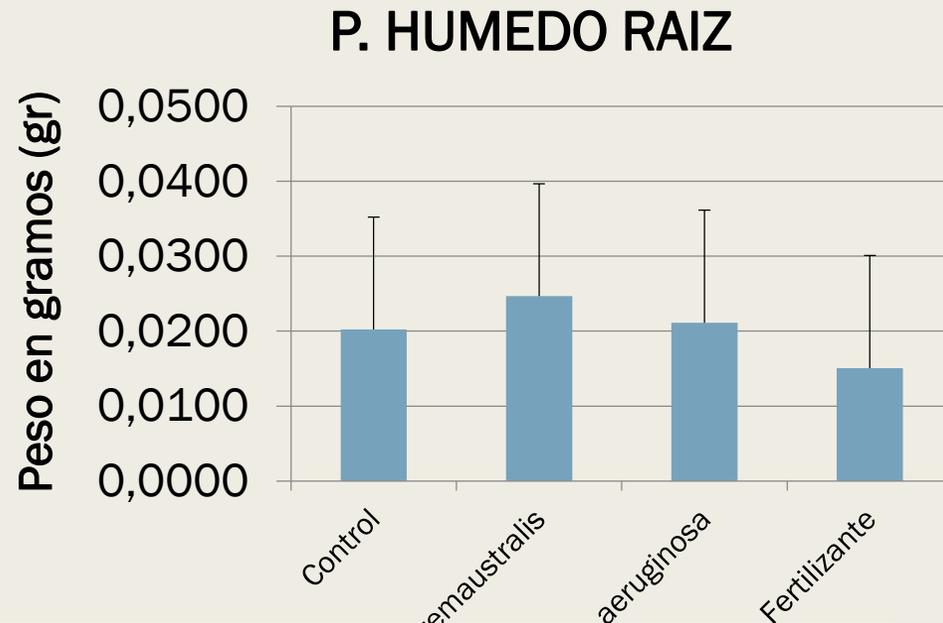
Figura 3. Plantas después de 4 semanas de su siembra, se puede apreciar que las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* (azul) muestran un mejor desarrollo en sus hojas.

(Amarillo: Control negativo, Verde: *P. aeruginosa*, Blanco: Fertilizante)



Figura 6. Plantas con 8 semanas de crecimiento. (Amarillo: Control negativo, Azul: *P. extremaustralis* CMPUJU 515, Verde: *P. aeruginosa* PAO1, Blanco: Fertilizante)

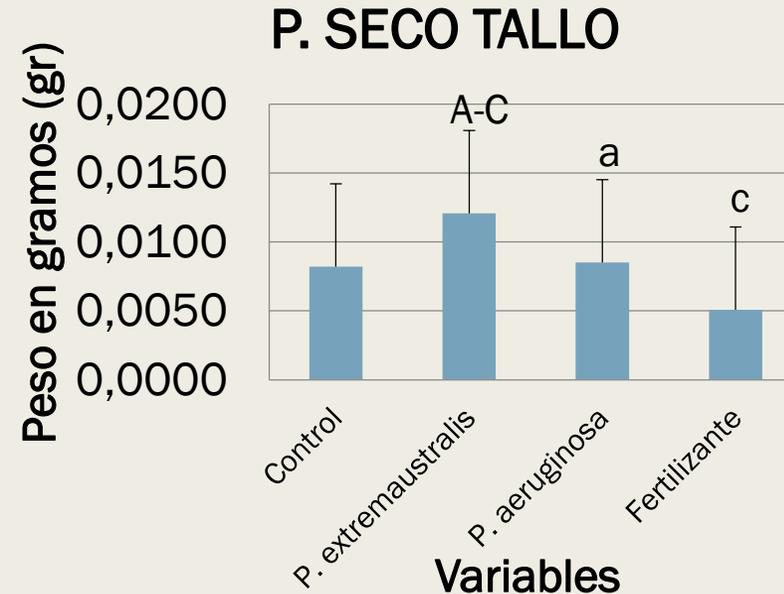
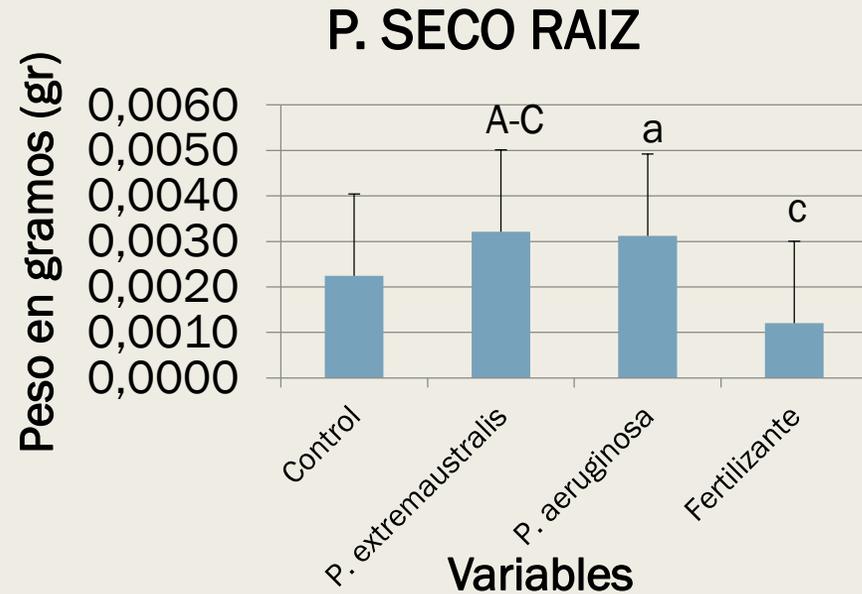
PESO HUMEDO RAIZ Y TALLO



Carrillo et al. 2000. evidenció que biomasa de la planta de tomate era mayor en aquellas plantas inoculadas con *P. fluorescens*. Relacionado con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (0.0121 g) genera un efecto benéfico en este aspecto.

- *P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs *P. aeruginosa*: A
- *P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs control: B
- *P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs Fertilizante: C

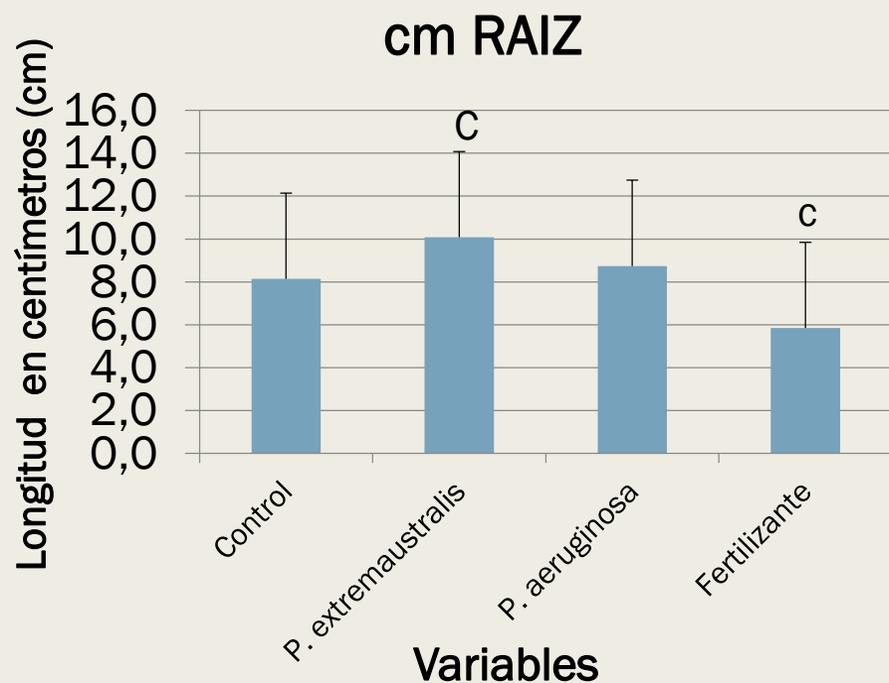
PESO SECO RAIZ Y TALLO



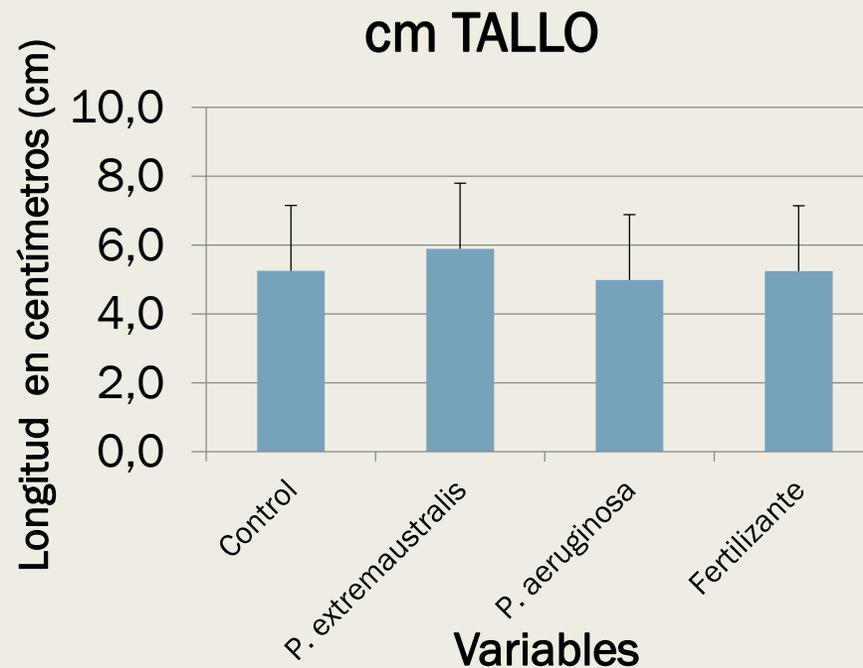
Sánchez. 2011. evidenció que biomasa seca de la parte aérea de la planta era mayor en aquellas plantas inoculadas con *P. putida*. Relacionado con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (0.0121 g) genera un efecto benéfico en este aspecto.

- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs *P. aeruginosa* PA01: A
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs control: B
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs Fertilizante (Urea): C

LONGITUD RAIZ Y TALLO

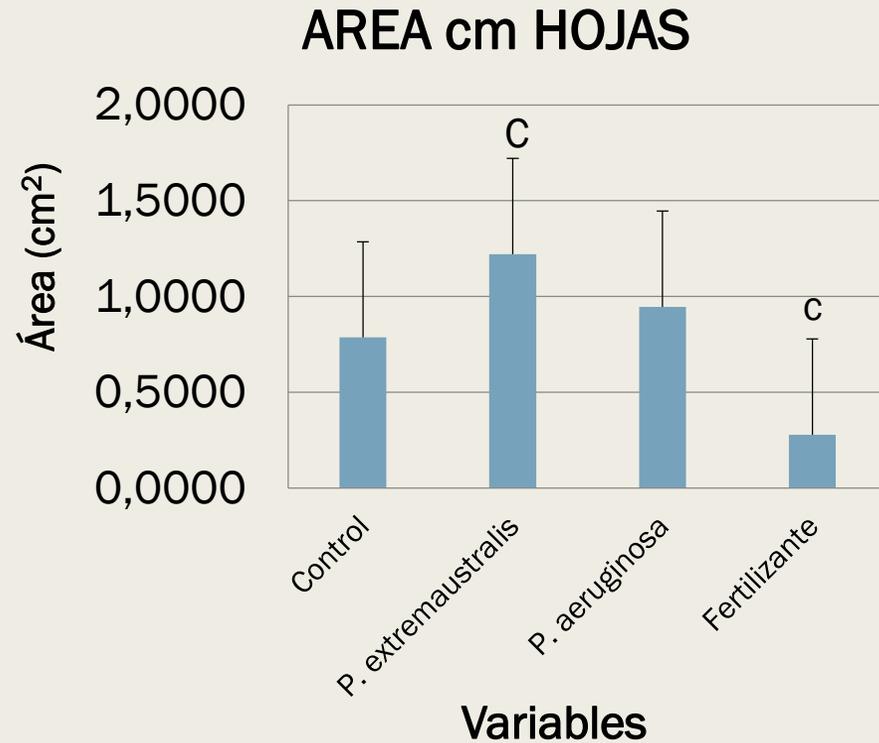


Ballesteros. 2018. evidenció en plántulas de frijol que la longitud fue mayor en los tratamientos con *P. extremaustralis* CMPUJU 515, *P. aeruginosa* PA01 y *B. subtilis* ATCC 6633 (23.09, 23.10 y 22.39 cm) de la raíz.



- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs *P. aeruginosa* PA01: A
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs control: B
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs Fertilizante (Urea): C

AREA DE HOJAS



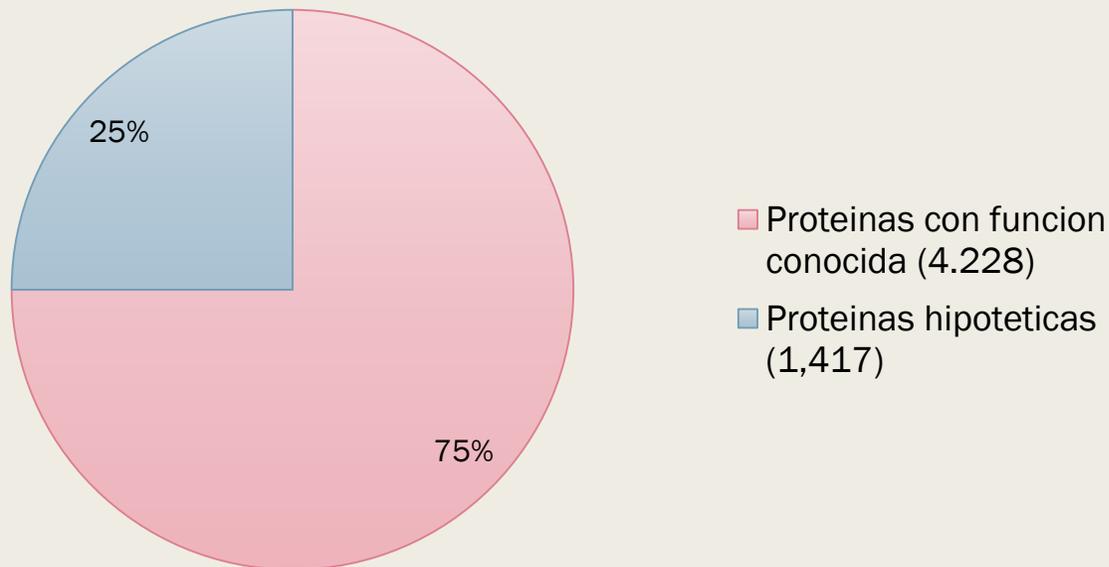
Se obtuvo un mejor resultado en las plantas inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (1.2210 cm³) seguido por *P. aeruginosa* PA01 (0.9457 cm³).

- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs *P. aeruginosa* PA01: A
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs control: B
- P. extremaustralis* CMPUJU 515 vs Fertilizante (Urea): C

■ Objetivo 2

Desarrollar una clasificación funcional de proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJU 515.

Proteínas *P. extremaustralis* CMPUJU 515 (5.665 proteínas)



Se anotaron funcionalmente
592 proteínas

López *et al.* 2018. clasificaron en la categoría de transporte y metabolismo de aminoácidos (10.5%) seguido de transcripción (8.4%) y mecanismos de transducción de señales (7.3%)

```
MTLIIEDGTGKPD AESYASAEDLALYAVKFGTVIPAGVPEQEALLRR  
AALAMDGKTWKGRKMSSEQALSWPRREVLLDHEIKPNNYLPAR  
IQYGQMALAAEIHQDDIDPVEKRKGAVTLERVEGAVTREYATIPN  
TSGRLLPAAPDRPSATQFSDYLQRRGLFAVRA
```

```
MKRSAFFISDGTGITAETLGQSLLAQFENVTFKFTRPYIDNADKA  
RAMVQQINLAAEKDGFRIIFDTIVNQDIREILATSNGFMIDIFSSF  
LAPLEQELSEHSSYSVGKSHSIGHNSNYMERIEAVNFALDNDGGA  
RTHYYDKADIILVGVSRGKTPTCLYMAMQFGIRAANYPLTEDD  
MEHLTLPTALRAHAHKLFLGLTIDPDRLTAIRNERKPNSRYSSYAQCE  
FEVREVENLFRRENIPHINSTHFSVEEISAKILVEKGVERRFK
```

■ Objetivo 3

Caracterizar proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* relacionadas con promoción de crecimiento en tomate.

Genes <i>nif</i>	
<i>NifO</i>	24
* <i>NifH</i>	8
<i>NifB</i>	3
<i>NifQ</i>	17
<i>NifZ</i>	19
<i>NifE</i>	11
<i>NifN</i>	11
<i>NifX</i>	23
TOTAL	116

Moreno *et al.* 2015. Están altamente conservados en todos los aislamientos de *A. brasilense*, como un marcador filogenético.

HisC1

HisC2

ipdC

Dai *et al.* 2015. Muchos genes *nif* adicionales juegan un papel en la regulación de genes *nif* y en procesos de maduración de productos inactivos, como el transporte de e⁻, la biosíntesis y ensamblaje de FeMo-cofactor



Genes *nif*

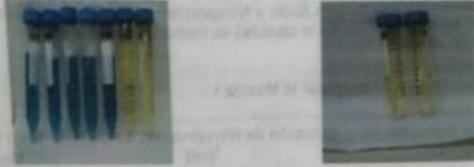
Genes de AIA	
ipdC	9
HisC1	12
HisC2	17
TOTAL	38

OTROS RESULTADOS

PROTOCOLO DE CUANTIFICACION DE NITROGENO EN TEJIDO FOLIAR (CENIPALMA)

Se realizo un protocolo de cuantificación de nitrógeno en tejido foliar, por medio de espectrofotometría para ser aplicado en próximas investigaciones.

Si hay contaminación se observan los colores más intensos como lo muestra la figura:



5.8 Solución de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4 5 N)

En un balón aforado de 25 ml adicionar algo más de la mitad del volumen final de H_2O dd, agregar con macropipeta y lentamente 3,47 ml de ácido sulfúrico concentrado R.A. Dejar enfriar. Completar a volumen con H_2O dd y homogenizar.

5.9 Patrón de N de 1000 mg/l

En un vaso de precipitados disolver 0,3819 g de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) en aproximadamente 50 ml de H_2O dd. Completar a un volumen de 100 ml en un matraz aforado con H_2O dd y homogenizar.

A partir del patrón de 10000 ppm, tomar 5 ml y aforar a 50 ml.

5.10 Serie de Patrones

Para preparar los patrones tome el volumen de solución de N de 1000 mg/l, tal como se especifica en la Tabla 8, adicionar a cada uno 2,4 ml de solución de ácido sulfúrico 5N y completar a volumen con H_2O dd en un matraz aforado.

Tabla 8. Preparación de la curva de calibración para el análisis de Nitrógeno

Concentración Patrón de N(mg/l)	Volumen Patrón de N de 1000 mg/l (ml)	Volumen de H_2SO_4 5 N (ml)	Volumen final del patrón* (ml)
0,0	0,00	2,4	50
15,0	0,75		50
30,0	1,50		50
60,0	3,00		50
90,0	4,50		50
120,0	6,00		50
150,0	7,50		50
			50

* Estos patrones deben conservarse en nevera en frasco de polipropileno.

Presentación del trabajo en el BOMM 2018 - 2019

Conclusiones

P. extremaustralis CMPUJU 515 generó aumento significativo para los fenotipos de peso seco de la raíz y el tallo en la longitud de la raíz y el área foliar

El estudio *in silico* de las proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* dio una visión de su posible funcionalidad en factores asociados a promoción de crecimiento en plantas

Este trabajo aporta un protocolo para contenido de nitrógeno usando espectrofotometría, que puede ser usado como un fenotipo adicional en pruebas de fijación de nitrógeno en plantas.

Bibliografía

- 1. **Vallejo Cabrera, Franco Alirio.** *Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia.* Cali : Universidad Nacional de Colombia, 1999.
- 2. **Carrillo Castañeda, Guillermo, y otros.** Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. 2000, Vol. 17, 3.
- 3. **Barraza, Fernando, Fischer, Gerhard y Cardona, Carlos.** Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle del Sinú medio, Colombia. 2004, Vol. 22, 1, págs. 81-90.
- 4. **Camelo, Mauricio, Vera, Sulma Paola y Bonilla, Ruth Rebeca.** Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. 2011, Vol. 12, 2, págs. 159-166.
- 5. **López, Nancy, y otros.** *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. 2009, Vol. 59, 5, págs. 514-519.
- 6. **Zarembinski, Thomas I., y otros.** Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics. 1998, Vol. 95, págs. 15189–15193.
- 7. **Ribaudo, Claudia Mónica.** Mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenados en la interacción bacterias promotoras de crecimiento vegetal y plantas de interés agronómico. 2013.
- 8. *Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento.* **Luna Martínez, Laura, y otros.** 2013, Revista fitotecnia mexicana, Vol. 36.

GRACIAS