



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN ENDÓFITA ENTRE
Acacia farnesiana Y *Methylobacterium oryzae* EN LA
TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. en B.E. ILHUICE NEMI ALCÁNTARA MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPÚLVEDA

DR. FRANCISCO FIGUEROA MARTINEZ

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

DIRECTORA

ASESOR

ASESOR

MÉXICO, Ciudad de México.

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa por haberme permitido llevar a cabo este proyecto en sus instalaciones, particularmente al posgrado de Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero recibido durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada (35330).

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por su dedicación, paciencia, esfuerzo y apoyo que hicieron posible la culminación de este trabajo.

Al Dr. Fernando Rivera Cabrera y Dr. Francisco Figueroa Martínez, por su asesoría, dedicación y apoyo, que le dieron forma a este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela por su apoyo, consejos y atinados comentarios.

A mis compañeros y amigos de diferentes laboratorios, de quienes también aprendí, y quienes hicieron de los momentos difíciles más sencillos y de los felices más divertidos.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi padre Salvador Alcántara y madre Juliana Rosario Martínez, por cuidarme, apoyarme e impulsarme siempre en mi formación académica y personal.

A mi pareja de vida Mario Alberto Arias, por su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanos Antar, Metzli y Yoalli por apoyarme y animarme cuando más lo necesito.

A mi cuñada Athena y sobrino Aradán, por alegrarme siempre.

A la familia Arias García por su apoyo incondicional.

RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide altamente tóxico y ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Por lo anterior, actualmente existen diversas tecnologías para limpiar suelos contaminados con este metaloide, una de ellas es la fitorremediación, que utiliza plantas tolerantes y sus microorganismos (MOs) asociados, los cuales pueden modificar la capacidad de las plantas para bioacumular elementos tóxicos en sus tejidos. Por ello, se evaluó el crecimiento de *Acacia farnesiana*, una planta tolerante al As, en presencia de diferentes MOs, bajo estrés por As. A partir de resultados de biomasa y bioacumulación de As en tallos y raíz, se seleccionó la bacteria endófito identificada molecularmente como *Methylobacterium oryzae*, para inducir la simbiosis *A. farnesiana*-*M. oryzae* y realizar ensayos de fitorremediación. Una manera de entender los mecanismos intracelulares que confieren tolerancia a las plantas al As, así como el efecto de la simbiosis planta-MO es a través de la cuantificación de la actividad de enzimas y la presencia de moléculas involucradas en dichos mecanismos, y a través del análisis del perfil proteómico. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de la bacteria endófito *M. oryzae* en la tolerancia de *A. farnesiana* al As a través del análisis de bioacumulación de As, de cambios fisiológicos en la planta y de la expresión diferencial de proteínas. Para ello, se cultivaron plantas de *A. farnesiana* y de *A. farnesiana* en asociación con *M. oryzae* en condiciones *in vitro*, con y sin 580 μM As durante 15 días. Al cabo de dicho tiempo, la presencia de la bacteria no modificó el crecimiento vegetal, a pesar del incremento detectado en la bioacumulación de As en tallos y raíces, así como del contenido de clorofila. La simbiosis también incrementó el contenido de glutatión (GSH) y la relación GSH/GSSG, lo que sugiere una disminución en el grado de oxidación (GO), en ambos tejidos. Por otro lado, la simbiosis disminuyó el nivel de H_2O_2 inducido por el As en raíces, y la actividad GST y POX en tallos y raíces de plantas expuestas a As, indicando en general una mejora en el estado redox celular. Los resultados obtenidos sugieren un efecto protector de la simbiosis contra la toxicidad del As bioacumulado, favoreciendo la tolerancia vegetal. Los cambios mencionados por efecto de la simbiosis podrían ser regulados por un cambio en el proteoma intracelular. Los análisis proteómicos demostraron que la presencia de *M. oryzae* alivió el desorden metabólico inducido por la toxicidad por As, principalmente en tallo, donde la bacteria reguló positivamente las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de GSH y plegamiento de proteínas, mientras que en raíces, *M. oryzae* estimuló la diversidad de isoformas de proteínas expresadas y mantuvo la abundancia de proteínas relacionadas al metabolismo de aminoácidos, en respuesta a la alta bioacumulación de As.

Palabras clave: *Acacia farnesiana*, *Methylobacterium oryzae*, simbiosis, fitorremediación, arsénico, GST, estrés oxidante, proteoma.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a metalloid highly toxic and widely distributed in the ground. For that reason, nowadays there are several technologies to clean As-polluted soils. One of these is phytoremediation, which use tolerant plant and its associated microorganisms (MOs), which can modify the ability of plant to bioaccumulate toxic elements in their tissue. For that, growth of a plant tolerant to As, *Acacia farnesiana*, was tested in presence of different MOs, under As stress conditions. From results of biomass and bioaccumulation of As in stem and roots, an endophytic bacteria identified as *Methylobacterium oryzae* was selected to perform phytoremediation assays.

One way to understand intracellular mechanisms involved in As-plant tolerance as well as the effect of plant-MO symbiosis is through the quantification of the enzymatic activity and presence of molecules involved in such a mechanisms and the analysis of proteomic profile. Thus, the aim of this work was to evaluate the influence of the endophytic *M. oryzae* in the As-tolerance of *A farnesiana* through the analysis of the As bioaccumulated, physiological changes as well as differential protein regulation. For that, *A. farnesiana* and *A. farnesiana*- *M. oryzae* plants were grown *in vitro*, with 0 and 580 μM As for 15 days. The presence of bacteria did not modify the vegetal growth despite the increase of As bioaccumulation in shoots and roots and the increase of chlorophyll. Symbiosis also increased glutathione (GSH) content, as well as GSH/GSSG rate, decreasing the oxidation degree (OD), in both shoots and roots. On the other hand, symbiosis decreased the H_2O_2 level induced by As in roots, as well as GST and POX activity in both tissues of As-stressed plants, indicating a general improvement in the redox cellular state. The obtained results suggest a protective effect of symbiosis against the As toxicity, which favor the vegetal tolerance. The changes induced by symbiosis could be regulated by modifications in the intracellular proteome. The proteomic analysis demonstrated that *M. oryzae* alleviated the As-induced metabolic disorder, mainly in shoot where bacteria positively regulated proteins related to carbohydrate metabolism, aminoacid metabolism, GSH biosynthesis and protein folding, whereas in roots, *M. oryzae* increased the diversity of protein isoforms expressed and maintained the abundance of proteins related to metabolism of aminoacids in response to the high As bioaccumulated.

Keywords: *Acacia farnesiana*, *Methylobacterium oryzae*, symbiosis, phytoremediation, arsenic, GST, oxidant stress, proteome.

LISTA DE ABREVIATURAS

AN: Agar nutritivo

APX: ascorbato-peroxidasa

ASC: Ascorbato

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: “adenosín trifosfato”

Bacteria PCV: Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

BSA: Bovine Serum Albumine

CAT: Catalasa

CS: cisteína sintasa

DHAR: dehidro-ascorbato reductasa

Ciclo ATC: Ciclo de ácidos tricarbóxicos

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DTT: Ditiotreitól

EAA: Espectrometría de absorción atómica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPT: Elementos potencialmente tóxicos

FT: Factor de translocación

FBA: Factor de bioacumulación

EC: Extracto crudo

ERO: Especies reactivas de oxígeno

GO: Grado de oxidación

G-POX: Actividad guayacol peroxidasa

GPX: Glutati3n peroxidasa

GR: Glutati3n reductasa

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutati3n oxidado

GST: Glutati3n S-transferasa

GSTF: GST phi

GSTL: GST lambda

GSTT: GST theta

GSTZ: GST zeta

HM: Hongos micorrízicos

KCN: cianuro de potasio

LC - MS / MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

MDHAR: monodehidroascorbato reductasa

MetH: metionina sintasa

MDH: malato deshidrogenasa

MO: Microorganismo

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PCR: “Reacci3n en Cadena de la Polimerasa”

PEG: Polietilenglicol

PDA: medio agar papa dextrosa

PF: Peso fresco

PGK: fosfoglicerato cinasa

PI: punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

POX: Peroxidasa

PPI: peptidil-prolil cis-trans isomerasa

Proteínas PR: Proteínas de respuesta a patógenos

PRX: peroxi-redoxinas

RSAF: factor relativo de abundancia de espectros

PSMsR: factor relativo de espectros por proteína en cada spot

PSP: Inhibidores de traducci3n

SAH: S-adenosil-homocisteinasa

SAM: S-adenosil-metionina

SAMS: S-adenosil-metionina sintasa

SOD: Superóxido dismutasa

TLP: proteína del lumen del tilacoide

TNB: 5-thio-2-nitrobenzoico

TRX: tiorredoxinas

UFC: Unidades formadoras de colonias

VPF: Vía de pentosas fosfato

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Contaminación por arsénico en suelos	4
1.2 Toxicidad y tolerancia al arsénico en plantas y bacterias.....	4
1.3 Fitorremediación asistida por microorganismos endófitos.....	11
1.4 <i>Acacia farnesiana</i> : una planta tolerante y potencialmente fitorremediadora	16
1.5 <i>Methylobacterium</i> : una bacteria simbiote y resistente	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	23
4.1 General.....	24
4.2 Particulares	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Estrategia experimental general	26
5.2 Material biológico.....	27
5.3 Etapa 1. Selección de un microorganismo endófito	28
5.4 Etapa 2. Cultivos de <i>A. farnesiana</i> - <i>M. oryzae</i> bajo estrés por arsenato	30
5.5 Etapa 3. Análisis del proteoma intracelular	34
5.6 Análisis estadístico.....	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Etapa 1. Selección de un microorganismo endófito	44
6.2 Etapa 2. Cambios fisiológicos y bioacumulación de As por <i>A. farnesiana</i>	48
6.3 Etapa 3. Proteoma intracelular de <i>A. farnesiana</i>	60
7. CONCLUSIONES	88
8. PERSPECTIVAS	90
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
10. ANEXOS	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos utilizados para las pruebas de asociación con plántulas de <i>A. farnesiana</i>	29
Tabla 2. Bioacumulación de As en tallos y en raíces de <i>A. farnesiana</i> (AF) crecida con diferentes MOs durante 50 días en medio MS con 80 mg L ⁻¹ As ^V . AF-M: Planta- <i>M. oryzae</i> ; AF-C: Planta- <i>Coccomyxa</i> sp.; AF-CI: Planta- <i>Caldosporium</i> sp.....	46
Tabla 3. Contenido de pigmentos fotosintéticos de <i>A. farnesiana</i> en asociación con <i>M. oryzae</i> y bajo estrés por As ^V	50
Tabla 4. Bioacumulación de As, en tallo y raíz de <i>A. farnesiana</i> y <i>A. farnesiana-M.oryzae</i>	52
Tabla 5. Contenido de proteína total, glutatión total (GSH _T), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), grado de oxidación (GO) y potencial de reducción (E _{hc}) de As, en tallo y raíz de <i>A. farnesiana</i>	56
Tabla 6. Proteínas reguladas diferencialmente en tallos de <i>A. farnesiana</i> , identificadas por LC-MS/MS.....	62
Tabla 7. Proteínas únicas y reguladas diferencialmente en raíces de <i>A. farnesiana</i> , identificadas por LC-MS/MS,.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de los mecanismos implicados en la tolerancia vegetal al As^V.....7

Figura 2. Estrategia experimental general. En los cuadros grises se muestra la actividad general realizada en cada etapa del estudio, los cuadros blancos de línea continua indican las actividades particulares y, en los cuadros con línea punteada, se muestran las variables de respuesta determinadas en cada caso. El crecimiento se determinó mediante la biomasa vegetal seca y la concentración de pigmentos fotosintéticos; las pruebas bioquímicas incluyen la cuantificación de la concentración de H₂O₂, GSH y GSSG, y la actividad de las enzimas GST y POX.....25

Figura 3. Esquema de los tratamientos establecidos durante la etapa 2 y 3. Los recuadros grises representan los cultivos bajo estrés por As^V, los cuadros blancos representan los cultivos que crecen sin As^V. En cada condición, se evaluó la influencia del *M. oryzae* en las variables cuantificadas, la presencia de la bacteria se representa con línea punteada.....29

Figura 4. Geles maestros por cada tratamiento, obtenidos con el programa PDQuest.....37

Figura 5. Gráfica construida a partir del logaritmo del peso molecular y la distancia relativa de migración de las proteínas del marcador molecular.....38

Figura 6. Gráfica construida a partir de las unidades de pH y las unidades de distancia de la tira. Una unidad de distancia es igual a 1.02, y se calculó como la relación entre la distancia donde terminaron de correr las proteínas en la primera dimensión, y la longitud de la tira (7 cm).....39

Figura 7. Biomasa (base seca) de *A. farnesiana* (AF) crecida durante 50 días con diferentes cepas microbianas, en medio MS. Cl: *Cladosporium* sp.; EM: *Emericella* sp.; L: *Lewia* sp.; P: *Penicillium* sp.; T: *Trichoderma* sp.; M: *M. oryzae*; C: *Coccomyxa* sp. Se muestran valores promedio ± D.E.; las diferencias significativas se indican con letras diferentes (p<0.05).....43

Figura 8. Biomasa total de *A. farnesiana* (AF) al cabo de 50 días de crecimiento con las diferentes cepas de MOs, en medio MS sin (barras verdes) y con 80 mg L⁻¹ de As^V (barras grises). AF-M: Planta-*M. oryzae*; AF-C: Planta-*Coccomyxa* sp.; AF-Cl: Planta-*Cladosporium* sp. Se muestran promedios ± D.E. Las diferencias significativas entre diferentes medios de la misma asociación se indican con asteriscos, y aquellas encontradas entre las diferentes asociaciones en el mismo medio se muestran con letras diferentes (p<0.05).....44

Figura 9. Pruebas de endofiticidad por el método en placa. A: Plantas de *A. farnesiana* creciendo en presencia de *M. oryzae* en medio MS. B: En la parte superior, se observan segmentos de tallo y en la parte inferior, segmentos de raíz, con crecimiento bacteriano. C: En la parte superior se observan segmentos de tallo de plantas que crecieron sin la bacteria y en la parte inferior segmentos de raíz en la misma condición, como control negativo de la prueba.....45

Figura 10. Pruebas de endofiticidad en tallo, por microscopía. A: Cortes de 50 µm de segmentos de tallo, observado con microscopía de campo claro, en la parte superior se observa fragmentos de plantas crecidas en asociación con la bacteria, en la parte inferior, fragmentos de plantas control. B: Cortes de 50 µm observado con microscopía confocal, se

muestran células de *M. oryzae* con fluorescencia de color verde, dentro de células de tallo de *A. farnesiana*, después de 15 días de cultivo.47

Figura 11. Crecimiento (biomasa) de tallos y raíces, de *A. farnesiana* en asociación con *M. oryzae* y bajo estrés por As^V. Se muestran promedios ± D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con letras diferentes (p<0.05).....48

Figura 12. Concentración de H₂O₂ en tallos y raíces de *A. farnesiana*, en plantas expuestas a As^V, en presencia y ausencia de *M. oryzae*. Se muestran valores promedio ± DE; las diferencias significativas entre tratamientos se indican con letras diferentes (p<0.05).....54

Figura 13. Actividad GST en tallos y raíces de *A. farnesiana*. A) Actividad específica; B) Actividad relativa. Las diferencias significativas entre tratamientos se señalan con letras diferentes (promedio ± DE, p<0.05).....57

Figura 14. Actividad POX en tallos y raíces de *A. farnesiana*. A) Actividad específica; B) Actividad relativa. Las diferencias significativas entre tratamientos se señalan con letras diferentes (promedio ± DE, p<0.05).....58

Figura 15. Clasificación de proteínas identificadas en tallos. A) Clasificación en las diferentes categorías de acuerdo a su función principal, total de proteínas identificadas por LC-MS/MS: 119. B) Diagrama de Venn de la distribución de proteínas, se muestra el número de proteínas compartidas entre diferentes tratamientos y únicas por tratamiento.....60

Figura 16. Esquema que resume los principales cambios encontrados en algunas rutas metabólicas intracelulares de tejido de tallo, basado en el análisis proteómico. Las flechas hacia arriba indican regulación positiva de las proteínas (sobre-regulación) y flechas hacia abajo indican que las proteínas se encuentran reguladas negativamente (bajo-regulación).....66

Figura 17. Clasificación de spots y proteínas identificadas en raíces. A) Clasificación de proteínas en las diferentes categorías de acuerdo a su función principal, total de proteínas identificadas por LC-MS/MS: 49. B) Diagrama de Venn de distribución de spots en muestras de raíz, identificados con el programa PDQuest, se muestra el número de spots compartidos entre diferentes tratamientos y únicos por tratamiento.....73

Figura 18. Comparación de la intensidad promedio de los spots seleccionados para el análisis por LC-MS/MS. La intensidad indica la cantidad de proteína en el spot. Se muestra D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos con letras diferentes. ND: No detectado.....78

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide altamente tóxico, a pesar de ser poco abundante en la corteza terrestre (0.0005 %), está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y puede llegar a acumularse en suelos y cuerpos acuáticos. Por más de tres siglos, en México, la explotación minera ha contribuido a la contaminación de suelos con As, ya que este metaloide se deriva de los procesos de extracción (método de flotación o hidrometalurgia) de minerales de interés, como minerales de zinc-plomo, cobre, oro y con mayor frecuencia en minerales con azufre; el As derivado de estos procesos no se recupera y se acumula en los residuos mineros (o jales), y por ello la principal fuente que contribuye a la acumulación de As en suelo en México es la actividad minera (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). Este metaloide puede provocar alteraciones químicas en el suelo y toxicidad en los sistemas biológicos que lo absorben y, de acuerdo con la “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 2012), es catalogado como un elemento cancerígeno para humanos. Por lo anterior, actualmente existen diversas tecnologías para limpiar suelos contaminados con As; una de ellas es la fitorremediación, una técnica que implica el uso de plantas y los microorganismos (MOs) asociados a ellas para remediar matrices contaminadas, ya sea suelos o agua, a través de la remoción, transformación, degradación o estabilización de los contaminantes (Meagher, 2000; Mench *et al.* 2009). El uso de plantas para remediar suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos (EPT) se exploró desde los años 50 y, en la última década, el uso de la fitorremediación comenzó a expandirse, demostrando hasta la fecha ser una alternativa efectiva y económicamente rentable para la limpieza *in situ* de suelos contaminados con metales y metaloides (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). En comparación con los métodos fisicoquímicos tradicionales utilizados para la remediación de suelos contaminados con metales y metaloides, (el lavado, la remoción, el transporte y el confinamiento) la fitorremediación representa una tecnología más económica, amigable con el ambiente y factible para grandes terrenos contaminados (Baker *et al.* 1994). Las plantas usadas con fines de fitorremediación, deben ser tolerantes a los contaminantes que se desea degradar o remover; cuando el contaminante es el As, solo es posible su biotransformación, remoción o transformación en formas menos tóxicas, dentro de los tejidos vegetales. Para bioacumular el As en los tejidos, las plantas tolerantes tienen mecanismos intracelulares que les permiten contrarrestar el daño oxidante que el metaloide puede causar en la estructura y funcionamiento de la célula (Verbruggen *et al.* 2009), de manera que las plantas pueden crecer y cumplir su ciclo de vida en un suelo contaminado con As. En este sentido *Acacia farnesiana* (L.) Willd., es un arbusto o árbol que crece y cumple su ciclo de vida en lugares contaminados con altas concentraciones de As (Armienta *et al.* 2008; Puga *et al.* 2006), y se ha propuesto que dicha especie tiene potencial para fitorremediar sitios contaminados con plomo, cadmio y As (Maldonado-Magaña *et al.* 2011; Solís-Ibarra 2009; Alcántara-Martínez *et al.* 2016).

Estudios recientes enfocados en el mejoramiento de la tolerancia de las plantas y en el uso de simbiosis planta-MO (rizosférico o endófito), han demostrado que los MOs pueden favorecer el crecimiento y tolerancia de plantas (Singh *et al.* 2011; Ullah *et al.* 2015). *Methylobacterium* es un género de bacterias que puede asociarse con plantas en la rizósfera, filósfera o dentro de los tejidos vegetales (Kwak *et al.* 2014). Aunque se han aislado algunas cepas de dicho género a partir de plantas tolerantes a EPT, poco se sabe de su efecto en la tolerancia vegetal al As. Una manera de entender los mecanismos intracelulares que confieren tolerancia a las plantas al As, así como el efecto de los MOs en las simbiosis planta-MO es a través de la cuantificación de la actividad de enzimas y de moléculas involucradas en dichos mecanismos. Por otro lado, debido a que la activación de los mecanismos en respuesta al estrés se refleja en cambios en el proteoma vegetal, el análisis de la expresión diferencial de proteínas permite dilucidar el efecto del As, o del MO, sobre la planta. Con base en lo anterior, el objetivo general del presente estudio fue determinar la influencia de la cepa AFM14 de *Methylobacterium oryzae* en la tolerancia de *A. farnesiana* al As, medida a través de la capacidad de bioacumulación de As, cambios bioquímicos y fisiológicos en la planta, y de cambios en el perfil proteómico intracelular.

El primer capítulo de este documento comprende una revisión bibliográfica que incluye una breve descripción del problema de la contaminación de suelos por As y el efecto tóxico de este metaloide en las plantas y bacterias, se revisan los diferentes mecanismos implicados en la tolerancia a As, en ambos organismos y, por último, el uso de la fitorremediación como alternativa para remediar suelos contaminados con As y el uso de las asociaciones planta-MO en la fitorremediación, profundizando el efecto de los MOs endófitos, particularmente bacterias endófitas, en la tolerancia vegetal ¿a metales pesados?. En los capítulos dos, tres y cuatro se plantea el problema que justifica el estudio y la hipótesis a demostrar y los objetivos a cumplir, respectivamente. En el capítulo cinco se presenta la estrategia general de trabajo y se detallan los materiales y métodos utilizados; como parte del capítulo, se detallan los métodos para la obtención de la cepa de *M. oryzae*, y para el análisis de: (i) el tipo de simbiosis que forman *A.farnesiana-M.oryzae* (ii) el crecimiento y la bioacumulación de As, (iii) la concentración de peróxido de hidrógeno, (iv) la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de moléculas antioxidantes, (vi) el proteoma intracelular. Los resultados y discusión del trabajo se presentan en el capítulo seis; en donde se discute la selección de la cepa de *M. oryzae*, y se describe el tipo de simbiosis que forman ambos organismos en un sistema *in vitro*. Una vez descrita la naturaleza de la simbiosis, se analiza y discute el efecto de la simbiosis sobre la tolerancia de *A. farnesiana* a la presencia de arsenato, comparando los cambios en el proteoma intracelular, inducidos por la presencia o no de la bacteria.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Contaminación por arsénico en suelos

El As es un EPT, ya que puede ser tóxico para los sistemas biológicos debido a sus propiedades y dependiendo de su concentración (Lal, 2010). Este metaloide puede encontrarse con cuatro estados de oxidación diferentes (V, III, 0, -III) y en una variedad de formas inorgánicas y orgánicas, sin embargo, el arsenato (As^{V}) y el arsenito (As^{III}) son las formas iónicas predominantes en el suelo y agua, siendo el As^{V} la forma más común en suelos aerobios (Huang, 1994). Este metaloide es un EPT ampliamente distribuido en la corteza terrestre y, particularmente, en muchos suelos de México, que se libera al ambiente a través de cenizas por la combustión de carbón, el uso de plaguicidas y herbicidas que lo contienen, o mediante residuos generados de actividades como la minería y metalurgia (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). En los suelos, puede encontrarse en concentraciones por debajo de 10 mg kg^{-1} de suelo (Adriano, 1986) o en concentraciones de hasta 30000 mg kg^{-1} , en suelos contaminados (Vaughan, 1993). Dependiendo de su concentración y, en general, de la composición físico-química del suelo, la concentración de As que puede encontrarse en una planta es variable; de esta forma se han reportado valores de 0.01 a $1.5 \text{ mg As kg}^{-1}$ de peso seco en plantas que crecen en suelos no contaminados (Kabata-Pendias, 2001), mientras que en plantas que crecen en sitios contaminados se han encontrado valores de As superiores a $6000 \text{ mg As kg}^{-1}$ de peso seco (Porter y Peterson, 1975; Visoottiviseth *et al.* 2002).

1.2 Toxicidad y tolerancia al arsénico en plantas y bacterias

Debido a que el As puede acumularse en las células, se le reconoce como un elemento altamente tóxico para los seres vivos (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). En las plantas, el As puede ser absorbido por las raíces mediante transportadores de fosfato ya que el As^{V} tiene similitud con el fósforo. Una vez que entra a las células, el As^{V} puede remplazar el fósforo esencial en el DNA y en reacciones de fosforilación, incluyendo la síntesis de ATP, lo que conduce a la interrupción de la fotosíntesis y la respiración celular (Babula *et al.* 2008). Otra forma iónica menos común en suelos superficiales, pero más tóxica, es el As^{III} , el cual se absorbe principalmente a través de proteínas de la subfamilia de las acuaporinas, relacionadas con el transporte del glicerol (Verbruggen *et al.* 2009). El As^{III} es la forma predominante en la planta, debido a la rápida reducción del As^{V} dentro de la célula (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). La reducción del As^{V} a As^{III} conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que son especies químicas altamente reactivas, como el superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion hidroxilo ($\bullet\text{OH}^-$), capaces de oxidar biomoléculas como lípidos de membranas (lipoperoxidación), proteínas y DNA. El As^{III} puede unirse a grupos tiol de las proteínas causando alteración de la estructura, inhibición de actividades enzimáticas y mal plegamiento de las proteínas (Ramadan *et al.* 2008; Verbruggen *et al.* 2009). La sobreproducción de ERO y el daño en la integridad de las proteínas contribuyen al daño oxidante, una respuesta común al estrés por

As que puede conducir a la disminución de crecimiento e incluso la muerte de un organismo (Ramadan *et al.* 2009).

En el caso de los MOs, el metabolismo del As se ha estudiado principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Rosen, 2002). Al igual que en las plantas, el As^V y As^{III} son absorbidos por transportadores de fosfato y acuaporinas respectivamente; en *Escherichia coli*, se han descrito dos transportadores de fosfato Pit y Pst que catalizan el transporte de As^V (Rosen, 2002). En los MOs, el As es tóxico de manera similar a lo reportado en las plantas, de manera que éstos también han desarrollado mecanismos intracelulares para evitar o disminuir el daño oxidante provocado por el incremento en la producción de ERO.

1.2.1 Sobreproducción de ERO y estrés oxidante

Las ERO son moléculas de vida media corta que se producen durante la transferencia de electrones al O₂ en procesos celulares normales como la fotosíntesis, foto-respiración y respiración celular. En bajas concentraciones, las ERO actúan como moléculas señalizadoras que regulan procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo, la muerte celular programada, la respuesta a hormonas y a distintos tipos de estrés biótico (ataque por patógenos) y abiótico (sequía, salinidad, temperatura, radiación, carencia de nutrientes, luminosidad intensa, estrés mecánico y exposición a EPT). Sin embargo, cuando el equilibrio entre la producción y la remoción de ERO se altera, éstas pueden causar daño oxidante. Por lo anterior, la regulación de los niveles de ERO mediante su producción y su remoción, es importante para permitir la señalización celular sin causar estrés oxidante, definido como la oxidación de biomoléculas proveniente de un desequilibrio en la producción y remoción de ERO (Konigsberg, 2008; Garg y Singala, 2011). La entrada y acumulación de As^V y As^{III} en los tejidos de las plantas y en los MOs genera sobreproducción de ERO, lo que conduce a un estrés oxidante, el cual puede eventualmente inhibir el crecimiento de la planta (Sharma y Dietz, 2008). En condiciones normales de crecimiento, la producción de ERO en las células es de ~240 μM de •O₂⁻ seg⁻¹ y de ~0.5 μM de H₂O₂ seg⁻¹ en los cloroplastos. Sin embargo, en respuesta a diversos tipos de estrés que alteran la homeostasis celular, la concentración de ERO aumenta a niveles de 240-720 μM de •O₂⁻ seg⁻¹ y 5-15 μM de H₂O₂ seg⁻¹ (Konigsberg, 2008). En plantas expuestas a EPT la señalización celular en respuesta a un incremento en la producción de ERO se relaciona con la inducción del sistema antioxidante que, entre otros mecanismos, elimina ERO para evitar la propagación del daño oxidante (Sharma y Dietz, 2008).

1.2.2 Mecanismos de tolerancia

De acuerdo con Baker (1987), las plantas pueden resistir el estrés por EPT debido a dos estrategias principales: (i) exclusión y (ii) tolerancia. La primera estrategia se refiere a una protección externa que evita el daño celular por los elementos tóxicos, esta protección puede

deberse a una reducción en la absorción del contaminante, o bien, a la unión del elemento a la pared celular. La tolerancia se refiere a mecanismos intracelulares específicos que se activan cuando el contaminante entra a la célula, lo cual reduce la toxicidad y permite a la planta crecer normalmente (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). En plantas, los mecanismos de tolerancia pueden clasificarse en dos vías generales: (i) activación del sistema de defensa antioxidante, que incluye la acción de enzimas y moléculas antioxidantes que mantienen el estado redox celular; (ii) secuestro intracelular, es decir, la compartimentación del As en las vacuolas mediante transportadores del tonoplasto (destoxificación) (Prasad *et al.* 2003). Las plantas pueden presentar estrategias de exclusión y tolerancia de forma conjunta, para disminuir los efectos tóxicos del EPT. Aunque las bacterias tienen algunos mecanismos de tolerancia similares a los de las plantas, también han desarrollado diferentes estrategias; por ejemplo, las bacterias carentes de vacuolas desarrollaron otro mecanismo de destoxificación, que consiste en la expulsión del As^{III} de las células a través de un sistema de transporte activo compuesto por proteínas transmembranales (Cavalca *et al.* 2010).

1.2.2.1 Sistema antioxidante

Se sabe que en plantas, la respuesta celular al estrés por As puede desencadenarse por el cambio en la homeostasis de elementos esenciales o por el incremento de ERO (Verbruggen *et al.* 2009). El sistema antioxidante interactúa directamente con ERO para evitar daño oxidante, y se compone de una compleja red de moléculas, como glutatión (GSH) y ascorbato (ASC), y de la actividad de enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y peroxidasas (POX), que metabolizan ERO y mantienen la homeostasis celular (Lal, 2010) (Figura 1). En plantas y MOs, las moléculas más importantes implicadas en la destoxificación de ERO, son el ASC y el GSH. El ASC es el antioxidante hidrosoluble más abundante que protege a las membranas mediante la reducción de la forma oxidada del α -tocoferol y por la eliminación directa de $\bullet\text{O}_2^-$, además es sustrato de la enzima ascorbato-peroxidasa (APX), que cataliza la reducción de H_2O_2 . Por otra parte, el GSH es un tri-péptido (Glu-Cys-Gly) con diversas funciones; es clave en el balance redox celular, está involucrado en el transporte y almacenamiento de azufre reducido, es precursor de fitoquelatinas (FQ) y puede unirse al As^{III} para su compartimentación en la vacuola (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2011). El GSH es abundante en plantas, ya que comúnmente excede la concentración de 1 mM en el citoplasma. La acción antioxidante conjunta del GSH y el ASC ocurre a través de una serie de reacciones redox que conforman el ciclo de ASC-GSH. El estado redox de éstas moléculas se mantiene a través de las enzimas glutatión reductasa (GR), mono-dehidro-ascorbato reductasa (MDHAR) y DHAR (Sharma y Dietz, 2008). Por otra parte, la SOD es la única enzima en las plantas que dismuta el $\bullet\text{O}_2^-$ en H_2O_2 y O_2 , isoformas de SOD (Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) se localizan en varios compartimentos celulares, evitando la producción del radical libre $\bullet\text{OH}$ a partir de $\bullet\text{O}_2^-$

. Como parte de la compleja red antioxidante, diversas enzimas catabolizan H_2O_2 , tales como la CAT, y diferentes enzimas con actividad peroxidasa como APX, glutatión-peroxidasa (GPX) y las peroxi-redoxinas (PRX), las cuales también pueden metabolizar otros peróxidos a compuestos menos tóxicos (Konigsberg, 2008). Otra enzima que tiene actividad peroxidasa importante en las plantas, es la glutatión S-transferasa (GST), la cual puede reducir hidroperóxidos orgánicos. Además de las enzimas y moléculas mencionadas, las plantas han mostrado producir otros compuestos con potencial antioxidante, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, hidroxiantraquinonas y terpenos fenólicos, que contribuyen a la defensa contra el estrés oxidante (White y Torres, 2010).

En bacterias, algunos trabajos han demostrado la presencia de enzimas relacionadas a GSH en el proceso de virulencia. Sin embargo, se conoce que algunas bacterias como *Staphylococcus aureus* no tienen enzimas relacionadas con el ciclo ASC-GSH (Staerck *et al.* 2017). Una de las principales enzimas implicadas en la detoxificación de ERO en bacterias es la SOD; al respecto, se ha demostrado que cepas carentes de genes que codifican para SOD, son más sensibles al estrés oxidante (Staerck *et al.* 2017). Por otro lado, las POX son esenciales para el crecimiento de bacterias, y en algunas especies, las tioredoxinas (TRX) y otras POX se han observado inducidas en respuesta a condiciones de estrés (White y Torres, 2010).

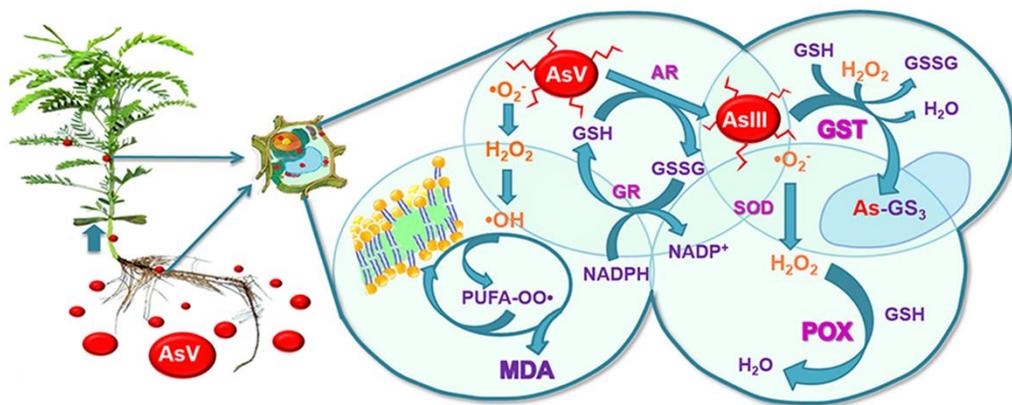


Figura 1. Esquema general de los mecanismos intracelulares implicados en la tolerancia vegetal al As. El As^V es reducido a As^{III} por la acción de la enzima AR, en forma de As^{III} , la enzima GST forma conjugados $As-GS_3$, y éstos son guardados en la vacuola para bioestabilizar el As. La sobre producción de ERO causada por el As^V y el As^{III} es controlada por una red de enzimas antioxidantes, tales como GR, SOD, y POX, que dependen de moléculas con poder reductor como NADPH, GSH, entre otras.

1.2.2.2 Secuestro intracelular

Además del sistema antioxidante que regula los niveles de ERO, la detoxificación de As en plantas se relaciona con su secuestro en la vacuola, evitando de esta manera la exposición

celular a su toxicidad (Figura 1). El secuestro intracelular de As precisa de la reducción de As^V a As^{III}, a través de una reacción enzimática o no enzimática. En plantas y en MOs, la reducción catalítica de As^V ocurre por acción de la enzima arsenato reductasa (AR). En MOs se han descrito dos tipos de AR: ArsC en *Escherichia coli* y Acr2p en *Saccharomyces cerevisiae* (Maciaszczyk-Dziubinska *et al.* 2012). La transformación química del As se considera uno de los principales mecanismos en la detoxificación en plantas y MOs (Ali *et al.* 2009), ya que en la forma As^{III}, este metaloide puede ser conjugado con el GSH (As-GS₃) para su secuestro en la vacuola y, en el caso de MOs, el As^{III} puede ser expulsado de la célula por un sistema que incluye la actividad de ATPasas (sistema de exclusión).

La enzima que cataliza la formación de conjugados As^{III}-GS₃ es la GST. Las GST son una familia de enzimas muy importantes en la detoxificación de compuestos citotóxicos endógenos y exógenos, y participan principalmente en la formación de conjugados con GSH (R-SG) a través de una reacción de sustitución nucleofílica, para estabilizarlos en formas menos tóxicas, y facilitar su transporte a la vacuola (Moons, 2005):



El transporte de los conjugados R-SG al interior de las vacuolas es mediado por los transportadores de membrana ABC dependientes de ATP; en las vacuolas, los R-SG son metabolizados en diversos compuestos que contienen sulfuro (Moons, 2005). Además, se ha reportado que algunas GST poseen actividad peroxidasa y forman parte del sistema de defensa antioxidante (Verbruggen *et al.* 2009).

1.2.2.3 Actividad de glutatión S-transferasas (GST)

Las enzimas GST son una familia diversa de proteínas que existe en bacterias, hongos, animales y plantas. Las proteínas de la familia GST tienen gran similitud en la secuencia del dominio que une GSH y además pueden unir otras moléculas con grupos tiol para reacciones de conjugación, no obstante, algunas proteínas relacionadas con esta superfamilia, como la proteína cristalina del lente de calamar, han perdido su capacidad de unir GSH o utilizar tiol en reacciones de conjugación (Edwards y Dixon, 2005). Las GST unen selectivamente GSH u homólogos naturales, como homoglutatión (Glu-Cys-Ala) e hidroximetil glutatión (Glu-Cys-Ser), que son frecuentes en leguminosas y pastos, respectivamente (Edwards y Dixon, 2005; Dixon y Edwards, 2011). La superfamilia de GST se clasifica en distintas categorías, con base en su evolución; cada categoría se denota con una letra griega, excepto la dehidro-ascorbato reductasa (DHAR) y la tetracloro-hidroquinona deshalogenasa (TCHQD) (Dixon *et al.* 2010). Las GST phi (GSTF) y tau (GSTU) son específicas de plantas; otras categorías también presentes en plantas, pero menos abundantes son las GSTs zeta (GSTZ), theta (GSTT) y lambda (GSTLs). Las funciones de las GSTs son variables, e incluyen la conjugación del GSH

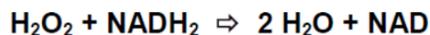
en el mecanismo de destoxicación de subproductos naturales, de herbicidas o metales y metaloides; reacciones de peroxidasas dependientes de GSH, que eliminan los hidroperóxidos tóxicos y protegen del daño oxidante; participan en isomerizaciones del metabolismo endógeno dependientes de GSH; pueden transferir grupos tiol a proteínas, protegiendo la función enzimática del daño oxidante; pueden funcionar como ligandos o proteínas de unión a fitohormonas (auxinas y citoquininas) o antocianinas, facilitando su distribución y transporte. Las GST también participan indirectamente en la regulación de la apoptosis y posiblemente también en la señalización del estrés (Moons, 2005). Principalmente debido a su actividad como peroxidasas y como enzimas de conjugación con el GSH, las GST se encuentran frecuentemente relacionadas con la tolerancia de las plantas al estrés por EPT (Dixon *et al.* 2010).

El sitio activo de las GST incluye un sitio conservado de unión al GSH, localizado en el dominio N-terminal (sitio G) y un sitio de unión de co-sustrato localizado en el dominio C-terminal (sitio H), el cual puede unir diferentes compuestos hidrofóbicos. Dentro del sitio G, la mayoría de las GSTs tienen un residuo de serina que interactúa con el grupo sulfhidrilo del GSH, lo cual permite la sustitución nucleofílica de la molécula en reacciones de conjugación y actividad peroxidasa. Algunas otras GSTs, como DHARs y GSTLs tienen cisteína en lugar de serina en el sitio activo, lo cual permite formar reversiblemente disulfuros mixtos con el grupo tiol. Se sabe que las DHARs reducen el DHA (dehidroascorbato) a ácido ascórbico, a través de la oxidación del GSH en el ciclo de ASC-GSH. Sin embargo, la función de las GSTLs aún es poco conocida (Dixon y Edwards, 2011).

Al igual que en las plantas, las GSTs de bacterias están relacionadas con una variedad de procesos de degradación de xenobióticos y protección contra estrés oxidante. Por ejemplo, en una cepa de *Proteus mirabilis* se identificó que una GST contribuye a la protección de las células contra el estrés oxidante inducido por H₂O₂ (Allocati *et al.* 2003). Además, en bacterias, las GST también están involucradas en la biotransformación del diclorometano, la degradación de lignina y atrazina, y la dechloración reductiva del pentaclorofenol (Allocati *et al.* 2008). Aunque el genoma de bacterias tiene múltiples genes que codifican para GSTs, se han identificado solo algunas proteínas funcionales; por ejemplo, en *P. mirabilis* y *P. vulgaris* se han identificado tres y cuatro diferentes GSTs, respectivamente (Allocati *et al.* 2009).

1.2.2.4 Peroxidasas (POX)

Las peroxidasas (POX) son enzimas bisustrato que utilizan un peróxido (H₂O₂, o peróxidos de ácidos grasos) como oxidante y un segundo sustrato con características reductoras, que es oxidado por el peróxido. El mecanismo catalítico de las peroxidasas, así como las moléculas reductoras pueden ser distintas (Konigsberg, 2008):



La actividad de estas enzimas depende del estado redox de la célula, ya que las moléculas reductoras se oxidan durante la reacción de óxido-reducción y necesitan restablecer continuamente su poder reductor. Hay muchos tipos de peroxidasa que se distribuyen en los diferentes organelos de las células; algunas de ellas son la TRX, PRX, APX, GPX y GST. Las TRXs conforman un sistema antioxidante que facilita la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína (Matsuzawa, 2017). Las PRXs son enzimas abundantes que regulan la señalización redox en coordinación con las TRXs. Diversas enzimas con actividad peroxidasa, tales como la APX, se relacionan indirectamente con la presencia de GSH, a través del ciclo ASC-GSH, mientras que la actividad de algunas de ellas como GPX y GST es dependiente de GSH.

La actividad POX es frecuentemente analizada en estudios de estrés vegetal, particularmente de tolerancia a EPT. En tal caso, se ha observado que la actividad de esta enzima varía dependiendo de la especie vegetal, del elemento tóxico, de su concentración y del tiempo de exposición (Mishra *et al.* 2008; Solis-Ibarra, 2009; Garg y Singla, 2011).

1.2.3 Cambios en el proteoma

Los estudios proteómicos sobre la respuesta vegetal a condiciones de estrés generadas por EPT, han contribuido a proponer mecanismos de defensa y de respuesta al estrés oxidante. Independientemente de la sensibilidad de la planta a la toxicidad de un EPT, este tipo de estrés frecuentemente estimula algunas proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, el ciclo del ASC-GSH, enzimas antioxidantes (por ejemplo POX, GST, GR), y proteínas de choque térmico (HSP) (Kosová *et al.* 2011).

En 2005, Requejo y Tena, describieron por primera vez en plantas de maíz, el patrón de expresión de proteínas en respuesta al estrés por As, encontrando una sobre-regulación de enzimas antioxidantes como SOD, GPX y PRX. Sus resultados sugieren que la inducción de estrés oxidante es un proceso importante para desencadenar una respuesta antioxidante en plantas bajo estrés por As. De hecho la sobre-expresión significativa de proteínas relacionadas con la defensa antioxidante en respuesta a tratamientos con metales no redox, como el As, ha mostrado que estos elementos también pueden desencadenar un mecanismo de defensa antioxidante, probablemente a través de la producción de ERO (Ahsan *et al.* 2009).

Otras proteínas que responden al estrés por el As, son aquellas involucradas en la homeostasis celular, en la producción de moléculas de señalización y metabolitos secundarios, así como proteínas involucradas en el desarrollo y biosíntesis de proteínas, por ejemplo, la S-adenosil-metionina sintasa (SAMS) y la cisteína sintasa (CS) –ambas involucradas en el plegamiento correcto de proteínas-, además de chaperonas e inmunofilinas (Ashan *et al.* 2008). Varios

estudios han mostrado también una regulación diferenciada de proteínas involucradas en la biosíntesis de GSH y en el ciclo ASC-GSH en respuesta a la exposición a As^V , por ejemplo γ -glutamyl-cisteina sintasa γ -GCS, GR y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), o de enzimas que detoxifican elementos tóxicos, como las GST (Ashan *et al.* 2008; Dubey *et al.* 2016).

A través de estudios de proteómica, también se ha identificado el tipo de GST que participa en el metabolismo del As^V . Al respecto, Ashan *et al.* (2008), encontraron que el dominio omega de GST podría estar involucrado en la biotransformación de As en raíces de plantas de arroz.

1.2.4 Otros sistemas de tolerancia en bacterias

En contraste con los mecanismos de detoxificación en plantas, se ha reportado un sistema de expulsión de As^{III} como otro mecanismo importante de detoxificación de As que es particularmente importante en bacterias. Se han reportado dos mecanismos bacterianos básicos de expulsión de As, uno de ellos, es mediado por una proteína transportadora de As^{III} , que utiliza energía proveniente del potencial de membrana celular; el otro mecanismo es mediado por una proteína ATPasa que provee energía para expulsar al As^{III} del citosol (Rosen, 2002). La mayoría de las bacterias utilizan ArsB que se encentra en la mayoría de los operones ars. En plantas no se han reportado transportadores de exclusión de As, pero aún faltan estudios al respecto (Xu *et al.* 2007).

Además del sistema antioxidante y de exclusión, las bacterias han desarrollado otros mecanismos para resistir el As. Uno de ellos, es la biotransformación de As^{III} , a través de procesos de oxidación y metilación que dan como resultado moléculas menos tóxicas y en ocasiones volátiles (Yang y Rosen, 2016). La metilación del As^{III} es catalizada por metiltransferasas (AsMTs) y produce metilarsinito^{III} (Mas^{III}), dimetilarsenito^{III} (DMAs^{III}), y trimetilarsine^{III} (TMAs^{III}) volátil. Otro mecanismo de defensa es la formación de biopelículas (Talano *et al.* 2013). Por ejemplo, se encontró que *Thiomonas arsenivorans* produjo una biopelícula como una barrera física para disminuir la disponibilidad del As^{III} (Michel *et al.* 2007).

1.3 Fitorremediación asistida por microorganismos endófitos

Debido a la alta toxicidad del As para los organismos, se han propuesto diversas tecnologías para su remoción y/o estabilización en los suelos contaminados, que ayuden a prevenir su entrada en la cadena trófica. Entre los métodos empleados para la remediación de suelos contaminados con As se encuentran los métodos fisicoquímicos tradicionales (solidificación/estabilización, excavación, lavado y entierro) y los métodos biológicos, particularmente la fitorremediación. Es importante señalar que el As no se degrada, pero se puede estabilizar o concentrar. Así, la fitorremediación de suelos contaminados con As puede lograrse a través de: (i) la acumulación en los tejidos aéreos de la planta (fitoextracción); (ii) la transformación a

especies químicas menos tóxicas y/o solubles (fitoestabilización); (iii) la inmovilización por la acumulación en raíces o su incorporación a lignina o humus (fitoestabilización) (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Actualmente se han reportado diversas plantas tolerantes al As, por ejemplo, *Prosopis* sp., *Holcus lanatus* L., *Pteris vittata*, *P. umbrosa*, *Ceratophyllum demersum*, *Cytisus striatus* y *Acacia farnesiana*, entre otras; todas ellas con potencial para la fitorremediación de suelos contaminados (Meharg y Macnair, 1992; Mokgalaka-Matlala *et al.* 2009; Armienta *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2005; Ma *et al.* 2009; Alcántara-Martínez *et al.* 2016). A pesar de las ventajas de la fitorremediación sobre otras técnicas tradicionales para remediar suelos, este método tiene limitaciones. Por ejemplo, su aplicación lleva más tiempo debido a que depende del crecimiento vegetal, lo cual incide directamente sobre la velocidad de extracción, estabilización y/o fitovolatilización de EPT. Para que la aplicación de la fitorremediación resulte eficiente, es necesario comprender los procesos biológicos que intervienen en la tolerancia a EPT, así como el desarrollo de nuevas estrategias que permitan acelerar el proceso (Khan *et al.* 2009). Una alternativa que puede aplicarse con ambos propósitos, es la manipulación de asociaciones simbióticas entre plantas y MOs específicos, ya sea rizoféricos o endófitos y evaluar el efecto de la asociación sobre los diferentes mecanismos implicados en la tolerancia de la planta a los EPT (Singh *et al.* 2011). El uso de MOs endófitos con fines de fitorremediación ofrece principalmente las siguientes ventajas: (i) la población del MO es controlada por la planta, reduciendo la competencia entre poblaciones; y (ii) los MOs endófitos pueden influir en la disponibilidad de los EPT, por lo que pueden mejorar la fitorremediación de EPT (Doty, 2008).

En condiciones de estrés por EPT, los MOs endófitos pueden mejorar la remoción de contaminantes inorgánicos (Lebeau *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010), ya que influyen en los procesos de biotransformación de EPT a través de mecanismos como oxidación, reducción, metilación, desmetilación, formación de complejos y biosorción (Bolan *et al.* 2013), lo que conduce a una alteración de las formas solubles e insolubles y formas tóxicas o no tóxicas del As. En el caso de los endófitos asociados a plantas hiperacumuladoras (plantas cuyos tallos y hojas bioacumulan la mayor parte del EPT), la resistencia de los MOs a EPT, se asocia con adaptaciones a las altas concentraciones que acumulan dichas plantas. Tal es el caso de endófitos aislados de *Alyssum bertolonii*, *Alnus firma*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Thlaspi caerulescens*, *T. goesingense* y *Solanum nigrum* (Li *et al.* 2012). El crecimiento bacteriano asociado a una planta puede promover cambio en la absorción y bioacumulación de EPT en los tejidos vegetales, que proviene de la alteración de las características fisicoquímicas de la rizósfera, cambio de la disponibilidad de EPT (anteriormente mencionada), y de un incremento de la defensa vegetal al estrés por EPT (Gadd, 2007). Además, estudios previos han demostrado que bacterias resistentes a EPT pueden incrementar la absorción de EPT de plantas tolerantes (De Souza, 1999; Sheng *et al.* 2008; Mastretta *et al.* 2009). Este incremento

se ha atribuido principalmente a la acidificación del suelo en la rizósfera facilitando la movilidad de los elementos alrededor de la zona de la raíz (Sheng *et al.* 2008; Rajkumar y Freitas, 2008). Otros estudios han reportado una disminución en la absorción de EPT mediada por bacterias, por ejemplo, *M. oryzae* incrementó significativamente el crecimiento y redujo la acumulación de Ni y Cd en plántulas de jitomate (Madhaiyan *et al.* 2007), mientras que Srivastava *et al.* (2013) no reportó cambios en la acumulación de As en las raíces de *Brassica juncea* expuestas a As^V e inoculadas con *Staphylococcus arlettae*, con respecto a las plantas no asociadas. Además, diversos estudios han demostrado que bacterias endófitas como *Bradyrhizobium japonicum*, *Methylobacterium oryzae* y *Burkholderia* sp., mejoran el crecimiento de los tallos de varias especies que crecen bajo condiciones de estrés por As y otros EPT (Reichman, 2007; Madhaiyan *et al.* 2007).

La interacción entre planta y MOs es un proceso complejo; los estudios de la asociación endosimbiótica planta- MO sugieren una respuesta mutualista de ambos organismos que favorece la tolerancia vegetal a diferentes elementos tóxicos. No obstante, hasta la fecha, el papel de los MOs en la fitorremediación aún no es claro debido a la complejidad que implica una asociación endófitas. La eficiencia de la fitorremediación asistida por MOs depende de varios factores, incluyendo la concentración de EPT y su forma iónica, propiedades fisicoquímicas del suelo, fisiología de la planta, arquitectura de la raíz, condiciones de crecimiento, y la interacción entre los MOs y las plantas (Zhuang *et al.* 2007).

1.3.1 Bacterias endófitas

De manera general, se consideran como MOs endófitos, aquellos que viven dentro de la planta sin causar enfermedad a su hospedero (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Para el establecimiento de una asociación endófitas, los MOs deben ser compatibles con las plantas hospederas y capaces de colonizar los tejidos vegetales sin que se comporten como patógenos (Dudeja *et al.* 2012), estableciendo una relación mutualista o comensalista. Dicha interacción puede favorecer la supervivencia de ambos organismos simbioses, explicando el éxito de las especies vegetales en hábitats bajo diferentes tipos de estrés. Hasta la fecha, los MOs endófitos han sido ampliamente estudiados en diversas condiciones ambientales y diversos estudios reportan la colonización de diferentes tejidos vegetales (raíz, nódulos, hojas, flores) en diferentes plantas por bacterias y hongos endófitos, reconociendo diversidad de órdenes, familias, géneros y especies (Dudeja *et al.* 2012; Li *et al.* 2012).

Dentro de los MOs endófitos, las bacterias pueden ser clasificadas en obligadas o facultativas, de acuerdo con su estrategia de vida. Las bacterias endófitas obligadas son estrictamente dependientes de la planta para su crecimiento, mientras que las endófitas facultativas, tienen al menos una etapa de vida en la cual pueden existir fuera de la planta (Rajkumar *et al.* 2009). Esto implica que muchos tipos de bacterias endófitas también son capaces de vivir fuera de los

tejidos vegetales y tener características similares a las bacterias rizosféricas. Por ejemplo, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV) pueden ser de crecimiento libre o vivir en asociaciones simbióticas o endosimbióticas (Glick, 2012). En general los MOs endófitos entran a los tejidos de las plantas a través de la zona de la raíz, pero también pueden entrar a través de las flores, los tallos y los cotiledones. Particularmente, las bacterias entran por los tejidos de las radículas en germinación, por las raíces laterales, a través de estomas o por heridas en el tejido; una vez dentro de la planta, los MOs pueden localizarse dentro de las células, en los espacios intercelulares o en el sistema vascular (Rajkumar *et al.* 2009).

Se han aislado bacterias endófitas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y se conocen muchas bacterias que pueden establecer endosimbiosis con plantas. Algunos géneros reportados como endófitas, incluyen: *Pseudomonas* (Chen *et al.* 2014), *Methylobacterium* (Nobrega *et al.* 2011), *Serratia* (Wan *et al.* 2012), *Rhizobium* (Wani *et al.* 2007), *Photobacterium*, *Micrococcus*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Aurantimonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia* (Mano y Morisaki, 2008) y *Bacillus* (Tiwari *et al.* 2012).

Quizá el beneficio más sobresaliente de un endófito sobre las plantas, es su capacidad de mejorar el crecimiento bajo condiciones como sequía, salinidad, ataque de patógenos o herbívoros, contaminación por EPT y cambios ambientales. Los endófitos pueden mejorar el crecimiento vegetal a través del aumento en la disponibilidad de fosfatos solubles y nitrógeno asimilable, producción de sideróforos, incremento de actividades enzimáticas, protección contra patógenos mediante producción de antibióticos y mediante la producción de fitohormonas o de enzimas que reducen los niveles de etileno. Otros beneficios para la planta incluyen la producción de metabolitos secundarios que estimulan la activación de mecanismos de defensa e incrementan la resistencia vegetal contra patógenos. En la relación simbiótica, el MO endófito recibe a cambio carbohidratos de la planta (Ullah *et al.* 2015; Li *et al.* 2012). Actualmente se sabe que los MOs endófitos poseen un gran potencial económico para su aplicación en diferentes campos, ya que confieren ventajas adaptativas a las plantas hospederas frente a condiciones abióticas adversas (Doty, 2008).

1.3.2 Cambios en la actividad de enzimas antioxidantes mediados por endosimbiosis

La tolerancia al estrés atribuida a la relación simbiótica, involucra al menos dos mecanismos: La rápida activación del sistema de respuesta del hospedero, y la biosíntesis de moléculas y enzimas antioxidantes por los MOs endófitos (Sing *et al.* 2011). La presencia de los MOs puede estimular la actividad de enzimas antioxidantes en una planta creciendo bajo condiciones de estrés, por ejemplo, en presencia de patógenos, salinidad o estrés por EPT (Hamilton *et al.* 2012). Dado que la interacción entre planta-MO puede disminuir o incrementar la absorción de As en las plantas, la respuesta en la expresión o actividad de enzimas antioxidantes, así como la

concentración de moléculas antioxidantes, es variable y específica para cada simbiosis. Por ejemplo, se sabe que diversos hongos pueden estimular la actividad de diferentes enzimas involucradas en el ciclo ASC-GSH, y enzimas antioxidantes como POX, SOD y CAT en plantas bajo estrés por salinidad o exposición a Fe, Al, Zn, As, Cd y Pb (Waller *et al.* 2005; Baltruschat *et al.* 2008; Azcón *et al.* 2009; Boonet *et al.* 2000).

Diversos estudios han demostrado que las bacterias rizosféricas y endófitas también son capaces de modular la actividad de enzimas antioxidantes, como POX, SOD, CAT, APX, GPX, de plantas bajo estrés por EPT (Zhang *et al.* 2010; Ma *et al.* 2010; Wan *et al.* 2012; Yu *et al.* 2017; Chiboub *et al.* 2018). Al respecto, una bacteria PCV (*Psychrobacter sp.*) estimuló la actividad de POX, CAT en *Ricinus communis* y *Helianthus annuus* inoculadas en respuesta al estrés por Ni (Ma *et al.* 2011), mientras que la inoculación de *Populus deltoides* con *Agrobacterium radiobacter*, resistente a As, incrementó la actividad SOD y CAT, cuando la planta creció en un medio contaminado con 300 mg kg⁻¹ As, lo cual se le relaciona al incremento de bioacumulación de As registrado en plantas inoculadas (Wang *et al.* 2011). El incremento de la actividad de enzimas antioxidantes de plantas bajo estrés por EPT, mediado por la simbiosis con bacterias, se ha relacionado en diversos estudios a un incremento en la bioacumulación de los elementos tóxicos en los tejidos vegetales. En la leguminosa *Pongamia pinnata* que creció en un suelo contaminado con residuos mineros, se observó mayor actividad de SOD en tallos, cuando la planta creció en simbiosis con *Bradyrhizobium liaoningense* y bioacumuló mayor cantidad de metales, con respecto a las plantas no inoculadas (Yu, et al, 2017), mientras que en la fabaceae *Sulla coronaria*, la asociación con cuatro bacterias resistentes a Cd (dos *Pseudomonas spp.* y dos *Rhizobium sullae*), estimuló la actividad de enzimas APX, SOD, CAT y POX en tallos y raíces, en respuesta al incremento (20%) de la bioacumulación de Cd en raíces, en comparación a las plantas no asociadas (Chiboub *et al.* 2018). La inducción de actividad de enzimas antioxidantes, debido al efecto de la simbiosis, es diferente dependiendo de varios factores, tales como tejido vegetal, (tallo o raíz), concentración de EPT, y tiempo de exposición al elemento. Por ejemplo, en el estudio que realiza Chiboub *et al.* (2018), los autores encuentran diferencias en las enzimas estimuladas, registrando un incremento de mayor número de enzimas en el tallo, en comparación a la raíz, cuando la simbiosis se expuso a 50 y 100 µM CdCl₂ durante 30 días, en cambio en raíz se registró solo el incremento de CAT en la dosis mayor.

1.3.3 Cambios en el proteoma vegetal mediados por relaciones endosimbióticas

La modulación de actividad enzimática puede deberse al cambio en la abundancia de las enzimas, regulado por la expresión de genes, en respuesta al estrés y a la presencia de los MOs.

Los MOs endófitos, pueden cambiar el perfil proteómico de una planta, ya que la interacción simbiótica involucra una señalización compleja entre ambos organismos para el establecimiento del MO dentro de las células vegetales (Larrainzar y Wienkoop, 2017). Actualmente, se han estudiado los cambios en el proteoma de plantas inoculadas con MOs, ya sea por hongos micorrízicos (HM) o bacterias PCV (Bona *et al.* 2010; Chi *et al.* 2010; Larrainzar y Wienkoop, 2017). En el caso de las simbiosis con bacterias, uno de los géneros más estudiados es *Rhizobium* (Farinati *et al.* 2009; Lim *et al.* 2010; Molesini *et al.* 2014). En plantas que crecen bajo estrés por EPT, los MOs asociados alteran el perfil proteómico de tallos y raíces, cambiando la respuesta vegetal al estrés. Este cambio implica diferencias en la abundancia de proteínas, dependiendo del tejido y del As bioacumulado en el mismo (Ahsan *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2014). En tallos, los resultados encontrados en los análisis proteómicos de plantas creciendo en presencia del MOs demuestran: (i) bajo-regulación de proteínas involucradas en la defensa vegetal contra el estrés abiótico; (ii) sobre-regulación de proteínas relacionadas a la fotosíntesis y al metabolismo de carbohidratos (Farinati *et al.* 2009). Por ejemplo, en la simbiosis entre *P. vittata*-HM bajo estrés por As^V, se demostró la sobre-regulación de enolasa y fosfoglicerato kinasa (Bona *et al.* 2010). Mientras que en raíces la respuesta es variable, sin embargo, algunas proteínas frecuentemente reportadas son aquellas involucradas con el metabolismo de carbohidratos, de aminoácidos y de defensa antioxidante (Bona *et al.* 2011; Aloui *et al.* 2009). No obstante, los estudios acerca de la influencia de una bacteria endófito en el proteoma de plantas tolerantes al As son aún escasos.

1.4 *Acacia farnesiana*: una planta tolerante y potencialmente fitorremediadora

Acacia farnesiana (L.) Willd, comúnmente llamada huizache, es un arbusto o árbol pequeño perenne que pertenece a la familia Fabaceae. Se caracteriza por tener una copa esparcida y densa, ramas espinosas y flores fragantes (Parrotta, 1992). Esta especie crece en climas cálidos y semi-cálidos, donde las temperaturas anuales promedio varían entre 15 y 28°C, en una gran variedad de suelos, desde arcillas pesadas hasta arenas y en un amplio rango de pH. Sus semillas son reniformes, de 6 a 8 mm de largo, de color pardo-amarillentas y pueden conservar su viabilidad durante 30 o más años bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y en recipientes cerrados y secos, ya que presentan una latencia física debido a una testa impermeable al agua (Parrotta, 1992). Por sus características de crecimiento, *A. farnesiana* se considera una planta útil para la reforestación de tierras secas degradadas, para evitar la erosión de suelos y ayudar a la estabilización de dunas arenosas (Vengadesan *et al.*, 2002). En México, *A. farnesiana* también tiene usos en la medicina tradicional; los extractos de las flores se utilizan en remedios para los dolores de cabeza y en el tratamiento de la indigestión, su fruto se usa para tratar la disentería e inflamaciones en la piel (Parrotta, 1992). Cabe mencionar, que extractos obtenidos de esta especie han demostrado

diversas propiedades, Lin *et al.* (2009) encontraron actividad citotóxica de terpenos y flavonoides extraídos de raíces de *A. farnesiana* contra cuatro líneas celulares de cáncer, además, extractos de esta especie han demostrado tener propiedades antimicrobianas, y antioxidantes (Sánchez *et al.* 2013; Puga *et al.* 2015).

Otro aspecto muy importante de *A. farnesiana* es que crece y cumple con su ciclo de vida en lugares contaminados con EPT, es resistente a la sequía y tolerante a Pb y As (Armienta *et al.* 2008; Maldonado-Magaña *et al.* 2011; Alcántara-Martínez *et al.* 2016). En Zimapán (Hidalgo) y Chihuahua (Chihuahua), se ha reportado la presencia frecuente de este arbusto creciendo en sitios contaminados con residuos mineros (Armienta *et al.* 2008; Maldonado-Magaña *et al.* 2011). Particularmente en Zimapán, se le ha encontrado en suelos con concentraciones de As de hasta 32000 mg-Kg⁻¹ (Armienta *et al.* 2008; Puga *et al.* 2006). Las plántulas de esta especie muestran una alta tolerancia a concentraciones de As de hasta 400 mg AsO₄³⁻L⁻¹ durante 45 días de exposición y una notable capacidad de bioacumulación, de hasta 80.5 ± 7.2 µg por planta, en plántulas expuestas a 80 mg AsO₄³⁻L⁻¹ durante 60 días, en condiciones *in vitro* (Alcántara-Martínez *et al.* 2016).

1.5 *Methylobacterium*: una bacteria simbiote y resistente al estrés

Methylobacterium es un género de bacterias metilótrofas, aeróbicas, Gram-negativas y capaces de crecer en un amplio rango de sustratos, sin embargo se caracterizan por su capacidad de crecer en compuestos de un solo carbono (C₁) como única fuente de este elemento, tales como formato, formaldehído y metanol (Madhaiyan *et al.* 2007).

Este género de bacterias puede colonizar la rizósfera y en las plantas, la filósfera, alrededor de los estomas y en los tricomas, además el interior de los tejidos vegetales, en los espacios intercelulares, estableciendo diferentes grados de asociación simbiótica (Sy *et al.* 2005; Kwak *et al.* 2014). Como simbiote, diversas cepas de *Methylobacterium* han demostrado incrementar el crecimiento de diferentes plantas, tales como *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinapis alba*, *Fragaria vesca* (Abanda-Nkpawatt *et al.* 2006), *Jatropha curcas* (Madhaiyan *et al.* 2015), y *Brassica campestris* (Madhaiyan *et al.* 2006); el crecimiento de *Burkholderia* sp. bajo estrés por metales (Madhaiyan *et al.* 2007); y en co-simbiosis con un hongo ectomicorrízico incrementó el crecimiento de *Pinus sylvestris* (Pohjanen *et al.* 2013). Los beneficios de *Methylobacterium* en el crecimiento vegetal, pueden deberse a diversos mecanismos, que pueden variar de acuerdo a la cepa, tales como: disminución de nivel de etileno inhibiendo la actividad de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato-(ACC) sintasa (Madhaiyan *et al.* 2006); producción de hormonas vegetales tales como citoquininas y auxinas por la bacteria; fijación de nitrógeno; producción de sideróforos, mejorando la absorción de nutrientes; producción de vitamina B12 (Abanda-Nkpawatt *et al.* 2006); e inducción de actividad fotosintética (Dourado *et al.* 2015). Además de incrementar el crecimiento vegetal, algunas cepas del género

Methylobacterium han mostrado resistencia contra concentraciones altas de diversos metales y metaloides, por ejemplo, Ni, Cd, Cr, Hg, Zn, Co, Pb y As (De Marco *et al.* 2004; Dourado *et al.* 2015); de hecho, se han reportado genes relacionados a la tolerancia a Co-Zn-Ni y relacionados a la resistencia a As^V (mecanismos de exclusión) en *M. oryzae* (Kwak *et al.* 2014). La asociación de especies de *Methylobacterium* con plantas podría basarse en que la bacteria utiliza el metanol (metabolito de desecho en las plantas) como fuente de energía y a cambio, la planta recibe compuestos (como los mencionados anteriormente) que promueven el crecimiento vegetal (Madhaiyan *et al.* 2007). Hasta ahora, la naturaleza de la simbiosis entre *Methylobacterium* y las plantas aún es poco comprendida y en comparación a otras asociaciones especializadas, como el caso de *Rhizobium*, el significado evolutivo y biológico de dicha asociación es aún poco conocido; igualmente el género *Methylobacterium* no ha sido explorado como simbionte de una planta tolerante al As.

2. JUSTIFICACIÓN

La exposición crónica al As puede causar diversas alteraciones de la salud, tales como afecciones de la piel, cáncer, enfermedades cardio-vasculares y trastornos neurológicos. Por ello, es importante el desarrollo y/o mejoramiento de tecnologías para su remoción y/o estabilización en suelos contaminados con este metaloide. Una alternativa para ello es la fitorremediación, que utiliza la capacidad de plantas tolerantes y de los MOs asociados para remover y/o estabilizar el arsénico y otros EPT (Meagher, 2000; Mench *et al.* 2009). En este sentido, la tolerancia de *A. farnesiana* a As^V , permite considerarla una especie potencialmente fitorremediadora para suelos contaminados con As; además *A. farnesiana* es una planta que puede formar asociaciones con MOs, tiene alta producción de biomasa y un ciclo de vida favorable para dicho propósito. En los últimos años, diversos estudios sustentan un efecto benéfico de MOs endófitos en diversas especies vegetales con potencial para la fitorremediación (Lebeau *et al.* 2008), particularmente los HM y bacterias PCV han sido exploradas en este contexto. Aunque algunas cepas del género *Methylobacterium* han mostrado resistencia a diversos metales y metaloides, hasta la fecha no hay reportes de su efecto como simbionte de plantas tolerantes al As.

Para incrementar la efectividad de la fitorremediación es importante conocer los diversos mecanismos involucrados en la tolerancia a EPT, así como los involucrados en las simbiosis entre plantas y MOs. Entre los mecanismos clave implicados en la detoxificación de As, tanto en plantas como bacterias, se encuentra una red de moléculas y enzimas antioxidantes, así como enzimas que reducen el As para estabilizarlo en la vacuola. La activación de estos mecanismos se relaciona con una regulación diferenciada de dichas enzimas (Ahsan *et al.* 2009; Requejo y Tena, 2005). Aunque se ha demostrado una serie de respuestas al estrés por As en plantas y en bacterias, los estudios proteómicos de asociaciones planta-bacterias endófitas son escasos.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de *Methylobacterium oryzae* en la tolerancia de *A. farnesiana* al As^V , a través del análisis de la actividad de enzimas antioxidantes, la concentración de moléculas antioxidantes y el análisis del perfil proteómico intracelular, relacionado a la bioacumulación de As en los tejidos así como al crecimiento de la planta.

3. HIPÓTESIS

La asociación endófitra entre *Acacia farnesiana* y *Methylobacterium oryzae* favorecerá la tolerancia vegetal al As^V, a través de la regulación del proteoma que modifique la acumulación de arsénico e incremente la defensa antioxidante.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la influencia de la asociación endófito entre *A. farnesiana* y *Methylobacterium* sp., sobre la tolerancia, la capacidad de bioacumulación de As y la modificación en el proteoma de la planta, durante su exposición a As^V.

4.2 Particulares

1. Seleccionar un microorganismo que forme una simbiosis positiva de carácter endófito con *A. farnesiana*.
2. Cuantificar el crecimiento, la concentración de pigmentos fotosintéticos y bioacumulación de As por *A. farnesiana* y la asociación *A. farnesiana*- *M. oryzae*.
3. Evaluar el efecto del As^V sobre la actividad de GST y la actividad POX en *A. farnesiana* y la asociación *A. farnesiana*- *M. oryzae*.
4. Evaluar el efecto del As^V sobre la concentración de GSH y la concentración de H₂O₂ en *A. farnesiana* y la asociación *A. farnesiana*- *M. oryzae*.
5. Analizar el perfil de proteínas intracelulares totales de *A. farnesiana* y de la asociación *A. farnesiana*- *M. oryzae* bajo estrés por As^V.
6. Correlacionar la bioacumulación de As con el perfil de proteínas expresadas diferencialmente, y con las enzimas y moléculas de respuesta antioxidante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental general

Para cumplir los objetivos de este trabajo se llevó a cabo un diseño experimental dividido en tres etapas (Figura 2). Durante la primera etapa, se seleccionó un MO endófito de *A. farnesiana*, se obtuvo el inóculo del MO endófito seleccionado y se verificó el tipo de simbiosis que forma con *A. farnesiana*. Para ello, se produjeron plántulas en condiciones *in vitro* y se obtuvieron diferentes MOs aislados de plantas tolerantes a EPT. Las plantas producidas también se utilizaron para la segunda y tercera etapa. Posteriormente, se establecieron cultivos *in vitro* de plantas asociadas y no asociadas con el MO seleccionado, en un medio contaminado con As^V , para evaluar el efecto de la simbiosis en la tolerancia vegetal al As^V . Para ello, plántulas de ~25 días fueron trasplantadas a medio contaminado con As^V donde se inocularon con *M. oryzae* (MO endófito seleccionado) y fueron expuestas durante 15 días a 580 μM As . Al cabo de dicho tiempo, en la segunda etapa, se cuantificó la biomasa seca (n=9), la concentración de pigmentos fotosintéticos (n=3), la concentración de As (n=3), la concentración de H_2O_2 (n=3), la concentración de GSH y GSSG (n=3) y la actividad de enzimas antioxidantes (n=3); en la tercera etapa se analizó el perfil proteómico intracelular de la planta (n=2). Cada variable se cuantificó en tejido de tallo y raíz por separado.

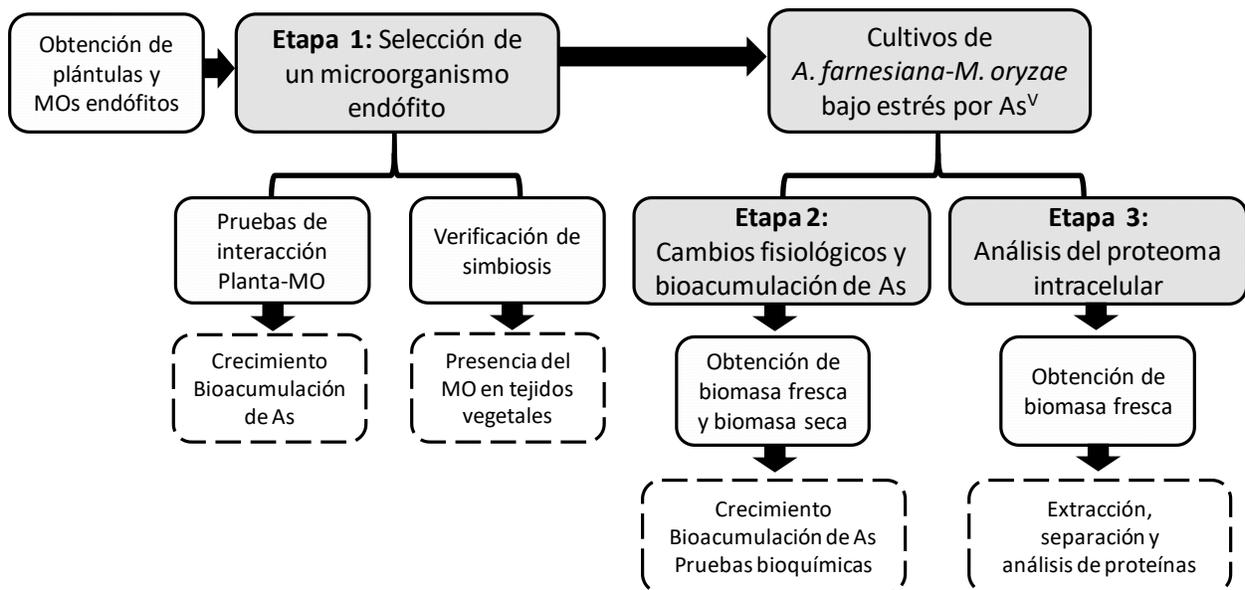


Figura 2. Estrategia experimental general. En los cuadros grises se muestra la actividad general realizada en cada etapa del estudio, los cuadros blancos de línea continua indican las actividades particulares y, en los cuadros con línea punteada, se muestran las variables de respuesta determinadas en cada caso. El crecimiento se determinó mediante la biomasa vegetal seca y la concentración de pigmentos fotosintéticos; las pruebas bioquímicas incluyen la cuantificación de la concentración de H_2O_2 , GSH y GSSG, y la actividad de las enzimas GST y POX.

5.2 Material biológico

Para realizar el presente trabajo se seleccionó *A. farnesiana* por ser una especie que crece en climas áridos y en sitios contaminados con metales y metaloides, además de que estudios previos, demostraron su tolerancia al As^V en condiciones *in vitro* (Alcántara-Martínez *et al.* 2016).

Todos los ensayos se realizaron con semillas colectadas de árboles maduros de *Acacia farnesiana* (L.) Willd., que crecen en un sitio contaminado con residuos mineros en Guanajuato. Las semillas para los estudios, se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel en un lugar seco y oscuro hasta el momento de su uso.

Los MOs que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de diversas fuentes, algunos se aislaron de raíces de una planta adulta de *A. farnesiana* que crece en suelo contaminado con Pb y As, otros pertenecen a la colección de MOs endófitos del laboratorio de Residuos Sólidos del departamento de Biotecnología UAM-I, y también se aislaron algunos MOs de plántulas de *A. farnesiana* creciendo bajo condiciones *in vitro*. De acuerdo con los resultados de la primera etapa, se seleccionó una cepa bacteriana (*Methylobacterium oryzae* AFM14) para establecer una simbiosis *A.farnesiana-M.oryzae*, y evaluar su efecto en la tolerancia vegetal al As^V, durante las etapas 2 y 3. La cepa bacteriana se identificó en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV) a través de pruebas bioquímicas (API20 NE *bioMérieux*, Lyon, Francia) y del análisis de la secuencia genética 16S rRNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) como *Methylobacterium oryzae* (99% de similitud, valor de e: 0.0). La secuencia 16S se depositó en el Gen Bank con el número de acceso KY229233.

5.2.1 Obtención *in vitro* de plántulas de *A. farnesiana*

Para la obtención de plántulas de *A. farnesiana* en condiciones *in vitro*, se seleccionaron semillas viables mediante el método de flotación en agua (Camacho *et al.* 1992). Una vez seleccionadas, las semillas se escarificaron mecánicamente, lijando un costado sin lacerar el embrión. Posteriormente se desinfectaron con el siguiente método: lavado en detergente (1%, 30 min), 5 lavados con agua destilada, inmersión en etanol (70%, 30 s), inmersión en hipoclorito de sodio (1.8%, 30 min), 6 lavados con agua destilada estéril. Enseguida de la desinfección, se sembraron asépticamente 4 semillas por caja Magenta (*Sigma-Aldrich*), conteniendo medio Murashige y Skoog (MS, *Sigma-Aldrich*), adicionado con sacarosa (30 g·L⁻¹, *Sigma-Aldrich*) y Phytigel (1.8 g·L⁻¹, *Sigma-Aldrich*) como agente gelificante. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH (1N) y las cajas con medio se esterilizaron (15 lb·in⁻², 20 min) antes de la siembra. Las semillas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente hasta la germinación, considerada como la emergencia de los puntos de crecimiento radicular y plúmula después de la imbibición de agua (Flores, 2004). Las plántulas obtenidas se incubaron a 25 ± 1°C bajo una intensidad lumínica de 50 mmol·m⁻²·s⁻¹ con un fotoperiodo de 16 h, hasta alcanzar

una longitud de raíz de ~3 cm y el desarrollo de al menos 3 hojas verdaderas (~25 días). Las plántulas que cumplieron estas condiciones se trasplantaron al medio utilizado para todas las etapas, indicado en las siguientes secciones.

5.2.2 Obtención de microorganismos endófitos

Parte de los MOs endófitos utilizados en esta etapa se obtuvieron de raíces de una planta adulta de *A. farnesiana*. Las raíces se trataron con el siguiente método de desinfestación: lavado con detergente (2%, 30 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), inmersión en hipoclorito de sodio (2%, 20 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), enjuagues con agua destilada estéril. Segmentos de ~1 cm de longitud de raíz se sembraron asépticamente en medio agar papa dextrosa (PDA) adicionado con estreptomycin (50 mg·L⁻¹) y ampicilina (100 mg·L⁻¹) para obtener hongos endófitos y en medio agar nutritivo (AN) sin antibióticos para obtener bacterias. Para confirmar que las hifas o el crecimiento bacteriano que emerge del interior de los cortes son de MOs endófitos cultivables, el control consistió en la huella de cada uno de los segmentos de raíz en una placa con medio. Los MOs que crecieron a partir del tejido de la raíz, se resembraron en medio PDA o AN hasta obtener cepas puras. Para este trabajo también se utilizó una microalga cultivable en laboratorio, la cual se aisló de un cultivo *in vitro* de *A. farnesiana* (60 días de cultivo). La microalga se creció en medio MS semisólido o líquido, adicionado con 10 gL⁻¹ de sacarosa, pH 7.

5.3 Etapa 1. Selección de un microorganismo endófito

5.3.1 Pruebas de interacción planta-microorganismo

Con el fin de seleccionar un MO que forme una simbiosis endófito con *A. farnesiana*, se realizaron pruebas de asociación entre los MOs obtenidos y plántulas de *A. farnesiana* de ~25 días de edad. La raíz de cada plántula creciendo en medio MS (100%, 10 g L⁻¹ de sacarosa, pH 5.7), se inoculó por picadura en el medio con cada cepa; las plántulas inoculadas se incubaron a 25 ± 1°C, con un fotoperíodo de 16 h, durante 50 días más.

Los MOs utilizados en las pruebas fueron 9 cepas de hongos filamentosos, 1 cepa de microalga (*Coccomyxa* sp.) y 1 cepa de bacteria (*Methylobacterium oryzae* AFM14) (Tabla 1). Después del tiempo de cultivo se cuantificó el crecimiento de la planta a través de la biomasa seca total (tallos más raíces, n=9). Posteriormente, con base en los resultados de crecimiento, se seleccionaron 3 MOs para formar una simbiosis con *A. farnesiana* en condiciones de estrés por As^V (80 mg L⁻¹) durante 50 días. El control consistió en las plántulas que crecieron en presencia del MO, sin As^V. Al cabo de dicho tiempo se determinó la concentración de As en los tejidos de tallo y raíz (n=3). De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la bacteria *M. oryzae* como MO endófito que favorece el crecimiento vegetal, para establecer la simbiosis con

A. farnesiana y evaluar su efecto en la tolerancia de la planta en los cultivos de la etapa 2 y 3. Para obtener el inóculo, la bacteria se creció durante 10 días en AN ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Tabla 1. Microorganismos utilizados para las pruebas de asociación con plántulas de *A. farnesiana*.

MOs aislados de raíz	MOs de la colección	MOs aislados a partir de cultivos <i>in vitro</i>
<i>Fusarium sp.</i> (2-1 A)	<i>Penicillium sp.</i> AA1	<i>Coccomyxa sp.</i>
<i>Fusarium sp.</i> (2-1 E)	<i>Emericella sp.</i> CE1	<i>Methylobacterium oryzae</i>
<i>Fusarium sp.</i> (2-L)	<i>Fusarium sp.</i>	
	<i>Lewia sp.</i>	
	<i>Cladosporium sp.</i> DO-PC	
	<i>Trichoderma sp.</i>	

5.3.2 Verificación del tipo de simbiosis

Para verificar el tipo de simbiosis que forman *A. farnesiana* y *M. oryzae* durante 15 días de crecimiento en medio MS semisólido, se utilizaron dos técnicas:

- 1) Método en placa. Tallos y raíces completos de la planta inoculada, se desinfectaron con detergente (2%, 30 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), inmersión en hipoclorito de sodio (1.8%, 25 min), inmersión en etanol (70%, 1 min), 5 enjuagues con agua destilada estéril (20 s cada uno). Después del tratamiento anterior, los tallos o raíces, se cortaron en segmentos de ~1 cm de longitud para su siembra en cajas Petri con AN. Con el fin de descartar la presencia extracelular de la bacteria, cada segmento se presionó sobre una placa con AN antes de su siembra (Lucero *et al.* 2006). Los cultivos se incubaron a 25°C hasta la observación de crecimiento bacteriano a partir de los extremos de cada corte.
- 2) Microscopía confocal. Segmentos de tallo o raíz tratados con el método de desinfección y siembra anterior fueron inmersos en cubos preparados con agar bacteriológico (3%) y se realizaron cortes de 50 μm en un vibratomo (*Series 1000, Pelco 101*). Los cortes se fijaron con metanol (96%, 2 min) y se tiñeron con naranja de acridina (0.01%, 2 min) en buffer de acetato (0.5 M), se enjuagaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente (Kasten, 1967). Las muestras fijadas y teñidas se montaron con medio de montaje Vectashield (H-1000, *Vector*). Las observaciones de los cortes, se realizaron en un microscopio confocal (LSM700, *Zeiss*), con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 500-515 nm. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 60x y se procesaron con el programa ZEN 2012.

5.4 Etapa 2. Cultivos de *A. farnesiana*-*M. oryzae* bajo estrés por arsenato

Plántulas de aproximadamente 25 días, germinadas *in vitro* (sección 5.2.1), se transfirieron a cajas Magenta con medio MS, con la misma composición mencionada en la sección 5.3.1 y más 580 μM arsénico (As^{V}) adicionado como arsenato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Meyer). Otro grupo de plantas, usadas como controles, se transfirieron a medio sin As^{V} . Los cultivos de *A. farnesiana* creciendo con o sin As^{V} , se separaron a su vez en dos grupos (Figura 3), uno se cultivó en presencia de la bacteria endófito, inoculando cada planta por piqueta con $1.4 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ UFC alrededor de la raíz (tratamientos AF+ y AF+/As). El grupo control, se cultivó en ausencia de la bacteria (AF y AF/As). Los cultivos crecieron bajo las mismas condiciones descritas (5.3.1) durante 15 días.

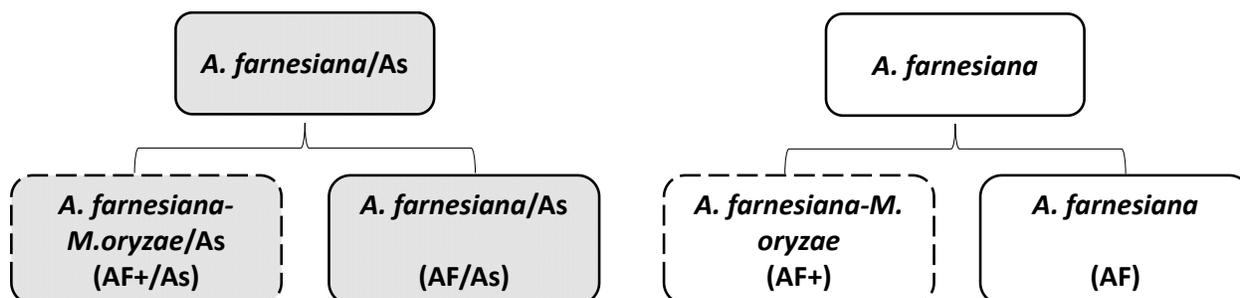


Figura 3. Esquema de los tratamientos establecidos durante la etapa 2 y 3. Los recuadros grises representan los cultivos bajo estrés por As^{V} , los cuadros blancos representan los cultivos que crecen sin As^{V} . En cada condición, se evaluó la influencia del *M. oryzae* en las variables cuantificadas, la presencia de la bacteria se representa con línea punteada.

Cada tratamiento consistió de 16 réplicas, con tres plantas cada una, en un diseño de bloques aleatorio. Al cabo de 15 días de cultivo, se cosecharon 42 plantas por tratamiento, los tallos (más hojas) se separaron de las raíces y ambos tejidos se analizaron como sigue. Nueve plantas se secaron (60°C , 48 h) para obtener la biomasa seca y cuantificar el crecimiento mediante el peso en base seca, estos tejidos se distribuyeron en tres vasos (3 réplicas) para su digestión ácida y cuantificación de As (3 tallos o raíces por vaso). Treinta y tres plantas (11 réplicas) se trataron en fresco como sigue: (i) nueve para obtener 3 muestras para la determinación de pigmentos (sólo en tallos); (ii) 12 para preparar extractos crudos (EC) para determinar la concentración de H_2O_2 , el contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), actividad glutatión S-transferasa (GST) y actividad peroxidasa total (POX); (iii) 12 para los análisis proteómicos.

5.4.1 Cambios fisiológicos y bioacumulación de As

5.4.1.1 Crecimiento

El crecimiento de *A. farnesiana* se cuantificó mediante la estimación de biomasa, en base seca, de raíces y tallos por separado. Las raíces se retiraron cuidadosamente del medio MS y se lavaron con agua destilada con el fin de eliminar el medio restante. Las raíces y los tallos se secaron con papel absorbente para eliminar el exceso de agua y se colocaron, por separado, en charolas de aluminio a peso constante. Las charolas con el tejido, se pesaron y enseguida se colocaron en una estufa (*Binder*) a 60°C durante 48 h. La biomasa se calculó a través de la diferencia entre el peso final menos el peso inicial. Las mediciones de biomasa se utilizaron para estimar el índice de tolerancia IT, de acuerdo a la Ec. 1 (Audet y Charest, 2007):

$$\text{Ec. 1} \quad IT = \frac{\text{Biomasa}_{\text{Planta+As}}}{\text{Biomasa}_{\text{Planta}}}$$

5.4.1.2 Pigmentos fotosintéticos

Se determinó el contenido de clorofila a (Cl *a*), clorofila b (Cl *b*) y carotenoides (Car) a través de un método espectrofotométrico (Lichtenthaler y Wellburn, 1983). Se realizó una extracción de los pigmentos a partir de ~50 mg de tejido fresco de hojas, homogenizado en 5 mL de acetona (100%) y el extracto se centrifugó a 3000xg (15 min). La concentración de Cl *a*, Cl *b* y Car se determinó leyendo el extracto a 662, 645 y 470 nm y se calculó de acuerdo a las fórmulas propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983) específicas para el método de extracción con acetona. La concentración de pigmentos se expresa en mg g⁻¹ de peso fresco (PF).

5.4.2 Cuantificación de arsénico total

Con el fin de determinar la influencia de la simbiosis en la bioacumulación de As por *A. farnesiana*, las plántulas se separaron en raíces y tallos. Las raíces se lavaron 5 min con una solución de EDTA (10 mM) para eliminar el As extracelular adsorbido (Maldonado-Magaña *et al.* 2011). Todas las muestras se secaron a 60°C por 48 h, para su digestión ácida y determinación de As por espectrometría de absorción atómica (EAA).

5.4.2.1 Digestión ácida asistida por microondas

Para la digestión ácida, se pesaron ~100 mg de tallos (peso seco, PS) o ~30 mg de raíces (PS) en un vaso de Teflón (*CEM, MARSXpress*). Cada vaso con la muestra se adicionó con 4 mL de agua desionizada (18 MΩ cm⁻¹, *PureLab-Q Elga*) y 5 mL de HNO₃ concentrado (69%) (*J.T. Baker, Instra-analyzed*) y fue completamente digerida a 200°C (1600 Watts) durante 15 min en un digestor de microondas (*CEM, MARSXpress*). Las muestras se dejaron enfriar, el volumen

de cada vaso se aforó a 10 mL con agua desionizada y se filtró con membranas de nitrato de celulosa (0.45 μm , *Whatman*). El As total en cada muestra se determinó por EAA.

5.4.2.2 Análisis de As por espectrometría de absorción atómica (EAA)

El contenido total de As en los extractos líquidos obtenidos de la digestión ácida se analizó por EAA. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro de absorción atómica (*Shimadzu*, AA-6300) mediante el método de flama (EAA-flama), utilizando una longitud de onda de 193.7 nm, con una mezcla de aire-acetileno (3.7 L·min⁻¹) y una abertura del quemador de 0.2 nm. Las curvas patrón para la cuantificación de As se prepararon con agua desionizada, en un rango de 0 a 60 mg·L⁻¹; las diluciones se realizaron a partir de una solución estándar de 1000 $\mu\text{g As}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*J.T. Baker, Instra-analyzed*).

5.4.2.3 Estimación de parámetros indicadores de fitorremediación

Para evaluar el potencial fitorremediador de As de *A. farnesiana* y de la simbiosis *A. farnesiana*-*M. oryzae* se estimó el factor de translocación (FT) y el factor de bioacumulación (FBA) en los cultivos que crecieron bajo estrés por As^V. Ambos índices se estimaron a partir de los datos de acumulación de As en tejidos vegetales. El FT indica la capacidad de la planta para translocar el As de las raíces a los tallos (*Vithanage et al.* 2011), y se calculó como la relación entre la concentración de As acumulado en la parte aérea ($[\text{As}]_{\text{tallo}}$) y la concentración en raíces ($[\text{As}]_{\text{raíz}}$) (Ec. 2):

$$FT = \frac{[\text{As}]_{\text{tallo}}}{[\text{As}]_{\text{raíz}}}$$

Para cuantificar la capacidad de bioacumulación de As por *A. farnesiana*, con relación a la concentración del metaloide en el medio, se estimó el FBA (Ec. 3), como la relación entre la concentración de As acumulado en la planta ($[\text{As}]_{\text{planta}}$) y la concentración total inicial en el medio ($[\text{As}]_{\text{medio}}$) (*Audet y Charest*, 2007):

$$FBA = \frac{[\text{As}]_{\text{planta}}}{[\text{As}]_{\text{medio}}}$$

Ec. 3

5.4.3 Pruebas bioquímicas

5.4.3.1 Obtención de extractos crudos

Para obtener los EC, los tejidos (tallos o raíces, por separado) se pulverizaron con N₂ líquido durante 5 minutos y el tejido pulverizado se homogeneizó con 1 mL de la solución adecuada para cada análisis por cada 100 mg de tejido (4°C): (i) buffer de fosfato de sodio (50 mM, pH 7) adicionado con cianuro de potasio (KCN) 5 mM para la determinación de H₂O₂; (ii) ácido

metafosfórico 5% (MPA) para glutatión total (GSH_T), MPA 5%, 1mM 2-vinylpyridine (2-VP) para GSSG (Griffith, 1980); (iii) buffer de fosfato de sodio (50 mM, pH 7) con inhibidor de proteasas (5 µL 100 mg⁻¹ TF, P2714, *Sigma*) para determinación de actividad GST y POX. Los homogenizados se centrifugaron (4°C, 15 min) a 10000xg para la determinación de H₂O₂, GSH_T y GSSG, o a 18000xg para los análisis enzimáticos. Los sobrenadantes resultantes se consideraron como los EC y la concentración de proteína se determinó en un lector de microplacas (ELX808, BIO-TEK Instruments) por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un kit comercial (500-0006, *Bio-Rad*) y la proteína albumina sérica bovina (BSA) (A7906, *Sigma*) como estándar.

5.4.3.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La concentración de H₂O₂ se determinó con base en el método reportado por Cheeseman (2006). El EC se adicionó con KCN 5 mM para inhibir la actividad CAT y POX y se mezcló con una solución (1 mL) que contiene sulfato ferroso de amonio 250 µM, sorbitol 100 µM y naranja de xilenol 100 µM disueltos en ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25 mM y etanol 1%. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, y el complejo formado entre Fe²⁺ y naranja de xilenol se midió espectrofotométricamente a 560 nm (50 Conc, *Varian*). La concentración de H₂O₂ se calculó a partir de una curva estándar de H₂O₂ preparada en agua destilada en una concentración de 0.3 a 20 µM.

5.4.3.3 Glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG)

La determinación de GSH_T y GSSG se realizó utilizando un kit comercial (CS0260, *Sigma*). Los EC se neutralizaron (pH ~7) con trietanolamina (~5 µl mL⁻¹; 0.45 M) para la precipitación de proteína. El contenido de GSH_T fue estimado como la tasa de producción de ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB), debido a la reducción del ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) por la oxidación del GSH, monitoreado a 412 nm (Griffith 1980) en un lector de microplacas. El contenido de GSSG se determinó en muestras con 2-VP (Griffith, 1980), en las cuales el GSSG es reducido por la enzima GR produciendo GSH. La mezcla de reacción contiene 150 µL de mezcla de trabajo (0.17 U mL⁻¹ GR y 43 µg mL⁻¹ DTNB, en buffer de fosfatos 100 mM con EDTA 1 mM y pH 7), 50 µL de NADPH (0.16 mg mL⁻¹) y 10 µL de EC con o sin 2-VP. La concentración de GSH_T y GSSG fue calculada a partir de una curva estándar de GSH en MPA 5% y se expresa en nmol g⁻¹ PF. Los datos de concentración de GSH y GSSG se utilizaron para estimar el potencial de reducción (E_{hc}) con la ecuación de Nernst (Schafer y Buettner, 2001) y obtener el grado de oxidación (GO) de acuerdo a la Ec. 4 (Meyer y Hell 2005):

$$\text{Ec. 4} \quad \text{GO(\%)} = \frac{2[\text{GSSG}]}{[\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]} \times 100$$

5.4.3.4 Actividad glutatión S-transferasa (GST, EC 2.5.1.1.8)

La actividad GST se determinó con un kit comercial (*Sigma-Aldrich*, CS0410). Este método se basa en la formación del conjugado GS-DNB, en una reacción catalizada por las GST que utilizan CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) y GSH como sustrato. La mezcla de reacción contiene 20 μL de EC y 180 μL de solución de reacción (buffer de fosfatos Dulbecco, GSH 200 mM y CDNB 100 mM). En el blanco, el volumen de la muestra se sustituyó por buffer (fosfatos de sodio 50 mM, pH 7) y al control de actividad se le adicionaron 2 μL de estándar de enzima GST. La actividad se leyó a través del aumento en la absorbancia a 340 nm, durante 4 min en un lector de microplacas y la actividad enzimática se calculó considerando un ϵ de $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Habig y Jakoby, 1981). Una unidad GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol del conjugado GS-DNB por minuto a 27°C y pH 7.

5.4.3.5 Actividad peroxidasa total (G-POX, EC 1.11.1.7)

La actividad peroxidasa total se determinó mediante el método descrito por Maehly (1954), usando guayacol como sustrato donador de H⁺. El método cuantifica la tasa de utilización de H₂O₂ para formar un cromóforo (tetra-guayacol) que absorbe a 415 nm (Chance y Maehly, 1955). La mezcla de reacción contiene 200 μL de buffer de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7), 10 μL de guayacol (1% preparado en buffer de fosfatos), 20 μL de H₂O₂ (10 mM preparado en buffer de fosfatos) y 10 μL de EC. La reacción se inició con la adición de H₂O₂ y, en el blanco, éste se sustituyó por buffer de fosfatos (50 mM, pH 7). La actividad G-POX se determinó en un lector de microplacas, a través del aumento en la absorbancia a 415 nm, considerando un ϵ de $16.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Maehly, 1954). Una unidad G-POX se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetra-guayacol por minuto a 26°C y pH 7.

5.4.3.6 Estimación de actividades enzimáticas relativas

Se estimó la actividad específica relativa de cada enzima, relacionando la actividad específica (U·mg proteína⁻¹) obtenida en los tratamientos AF+, AF/As y AF+/As con la obtenida en el tratamiento AF. La actividad relativa, indica la regulación de la actividad enzimática en cada tejido, por efecto de la bacteria, del As^V o el conjunto de ambos.

5.5 Etapa 3. Análisis del proteoma intracelular

El análisis de la expresión diferencial de proteínas de *A. farnesiana* crecida bajo condiciones de estrés por As, se realizó en tejidos frescos de raíces y de tallos de la planta sola y en asociación con la bacteria endófito. Debido a la diferencia en los tejidos, con respecto a la composición proteica, lipídica y glucosídica, los métodos de extracción de proteína intracelular, así como los métodos usados para su análisis, fueron diferentes para cada tejido. Las muestras de tallo se trataron con polietilenglicol (PEG) para remover la proteína ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa-

oxigenasa (RuBisCO), ya que ésta puede llegar a representar más del 50 % de proteína total en el tejido fotosintético (Xi *et al.* 2006). De esta manera se evitó enmascarar las proteínas menos abundantes durante el análisis de proteínas. Cada método se describe a continuación.

5.5.1 Análisis del proteoma intracelular de tallos

5.5.1.1 Extracción de proteína

Alrededor de 0.6 g de tejido fresco de tallo se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 6 mL de buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7) adicionado con polivinilpolipirrolidona (PVPP) (1%, p/v), MgCl₂ (20 mM) y un coctel de inhibidor de proteasas (5 µL 100⁻¹ PF). Los homogenizados se centrifugaron (18000xg, 4°C, 15 min) y el sobrenadante se consideró como el EC con las proteínas intracelulares. El EC se trató con PEG (16% concentración final) (3250, *Sigma*) durante 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugó 12000xg, 4°C, 15 min. Las proteínas del sobrenadante resultante se precipitaron con acetona fría (100% v/v) durante toda la noche antes de centrifugarse (18000xg, 4°C, 15 min). El precipitado resultante se resuspendió en 1 mL de buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7), se diafiltró con 6 mL del mismo buffer y se concentró por ultrafiltración (Ultra-4-10 kDa NMWL, *Amicon*). La concentración de proteínas se determinó utilizando un kit comercial kit (23228, *Thermo Scientific*) basado en el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.* 1985) y BSA como estándar. En tubos Eppendorf de 1 mL se colocaron alícuotas del EC con 100 µg de proteína cada uno, se liofilizaron y se utilizaron para la separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE.

5.5.1.2 Separación de proteína por electroforesis SDS-PAGE

Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 25 µL de buffer Laemmli (S3401, *Sigma*), se calentaron a 95°C durante 5 min y se centrifugaron (1 min) para eliminar pequeñas partículas. Las muestras se cargaron en un gel pre-hecho 12% SDS-PAGE (12% Bis-Tris, *Bolt-Novex*). La electroforesis desnaturizante se corrió con un voltaje constante de 200 V durante ~40 min (1000/500 *Power Supply*, *Bio-Rad*). Los geles se revelaron con azul de Coomassie G-250 (161-0406, *Bio-Rad*).

5.5.1.3 Digestión trípica en gel

Después de la separación de proteínas, cada carril del gel, se cortó manualmente en 3 secciones de igual tamaño; cada sección se cortó a su vez en piezas más pequeñas (~3 mm²). Los cortes de gel fueron desteñidos con una solución de metanol/ácido acético/agua destilada (10/1/9), deshidratados con acetonitrilo y secados en un centrifuga de vacío (CT110, *Hetto*). Las proteínas fueron reducidas con ~0.5 mL de ditiotreitól (DTT) 10 mM en una solución de bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) 100 mM por 1 h a 57°C. La solución de DTT fue sustituida por el mismo volumen de iodo-acetamida 55 mM en una solución de NH₄HCO₃ (100 mM) y se

incubó 45 min en la oscuridad para la alquilación de las proteínas. Después de la alquilación, las piezas de gel fueron tratadas secuencialmente con bicarbonato de sodio 100 mM y acetonitrilo, para finalmente secarlas en una centrífuga de vacío. Las piezas de gel secas se sumergieron en una solución con 2 mg/mL de tripsina (1 µg tripsina/ 50 µg proteína) (*Promega*) en NH_4HCO_3 50 mM. La digestión de las proteínas con tripsina se realizó a 37°C por 16 h. Los péptidos fueron eluidos de los fragmentos de gel con 5 lavados secuenciales de solución de 50 mM de NH_4HCO_3 . Los péptidos eluidos fueron filtrados (0.2 µm, Nanosep, *PALL*), secados y almacenados a -70°C.

5.5.1.4 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Los péptidos obtenidos fueron resuspendidos en 20 µL de buffer de formato de amonio (NH_4HCO_2) 10 mM con 2% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico. Las muestras se inyectaron por duplicado (8 µL) en un Sistema capilar LC (1100, *Agilent Technologies*), usando una columna capilar Halo Peptide ES-C18 0.2x50 mm (*Advanced Materials Technology*). El análisis por espectrometría de masas (MS) online se realizó en un espectrómetro de masas con trampa lineal de iones LTQ (*Thermo-Fisher*). La fase móvil A consistió en ácido fórmico 0.1% en NH_4HCO_2 ; la fase móvil B consistió en acetonitrilo 80%, y ácido fórmico 0.1% en NH_4HCO_2 . La concentración de la fase B se incrementó de 5 a 60% durante 12.5 min a una tasa de flujo de 9 µL min⁻¹. Las especificaciones de espectrómetro de masas incluyeron un escaneo de MS1 con un rango de m/z entre 300 a 2000, con la selección de los 5 iones precursores más intensos para la adquisición de MS2, con el recuento de repetición establecido en MS1, y la repetición de la duración de 10 seg con una exclusión dinámica de 30 seg.

5.5.1.5 Búsqueda e identificación de proteínas

Los espectros de los péptidos analizados fueron convertidos a archivos mzXML, luego en un archivo PKL a través de los programas contenidos en el "Trans-Proteomic Pipeline". Los archivos PKL se analizaron con el buscador Mascot (Matrix Scientific, Boston, MA) con una base de datos señuelo creada a partir de las proteínas de la familia Fabaceae contenidas en la base de datos del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). La base de datos señuelo fue creada mediante la inversión de todas las secuencias de proteínas de la base de datos objetivo, verificando que todas las secuencias reversas no se sobrelapan con las secuencias presentes en la base de datos objetivo. Las restricciones del análisis de Mascot fueron las siguientes: digestión trípica con dos posibles escisiones omitidas, tolerancia de péptidos de 800 ppm, tolerancia de fragmento de ion de 0.8 Da, modificación fija debido a carboxy-amidometilación de cisteína (+57 Da), modificaciones variables de oxidación de metionina (+16 Da) y deaminación de asparagina y glutamina (+0.98 Da). Las proteínas estadísticamente significativas son determinadas para todas las muestras a un "% protein false discovery rate"

(FDR) de 1 % de proteína a través de ProteoIQ (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA). Para proteínas desconocidas, la búsqueda de homología se realizó con el buscador BlastP, tomando como referencia las secuencias de todas proteínas no redundantes de la base de datos Fabaceae del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Las homologías de las proteínas fueron consideradas significativas si mostraron un valor menor a 10^{-80} . La función de las proteínas fue asignada utilizando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y la base de datos KEGG (www.genome.jp/kegg/). La localización subcelular fue estimada utilizando el programa WoLF-PSORT (<http://wolfpsort.org/>).

5.5.1.6 Análisis de la regulación de proteínas

Como medida de la abundancia relativa de cada proteína dentro del total de proteínas obtenidas de todos los tratamientos, se obtuvo un factor relativo de abundancia de espectros (RSAF) con la siguiente Ec. 5 (Volke-Sepúlveda *et al.* 2016):

$$\text{Ec. 5} \quad (\text{RSAF})_k = \frac{(S_p C/L)_k}{\sum (S_p C/L)_i}$$

Donde el $(\text{RSAF})_k$ es el RSAF para una proteína k , $S_p C$ es el número de conteo de espectros de MS, L es la longitud de la proteína, y $\sum (S_p C/L)_i$ es la suma de los espectros MS de todas las proteínas encontradas. Para cuantificar la regulación de las proteínas debido al efecto de As^V y/o a *M. oryzae*, se estimaron tres tasas $(\text{RSAF})_k$, relacionando el $(\text{RSAF})_k$ de los tratamientos AF/As, AF+ y AF+/As con el $(\text{RSAF})_k$ obtenido en las plántulas del tratamiento AF. Valores mayores a 1 (proteínas sobre-reguladas) se muestran como tal, mientras que valores debajo de 1 (bajo-reguladas) fueron tratados dividiendo -1 entre cada valor (Bona *et al.* 2010), valores que exceden ± 10 fueron considerados como proteínas fuertemente reguladas.

5.5.2 Análisis del proteoma intracelular de raíz

5.5.2.1 Extracción de proteína

Alrededor de 0.5 g de biomasa de raíz se trituraron con N_2 líquido para obtener las proteínas intracelulares solubles. El tejido pulverizado se homogeneizó con 5 mL de buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7) adicionado con inhibidor de proteasas ($5 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ PF) y PVPP (1%, w/v) en un molino (2000 rpm, 2 min) con perlas de vidrio (0.5 mm ; $0.5 \text{ mL} \cdot 200 \text{ mg}^{-1}$ PF). La suspensión se centrifugó a 18000 xg (15 min, 4°C) y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas intracelulares solubles se ultra filtraron en tubos Ultra Amicon (*Millipore*, 10 KDa) a 3200 xg durante 28 minutos, para eliminar moléculas no proteicas y concentrar la proteína en un volumen de ~ 0.1 mL. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinonínico, y se utilizó BSA como estándar. Muestras con $200 \mu\text{g}$ de proteína se liofilizaron para su separación por electroforesis 2-D.

5.5.2.2 Separación de proteínas por electroforesis 2-D

Para la separación de las proteínas por isoelectroenfoque (IEF), las muestras de raíz se rehidrataron en 125 μ L de buffer de rehidratación (urea 7 M, 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato 4%, DTT 100 mM y anfólitos 0.1%) y se cargan en tiras de 7 cm con gradiente de pH de 3-10 (BioRad). Se realizó una rehidratación activa de las tiras (16 h) y posteriormente las proteínas se separaron por IEF utilizando una celda IEF (BioRad) con el siguiente método: 1) fase lineal, 250 V, 0.3 h; 2) fase rápida, 500 V, 0.3 h; 3) fase lineal, 4000 V, 2 h; 4) fase rápida, 4000 V, hasta alcanzar 14,000 V/h. Para reducir las proteínas, las tiras se sumergieron por 15 min en un buffer que contiene urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, glicerol 20%, y DTT 2%. El buffer con DTT se retiró y las tiras se sumergieron durante 15 min en un buffer que contiene urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, glicerol 20% y iodoacetamida 2.5%, para alquilar las proteínas. La separación en segunda dimensión se realizó con una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12%, con un voltaje de 150 V y se utilizó un marcador molecular (Precision Plus Protein, BioRad). Los geles 2-D se tiñeron con azul de Coomassie G-250.

5.5.2.3 Análisis de geles

Los geles 2-D se digitalizaron con un fotodocumentador de alta resolución (BioRad) y las imágenes adquiridas se analizaron con el programa PDQuest (BioRad). A través de PDQuest, se detectaron los spots en cada gel, y posteriormente se obtuvo un gel maestro por tratamiento (Figura 4), considerando 3 réplicas por tratamiento.

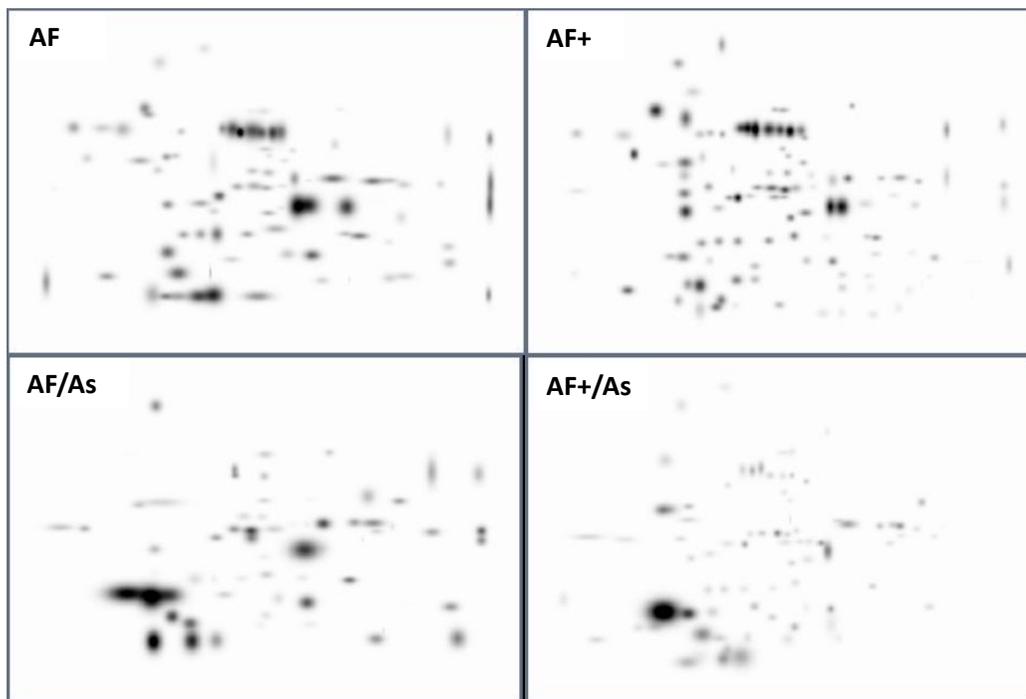


Figura 4. Geles maestros por cada tratamiento, obtenidos con el programa PDQuest.

Una vez generados los geles maestros, éstos se compararon entre tratamientos, para encontrar los spots compartidos y únicos. A partir de este análisis, se estimó la intensidad total de un spot que corresponde a la cantidad de la proteína. De cada spot, se obtuvo el promedio (m) y la desviación estándar (DE) de la cantidad de proteína y se estimó el coeficiente de variación (CV). Los spots con un CV menor a 30% (al menos en dos tratamientos), fueron seleccionados para un análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA). Estos mismos spots también se seleccionaron para estimar indirectamente su regulación, debido al estrés por As^V o a la presencia de la bacteria. Para ello, por spot, se estimó la relación entre el promedio de la cantidad de proteína del tratamiento AF/As, AF+/As ó AF+ y el promedio de la cantidad de proteína de AF. Valores mayores que 1 (spots con al menos una proteína sobre-regulada) se muestran como tal, mientras que valores debajo de 1 (spots con al menos una proteína bajo-regulada) fueron tratados dividiendo -1 entre cada valor (Bona *et al.* 2010), valores que exceden ±10 fueron consideradas como spots fuertemente reguladas. Los spots que mostraron diferencias significativas y regulación diferencial, al menos en un tratamiento (con respecto a AF) se cortaron para la identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Con el fin de caracterizar los spots reproducibles, se estimó el peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (PI) de las proteínas presentes en los spots con un CV menor a 30%, al menos en dos tratamientos (Anexo 3).

Estimación del peso molecular. Para obtener el PM, se construyó una gráfica con los logaritmos de los pesos moleculares y la distancia relativa de migración de las proteínas del marcador molecular (Figura 5), ya que en una electroforesis SDS-PAGE la movilidad relativa de las proteínas varía aproximadamente en forma lineal respecto al logaritmo de sus masas moleculares. La distancia relativa de migración (Rf) de las proteínas del marcador molecular se determinó a través de la Ec. 6 (Voet *et al.* 2009):

$$\text{Ec. 6} \quad Rf = \frac{\text{distancia de migración de proteína (cm)}}{\text{distancia de migración del frente de corrida (cm)}}$$

A partir de la gráfica construida, se interpoló el valor de PM de los spots, considerando el valor de Rf calculado para cada uno.

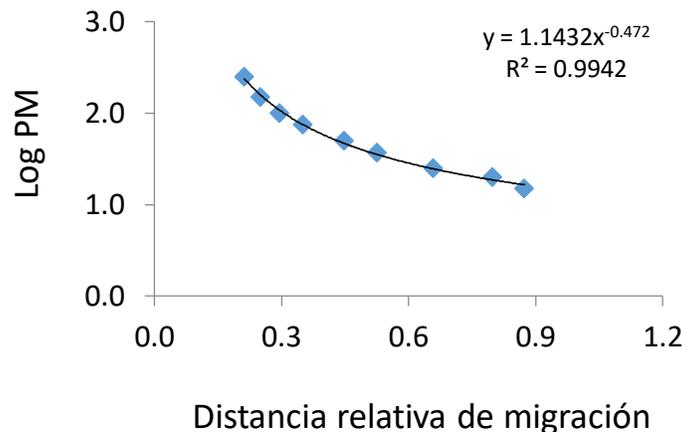


Figura 5. Gráfica construida a partir del logaritmo del peso molecular y la distancia relativa de migración de las proteínas del marcador molecular.

Estimación del punto isoelectrónico. Para calcular el PI se construyó una gráfica de ajuste lineal, con los valores de pH de la tira de isoelectroenfoco y la distancia (cm) que corresponde a cada valor (Figura 6), considerando que el gradiente de pH es lineal en una tira de 7 cm. A partir de la ecuación de la recta, se estimó el PI de los spots, sustituyendo el valor de x por el valor de la distancia recorrida (cm) en la tira, de cada spot.

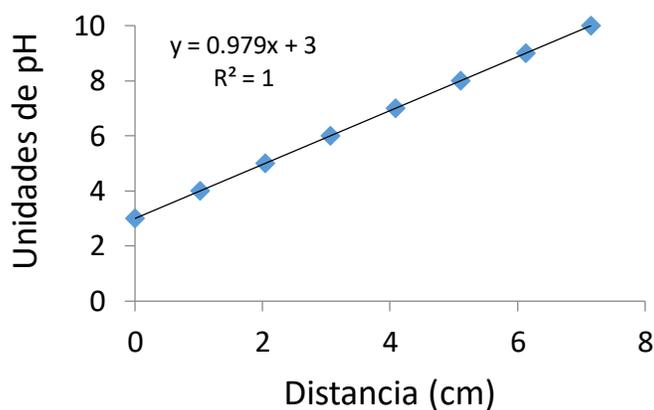


Figura 6. Gráfica construida a partir de las unidades de pH y las unidades de distancia de la tira. Una unidad de distancia es igual a 1.02, y se calculó como la relación entre la distancia (cm) donde terminaron de correr las proteínas en la primera dimensión, y la longitud de la tira (7 cm).

5.5.2.4 Procesamiento de los spots y digestión de proteínas

Se seleccionaron 18 spots, éstos fueron cortados manualmente con puntas estériles de micropipeta de 200 μ L. Los spots fueron cortados de acuerdo a su tamaño, para evitar la pérdida de proteína en este paso. Posteriormente, los spots, se enviaron a analizar por LC-MS/MS al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN unidad Irapuato (CINVESTAV). Todo el procesamiento de muestras se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Shevchenko *et al.* (2006). Los spots fueron desteñidos con 100 μ L de NH_4HCO_2

100 mM disuelto en acetonitrilo (1:1, v/v), en incubación durante 30 minutos con agitación suave. A continuación, se adicionaron 500 μ L de acetonitrilo puro a temperatura ambiente hasta que los spots adquirieron una coloración blanca y se encogieron, inmediatamente se retiró el exceso de acetonitrilo. Las proteínas presentes en los spots se digirieron con una solución de tripsina (Promega 13 ng μ L⁻¹) en buffer de NH₄HCO₃ 10 mM, 10% (v/v) de acetonitrilo, durante toda la noche a 37°C. Los péptidos fueron extraídos con 100 μ L de buffer de extracción compuesto por ácido fórmico al 5% y acetonitrilo (1:2, v/v), El sobrenadante fue colectado en tubos para PCR y secado en una centrifuga de vacío. A continuación, en cada tubo se adicionaron 20 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v), se agitaron y se colocaron durante 5 min en un baño de agua con sonicación. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 18000 xg y el sobrenadante fue colectado y secado en centrifuga de vacío.

5.5.2.5 Análisis de proteínas por LC - MS / MS

Los péptidos se analizaron con un sistema NanoAcquity para Cromatografía Líquida (Waters), acoplado a un espectrómetro de masas con trampa lineal de iones LTQ velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización por nano electrospray. El solvente A consistió de ácido fórmico 0.1% y el solvente B fue acetonitrilo 100% en ácido fórmico 0.1%. Se cargaron 3 μ L de las proteínas digeridas trópticamente en una pre-columna (Symmetry[®] C18, 5 μ m, 180 μ m x 20 mm, Waters). Se utilizó una columna capilar UPLC (100 μ m ID BEH-C18, 1.7 μ m tamaño de partícula), con una temperatura controlada de 35 °C. Los péptidos se separaron con un método de gradiente durante 60 min a una tasa de flujo de 400 nL min⁻¹. El gradiente fue el siguiente: 3–50 % solvente B (30 min), 50–85 % B (2 min), 85% B (4 min) y 3% B (22 min). Los péptidos se eluyeron en el espectrómetro de masas bajo el modo de “adquisición dependiente de datos”, con el fin de alternar entre un escaneo completo (400–1600 m/z) y escaneos subsecuentes Top 5 MS/MS en la trampa lineal de iones con exclusión dinámica. La disociación inducida por colisión (CID) de los iones, se realizó utilizando helio como gas de colisión, con una energía de colisión normalizada de 35% y 10 ms de tiempo de activación. Los datos se adquirieron a través del programa Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

5.5.2.6 Búsqueda e identificación de proteínas

Los espectros se analizaron en el buscador “Proteome Discoverer” version 1.4 y se buscó homología de proteínas utilizando la base de datos de Fabaceae del NCBI (414,123 entradas, Febrero de 2017). Las búsquedas se realizaron con los siguientes parámetros: ventana de ion MS precursor de 2 Da, ventana de ion MS/MS de 1 Da, digestión tróptica con dos posibles escisiones omitidas. Se consideró la carboxy-amidometilación de cisteína como una modificación fija y la oxidación de metionina como una modificación variable. Para proteínas

desconocidas, la búsqueda de homología se realizó con el buscador BlastP, tomando como referencia las secuencias de las proteínas no redundantes de la base de datos Fabaceae y *Methylobacterium* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Las homólogas de las proteínas fueron consideradas significativas si mostraron un valor-e menor a 10^{-80} . La función de las proteínas fue asignada utilizando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y la base de datos KEGG (www.genome.jp/kegg/). La localización subcelular fue estimada utilizando el programa WoLF-PSORT (<http://wolfpsort.org/>).

5.5.2.7 Análisis de la regulación de proteínas

El análisis de la regulación diferencial de las proteínas identificadas en raíz, se realizó considerando el factor relativo de espectros por proteína en cada spot (PSMsR), calculado a través de la Ec. 7:

$$\text{Ec. 7} \quad (\text{PSMsR})_k = \frac{(\text{PSMs}/L)_k}{\sum(\text{PSMs}/L)_i}$$

Donde $(\text{PSMsR})_k$ indica el número relativo de espectros para una proteína k, L es la longitud de la proteína, PSMs indica el número de espectros que coincidieron con un péptido de la proteína identificada y $\sum(\text{PSMs})_i$ indica el total de espectros que coincidieron con la proteína identificada en cada spot. En el caso de los spots que contienen más de una proteína, el valor de PSMsR, es una medida de la abundancia relativa de cada proteína en relación con el total de las proteínas en el spot. La presencia de diversas proteínas en un spot, o de la misma proteína en diversos spots, puede deberse a: modificaciones postranscripcionales que modifican el pI y PM de las proteínas, diferentes variantes debido al procesamiento alternativo del RNA transcrito, a la deficiencia en la separación de las proteínas, durante la cual puede ocurrir proteólisis, o dificultad del análisis de búsqueda de homología (Duquesnoy *et al.* 2009; Molesini *et al.* 2014).

5.6 Análisis estadístico

Para determinar efectos significativos entre los tratamientos, los datos obtenidos de cada variable de respuesta cuantificada se analizaron por ANOVA y una prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$) con el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC). Las diferencias estadísticas entre las medias se indican con diferentes letras o asteriscos. Los resultados se expresan como las medias con sus correspondientes DE.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa 1. Selección de un microorganismo endófito

6.1.1 Pruebas de interacción planta-microorganismo

Con el fin de seleccionar un MO que formara una simbiosis endófito con *A. farnesiana*, se cultivaron plántulas en presencia de los diferentes Mos (Tabla 1). Al cabo de 15 días de contacto, ninguna de las cepas de *Fusarium* formó simbiosis positiva con las plántulas, por el contrario, todas éstas penetraron en los tejidos de la planta causando su muerte. Aunque estos hongos se aislaron de una planta de *A. farnesiana*, es probable que debido a la etapa fisiológica de las plántulas, las cepas de *Fusarium* se comportaron como fitopatógenos como se ha reportado anteriormente para este género (Coleman, 2016). Los demás MOs crecieron con *A. farnesiana* sin causar su muerte y, al cabo de 50 días de asociación, las plántulas se cosecharon para cuantificar el crecimiento a través de la biomasa seca (Figura 7). Los hongos *Emericella sp.* y *Trichoderma sp.* disminuyeron significativamente el crecimiento de las plántulas, con respecto al control (AF), mientras que los hongos de los géneros *Cladosporium*, *Lewia*, y *Penicillium*, la bacteria *M. oryzae* y la microalga *Coccomyxa sp.* no causaron cambios significativos en la biomasa vegetal (Figura 7).

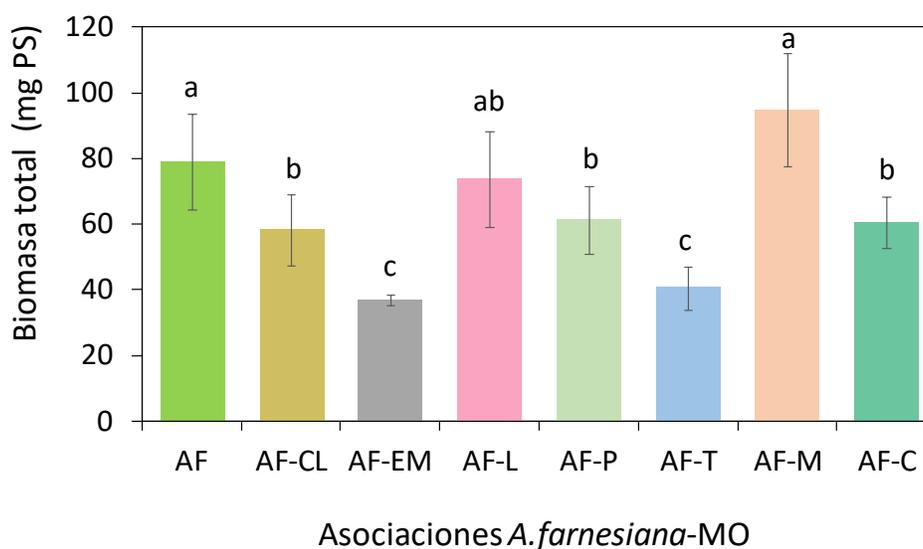


Figura 7. Biomasa (base seca) de *A. farnesiana* (AF) crecida durante 50 días con diferentes cepas microbianas, en medio MS. Cl: *Cladosporium sp.*; EM: *Emericella sp.*; L: *Lewia sp.*; P: *Penicillium sp.*; T: *Trichoderma sp.*; M: *M. oryzae*; C: *Coccomyxa sp.* Se muestran valores promedio \pm D.E.; las diferencias significativas se indican con letras diferentes ($p < 0.05$).

Aunque la simbiosis entre plantas y MOs es un fenómeno común en la naturaleza, éste es específico entre organismos, y responde a las condiciones particulares de crecimiento. Se ha

demostrado que bajo algún tipo de estrés, se favorece la simbiosis con la finalidad de asegurar la sobrevivencia de los organismos implicados, en ocasiones incluso incrementando el crecimiento de la planta, como se ha observado en *P. vittata* en simbiosis con una bacteria endófito y una bacteria rizosférica, bajo estrés por As (Han *et al.* 2016). Debido a lo anterior, se seleccionaron los tres MOs que, bajo las condiciones aquí evaluadas, no causaron un efecto negativo sobre el crecimiento de *A. farnesiana*, para evaluar el efecto de su asociación en condiciones de estrés por As^V durante 50 días de cultivo. Estos MOs fueron la bacteria *M. oryzae*, la microalga *Coccomyxa* sp. y el hongo filamentoso *Cladosporium* sp. Al cabo del tiempo de exposición al MO y al As^V , se observó que la biomasa total (tallos más raíces) de plantas que no estuvieron en simbiosis (AF) y la de aquellas que crecieron en presencia de *Cladosporium* sp. (AF-CL), disminuyó significativamente, cuando las plantas se expusieron a As^V (Figura 8).

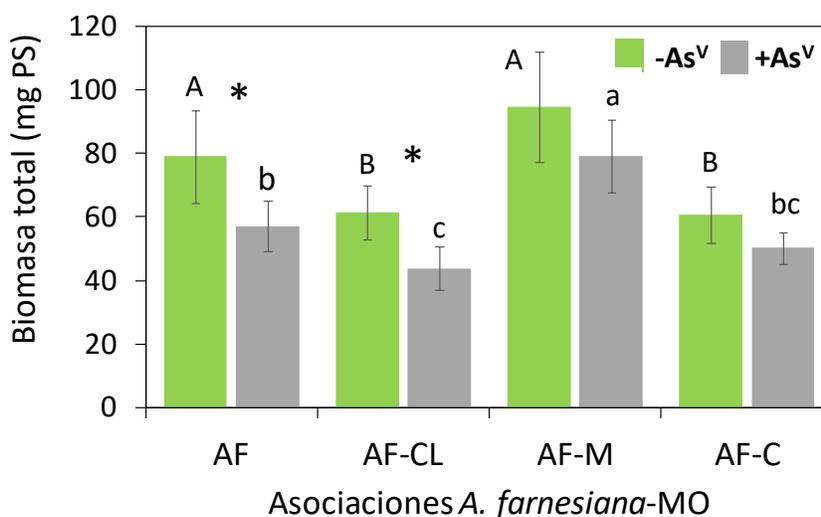


Figura 8. Biomasa total de *A. farnesiana* (AF) al cabo de 50 días de crecimiento con las diferentes cepas de MOs, en medio MS sin (barras verdes) y con $80 \text{ mg L}^{-1} As^V$ (barras grises). AF-M: Planta-*M. oryzae*; AF-C: Planta-*Coccomyxa* sp.; AF-CL: Planta-*Cladosporium* sp. Se muestran promedios \pm D.E. Las diferencias significativas entre diferentes medios (con o sin As) de la misma asociación se indican con asteriscos, y aquellas encontradas entre las diferentes asociaciones en el mismo medio se muestran con letras diferentes ($p < 0.05$).

La disminución del crecimiento vegetal, comúnmente se relaciona con los efectos tóxicos de la concentración de As intracelular (Sandalo *et al.* 2001; Mishra *et al.* 2008). De hecho, el FT de los cultivos AF-CL indica una alta translocación del As a la parte verde (Tabla 2). Las asociaciones con *M. oryzae* (AF-M) y *Coccomyxa* sp. (AF-C) no mostraron diferencias significativas en el crecimiento, al comparar los cultivos en medio MS y medio MS con As (Figura 8), a pesar de la alta bioacumulación de As detectada (Tabla 2). Sin embargo, las

plantas que crecieron con *M. oryzae* mostraron mayor producción de biomasa con respecto a los cultivos con la microalga, así como un alto FBA y el mayor IT observado de todos los tratamientos. A partir de éstos resultados, se seleccionó a *M. oryzae* como MO endófito para evaluar el efecto de esta endosimbiosis en la respuesta vegetal al estrés por As^V.

Tabla 2. Bioacumulación de As en tallos y en raíces de *A. farnesiana* (AF) crecida con diferentes MOs durante 50 días en medio MS con 80 mg L⁻¹ As^V. AF-M: Planta-*M. oryzae*; AF-C: Planta-*Coccomyxa* sp.; AF-Cl: Planta-*Caldosporium* sp.; FBA: factor de bioacumulación; FT: factor de translocación; IT: índice de tolerancia.

Tratamiento	[As] tallos (µg g ⁻¹ PS)	[As] raíces (µg g ⁻¹ PS)	As (µg planta ⁻¹)	FBA	FT	IT
AF	1622 (209) ^a	5899 (797) ^a	160.(20) ^a	96(11) ^a	0.4 (0.1) ^a	80.5(12.4) ^a
AF-M	1725 (261) ^a	5281 (466) ^a	168(15) ^a	86(9) ^a	0.3 (0.0) ^a	94.1(10.6) ^b
AF-C	1863 (420) ^a	5106 (629) ^a	135(14) ^a	76(17) ^a	0.4 (0.1) ^a	70.8(12.7) ^a
AF-CL	1766 (140) ^a	2230 (1305) ^b	74(2) ^b	59(16) ^b	1.0 (0.4) ^b	59.1(9.3) ^a

Se muestran promedios ± D.E.; las diferencias significativas entre asociaciones se muestran con letras diferentes (p<0.05).

6.1.2 Verificación del tipo de simbiosis

Una vez seleccionada la bacteria *M. oryzae* como MO para formar simbiosis con *A. farnesiana*, se verificó el tipo de simbiosis que forman, a través de pruebas cualitativas. Las pruebas del cultivo en placa, mostraron crecimiento de *M. oryzae* a partir de segmentos de tallo y raíz (Figura 9), a partir de los 5 días de incubación.

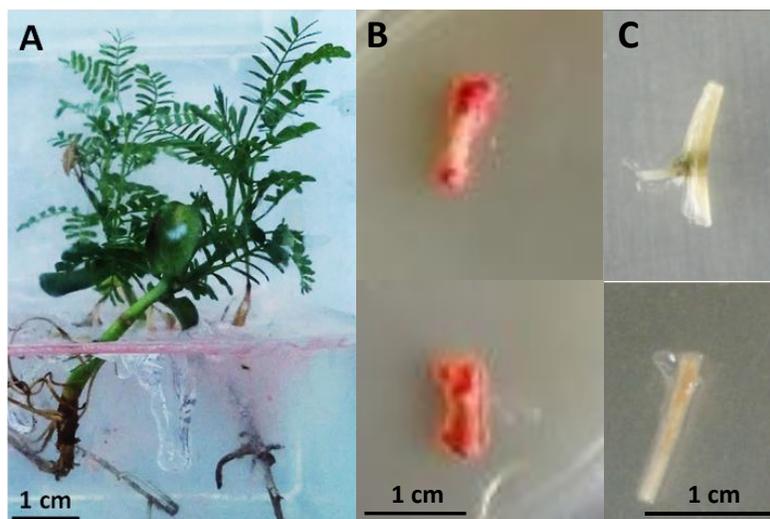


Figura 9. Pruebas de endofiticidad por el método en placa. A: Plantas de *A. farnesiana* creciendo en presencia de *M. oryzae* en medio MS. B: En la parte superior, se observan segmentos de tallo y en la parte inferior, segmentos de raíz, con crecimiento bacteriano. C:

Control negativo de la prueba de endofiticidad; segmentos de tallo (superior) y raíz (inferior) de plantas que crecieron en ausencia de la bacteria.

La presencia de células de *M. oryzae* dentro del tejido (tallo) de *A. farnesiana* después de 15 días de contacto se confirmó por microscopía confocal. Las imágenes de fluorescencia muestran las células bacterianas principalmente en los espacios intercelulares, sin embargo también se observaron dentro de las células (Figura 10). Los resultados observados se relacionan con el paso de las células bacterianas a través de los espacios intercelulares de la raíz a la parte verde, tal como se observó en plantas de jitomate, donde células de *M. suomiense* se encontraron presentes en las regiones del mesófilo y apoplasto de hojas, después de 7 días de inoculación de las semillas (Poonguzhali *et al.* 2008). El transporte de bacterias metilótrofas facultativas, como *M. oryzae*, de la raíz a la parte fotosintética, se atribuye a su capacidad para crecer con metanol como fuente de carbono, ya que éste en su mayoría se libera a través de los estomas de las plantas (Sy *et al.* 2005; Poonguzhali *et al.* 2008).

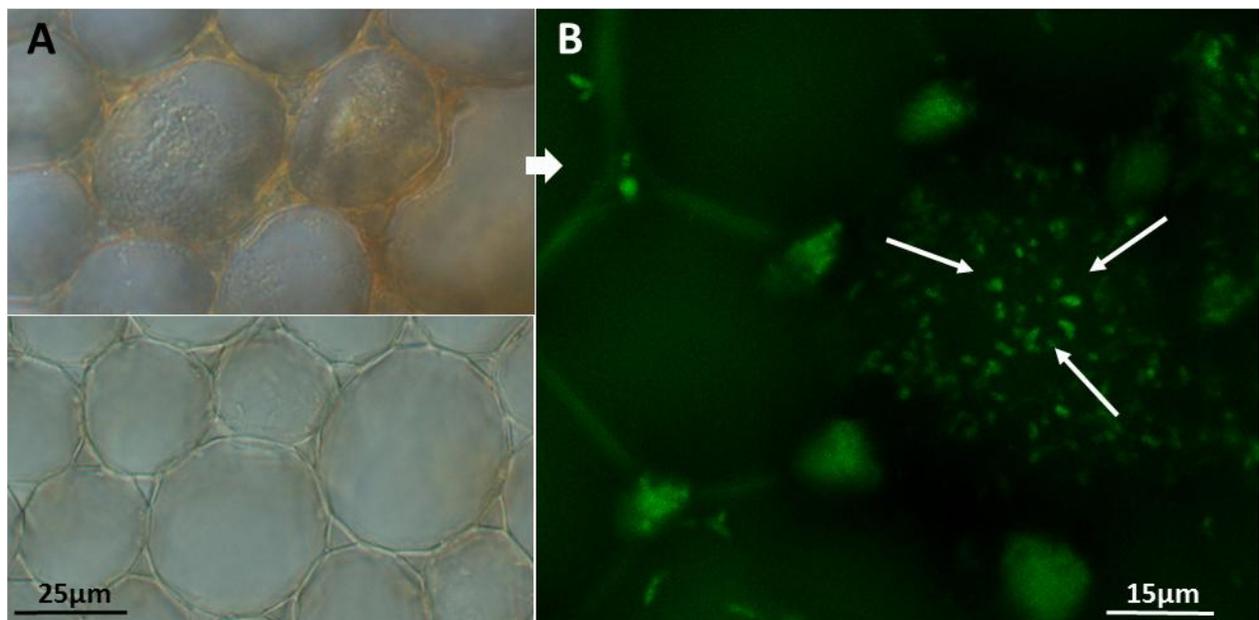


Figura 10. Pruebas de endofiticidad en tallo, por microscopía. A: Cortes de 50 µm de segmentos de tallo, observado con microscopía de campo claro, en la parte superior se observa fragmentos de plantas crecidas en asociación con la bacteria, en la parte inferior, fragmentos de plantas control. B: Cortes de 50 µm observado con microscopía confocal, las células de *M. oryzae* con fluorescencia de color verde se indican con flechas blancas, dentro de células de tallo de *A. farnesiana*, después de 15 días de cultivo.

6.2 Etapa 2. Cambios fisiológicos y bioacumulación de As por *A. farnesiana*

6.2.1 Crecimiento

Se evaluó la influencia de la cepa endófitra AFM14 de *M. oryzae* y del estrés por As^{V} sobre respuestas fisiológicas de *A. farnesiana*. Después de 15 días de cultivo, ni la presencia de la bacteria, ni la exposición a As^{V} modificaron la biomasa de tallos ni raíces (Figura 11). En el caso de plantas que crecieron bajo estrés por As^{V} , este resultado se relaciona con la tolerancia de la especie al As^{V} , tal como se observó anteriormente para *A. farnesiana* (Alcántara-Martínez *et al.* 2016). En cambio, comúnmente, plantas sensibles al As creciendo en condiciones de estrés por este metaloide, muestran daño en la membrana de las raíces, inhibición de funciones celulares y estrés oxidante que puede llegar a causar muerte celular o disminución de crecimiento (Verbruggen *et al.* 2009). No obstante, la capacidad de una planta para tolerar As depende de diversos factores, entre ellos, la especie vegetal, la concentración del contaminante, el tiempo de exposición y las condiciones de crecimiento, entre otros (Huang y Cunningham, 1996). Por ejemplo, Alcántara-Martínez *et al.* (2016) reportaron una disminución de la biomasa de tallos en plantas de *A. farnesiana* cuando se expusieron a 0.58 mM As^{V} durante 50 días. El efecto tóxico del As fue mayor al exponer a las plantas a una dosis de 3.60 mM As^{V} , resultando en una disminución significativa de la biomasa de tallos y raíces. En el presente trabajo, es probable que durante 15 días de exposición a $80 \text{ mg L}^{-1} \text{As}^{\text{V}}$ (0.58 mM As^{V}) el sistema de defensa de *A. farnesiana* pueda contrarrestar la toxicidad inducida por el As.

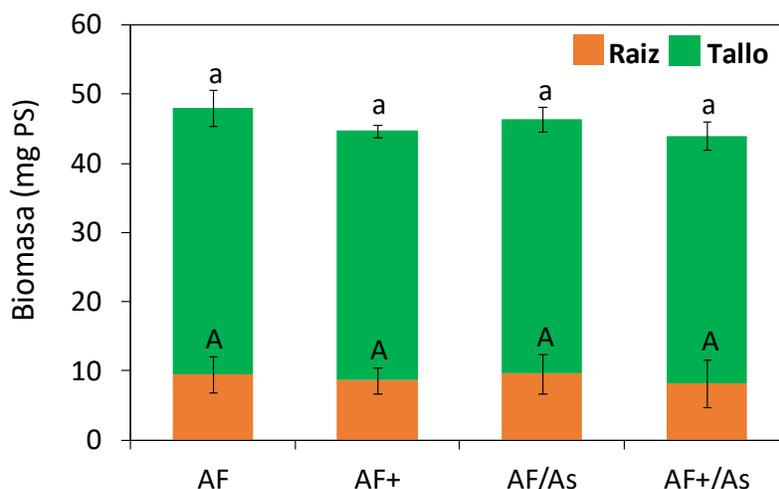


Figura 11. Crecimiento (biomasa) de tallos y raíces, de *A. farnesiana* en asociación con *M. oryzae* y bajo estrés por As^{V} . Se muestran promedios \pm D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con letras diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, el cambio que puede inducir la presencia de un MO en la tolerancia vegetal también es variable, dependiendo además de los factores mencionados, de las especies involucradas y del tipo de simbiosis entre ellas (Sheng *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2013b;

Ahsan *et al.* 2008; Bona *et al.* 2010). En el caso de la simbiosis inducida entre *A. farnesiana* y *M. oryzae*, además de formar una asociación de carácter endófito, la bacteria puede crecer alrededor de la raíz en el medio de cultivo (Figura 9 A). Por lo que se le reconoce como endófito facultativo (Rajkumar *et al.* 2009). Se ha reportado que cepas del género *Methylobacterium* aisladas en medios selectivos, pueden asociarse con plantas, habitando la rizósfera y como endófitas (Madhaiyan *et al.* 2007b); en este caso, la interacción entre *M. oryzae* y *A. farnesiana* puede ocurrir en el interior de los tejidos vegetales y alrededor de la raíz, donde se encuentran las bacterias de carácter rizosférico. De hecho, la rizósfera, provee un microambiente único formado por los MOs y las raíces, debido al proceso complejo de interacción entre ambos organismos que involucra exudados vegetales y del MO, que influyen en el metabolismo de los simbiosis (De Souza *et al.* 1999).

Bacterias endófitas como *Methylobacterium*, pueden mejorar el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos que incluyen: el incremento de la solubilidad de fosfatos y de nitrógeno asimilable, producción de sideróforos, producción de fitohormonas y de enzimas que reducen los niveles de etileno y modulan el crecimiento vegetal, producción de antibióticos y secreción de compuestos involucrados en el control de enfermedades (Poonguzhali *et al.* 2008; Li *et al.* 2012). Por ejemplo, una cepa de *M. oryzae* incrementó el crecimiento en plántulas de tomate expuestas a Ni y Cd, probablemente a través de la producción de compuestos que promueven el crecimiento vegetal, como citoquininas (Madhaiyan *et al.* 2007). Una cepa de *Staphylococcus arlettae* mejoró el crecimiento de tallos y raíces de *B. juncea* expuesta a As^V, principalmente debido a una estimulación de la producción de auxinas, promoviendo así la división y elongación celular (Srivastava *et al.* 2013b).

Por otro lado, similar al presente trabajo, también se ha reportado que la inoculación de plantas de trigo, cebada, maíz y zanahoria con *M. extorquens* no modificó el crecimiento de dichas especies (Abanda-Nkpwatt *et al.* 2006). Aunque en *A. farnesiana* no se observaron cambios en la producción de biomasa en tallos y raíces por efecto de *M. oryzae*, aún en presencia de As^V, es posible que la bacteria influya en el metabolismo de la planta, a través de la modulación de los niveles de fitohormonas (Srivastava *et al.* 2013b), como ácido indolacético (IAA) que, entre otros efectos, puede afectar la formación de pigmentos fotosintéticos (Glick 2012). Lo anterior podría relacionarse con el incremento en el contenido de clorofila a, detectado en plantas AF+/As. Similar a este trabajo, Talano *et al.* (2013) reportan que la presencia de *Bradyrhizobium japonicum* no modificó la biomasa de tallos ni raíces pero sí incrementó el contenido de clorofila en plantas de haba expuestas a 25 μ M As^V.

M. oryzae podría también influir en el crecimiento de las plantas bajo estrés por As^V, a través de la modulación de los niveles de etileno, reflejado en valores similares de biomasa de tallos y raíces, entre los tratamientos. El etileno es importante para el metabolismo de las plantas, sin embargo, en concentraciones excesivas durante situaciones de estrés, puede disminuir el

crecimiento vegetal (Boller *et al.* 1983). Aunque probablemente la bacteria induce una situación de mayor estrés, debido a una mayor bioacumulación de As en plantas inoculadas, la modulación de los niveles de etileno podría evitar la disminución de crecimiento de *A. farnesiana*. De hecho, se ha reportado que las bacterias con características PCV pueden mejorar el crecimiento vegetal regulando los niveles de etileno, facilitando el crecimiento de las raíces en plantas creciendo bajo estrés por EPT (Grichko *et al.* 2000).

Por otro lado, es importante considerar que algunos estudios de plantas bajo estrés por EPT, reflejan una relación entre la estimulación del crecimiento vegetal y la protección contra la toxicidad del EPT. Por ejemplo, plántulas de jitomate inoculadas con *M. oryzae* mostraron una disminución de la bioacumulación de Ni y Cd, lo que se relacionó con una mejora del crecimiento vegetal (Madhaiyan *et al.* 2007). Por el contrario, en el presente trabajo, plantas de *A. farnesiana* inoculadas con *M. oryzae* mostraron un incremento de la bioacumulación de As en tallos y en raíces, con respecto a las plantas no inoculadas, sin embargo, lo anterior no causó una disminución en el crecimiento, ya que éste se mantuvo similar entre todos los tratamientos; esto sugiere una mayor eficiencia de los mecanismos de defensa vegetal mediado por *M. oryzae*.

6.2.2 Contenido de pigmentos fotosintéticos

La fitotoxicidad del arsénico también afecta negativamente el contenido de los pigmentos fotosintéticos, incrementa la concentración de etileno y la producción de ERO (Boller *et al.* 1983; Ramadan *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2013a). En el presente trabajo, el As^V redujo significativamente (20%) el contenido de Cl b en las plantas sin asociación, pero la presencia de la bacteria impidió la caída de este pigmento en respuesta al As. En cambio, *M. oryzae* incrementó significativamente (>15%) el contenido de Cl a, particularmente en las plantas expuestas al metaloide (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de pigmentos fotosintéticos de *A. farnesiana* en asociación con *M. oryzae* y bajo estrés por As^V.

Tratamiento	Pigmentos fotosintéticos (mg g PF ⁻¹)		
	Cl a	Cl b	Car
AF	1.00 (0.05) ^{bc}	0.36 (0.03) ^a	0.40 (0.07) ^a
AF+	1.16 (0.17) ^{ab}	0.38 (0.06) ^a	0.46 (0.07) ^a
AF/As	0.90 (0.09) ^c	0.28 (0.03) ^b	0.36 (0.04) ^a
AF+/As	1.21 (0.09) ^a	0.40 (0.03) ^a	0.48 (0.05) ^a

Se muestran promedio con D.E. Las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con letras diferentes (p<0.05). Cl a: Clorofila a; Cl b: Clorofila b; Car: Carotenoides.

La concentración de pigmentos está directamente relacionada con la salud de la planta (Mishra *et al.* 2014). De hecho, se ha observado una disminución de los pigmentos fotosintéticos por

efecto del As^V en *Hydrilla verticillata* (Srivastava *et al.* 2013a), *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.* 2014) y *Withania somnifera* (Siddiqui *et al.* 2015). Sin embargo, otros estudios demuestran que el contenido de pigmentos puede aumentar a través de la inoculación de bacterias PCV, tal como se observó en plantas de *Glycine max* expuestas a 25 mM As^{III} durante 25 días (Talano *et al.* 2013) y en plantas de *Brassica juncea* expuestas a 10 y 15 mg kg^{-1} As durante 30 días (Srivastava *et al.* 2013b). En el presente trabajo, el incremento de Cl a inducido por *M. oryzae*, pudo ser mediado por la producción de compuestos que mejoran el metabolismo de las clorofilas, como las fitohormonas (Shi *et al.* 2010). Varios genes responsables de producir auxinas y citoquininas, además de otros relacionados con la producción de compuestos con características de PCV, se identificaron recientemente en el genoma de *M. oryzae* (Kwak *et al.* 2014). Por otro lado, la concentración de carotenoides se mantuvo sin cambios en todos los tratamientos, lo cual sugiere que estos pigmentos podrían participar en los mecanismos de defensa de *A. farnesiana*, como protectores del daño oxidante, favoreciendo su respuesta antioxidante en condiciones de estrés (Mishra *et al.* 2014). Los resultados encontrados en el crecimiento y en el contenido de pigmentos fotosintéticos sugieren que, aunque la cepa de *M. oryzae* no tiene efecto significativo en el crecimiento vegetal (durante 15 días), puede conferir un efecto protector contra la toxicidad del As bioacumulado, favoreciendo el contenido de Cl a y, en general, el metabolismo vegetal en condiciones de estrés por As^V .

6.2.3 Bioacumulación de As

Después de 15 días de exposición a As^V , la endosimbiosis causó un incremento significativo de la bioacumulación de As en tallos (2.8 veces) y raíces (1.8 veces), lo cual se reflejó en un aumento de casi tres veces en el FBA, con respecto a las plantas que crecieron sin la bacteria (Tabla 4). Anteriormente, ya se ha demostrado que las bacterias resistentes a metales y metaloides y con características de bacterias PCV, como *M. oryzae*, pueden reducir, incrementar o no tener efecto en la absorción de EPT por las plantas. Por ejemplo, en el estudio de Madhaiyan *et al.* (2007), *M. oryzae* redujo la acumulación de Ni y Cd en plantas de jitomate, mientras que Rajkumar y Freitas (2008), encontraron que la inoculación de *Ricinus communis* con *Pseudomonas* sp. incrementó (~1.3-veces) la bioacumulación de Zn en tallos. Particularmente en plantas bajo estrés por As , se ha reportado que la simbiosis con bacterias puede cambiar la bioacumulación del metaloide, como en el caso de plantas de haba expuestas a 25 μM As^V , donde se observó que *Bradyrhizobium* sp. incrementó el contenido de As en tallos, pero lo disminuyó en raíces, modificando el FT (Talano *et al.* 2013). Srivastava *et al.* (2013b), demostraron que la presencia de *Staphylococcus arlettae* aumentó la bioacumulación de As en tallos y raíces de plantas de *Brassica juncea* expuestas a diferentes concentraciones de As (5-15 mg Kg^{-1}), con respecto a las plantas control.

Tabla 4. Bioacumulación de As, en tallo y raíz de *A. farnesiana* y *A. farnesiana-M.oryzae* durante 15 días. FT: factor de translocación; FBA: factor de bioacumulación.

Tratamiento	Bioacumulación de As (mg Kg ⁻¹ PS)			
	Tallo	Raíz	FT	FBA
AF/As	615.3 (14.9) ^b	2326.9 (418.6) ^b	0.24(0.1) ^b	39 (5.9) ^b
AF+/As	1753.9 (66.6) ^a	4312.4 (550.8) ^a	0.43 (0.1) ^a	83 (5.9) ^a

Se muestran promedios con D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con letras diferentes (p<0.05).

El incremento de la absorción de EPT por las plantas, inducido por las bacterias asociadas, se atribuye principalmente al efecto de los MOs sobre las características del suelo en la zona de la rizósfera. Uno de estos efectos es la acidificación, debida a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, lo cual induce cambios en la especie iónica, toxicidad y movilidad de los EPT, incrementando así su disponibilidad y la absorción de iones por las raíces (Sheng *et al.* 2008; Rajkumar y Freitas, 2008; Sobariu *et al.* 2017). Este efecto mediado por las bacterias, y en general por MOs, depende de una interacción compleja entre el EPT y las características geoquímicas del suelo; en el caso del As, éste se encuentra frecuentemente asociado con diversos minerales (Sobariu *et al.* 2017; Volke Sepúlveda *et al.* 2005). Sin embargo, en el sistema utilizado en el presente trabajo (*in vitro*), todo el As^V en el medio se encontraba disponible y el incremento de la bioacumulación de As en *A. farnesiana*, mediado por *M. oryzae*, podría estar relacionado con mecanismos de tolerancia de la bacteria, cuando se encuentra asociada con las raíces (en la zona de la rizósfera) y cuando se encuentra dentro de las células vegetales (de carácter endófito).

Las células de *M. oryzae* podrían contribuir al aumento de la concentración de As^{III} a través de uno de los principales mecanismos de detoxificación de As reportado para bacterias, que consiste en la reducción de As^V a As^{III} y la expulsión de este último ión (Rosen, 2002). Las bacterias creciendo en la superficie y alrededor de las raíces de *A. farnesiana*, podrían favorecer la producción y absorción de As^{III} por las raíces, a través de las proteínas de la subfamilia de las acuaporinas (Verbruggen *et al.* 2009). Las bacterias que se encuentran dentro de los tejidos de la planta podrían incrementar la concentración de As^{III} dentro de las células, favoreciendo en raíces y tallos la formación de conjugados As^{III}-GS₃. Un resultado similar se observó en la simbiosis entre *P. vittata* con bacterias endófitas y rizosféricas, en el cual las bacterias tolerantes al As que mostraron ser reductoras de As^V, aumentaron la concentración de As en tallos y raíces del helecho y también la translocación de As^{III} hacia el tejido fotosintético (Han *et al.* 2016).

Otro mecanismo a través del cual *M. oryzae* pudo favorecer el incremento de la concentración de As en los tejidos de *A. farnesiana*, es a través de la modulación de los transportadores de fosfato de alta afinidad presentes en raíces, los cuales transportan el As^V al interior celular,

debido a su similitud con el fosfato (Meharg y Macnair, 1992). Se ha reportado que la simbiosis con HM puede disminuir la absorción de fosfato a través de la modulación de sus transportadores, resultando en una disminución del transporte de As hacia las raíces (Orlowska *et al.* 2012). Sin embargo, se sabe que las bacterias PCV y algunos otros MOs, pueden favorecer la nutrición vegetal a través del aumento de la disponibilidad de fosfatos solubles (entre otros mecanismos), lo que se relaciona a la activación de transportadores de fosfato (Ullah *et al.* 2015; Li *et al.* 2012). En el caso de *A. farnesiana*, una probable activación de los transportadores de fosfato mediada por *M. oryzae*, podría relacionarse con el incremento de la absorción de As^V por las raíces.

Además de incrementar la concentración de As en tallos y raíces, *M. oryzae* también incrementó (1.5 veces) el FT (Tabla 4), lo que indica que la presencia de la bacteria modificó la distribución del As bioacumulado en los tejidos de la planta. Este efecto ya se ha observado en plantas en simbiosis, y frecuentemente implica la disminución de la concentración del metaloide en alguno de los tejidos, ya sea tallo o raíz (Talano *et al.* 2013; Han *et al.* 2016). Por ejemplo, en plantas de *Glycine max* expuestas a 25 mM As^V , la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* disminuyó 1.2 veces la concentración de As en raíces, lo que sugiere que la simbiosis disminuye su capacidad de fitoestabilización, incrementando la translocación del As a la parte verde (Talano *et al.* 2013). Sin embargo, en *A. farnesiana*, la presencia de la bacteria no disminuyó la concentración de As en raíces, con respecto a la detectada en tallos. Incluso, la bioacumulación de As en raíz fue 2.4 veces mayor en plantas AF+/As, con respecto a plantas AF/As, indicando un alto potencial de la simbiosis *A. farnesiana*-*M. oryzae* para la fitoestabilización de As. Adicionalmente, la presencia de la bacteria potenció la capacidad de bioacumulación de As en ambos tejidos de la planta. Los resultados obtenidos sugieren que la cepa de *M. oryzae* podría mejorar la respuesta de *A. farnesiana* al estrés por As, lo cual se refleja en el mantenimiento de la producción de biomasa vegetal, a pesar del incremento en la bioacumulación de As en ambos tejidos.

6.2.4 Concentración intracelular de H_2O_2

En situaciones de estrés, tales como la exposición a EPT, la célula vegetal puede mostrar daño debido al contenido elevado de EROs (White y Torres, 2010). El H_2O_2 es una ERO que puede formar $\bullet OH$ y dañar la membrana celular y proteínas, por ello es indispensable su regulación y metabolismo. En tallos de *A. farnesiana* no se observaron diferencias significativas en la concentración de H_2O_2 en las plantas bajo los distintos tratamientos (Figura 12), lo cual podría estar relacionado con la respuesta de enzimas involucradas en el metabolismo de ERO, cuya actividad podría evitar la acumulación de estas moléculas durante el tiempo de cultivo evaluado. Lo anterior, puede contribuir a mantener un estado redox celular idóneo para la señalización en respuesta al estrés abiótico (As^V) y biótico (bacteria), sin causar estrés oxidante

(Konigsberg, 2008). Sin embargo, en raíces, la presencia del As^V , incrementó significativamente el contenido de H_2O_2 (0.9-2.0 veces) en plantas sin inocular (Figura 12), lo cual sugiere un mayor daño oxidante en este tejido. Un incremento en la acumulación de H_2O_2 ya se ha reportado en plantas de *Oryza sativa* bajo estrés por el metaloide. Por ejemplo, el contenido de H_2O_2 en tallos y raíces de plantas de *Oryza sativa* tratadas con As^V (100 μM), incrementó significativamente después de 24 (2.1 veces) y 48 (3.4 veces) horas de tratamiento (Nath *et al.* 2014). En plantas de la misma especie expuestas a A^{III} y As^V , Mohd *et al.* (2017), reportan un aumento de 50% en la concentración de H_2O_2 con respecto a las plantas control. En el presente trabajo, la simbiosis con la bacteria disminuyó significativamente (37%) el nivel de H_2O_2 en raíces expuestas a As^V , con respecto a plantas no asociadas, manteniendo un nivel similar al detectado en las plantas control (Figura 12). Este resultado puede atribuirse al efecto protector del simbionte endófito sobre la planta hospedera, a través del mantenimiento del estado redox celular. Algunos estudios muestran que MOs asociados con plantas, particularmente endófitos, pueden reducir la concentración de ERO en situaciones de estrés, por ejemplo, Mirzahosseini *et al.* (2015) reportan una reducción (10%) en el contenido de H_2O_2 en plantas de *F. arundinacea* expuestas a níquel (180 $mg\ kg^{-1}$), mediada por la asociación con el hongo *Epichloë coenophiala*. En plantas de arroz bajo estrés por A^{III} y As^V , también se observó que la asociación con el hongo *Piriformospora indica* disminuye (4%) el contenido excesivo de H_2O_2 producido por efecto del metaloide (Mohd *et al.* 2017).

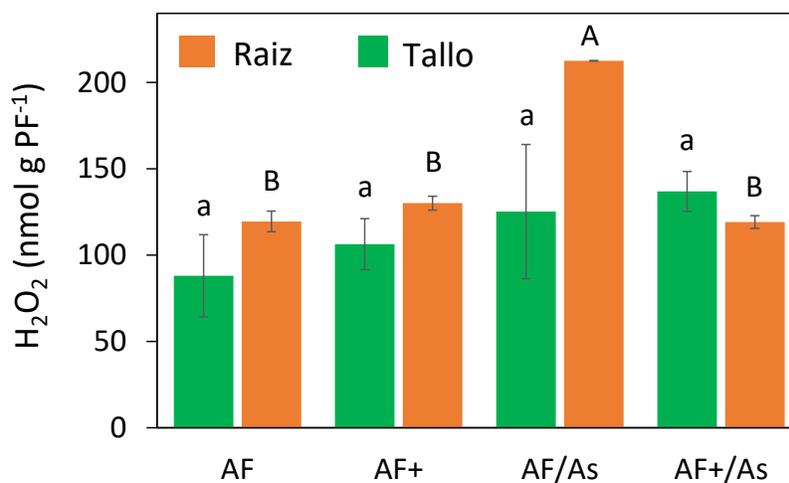


Figura 12. Concentración de H_2O_2 en tallos y raíces de *A. farnesiana*, en plantas expuestas a As^V , en presencia y ausencia de *M. oryzae*. Se muestran valores promedio \pm DE; las diferencias significativas entre tratamientos se indican con letras diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, en plantas sin estrés por As , no se encontraron diferencias significativas en el contenido de H_2O_2 por efecto de la simbiosis. Se sabe que una respuesta en las plantas durante el establecimiento de una simbiosis con un MO, es la regulación de los niveles de H_2O_2 , el cual puede ser inducido como molécula de señalización (Cheeseman, 2006) y puede

ser producido a partir de diversas fuentes que incluyen NADPH oxidasas, peroxidasas de la pared celular, amina oxidasas, oxalato-oxidasas y oxidasas que contienen flavina (Lanfranco *et al.* 2005). Por ejemplo, Mendarte-Alquisira *et al.* (2016), observaron que la inoculación de *F. arundinacea* con el hongo endófito *Lewia sp.*, causó un estímulo inicial en la producción de H₂O₂ después de 7 días de contacto. Este efecto también se reportó en etapas tempranas de la simbiosis entre dos plantas leguminosas y *Gigaspora margarita* (Lanfranco *et al.* 2005), así como entre el hongo micorrízico *Pisolithus tinctorius* y plantas de *Castanea sativa* (Baptista *et al.* 2007). En el presente trabajo, es probable que la interacción entre *A. farnesiana* y *M. oryzae* estimula la producción de ERO (“oxidative burst”) como parte de los mecanismos de defensa en la planta, durante las etapas tempranas de interacción, sin embargo, al cabo de 15 días de contacto entre los simbiosis, los niveles similares de H₂O₂, observados entre plantas AF+ y plantas AF, sugieren que en el tiempo de cultivo evaluado, se estableció una simbiosis positiva entre la bacteria y la planta, sin causar una segunda etapa de sobreproducción de ERO, como ocurre en la interacción con MOs patógenos (Nanda *et al.* 2010), la cual podría inducir daño oxidante y la activación de vías de muerte celular programada (Konigsberg, 2008; Nanda *et al.* 2010).

6.2.5 Contenido de GSH y GSSG

El GSH es un péptido que, en conjunto con otras moléculas y enzimas antioxidantes, mantiene el estado redox celular (Lal, 2010). En plantas bajo estrés por As, el GSH se sintetiza en respuesta a la sobreproducción de ERO, resultado de la reducción del As^V a As^{III} (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). En el presente trabajo, tanto la exposición a As^V como la presencia de *M. oryzae* modificaron el contenido de GSH y GSSG en tallos y raíces (Tabla 5). En plantas no asociadas, el estrés por As^V disminuyó significativamente el contenido de GSH en tallos (0.9 veces) y lo incrementó (8.9 veces) en raíces, con respecto a las plantas sin estrés. Mientras que en plantas en simbiosis el estrés por As incrementó el contenido de la molécula en tallos (2.8 veces) y raíces (17.4 veces), con respecto a las plantas asociadas con la bacteria, pero sin estrés por As, lo que sugiere una mejora en la respuesta antioxidante mediada por *M. oryzae*. Similar al presente trabajo, algunos estudios previos, han reportado que la inoculación con MOs puede mejorar los niveles de GSH en las plantas, como se demostró en frondes de plantas de *P. vittata* en simbiosis con *Glomus mosseae* en presencia de 334 µM As^V (Bona *et al.* 2011), y en raíces de plantas de *Nicotiana tabacum* inoculadas con el hongo micorrízico *Funneliformis mosseae*, expuestas a 1 mM o 30 mM de As^V (Degola *et al.* 2015).

Tabla 5. Contenido de proteína total, glutatión total (GSH_T), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), grado de oxidación (GO) y potencial de reducción (E_{hc}) de As, en tallo y raíz de *A. farnesiana*.

Variable	Tallo			
	AF	AF+	AF/As	AF+/As
Proteína (mg g PF ⁻¹)	3.08 (0.41) ^b	8.67 (1.28) ^a	3.13 (0.82) ^b	8.70 (1.20) ^a
GSH _T (nmol g PF ⁻¹)	630.9 (3.6) ^b	410.8 (27.9) ^c	639.2 (10.3) ^b	878.2 (57.2) ^a
GSH (nmol g PF ⁻¹)	591.2 (5.7) ^b	389.6 (3.4) ^d	553.4 (9.2) ^c	810.6(11.7) ^a
GSSG (nmol g PF ⁻¹)	39.7 (5.7) ^b	19.8 (2.4) ^c	82.0 (4.3) ^a	71.5 (8.9) ^a
GSH/GSSG (nmol g PF ⁻¹)	15.2 (2.2) ^b	17.4 (1.8) ^a	6.5 (0.7) ^d	12.3 (2.4) ^c
GO (%)	11.8 (1.3) ^b	10.4 (1.0) ^b	23.7 (2.2) ^a	14.3 (2.3) ^b
E _{hc} (mV)	-264.8 (1.7) ^a	-266.6 (1.4) ^a	-254.0 (1.5) ^b	-262.0 (2.5) ^a
Raíz				
Proteína (mg g PF ⁻¹)	0.9 (0.3) ^b	0.7 (0.1) ^b	2.7 (0.6) ^a	2.1 (0.0) ^a
GSH _T (nmol g PF ⁻¹)	180.5 (25.2) ^c	166.7 (13.6) ^c	1765.8 (40.7) ^b	2815.3 (34.4) ^a
GSH (nmol g PF ⁻¹)	170.8 (4.3) ^c	145.2 (3.3) ^c	1534.0 (69.1) ^b	2523.0 (43.0) ^a
GSSG (nmol g PF ⁻¹)	17.4 (4.3) ^b	22.4 (2.6) ^b	233.4 (6.3) ^a	229.4 (30.9) ^a
GSH/GSSG (nmol g PF ⁻¹)	8.9 (1.5) ^b	7.8 (1.6) ^b	6.3 (0.2) ^b	11.1 (1.6) ^a
GO (%)	11.2 (1.4) ^b	9.9 (0.9) ^b	21.1 (1.8) ^a	13.6 (2.0) ^b
E _{hc} (mV)	-258.0 (2.2) ^a	-256.1 (2.6) ^a	-256.0 (4.3) ^a	-260.8 (1.9) ^a

Se muestran promedio con D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con letras diferentes (p<0.05).

En tallos de *A. farnesiana*, la exposición de las plantas al As^V, condujo a la disminución de la relación GSH/GSSG que se reflejó en un incremento del GO de AF/As, debido a un incremento en el contenido de GSSG (Tabla 5). El aumento en el contenido de GSSG en tallos y raíces de plantas AF/As, sugieren que el As^V es reducido a As^{III} a expensas de la oxidación de GSH. Esta reacción es indispensable para la conjugación del GSH con As (Mishra *et al.* 2016; Paulose *et al.* 2013), lo cual confirma su papel clave como poder reductor en la detoxificación de As^V en *A. farnesiana*. En raíces, aunque el contenido de GSSG también se incrementó (10-13 veces) en plantas bajo estrés, independientemente de la presencia de la bacteria, la relación GSH/GSSG no se afectó, encontrando valores similares entre las plantas AF/As y las plantas sin estrés e, incluso, un valor mayor (11.1) en las plantas asociadas AF+/As, con respecto al resto de los tratamientos. Lo anterior, puede atribuirse a los altos niveles de GSH encontrados en las plantas expuestas a As^V, particularmente en raíces de plantas en simbiosis, donde el sistema de detoxificación a expensas de GSH podría estar aumentado, resultando en una mayor bioacumulación de As, con respecto a la observada en las plantas AF/As.

El contenido más alto de GSH_T tanto en tallos (878.2 ± 57.2 nmol g⁻¹ FW), como en raíces (2815.3 ± 344.4 nmol g⁻¹ FW) encontrado en plantas AF+/As, corroboran que el GSH juega un papel clave en la tolerancia de *A. farnesiana* cuando está en simbiosis con *M. oryzae*. Esto sugiere que la cepa bacteriana estimula la biosíntesis de GSH y el mantenimiento de su forma reducida, probablemente a través del incremento de la abundancia y/o la actividad de las proteínas relacionadas con el metabolismo del GSH y los aminoácidos involucrados en su

biosíntesis, por ejemplo cisteína. Lo anterior podría contribuir al mantenimiento de la reserva de GSH y de la formación de conjugados tiolados.

Por otro lado, en raíces se encontraron dos proteínas únicas de las plantas AF+, ambas relacionadas con la biosíntesis de GSH y cisteína (Tabla 7). La regulación de dichas proteínas con actividad enzimática, es importante debido a que el mantenimiento del estado redox celular en plantas bajo estrés por As, depende en gran medida de la concentración de GSH, cuya conjugación con el As es un mecanismo clave de detoxificación (Ahsan *et al.* 2008). En este sentido, la asociación con la bacteria redujo el estrés oxidante causado por el As^V, en ambos tejidos, manteniendo el GO y el E_{nc} de plantas bajo estrés sin cambios significativos con respecto a los valores encontrados en plantas sin estrés (Tabla 5).

6.2.6 Actividad Glutación S-transferasa (GST)

Unas de las enzimas antioxidantes que se han reportado implicadas en la respuesta vegetal a la toxicidad por As, son las GST (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Estas enzimas multifuncionales, pueden participar principalmente de dos formas en la tolerancia al As en las plantas: catalizando la formación de conjugados As^{III}-GS₃, y el metabolismo de las ERO sobreproducidas por la toxicidad de As, a través de su actividad peroxidasa (Dubey *et al.* 2016; Halušková *et al.* 2009). En el presente estudio, tanto la exposición a As^V como la presencia de *M. oryzae*, modificaron la actividad GST en tallos y raíces de *A. farnesiana*. El As^V estimuló la actividad (>5 veces) en ambos órganos (Figura 13 A). La actividad de estas enzimas se ha encontrado inducida en diversas plantas bajo estrés por EPT (Halušková *et al.* 2009; Mokgalaka-Matlala *et al.* 2009; Alcántara-Martínez *et al.* 2016) pero también se ha encontrado disminuida dependiendo de la concentración del EPT y del tiempo de exposición. Por ejemplo, Mokgalaka-Matlala *et al.* (2009) reportan que la actividad GST disminuyó en raíces de *Prosopis* sp. expuestas a concentraciones de 10- 50 mg As^V L⁻¹, y Mishra *et al.* (2008) encontraron una disminución de la actividad enzimática en plantas de *Ceratophyllum demersum* expuestas a 250 µM durante 2-7 días.

Previamente se demostró en *A. farnesiana* expuesta a As^V (580 µM As), que la actividad GST se correlaciona de manera positiva con el incremento del contenido de malondialdehído y la actividad POX (Alcántara-Martínez *et al.* 2016). Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran que las GST intervienen como parte de los mecanismos de defensa contra el estrés por As en *A. farnesiana*. Particularmente en raíces, las GST podrían participar de manera importante en la formación de conjugados As^{III}-GS₃, ya que en este tejido se detectó una mayor concentración de As, un mayor contenido de GSH y una mayor actividad GST en plantas bajo estrés, con respecto a lo encontrado en tallos (Figura 13 A). Estos resultados también podrían relacionarse con la abundancia diferencial de GST en los tejidos vegetales, por ejemplo, Gong

et al. (2009) encontraron que transcritos de GST son más abundantes en las raíces que en otros órganos vegetales (Gong *et al.* 2005).

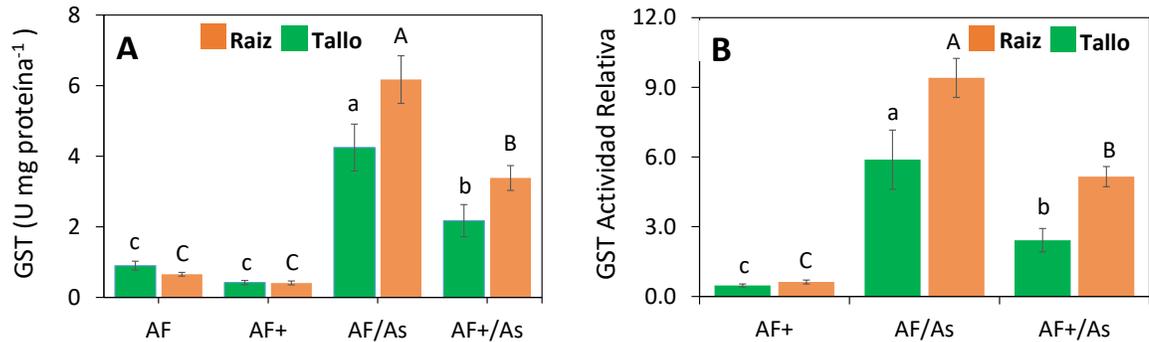
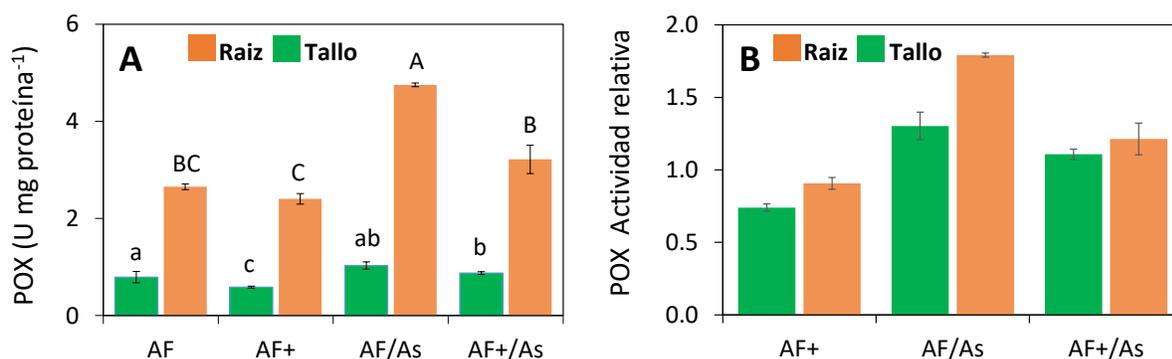


Figura 13. Actividad GST en tallos y raíces de *A. farnesiana*. A) Actividad específica; B) Actividad relativa. Las diferencias significativas entre tratamientos se señalan con letras diferentes (promedio \pm DE, $p < 0.05$).

La presencia de la bacteria disminuyó la actividad GST independientemente del estrés por As. En plantas expuestas al metaloide, *M. oryzae* disminuyó la actividad enzimática alrededor de 1.9 veces en tallos y 1.8 veces en raíces, con respecto a las plantas no asociadas. Este mismo efecto se observó en plantas sin estrés por As^V (~2.1 en tallos y 1.6 en raíces), aunque el efecto no fue significativo (Figura 13). De hecho, se ha reportado que algunas GST de las plantas pueden ser disminuidas en abundancia por MOs rizosféricos (Farinati *et al.* 2009). Por otro lado, la disminución significativa de la actividad GST en AF+/As con respecto a AF/As, en ambos tejidos podría ser resultado del mejoramiento de la salud de la planta mediada por la bacteria (Farinati *et al.* 2009). Además, al menos en tallos, la disminución de la actividad GST debida a la simbiosis, podría conducir al incremento del contenido de As, ya que se ha demostrado que la baja expresión de esta enzima puede dar como resultado un aumento de la translocación del metaloide (Dubey *et al.* 2016). Cabe resaltar que, tanto en raíces como en tallos, la actividad relativa GST fue mayor en plantas AF/As, con respecto a la calculada para AF+/As (Figura 13 B). Este resultado sugiere que, aunque el estrés por As^V estimula la actividad de esta enzima, la presencia de *M. oryzae* la modula de manera importante, influyendo en la respuesta destoxicante de *A. farnesiana*. Al respecto, se ha demostrado que algunos MOs endófitos pueden modificar la actividad GST de plantas (Zhang *et al.* 2010; Mendarte-Alquisira *et al.* 2016), similar al presente trabajo. Por ejemplo, Mendarte-Alquisira *et al.* (2016), encontraron que la inoculación de plantas de *Festuca arundinacea* con el hongo endófito *Lewia* sp. disminuyó la actividad GST en tallos y raíces de plantas expuestas a estrés por hidrocarburos.

6.2.7 Actividad Peroxidasa total (G-POX)

Las peroxididasas son enzimas que pueden eliminar hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos, producidos en respuesta al estrés oxidante. Por ello, varios estudios consideran su actividad como un método útil para evaluar la respuesta antioxidante de una planta a la presencia de EPT (Liu *et al.* 2009; Mishra *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2005). En *A. farnesiana*, al igual que la actividad GST, la actividad POX fue modificada por la exposición a As^V y la presencia de la bacteria. Las plantas bajo estrés por As^V mostraron hasta 1.7 veces más actividad en tallos, y hasta 1.9 veces más actividad en raíces, con respecto a las plantas control (Figura 14). El incremento de actividad POX, indica que los niveles de H_2O_2 se incrementaron por efecto del As, lo que coincide con el incremento significativo del nivel de H_2O_2 en raíces de AF/As, siendo este tejido el primero en tener contacto con el As y en donde los mecanismos de defensa contra el estrés se activan primero. Adicionalmente, el aumento de la actividad de estas enzimas sugiere un control del estrés oxidante evitando una sobre producción de ERO, reflejado en niveles similares de H_2O_2 entre tallos de plantas bajo estrés y aquellos de plantas control. El incremento en la actividad POX ya se ha reportado anteriormente en diversas plantas expuestas a As^V y metales como Pb. Por ejemplo, en los helechos *P. ensiformis* y *N. exaltata* se encontró un aumento en la actividad POX al cabo de 15 días de exposición a 300 μM As^V en frondes, raíces y rizoma (Srivastava *et al.* 2005). En plantas de maíz se registró un incremento de actividad POX en tallos y raíces por efecto de As; en raíces, este incremento se correlacionó de forma positiva con el aumento de la concentración de As (25-100 $mg\ Kg^{-1}$) en el suelo (Yu *et al.* 2009). Particularmente en *A. farnesiana*, Solis-Ibarra (2009) reportó un estímulo en dicha actividad enzimática, en brotes y raíces en plantas expuestas a Pb (100 $mg\ L^{-1}$) durante 5-60 días.



Diversos estudios han demostrado que la actividad POX es variable, dependiendo de distintos factores, uno de ellos es el tejido vegetal. En general, la actividad POX de *A. farnesiana* fue

mayor en las raíces que en los tallos, aún en ausencia de As. Este resultado se observó anteriormente en plantas de *F. arundinacea* crecida en medio MS por 7 días (Mendarte-Alquisira *et al.* 2016) y en los helechos *P. ensiformis* y *N. exaltata* crecidos en medio hidropónico sin estrés, así como en el mismo medio contaminado con 300 $\mu\text{M As}^{\text{V}}$ (Srivastava *et al.* 2005).

Otro de los factores que puede modular la actividad POX, incluso en plantas bajo estrés, es la presencia de MOs (Baptista *et al.* 2007; Yu *et al.* 2009; Mendarte-Alquisira *et al.* 2016). En *A. farnesiana*, la presencia de la bacteria disminuyó significativamente la actividad enzimática en tallos de plantas sin estrés (AF+) y en raíces de plantas expuestas a As^{V} (AF+/As), con respecto a plantas sin inocular. En plantas AF+/As, la disminución de actividad POX mediada por la bacteria, puede relacionarse con los niveles bajos de H_2O_2 detectados en dichas plantas, en comparación con la actividad registrada en las plantas no inoculadas. Lo anterior, puede indicar un control del estrés oxidante mediado por *M. oryzae*, principalmente en la raíz, tal como se observa en tallos y raíces de plantas de maíz expuestas a 50 y 100 mg Kg^{-1} de As en el suelo (Yu *et al.* 2009). Por otro lado, en las plantas asociadas que crecieron sin estrés (AF+), la disminución de la actividad POX podría relacionarse con el complejo proceso de simbiosis. Se sabe que en plantas inoculadas con MOs endófitos, la disminución de actividad POX podría estar relacionada al incremento de H_2O_2 , ya que la acumulación de esta ERO puede resultar de una disminución de las actividades de enzimas que eliminan ERO, entre ellas, las POX (Baptista *et al.* 2007).

Similar a lo encontrado en la actividad GST, tanto en raíces como en tallos, la actividad relativa POX fue mayor en plantas AF/As (Figura 14 B), con respecto a la estimada para plantas AF+/As; lo anterior sugiere que el As^{V} incrementa la actividad peroxidasa de *A. farnesiana* y la presencia de *M. oryzae* podría regular de manera importante la defensa antioxidante vegetal.

6.3 Etapa 3. Proteoma intracelular de *A. farnesiana*

El estudio de los cambios inducidos en el proteoma vegetal, debidos a un estímulo ambiental o a la colonización de MOs durante el establecimiento de una simbiosis, puede ayudar a comprender los mecanismos celulares que le permiten a la planta aclimatarse a diferentes tipos de estrés, de naturaleza tanto biótica como abiótica. Varios estudios han reportado cambios en el proteoma vegetal por efecto de la inoculación con hongos y bacterias benéficas para el crecimiento (Bona *et al.* 2010; Chi *et al.* 2010). Sin embargo, los estudios acerca del efecto de bacterias endófitas sobre el proteoma de plantas tolerantes al As aún son escasos. En este trabajo se discute el efecto del estrés por As^{V} y de la presencia de *M. oryzae* en el proteoma de tallos y raíces de *A. farnesiana*. Debido a que las muestras se analizaron a través de diferentes métodos para cada tejido, esta sección se divide en dos capítulos que presentan, por separado, los cambios en el proteoma de tallos y aquellos encontrados en raíz. En cada capítulo, se describe el efecto general del As^{V} , de la bacteria y de ambos en conjunto sobre el proteoma

intracelular. Posteriormente, se realiza un análisis de la regulación diferencial de proteínas identificadas, dividido en subcapítulos que corresponden a diferentes tipos de metabolismo intracelular. Debido a la importancia biológica que implica una simbiosis, se incluye un subcapítulo donde se consideran las proteínas de respuesta a MOs.

6.3.1 Cambios diferenciales en el proteoma de tallos

En el análisis de las muestras de tallo, la identificación de proteínas después de su separación por electroforesis 1-D permitió detectar 119 proteínas intracelulares (Anexo 1). Las proteínas identificadas se clasificaron en seis categorías basadas en su principal función documentada, de las cuales, metabolismo de carbohidratos fue la categoría con mayor número de proteínas (Figura 15 A). Se identificaron 23 proteínas únicas de AF+ y 1 proteína única de AF (subunidad IV del centro de reacción del fotosistema I) (Figura 15 B y Anexo 1).

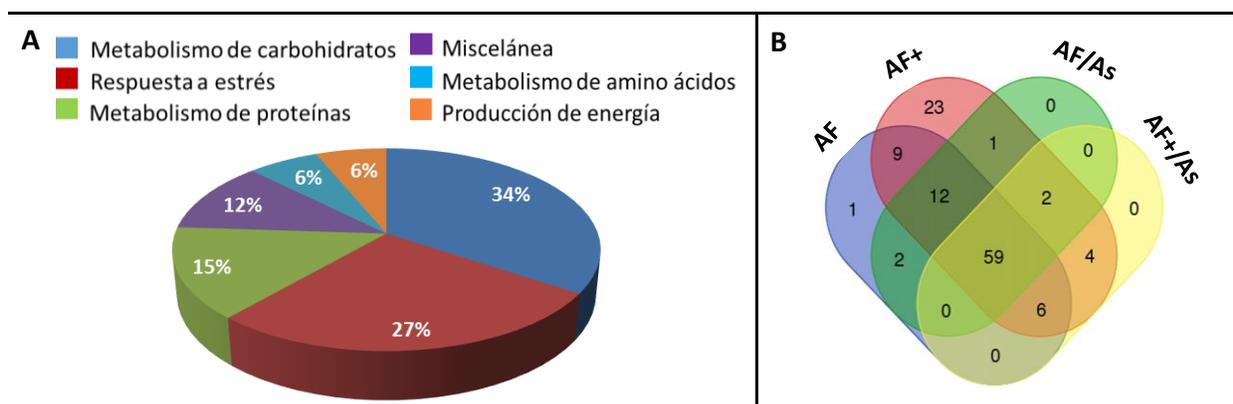


Figura 15. Clasificación de proteínas identificadas en tallos. A) Clasificación en las diferentes categorías de acuerdo con su función principal, total de proteínas identificadas por LC-MS/MS: 119. B) Diagrama de Venn de la distribución de proteínas, se muestra el número de proteínas compartidas entre diferentes tratamientos y únicas por tratamiento.

Los resultados del análisis del proteoma intracelular de tallos de *A. famesiana* muestran que el As^V reguló de manera diferencial 62 proteínas, de las cuales, 19 fueron sobre-reguladas y 43 bajo-reguladas (Tabla 6). Este resultado indica un efecto tóxico del As^V en el proteoma del tallo, reflejado en una represión general de la síntesis de proteínas. Un resultado similar se observó en la parte verde de *Zea mays* y frondes de *P. vittata* expuestas a As (Bona *et al.* 2010; Requejo y Tena, 2006). Las proteínas con el nivel más alto de regulación por efecto del As^V, fueron una forma cloroplástica de una peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPI), regulada positivamente (RSAF: 7), y dos formas mitocondriales de malato deshidrogenasa (mMDH), reguladas negativamente (-62 y -61).

La presencia de la bacteria (AF+), indujo la regulación diferencial de 81 proteínas, de éstas, 72 se encontraron sobre-reguladas y 9 bajo-reguladas (Tabla 6). Estos resultados se relacionan

con el efecto de un MO endófito en el proteoma vegetal durante el establecimiento de la simbiosis, pues durante este proceso, los MOs pueden inducir en las plantas la expresión de genes involucrados en la producción de antioxidantes y proteínas relacionadas al metabolismo de carbono y nitrógeno (Wani *et al.* 2015), que resulta en un incremento en la síntesis de proteínas y cambios metabólicos por efecto de los MOs endófitos.

Cuando la planta creció asociada con la bacteria y bajo estrés por As^V, se encontraron 39 proteínas sobre-reguladas y 22 bajo-reguladas. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de *M. oryzae* protege a *A. farnesiana* del estrés por As^V ya que, en general, la endosimbiosis reguló positivamente las mismas proteínas que el As^V reguló negativamente. A continuación se analiza la regulación diferencial de proteínas en cada tipo de metabolismo.

Tabla 6. Proteínas reguladas diferencialmente en tallos de *A. farnesiana*, identificadas por LC-MS/MS.

No. Acceso ^a / Especie vegetal	Proteína	Proceso específico / función	PT ^b	CS% ^c	Σ(RSAF) _k (x10 ³)	Regulación ^d : valor de (RSAF) _k		
						AF/As	AF+	AF+/As
Metabolismo de carbohidratos								
NP_001237329 / <i>Glycine max</i>	Enolasa (cl)	Glicólisis / gluconeogénesis	1071	23.2	42.4	-9.3	3.0	1.2
XP_003619643 / <i>Medicago truncatula</i>	Enolasa (c)		260	9.3	2.1	-6.0	2.3	1.3
AFK43733 / <i>M. truncatula</i>	Sin caracterizar (c)	Glicólisis / Actividad Enolasa	403	11.6	7.0	nd	6.0	5.6
AHA84226 / <i>Phaseolus vulgaris</i>	TPI (c)	Glicólisis / gluconeogénesis / fijación de carbono	317	15.0	3.3	-2.7	1.5	-2.5
XP_003554399 / <i>G. max</i>	TPI, cloroplástica		335	17.2	3.4	-1.3	3.8	1.0
ACU17423 / <i>G. max</i>	TPI (ch)		234	13.9	14.3	-1.5	4.3	-3.0
XP_003596092 / <i>M. truncatula</i>	Proteína topo PGK (c)	Aldolasa fructosa-bisfosfato, isozima citoplásmica (parcial)	343	16.5	4.2	2.0	13.5	10.0
XP_003596091 / <i>M. truncatula</i>	Proteína similar a PGK (ch)		307	15.0	4.5	-2.0	2.6	4.4
XP_003531483 / <i>G. max</i>	Proteína similar a PGK (c)		255	21	9.0	-2.3	3.3	4.7
XP_003521445 / <i>G. max</i>	Aldolasa fructosa-bisfosfato, isozima citoplásmica (parcial)	Glicólisis / gluconeogénesis / VPF	235	15.8	1.0	nd	3.5	nd
XP_013455946 / <i>M. truncatula</i>	aldolasa Fructosa-bisfosfato clase I (cl)		91	3.3	0.5	nd	-2.0	nd
AFK34348 / <i>Lotus japonicus</i>	Sin caracterizar (c)	Glicólisis / actividad aldolasa fructosa-bisfosfato	93	4.7	6.5	-2.0	1.9	3.3
NP_001243291 / <i>G. max</i>	MDH [EC 1.1.1.37], tipo citoplásmica	Ciclo ATC / metabolismo del piruvato / metabolismo de Cys y Met	633	29.2	45.4	-4.6	1.0	1.0
XP_003590025 / <i>M. truncatula</i>			526	25.9	9.0	1.5	5.8	3.4
AAO15574 / <i>Lupinus albus</i>	MDH (c)		636	20.8	11.9	1.1	2.3	2.6
AIY53988 / <i>Stylisanthes guianensis</i>	MDH (m)		590	19.9	12.8	-1.1	2.4	2.7
XP_006592546 / <i>G. max</i>	MDH, mitocondrial		302	16.5	7.6	-61.0	-3.1	-61.0
XP_006579529 / <i>G. max</i>	Similar a MDH cloroplástica		268	12.8	8.2	-62.0	-2.8	-15.5
XP_006579529 / <i>G. max</i>	Similar a MDH cloroplástica	Metabolismo del piruvato / fijación de carbono	144	5.6	0.5	nd	-3.0	-1.5
ABQ10186 / <i>Caragana jubata</i>	Subunidad β de succinil-Coa ligasa (m)	Ciclo ATC	146	3.6	2.0	-2.0	1.5	1.5
Q40345 / <i>M. sativa</i>	Precursor de la deshidrogenasa de isocitrato, parcial (ch)	Ciclo ATC / metabolismo de GSH	99	3.0	0.4	nd	4.0	1.0
ABY87038 / <i>Acmispon americanus</i>	Fosfogluconato deshidrogenasa, parcial (c)	VPF (fase oxidativa) / metabolismo de GSH	199	19.1	1.9	1.0	6.0	nd
AGV54320 / <i>P. vulgaris</i>	Proteína similar a transaldolasa (cl)	VPF (fase no oxidativa)	292	7.9	1.1	1.3	1.8	nd

No. Acceso ^a / Especie vegetal	Proteína	Proceso específico / función	PT ^b	CS% ^c	Σ(RSAF) _k (x10 ³)	Regulación ^d : valor de (RSAF) _k		
						AF/As	AF+	AF+/As
XP_003621050 / <i>M. truncatula</i>	Proteína de la familia transaldolasa (cl)		215	7.2	1.1	1.0	1.2	nd
AFZ76979.1 / <i>Astragalus membranaceus</i>	UDP-glucosa pirofosforilasa 1 (c)	Interconversión Pentosa -	288	9.8	2.3	1.3	6.0	3.0
ABY47902 / <i>M. sativa</i>	Glucanasa ácida (v)	Metabolismo de glucano	69	4.9	1.8	2.0	5.5	2.0
AFY08285 / <i>Acacia koa</i>	Quitinasa Clase II (extr)	Metabolismo de azúcares aminos y azúcares nucleótidos / Vía de señalización MAPK	212	10.5	1.4	nd	2.5	2.0
XP_013446334 / <i>M. truncatula</i>	Quitinasa Clase Ib (cl)		61	5.2	1.2	nd	11.0	nd
XP_003597523 / <i>M. truncatula</i>	Proteína de la familia carbohidrato cinasa pfkB (extr)	Metabolismo de fructosa y mannososa / metabolismo de D-ribosa	392	19.8	3.9	-1.4	1.9	-2.5
Producción de energía								
NP_001276136 / <i>G. max</i>	Similar a potenciador de evolución de oxígeno 2, cloroplástico	Fotosíntesis	319	14.7	21.5	-4.9	-1.5	-5.9
AGO44143 / <i>Glycine cyrtoloba</i>	Subunidad β de la ATP sintasa CF1 (cl)	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	259	13.1	1.1	nd	-7.0	-7.0
XP_003592582 / <i>M. truncatula</i>	ATP sintasa tipo FOF1, subunidad β (m)		145	6.6	0.6	nd	1.0	-1.3
ACZ74707 / <i>P. vulgaris</i>	Anhidrasa carbónica (cl)	Hidratación reversible de CO ₂ a ácido carbónico	206	13.0	1.8	-3.0	1.3	-2.0
ACJ84218 / <i>M. truncatula</i>	Sin caracterizar (c)	Fotosíntesis / Estabilización del fotosistema II	76	10.0	1.7	-2.0	nd	nd
Metabolismo de aminoácidos								
AAQ08403 / <i>G. max</i>	MetH [EC 2.1.1.14] (m)	Metabolismo de Cys y Met / metabolismo de homocisteína	883	18.0	10.9	-2.2	10.1	1.7
AIE47233 / <i>Pisum sativum</i>	MetH independiente de Vitamina B ₁₂ (c)	Biosíntesis de Met	700	12.6	10.1	-2.5	9.1	1.7
AAO89238 / <i>M. truncatula</i>	S-adenosilhomocisteinasa [EC 3.3.1.1] (c)	Metabolismo de Cys y Met	374	12.8	9.4	-2.2	3.7	2.0
AAO89237 / <i>M. truncatula</i>			198	7.6	7.8	-1.3	3.6	2.1
AAA33942 / <i>G. max</i>	Aspartato aminotransferasa, [EC 2.6.1.1] (cl)	Biosíntesis de Arg / Metabolismo de Ala, Asp y Glu / Metabolismo de Cys y Met	242	8.4	0.9	-2.0	1.8	nd
Metabolismo de proteínas								
AGS78050 / <i>Aeschynomene deamii</i>	Ciclofilina -1 (c)		452	30.8	48.1	1.1	5.0	2.6
XP_003604030 / <i>M. truncatula</i>	PPlasa [EC 5.2.1.8] (c)		161	15.7	6.0	1.0	9.7	-3.0
XP_003537761 / <i>G. max</i>	Similar a PPlasa 1-(c)	Chaperona / Plegamiento de proteína / Señalización celular	172	21.5	32.1	-2.0	3.3	2.5
XP_003522746 / <i>G. max</i>	Similar a PPlasa 1 (ch)		181	12.9	34.5	-2.2	3.3	2.3
XP_016187917 / <i>Arachis ipaensis</i>	Similar a PPlasa (cl)		255	26.2	39.7	-1.8	3.1	2.1
XP_015952684 / <i>A. duranensis</i>			480	34.3	17.7	2.1	8.0	-1.1
KHN43398 / <i>G. soja</i>	PPlasa, cloroplástica		194	10.8	19.4	7.0	88.0	63.0
ACF74274 / <i>Arachis hypogaea</i>	Proteína similar a GroES, parcial (cl)	Plegamiento de proteína / Regulación positiva de actividad SOD	111	5.9	11.2	-1.1	1.3	1.3
ACB87490 / <i>Mucuna pruriens</i>	Mucunaína (ch)	Proteólisis / Actividad peptidasa tipo Cys	182	3.8	5.3	-1.6	1.3	1.4
AES70316 / <i>M. truncatula</i>	Proteína similar a hidrolasa péptido-Acil [EC 3.4.19.1] (ch)	Proteólisis / Actividad peptidasa tipo Ser	109	1.8	1.5	3.0	11.5	1.5
XP_013459798 / <i>M. truncatula</i>	Proteína similar a ácido perclórico soluble inhibidor de la traducción (cl)	Inhibición de translación de proteínas / Fotosíntesis y cromoplastogénesis	436	27.1	95.8	1.7	6.3	12.8
ACF74362 / <i>A. hypogaea</i>	Ácido perclórico soluble inhibidor de la traducción (cl)		320	16.4	129.4	1.3	2.4	4.3

No. Acceso ^a / Especie vegetal	Proteína	Proceso específico / función	PT ^b	CS% ^c	Σ(RSAF) _k (x10 ³)	Regulación ^d : valor de (RSAF) _k		
						AF/As	AF+	AF+/As
ABM73376 / <i>P. sativum</i>	Ran1 (c)	Transporte de proteína / Unión de GTP	197	21.7	2.4	1.0	13.0	2.0
Respuesta a estrés								
AES92484 / <i>M. truncatula</i>	Proteína de choque térmico 70 kDa (c)	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico / Spliceosoma	389	9.3	0.6	-	12.0	-
ACD44386 / <i>Vigna luteola</i>	APX [EC 1.11.1.11], parcial (c)		235	18.1	11.1	-3.0	1.3	-1.8
AAY22486 / <i>Phaseolus lunatus</i>	APX, parcial (c)	Metabolismo de ASC y GSH /	226	25.0	9.0	1.0	3.3	-2.0
AAN60069 / <i>Retama raetam</i>	APX del estroma (cl)	Metabolismo de H ₂ O ₂	161	7.5	1.1	1.0	5.0	nd
AFN21424 / <i>Macrotyloma uniflorum</i>	APX (c)		113	9.6	0.6	-3.0	1.7	nd
XP_003615163 / <i>M. truncatula</i>	Proteína del lumen tilacoidal 29 kDa [EC 1.11.1.11] (cl)	Actividad peroxidasa L-ascorbato / Metabolismo de ASC y GSH	60	3.1	0.6	1.5	1.0	nd
XP_003557022 / <i>G. max</i>	MDHAR [EC 1.6.5.4] (cl)	GSH-ASC cycle	178	19.2	8.1	3.0	45.0	nd
ACZ56426 / <i>Vigna radiata</i>	2-Cys peroxidoredoxina BAS1, tipo cloroplástica	Metabolismo de GSH/	206	11.9	1.9	nd	7.0	nd
KHN20663 / <i>G. soja</i>	Peroxiredoxina-2B (c)	Metabolismo de H ₂ O ₂	146	20.4	15.9	-1.9	1.5	-1.2
XP_013464343 / <i>M. truncatula</i>	GST [EC 2.5.1.18], dominio amino-terminal (c)		226	8.2	48.8	-2.0	1.8	2.3
XP_013464347 / <i>M. truncatula</i>		Metabolismo de GSH	204	13.2	32.0	-2.2	1.5	2.2
ACL80571 / <i>G. max</i>	GST (c)		120	8.3	3.9	-2.1	1.4	1.9
ACA83740 / <i>Prosopis juliflora</i>	GST inducible por auxina (c)		172	12.2	34.2	-1.5	7.3	nd
XP_003610447 / <i>M. truncatula</i>	Proteína similar a		110	8.2	0.9	1.0	7.0	nd
XP_013462837 / <i>M. truncatula</i>	Lactoilglutación liasa [EC 4.4.1.5] (c)		179	15.7	3.8	-4.0	3.5	3.5
XP_003630757 / <i>M. truncatula</i>	Proteína similar a Lactoilglutación liasa (cl)	Metabolismo de piruvato / Biosíntesis de GSH /Vía del glioxal	138	7.5	3.5	-4.3	-1.2	-1.2
XP_004503461 / <i>Cicer arietinum</i>	Probable Lactoilglutación liasa, isoforma cloroplástica X1		100	5.8	1.7	-6.0	1.3	-1.5
AFK34350 / <i>L. japonicus</i>	Sin caracterizar (c)		84	6.0	10.1	3.2	4.0	-1.5
ACA23469 / <i>Arachis diogoi</i>	SOD Cu-Zn, parcial (c)	Actividad Superóxido dismutasa	67	12.0	1.5	-	4.0	nd
AAL32441 / <i>M. sativa</i>	Precursor SOD-Fe [EC 1.15.1.1] (cl)		138	5.8	5.2	1.4	1.1	-1.3
XP_003621684 / <i>M. truncatula</i>	Proteína oxidoreductasa de la familia Aldo / ceto reductasa (c)	Metabolismo de productos de peroxidación de lípidos / Biosíntesis de la hormona esteroide	246	8.3	2.3	-1.3	2.8	1.8
XP_003621701 / <i>M. truncatula</i>			201	11.2	2.2	-1.3	3.0	1.0
ACE00594 / <i>Leucaena leucocephala</i>	Peroxidasa de biosíntesis de lignina (cl)	Síntesis de lignina / Metabolismo de H ₂ O ₂	126	7.6	0.8	nd	1.7	nd
NP_001236067 / <i>G. max</i>	Proteína sin caracterizar LOC100526924 (cl)	Actividad Tioredoxina-disulfido reductasa / Homeostasis redox celular	68	6.0	2.6	-1.5	3.0	-3.0
ACU18144 / <i>G. max</i>	Proteína sin caracterizar putativa (cl)	Actividad oxidoreductasa	85	4.1	4.3	1.0	-1.1	1.6
Miscelánea								
AGV54397 / <i>P. vulgaris</i>	Cinasa 1 Nucleósido difosfato [EC 2.7.4.6] (c)	Metabolismo de nucleótidos / Vía de señalización MAPK	401	20.1	9.8	2.0	5.8	2.8
XP_004489907 / <i>C. arietinum</i>	Proteína similar a 2-metileno-furano-3-uno reductasa (c)	Biosíntesis de metabolitos secundarios	262	4.0	2.6	1.4	1.8	1.2
XP_013448875 / <i>M. truncatula</i>	Proteína Rossmann de plegamiento de unión a NAD(P) (cl)	Unión de FMN / Actividad NAD(P)H dehidrogenasa (quinona)	320	14.9	10.9	-2.6	1.0	-2.0
KHN45736 / <i>G. soja</i>	Flavoproteína wrbA (n)	Biosíntesis de ubiquinona y metabolitos secundarios/	262	16.9	2.5	1.0	12.0	2.0
AGV54245 / <i>P. vulgaris</i>	Flavoproteína wrbA (cl)	Regulación negativa de la	74	7.9	0.5	nd	2.0	nd

No. Acceso ^a / Especie vegetal	Proteína	Proceso específico / función	PT ^b	CS% ^c	$\Sigma(\text{RSAF})_k$ (x10 ³)	Regulación ^d : valor de (RSAF) _k		
						AF/As	AF+	AF+/As
		transcripción						
KHN20627 / <i>G. soja</i>	Porfobilinógeno deaminasa, cloroplástica	Vía de biosíntesis de tetrapirrol / Biosíntesis de clorofila	77	3.7	0.7	1.0	2.0	nd
XP_013465166 / <i>M. truncatula</i>	Proteína arabinogalactana tipo fasciclina (cl)	Adhesión celular	139	4.4	0.6	-2.0	1.0	nd
KHN36673 / <i>G. soja</i>	Proteína arabinogalactana tipo fasciclina 6 (extr)		77	4.0	1.0	nd	1.7	nd
AES67111 / <i>M. truncatula</i>	Proteína hipotética MTR_2g086910 (c)	Desconocida	121	13.3	21.6	1.1	-1.8	4.6
AFK43105 / <i>L. japonicus</i>	Sin caracterizar (cl)		82	4.4	1.9	-3.0	3.3	-3.0

^a Obtenido del NCBI; ^b puntaje total; ^c cobertura de secuencia (%), ^d AF/As: plantas de *A. farnesiana* (AF) expuestas a As^V; AF+: plantas inoculadas con *M. Oryzae*; AF+/As: AF+ plantas expuestas a As^V. Todos los tratamientos fueron comparados con tallos de AF. Sobre regulación (valores en color verde) y bajo regulación (valores en color rojo) son representados por signos positivos y negativos, respectivamente; nd: no detectado. VPF: Vía de pentosas fosfato; Ciclo ATC: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; Meth: metionina sintasa; APX: Ascorbato peroxidasa; PGK: fosfoglicerato cinasa.

6.3.1.1 Metabolismo de carbohidratos y producción de energía

Debido a su importancia en el crecimiento, las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos se reportan frecuentemente en los estudios de proteómica de plantas que crecen bajo estrés biótico y abiótico (Kosová *et al.* 2011). Entre los resultados reportados, se han observado niveles bajos de dichas proteínas en especies tolerantes expuestas a estrés abiótico (Rodziewicz *et al.* 2014). En este trabajo, se encontró que en los tallos de *A. farnesiana*, la mayoría de las enzimas glicolíticas y varias de las que participan en el ciclo de los ATC (ácidos tricarboxílicos) fueron bajo-reguladas por el As, lo que se relaciona con una de las principales consecuencias de la toxicidad del As en los tejidos fotosintéticos de las plantas: una represión general de la síntesis de proteínas (Requejo y Tena, 2006; Bona *et al.* 2010). Por otro lado, la sobre-regulación de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, mediada por la bacteria, indica que *M. oryzae* puede contribuir en el control del efecto tóxico del As^V, principalmente en el citosol y cloroplastos. Tres proteínas con actividad PGK y tres enolasas se sobre-regularon en los tallos AF+, independientemente de la exposición de As^V. La sobre-regulación mediada por la bacteria de las PGK y enolasas citosólicas, podría relacionarse con la producción de energía durante condiciones de estrés (Dixit *et al.* 2015), ya que éstas participan en las últimas etapas de la glicólisis. Por otro lado, la sobre-regulación de enolasas cloroplásticas podría ser importante para la síntesis de aminoácidos, ya que ésta participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos por la vía del ácido shikímico, mientras que la sobre regulación de las PGK cloroplásticas, que catalizan la primera reacción en la fase de reducción del ciclo de Calvin, podría estar conectada con un incremento de fijación de CO₂, influenciado por la bacteria (Rodziewicz *et al.* 2014). Lo anterior, junto con la sobre-regulación de una

anidrasa carbónica, puede contribuir con la actividad fotosintética en *A. farnesiana*, lo cual se refleja en el alto contenido de pigmentos fotosintéticos detectado en tallos de AF+ y AF+/As.

Se identificaron 7 isoformas de MDH reguladas, 4 citosólicas (MDHc), dos mitocondriales (MDHm) y una cloroplástica (MDHcl). Las diferentes formas de MDH en las células de las plantas participan en diferentes vías metabólicas, dependiendo de su localización (Gietl, 1992). Las dos mMDH, las cuales convierten malato a oxaloacetato en el ciclo de los ATC, fueron bajo-reguladas por la bacteria y el As^V, indicando una disminución principalmente en las enzimas mitocondriales involucradas en el metabolismo de carbono, particularmente en respuesta al As^V (Figura 16). No obstante, la represión de isoenzimas de mMDH, además de la sobre-regulación de PGK, podría contribuir positivamente a la actividad fotosintética en *A. farnesiana*; un resultado similar se observó en plantas transgénicas de jitomate con una expresión disminuida de mMDH (Nunes-Nesi *et al.* 2005). La regulación positiva de cMDH por la bacteria, podría indicar la producción de oxaloacetato que, además de generar moléculas con poder reductor, podría contribuir a la síntesis de aminoácidos para mantener la homeostasis celular (Dixit *et al.* 2015) (Figura 16). A diferencia de las proteínas que intervienen en la glicólisis, las involucradas en la VPF (fosfogluconato deshidrogenasa y transaldolasa) no se afectaron por el As^V, lo cual sugiere que esta vía podría contribuir a mantener niveles adecuados de NADPH para las reacciones de reducción durante la defensa vegetal al estrés oxidante (Nelson y Cox, 2005). De hecho, varios estudios muestran que plantas bajo estrés por As requieren más energía para mantener la homeostasis celular (Srivastava *et al.* 2011). De acuerdo con los resultados, en *A. farnesiana*, el ciclo de ATC y la síntesis de ATP que proviene de la fosforilación oxidativa podrían estar dañados por efecto del As^V, de tal manera que la mayor parte de la energía celular podría ser generada por la fotosíntesis y la glicólisis. Además, equivalentes reductores producidos a través la VPF, cuyas enzimas no se modificaron por el As^V y equivalentes reductores producidos durante la fase lumínica de la fotosíntesis y trasladados al citosol a través de la lanzadera malato/ oxaloacetato, pueden servir para fortalecer el sistema antioxidante y para la producción de energía en tallos de *A. farnesiana*, en respuesta al estrés por As (Dixit *et al.* 2015).

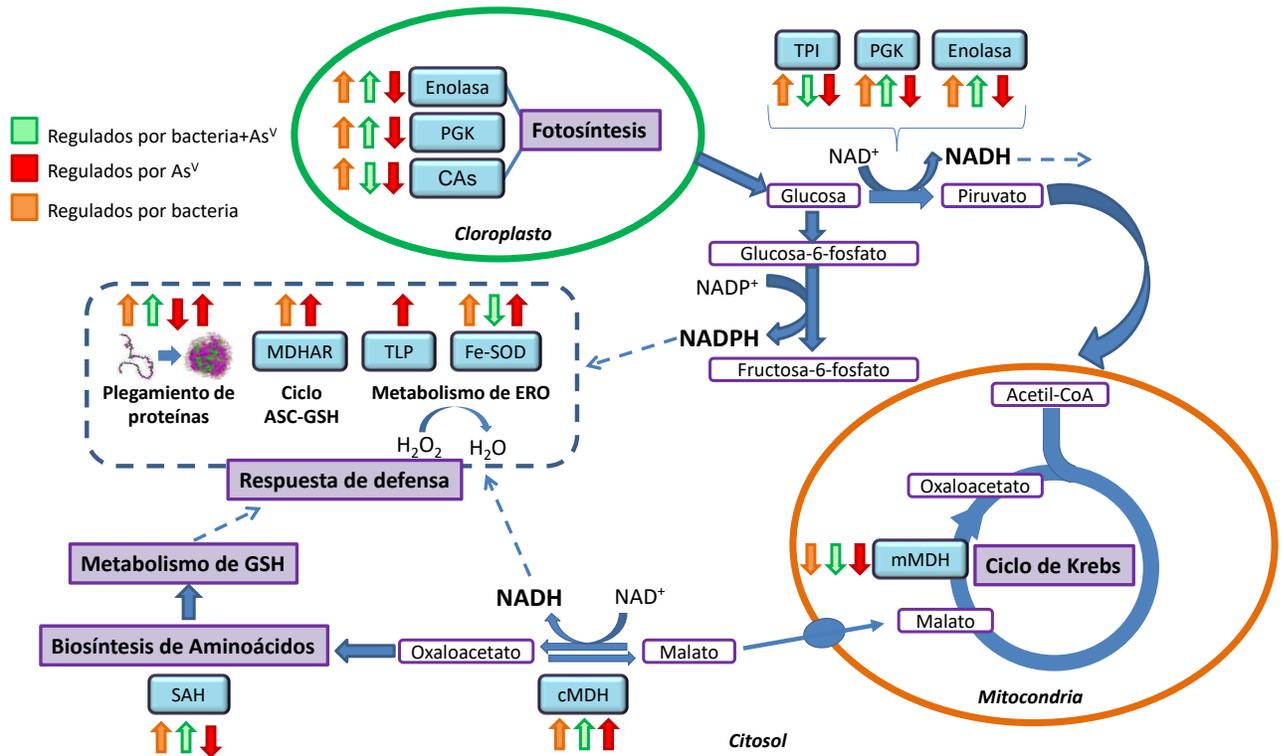


Figura 16. Esquema que resume los principales cambios encontrados en algunas rutas metabólicas intracelulares de tejido de tallo, basado en el análisis proteómico. Las flechas hacia arriba indican regulación positiva de las proteínas (sobre-regulación) y flechas hacia abajo indican que las proteínas se encuentran reguladas negativamente (bajo-regulación). El As^V afecta negativamente la mayoría de las enzimas relacionadas al metabolismo de carbohidratos y a algunas del metabolismo de aminoácidos, mientras que la simbiosis con *M. oryzae* alivió este desorden metabólico, regulando positivamente enzimas involucradas en la fotosíntesis, glicólisis y metabolismo de aminoácidos, lo cual proporciona la síntesis de moléculas con poder reductor utilizadas por la defensa antioxidante, y la producción de glucosa para la respiración celular.

6.3.1.2 Metabolismo de aminoácidos

Los aminoácidos desempeñan un papel importante en la señalización y la defensa antioxidante en la respuesta de las plantas al estrés por EPT (Ahsan *et al.* 2010; Dave *et al.* 2013). La exposición al As puede inducir cambios en los aminoácidos, debido a su participación en la quelación y homeostasis celular (Dixit *et al.* 2015). Además, la acumulación de estas biomoléculas se ha identificado como parte de las estrategias adaptativas de las plantas para resistir el estrés abiótico (Rodziewicz *et al.* 2014). Lo anterior sugiere que, en situaciones de estrés también puede incrementarse la abundancia de enzimas involucradas en las vías de biosíntesis de aminoácidos, por ejemplo, en plantas bajo estrés por As , muchas de estas enzimas se han encontrado sobre-reguladas (Ahsan *et al.* 2010). Sin embargo, también hay estudios que indican que proteínas como la glutamina y la glutamato sintasa pueden bajo regularse en plantas debido al estrés por EPT (Ahsan *et al.* 2008). En tallos de *A. farnesiana*, el

estrés por As bajo-reguló todas las enzimas identificadas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Tabla 6), lo cual podría relacionarse al efecto tóxico del metaloide sobre la actividad de las enzimas (Verbruggen *et al.* 2009).

En cambio, la presencia de la bacteria sobre-reguló todas las proteínas en esta categoría, lo que implica que la presencia de la bacteria favorece el incremento en la biosíntesis de aminoácidos, relacionado con el crecimiento, desarrollo y defensa vegetal. Lo anterior puede ayudar a la planta a combatir el estrés causado por una mayor bioacumulación de As, detectada en las plantas AF+/As, en comparación a la encontrada en plantas AF/As. Al respecto, Dave *et al.* (2013) reportan que una mayor bioacumulación de aminoácidos en plantas de *Oryza sativa* se relaciona con una mayor bioacumulación de As. Los aminoácidos son producidos a través de diferentes vías metabólicas, en *A. farnesiana*, el análisis proteómico sugiere que los cloroplastos, el citosol y la mitocondria son una fuente importante de aminoácidos. Por ejemplo, se observó que en cloroplastos la aspartato aminotransferasa (AST) podría estar regulando la biosíntesis de aminoácidos a partir del oxaloacetato (Nelson y Cox, 2005) y además, la biosíntesis de aminoácidos derivados del aspartato (Phe, Tyr, Trp). Lo anterior, ya se ha reportado en plantas bajo condiciones de estrés (de la Torre *et al.* 2014), particularmente en plantas de arroz en respuesta al estrés por As^V (Ahsan *et al.* 2010).

Por otro lado, la sobre-regulación de una Meth citosólica en AF+/As y su bajo-regulación en plantas de AF/As, podría relacionarse con la síntesis *de novo* de metionina (Met) a partir de la homosisteína, así como con el mantenimiento del ciclo S-adenosil-metionina (SAM), en respuesta al incremento en la bioacumulación de As en plantas en simbiosis. Durante las reacciones de metilación, la SAM es el mayor donador de grupos metilo (Nelson y Cox, 2005) y es convertida a S-adenosil-homocisteína; ésta es hidrolizada por la S-adenosil-homocisteinasa (SAH) (sobre-regulada por la bacteria) para formar adenosina y homocisteína. La homocisteína puede ser convertida en GSH o ser metilada para producir Met por la Meth. Esta secuencia de reacciones constituye un ciclo que es parte del metabolismo general de los aminoácidos derivados de azufre (Fontecave *et al.* 2004). Por lo tanto, la sobre-regulación de las enzimas Meth, AST y SAH en los tallos de AF+/As, indica una participación significativa de *M. oryzae* en el control del estrés por As en este tejido, a través de la inducción del metabolismo de aminoácidos y de la producción de precursores para la síntesis de GSH, lo que coincide con el mayor contenido de GSH encontrado en tallos de AF+/As (Sección 6.2.5 Tabla 5).

6.3.1.3 Metabolismo de proteínas

Uno de los efectos tóxicos del As es la oxidación de las proteínas, mediante la reacción del As^{III} con los grupos tiol y cisteína en proteínas pre-plegadas y sin plegar (respectivamente), lo que conduce al llamado estrés de plegamiento de proteínas (Ramadan *et al.* 2009). En el presente trabajo, se identificaron 13 proteínas relacionadas con el metabolismo de las proteínas (Tabla 6),

de las cuales, cinco se observaron bajo-reguladas por efecto del As^V , entre ellas algunas PPI y una mucunaína. Se identificaron tres inmunofilinas (una CYP-1 y dos PPI cloroplásticas) y dos inhibidores de traducción PSP inducidos por el As y por la presencia de la bacteria. La mayoría de las inmunofilinas tienen actividad PPI y catalizan un paso limitante en el plegamiento de proteínas, la cis-trans isomerización de uniones peptídicas (Romano *et al.* 2004). Adicionalmente, las PPI también juegan un papel en la regulación del estado redox celular a través de la formación del complejo cisteína sintasa (Domínguez-Solis *et al.* 2008). Por otro lado, aunque las PSP no han sido comúnmente reportadas en el proteoma de plantas, una PSP y varias enzimas proteolíticas se han reportado sobre-reguladas en hojas de *Posidonia oceanica* bajo estrés lumínico (Mazzuca *et al.* 2009).

El incremento en la abundancia de PPIs, PSPs y de una proteína similar a una acil-peptidil hidrolasa con actividad proteolítica, sugiere que el balance de síntesis y degradación de proteínas influye en la aclimatación al estrés por As en tallos de *A. farnesiana* (Mazzuca *et al.* 2009), principalmente en cloroplastos, donde una PPI mostró uno de los mayores niveles de regulación ($RSAF = 7$) y las PSP sobre-reguladas mostraron dos de los valores más altos de abundancia ($\sum(RSAF)_k > 45 \times 10^3$). Lo anterior podría conducir al restablecimiento de proteínas dañadas por la toxicidad del As, mediada por la sobre-regulación de enzimas proteolíticas (acil-peptidil hidrolasa) que mejoran la degradación de las proteínas anormales (Mazzuca *et al.* 2009). Un resultado similar se observó en plantas de *A. tenuis* expuestas a As (Duquesnoy *et al.* 2009), fortaleciendo de esta manera al sistema de defensa en los tallos, y en general de la planta. Adicionalmente, en plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés lumínico, varias PPIs confirieron resistencia contra estrés oxidante, favoreciendo el plegamiento de la enzima acetil-transferasa durante la biosíntesis cisteína (Domínguez-Solis *et al.* 2008).

Proteínas como las PSP y PPIs también se han encontrado sobre reguladas por efecto de la simbiosis entre plantas y MOs. Por ejemplo, en plantas de *Amorpha fruticosa* inoculadas con *G. mosseae* (Song *et al.* 2015) y en plantas de cebada en respuesta a la interacción con *Piriformospora indica* (Ghabooli *et al.* 2013). En tallos de *A. farnesiana*, la presencia de la bacteria (AF+) sobre-reguló todas las proteínas relacionadas con el metabolismo de proteínas, lo cual sugiere que durante el proceso de simbiosis la modificación y degradación de proteínas es crucial para el mantenimiento de la función celular de la planta, a través de una degradación selectiva de proteínas anormales (Song *et al.* 2015). En plantas AF+/As, se observaron solo dos proteínas de esta categoría bajo reguladas. Varios estudios han demostrado que la presencia de un MO puede potenciar la sobre regulación de PPIs en plantas bajo estrés; por ejemplo, en frondes de *P. vittata* inoculados con los HM *G. margarita* y *G. mosseae* en respuesta a $334 \mu M$ As^V (Bona *et al.* 2010). Los resultados encontrados en *A. farnesiana*, indican que *M. oryzae* disminuye el impacto negativo del As sobre la abundancia de las proteínas con actividad proteolítica y chaperona de esta categoría, lo que sugiere que la simbiosis juega un papel

importante en el control de la degradación y plegamiento de proteínas, en los mecanismos de defensa de *A. farnesiana* al estrés por As^V.

6.3.1.4 Respuesta al estrés oxidante

Diversos estudios proteómicos sugieren que la inducción del estrés oxidante es uno de los efectos principales debido a la toxicidad por As y, de hecho, se han identificado diversas enzimas antioxidantes reguladas por efecto del metaloide (Requejo y Tena, 2005; Farinati *et al.* 2009). En tallos de *A. farnesiana*, la mayoría de las proteínas relacionadas con la defensa vegetal se encontraron bajo reguladas por efecto del As, lo cual podría ser una consecuencia de la disminución general de la síntesis de proteínas, frecuentemente inducida por la toxicidad del As en los tejidos fotosintéticos de las plantas (Requejo y Tena, 2006; Bona *et al.* 2010). Similar a nuestros resultados, Farinati *et al.* (2009), encontraron una bajo regulación de diversas proteínas relacionadas con la defensa vegetal (AtGSTF2, monodehidroascorbato reductasa, endoquitinasa) en tallos de plantas de *A. halleri* tratadas con Cd (Farinati *et al.* 2009). Sin embargo, a través de análisis proteómicos y enzimáticos, se han identificado proteínas claves en la detoxificación de As en plantas tolerantes. Algunas de estas enzimas tienen actividad antioxidante, como SOD, CAT, GST y diversas peroxidasas como APX, GPX, que además de participar en la respuesta de defensa, son importantes durante el crecimiento de la planta (Sharma y Dietz, 2008; Bona *et al.* 2010).

En el presente trabajo, se encontraron tres proteínas relacionadas con la respuesta al estrés sobre-reguladas en tallos de plantas AF/As. Dos de éstas, se encuentran involucradas en el ciclo ASC-GSH (una MDHAR y una proteína del lumen del tilacoide [TLP] con actividad ascorbato peroxidasa [APX]) y la otra relacionada con el metabolismo de ERO (precursor de una Fe-superóxido dismutasa [SOD]). La estimulación de la expresión de SOD sugiere que quizá el As incrementó la producción intracelular de $\bullet\text{O}_2^-$. La actividad de esta SOD aumenta la producción de H_2O_2 , el cual podría ser controlado por la sobre regulación de TLP, junto con otras peroxidasas no detectadas en este estudio, tal como se observa en plantas de arroz sensibles al As, comparados con un cultivo tolerante (Dubey *et al.* 2016). En contraste, una MDHAR se encontró bajo-regulada en plantas de *Arabidopsis halleri* tratadas con Cd y Zn, lo cual fue atribuido a una bajo-regulación de APX, responsables de la producción de MDHA (Farinati *et al.* 2009). Los resultados obtenidos en *A. farnesiana* sugieren que en tallos de AF/As, el ciclo ASC-GSH podría ayudar a regular la concentración de H_2O_2 , evitando así los efectos negativos del estrés oxidante inducido por As.

A diferencia del efecto del As, la presencia de la bacteria incrementó la abundancia de la mayoría de las proteínas relacionadas con la respuesta al estrés (Tabla 6); solo dos de ellas (lactoilglutación liasa cloroplástica y una proteína sin caracterizar con actividad oxidoreductasa),

se encontraron disminuídas; dos de las proteínas reguladas positivamente mostraron valores altos de sobre-regulación: una MDHAR ((RSAF)_k= 45) y una proteína de choque térmico de 70 kDa ((RSAF)_k= 12). Este resultado podría deberse a la respuesta de *A. farnesiana*, relacionada con el proceso de interacción con *M. oryzae* (Schulz *et al.* 1999; Chi *et al.* 2010, Bona *et al.* 2016), ya que en etapas tempranas de dicho proceso, la bacteria puede inducir una sobre producción de ERO, como se ha observado en otras plantas en asociación con MOs (Mendarte-Alquisira *et al.* (2016; Lanfranco *et al.* 2005; Baptista *et al.* 2007). Tal respuesta, estimula el sistema de defensa de la planta, contribuyendo a la regulación y mantenimiento de niveles no tóxicos de ERO (Nanda *et al.* 2010). De hecho, al cabo de 15 días de cultivo, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de H₂O₂ en tallos de plantas en simbiosis con *M. oryzae* con respecto a la encontrada en tallos de plantas AF.

En tallos de AF+/As, se encontraron reguladas solo 13 de las 24 proteínas identificadas en AF+. De estas 13 proteínas, cuatro, se encontraron sobre reguladas (tres proteínas relacionadas con GST de clase tau (GSTU) y una lactoil-glutación liasa, todas ellas involucradas en el metabolismo del GSH) y cinco proteínas bajo reguladas (dos APX parciales, una peroxirredoxina-2B y dos probables lactoil-glutación liasas). En plantas, la lactoil-glutación liasa (glioxalasa I), junto con la glioxalasa II, son las dos principales enzimas del sistema de glioxalasa, el cual destoxifica el metilglioxal sobreproducido en condiciones de estrés. Dicha enzima también juega un rol en el mantenimiento de la homeostasis del GSH y se ha propuesto que su sobre-regulación podría mediar mecanismos de tolerancia a condiciones de estrés abiótico (Farinati *et al.* 2009; Hasanuzzaman *et al.* 2017). También se considera que las aldo/keto reductasas (bajo reguladas en tallos de AF/As y sobre reguladas en AF+/As) tienen potencial para destoxificar metilglioxal (Hasanuzzaman *et al.* 2017).

La bajo-regulación o ausencia de muchas proteínas relacionadas con la respuesta al estrés en tallos de AF+/As podría ser el resultado de una mejora de la salud de las plantas mediada por la bacteria (Farinati *et al.* 2009; Bona *et al.* 2010). Este efecto fue observado en frondes de *P. vittata* en simbiosis con *G. mosseae*, en donde el hongo indujo la desaparición o la reducción de la expresión de proteínas relacionadas con la defensa oxidante y el metabolismo de sulfuro, tales como la catalasa, APX y MetH (Bona *et al.* 2010). No obstante, en plantas expuestas a estrés, la sobre-regulación mediada por *M. oryzae*, de la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo del GSH y cisteína (Tabla 6), se relaciona con el incremento en la concentración de GSH detectado en plantas AF+/As (Tabla 5), con respecto al resto de los tratamientos, lo cual favorece las reacciones de conjugación entre el GSH y As^{III} y de óxido reducción en la defensa antioxidante.

Con respecto a las proteínas relacionadas con GSTs, contrario a lo encontrado en la actividad enzimática cuantificada en este trabajo, las cuatro GSTU identificadas disminuyeron en abundancia en AF/As. Esta aparente discrepancia entre los resultados de pruebas bioquímicas

y del análisis proteómico podría relacionarse con el método de extracción de proteínas utilizado para cada caso. Mientras que la actividad enzimática se determinó en extractos crudos que contienen la proteína RuBisCo más las GSTs totales solubles, los análisis proteómicos se realizaron en muestras libres de RuBisCo. La extracción de RuBisCo pudo conducir a una pérdida de otras proteínas, incluyendo GSTs. Las GSTU, junto con las GSTF, son específicas de plantas y las clases más abundantes de estas enzimas en plantas. Ambas clases de GST catalizan la reacción de conjugación durante el proceso de detoxificación, y su presencia puede ser rápidamente determinada utilizando CDNB (Edwards y Dixon, 2005), el sustrato utilizado para determinar actividad GST en este trabajo. Es probable que en las muestras de *A. farnesiana*, la proporción de GSTUs sea mayor con respecto a las GSTF, haciendo que las primeras sean más fácilmente detectables en tallos de AF+. De hecho, se ha demostrado que diversas GSTUs son inducidas por auxinas, comúnmente producidas por varias especies de *Methylobacterium* (Kwak *et al.* 2014) y en respuesta a infecciones por patógenos en las plantas (Moons, 2005). Por ejemplo, la inoculación de *A. thaliana* con *Peronospora parasitica* causó una acumulación de un transcrito de GST (At-GSTU19) (Wagner *et al.* 2002). En contraste, en *A. halleri*, tres isoformas de GSTF se encontraron bajo-reguladas por efecto de bacterias rizosféricas, y una de ellas (AtGSTF10) se sobre-reguló por efecto de metales (Farinati *et al.* 2009). Sin embargo, la bajo-regulación de proteínas relacionadas con GSTs por efecto del As que se observó en este estudio es un resultado inesperado y requiere investigaciones posteriores.

6.3.1.5 Proteínas de respuesta a microorganismos

La endosimbiosis entre plantas y MOs es una interacción compleja entre ambos simbioses para el establecimiento del MO dentro de la célula vegetal. Este tipo de interacción se considera de tipo mutualista y se sabe que los dos mecanismos básicos a través de los cuales los endófitos pueden modificar la respuesta de las plantas son: (i) generación de ERO, lo cual estimula la producción de antioxidantes, protegiendo las plantas del estrés oxidante; (ii) inducción de genes involucrados en el metabolismo del C y N, y en el crecimiento y defensa vegetal (Wani *et al.* 2015). Además de los procesos anteriores, los cambios que induce un MO en una planta se reflejan en el proteoma de la planta. Algunos estudios proteómicos reportan diferentes proteínas inducidas durante el establecimiento de la simbiosis entre MOs y diferentes plantas. Por ejemplo, en tallos de plantas asociadas con bacterias del género *Rhizobium* y hongos micorrízicos, principalmente se ha encontrado una sobre-regulación de proteínas relacionadas con la fotosíntesis y una bajo-regulación de proteínas involucradas en la respuesta al estrés (Farinati *et al.* 2009; Bona *et al.* 2010; Aloui *et al.* 2011). Particularmente, la abundancia de enzimas relacionadas con la respuesta antioxidante (MDHAR, GSTU), el metabolismo de proteínas (PPIs, proteasas) y el metabolismo de carbohidratos (MDH) es frecuentemente modificada por efecto de los MO

asociados (Song *et al.* 2015; Ghabooli *et al.* 2013; Wagner *et al.* 2002). En el caso de cepas endófitas del género *Methylobacterium*, hay pocos estudios enfocados al efecto del MO en el cambio del proteoma intracelular vegetal.

Además de las proteínas mencionadas, se han reportado otras proteínas características involucradas en la respuesta de la planta a la interacción con un MO, entre ellas, las llamadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como las quitinasas. En tallos de *A. farnesiana* se identificaron dos quitinasas sobre-reguladas por la presencia de la bacteria, y una quitinasa clase la única en plantas AF+. Una quitinasa 1b se encontró fuertemente sobre-regulada en tallos AF+, pero no se encontró en tallos de AF+/As, confirmando la participación de estas enzimas en la respuesta a la infección bacteriana de *A. farnesiana*. Las quitinasas son enzimas que pueden romper enlaces glicosílicos en la quitina, oligosacáridos presentes en hongos y artrópodos, y peptidoglicanos de bacterias (Tian *et al.* 2013). Estas enzimas están involucradas en procesos como crecimiento y regulación del desarrollo vegetal, simbiosis y tolerancia al estrés ambiental, además su actividad puede ser inducida por diversos tipos de estrés, y por la interacción con MOs (Hamid *et al.* 2013). Por ejemplo, en hojas de *Phaseolus vulgaris*, el etileno puede inducir la actividad de quitinasas como enzimas de defensa contra hongos y bacterias (Boller *et al.* 1983). Además de proteger a la planta contra patógenos, las quitinasas tienen un papel clave en el proceso de simbiosis. Durante la interacción con bacterias, éstas pueden hidrolizar oligosacáridos llamados factores de nodulación, modulando así la señalización celular durante el establecimiento de la simbiosis (Salzer *et al.* 2000), sin embargo, el papel de estas enzimas en este proceso es aún poco comprendido. La sobre-regulación de quitinasas por efecto de la simbiosis con *M. oryzae* indica una respuesta del tejido fotosintético a la presencia de células bacterianas, posiblemente regulada a través de la señalización celular que reconoce a *M. oryzae* como un MO endófito.

6.3.2 Cambios diferenciales en el proteoma de raíces

Los resultados del análisis de los geles provenientes de muestras de raíz revelaron 143 spots, de los cuales, se seleccionaron 18 para la identificación de proteínas (LC-MS/MS), de acuerdo con los criterios establecidos (Sección 5.5.2.3): (i) $CV \leq 30\%$; (ii) diferencias significativas en el promedio de la intensidad, entre al menos dos tratamientos. A partir de los resultados de la búsqueda de homología de proteínas, se identificaron 49 proteínas (Tabla 7) que se clasificaron en las mismas 6 categorías consideradas para el análisis de proteínas en tallos. Al igual que en los tejidos fotosintéticos, la mayoría de las proteínas identificadas en muestras de raíz pertenecen al metabolismo de carbohidratos (Figura 17 A, Tabla 7).

El análisis de geles proporciona información valiosa acerca del efecto general del As^V y de la presencia de la bacteria sobre el proteoma intracelular de la raíz. Del total de spots identificados, 83 (Anexo 2) son regulados con respecto al tratamiento AF, tres son únicos del tratamiento AF, cuatro de AF/As, siete únicos de AF+/As y 16 de AF+ (Figura 17 B). De los 83

spots compartidos con el tratamiento AF, 32 fueron regulados por el As^V. A diferencia de los tallos, en las raíces no se observó la disminución generalizada de la abundancia de proteínas. En este caso, el estrés por As^V disminuyó la intensidad solo de 14 spots, mientras que 18 se detectaron incrementados. La raíz es uno de los órganos más sensibles de la planta, pues en condiciones de estrés es el primer tejido en tener contacto con el agente de estrés, lo cual induce una respuesta de defensa antioxidante y desencadena la respuesta sistemática de la planta al estrés que resulta de la comunicación entre raíces y tallos (Molesini *et al.* 2013). La respuesta de defensa en la raíz puede variar de acuerdo con la especie, el tipo y la concentración del contaminante, así como con las condiciones de crecimiento. Similar al efecto del As encontrado en el proteoma de raíz de *A. farnesiana*, Ahsan *et al.* (2008) reportan que en raíces de plantas de arroz expuestas a 100 μ M As, de 37 spots regulados, 25 se sobre regularon y 12 se bajo-regularon por efecto del As.

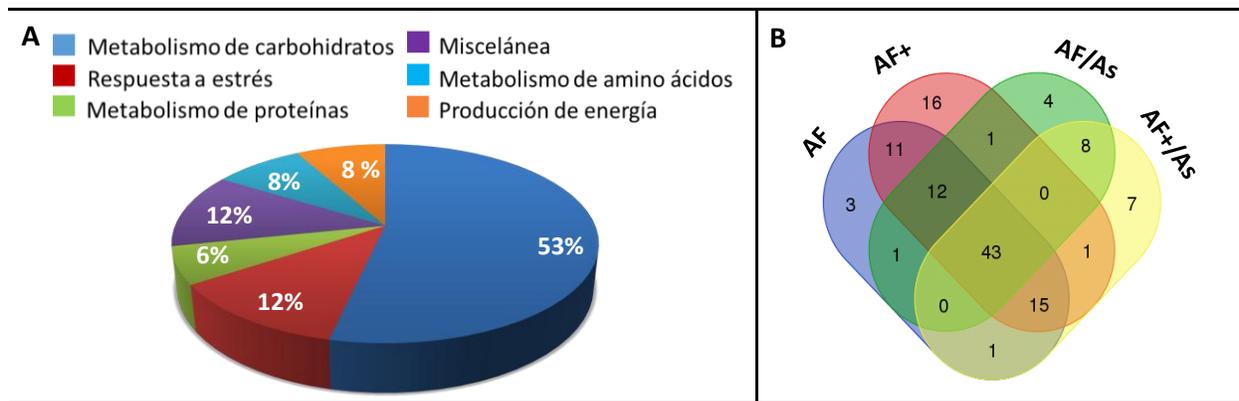


Figura 17. Clasificación de spots y proteínas identificadas en raíces. A) Clasificación de proteínas en las diferentes categorías de acuerdo con su función principal, total de proteínas identificadas por LC-MS/MS: 49. B) Diagrama de Venn de distribución de spots en muestras de raíz, identificados con el programa PDQuest, se muestra el número de spots compartidos entre diferentes tratamientos y únicos por tratamiento.

En general, la presencia de la bacteria disminuyó la intensidad de los spots en plantas AF+ y AF+/As, con respecto a las plantas AF. En plantas sin estrés, *M. oryzae* reguló 81 spots, de los cuales 60 se observaron disminuidos y 21 aumentados. Adicionalmente, las plantas AF+ también mostraron mayor número de spots con respecto al resto de los tratamientos, lo cual sugiere que la interacción entre *A. farnesiana* y *M. oryzae* es compleja y precisa de una modulación de la abundancia y diversidad de isoformas proteicas. Esta modulación puede ser resultado ya sea de un incremento en la síntesis de proteínas o de modificaciones transcricionales que diversifiquen la actividad enzimática en respuesta a las necesidades de la célula (Bestel-Corre *et al.* 2002). Previamente se ha reportado que la simbiosis con MOs afecta el perfil proteico de las raíces de diversas plantas como *P. vittata*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* (Bona *et al.* 2011; Bestel-Corre *et al.* 2002; Chi *et al.* 2010). Similar al presente trabajo,

Song *et al.* (2015) encontraron en plantas de *Amorpha fruticosa* inoculadas con el HM *Glomus mosseae*, que la mayoría de las proteínas reguladas en raíz (44 de un total de 77 spots) disminuyeron en abundancia.

El efecto conjunto de la simbiosis y del estrés por As^V reguló 45 spots, de los cuales 39 se observaron disminuidos y 9 incrementados en intensidad, con respecto a plantas AF. Este resultado indica que en la simbiosis *A.farnesiana*-*M.oryzae* también incrementó (1.4 veces) el número de spots en plantas bajo estrés por As (AF+/As), con respecto al número de spots en plantas sin inocular (AF/As). Lo anterior, podría relacionarse con una modulación de la síntesis y diversidad de proteínas, mediada por la bacteria, en respuesta a la toxicidad del As bioacumulado en raíces de AF+/As. En plantas bajo estrés por As, se ha encontrado que la simbiosis con MOs modifica la respuesta de defensa vegetal a nivel proteómico, favoreciendo la respuesta antioxidante. Esta modificación en raíces es variable y depende, entre otras cosas, del tipo de estrés y de la simbiosis específica (Bona *et al.* 2011; Ghabooli *et al.* 2013; Molesini *et al.* 2014). En raíces de plantas de *P. vittata* expuestas a As, la asociación con el HM *G. mosseae* disminuyó el número de spots regulados por efecto del As, como resultado de la protección del hongo contra el estrés por el metaloide (Bona *et al.* 2011). En raíces de plantas de *M. truncatula* expuestas a Cd, la simbiosis con el HM *G. intraradices* aumentó la intensidad de 12 spots y disminuyó la intensidad de 10, de un total de 30 spots regulados por la presencia del hongo y del Cd (Aloui *et al.* 2009).

Es importante considerar que, debido a la poca información de secuencias genómicas del género *Acacia*, así como a la base de datos utilizada (fabaceae_Refseq 414,123 entradas), que incluye secuencias de proteínas reportadas para la familia a la cual pertenece *A. farnesiana* (Fabaceae), la búsqueda de homologías de secuencias de aminoácidos fue limitada, tal como se ha reportado anteriormente para *Agrostis tenuis* de la familia Poaceae (Duquesnoy *et al.* 2009). En el presente trabajo, la limitante mencionada se refleja en valores bajos del porcentaje de cobertura (CS%) (Tabla 7). No obstante, hasta donde se sabe, el presente estudio es el primer acercamiento al conocimiento sobre la influencia de una bacteria endófito en el proteoma intracelular de raíces de *A. farnesiana*, una planta altamente tolerante al As^V.

Tabla 7. Proteínas únicas y reguladas diferencialmente en raíces de *A. farnesiana*, identificadas por LC-MS/MS.

No. Acceso ^a / Especie vegetal	Proteína	Proceso específico / función	PT ^b	CS% ^c	PSMsR	Nombre Spot
Metabolismo de Carbohidratos						
KHN40000.1/ <i>Glycine soja</i>	Subunidad β del componente piruvato deshidrogenasa E1, mitocondrial	Ciclo ATC/ Oxidación de piruvato	9.5	10.0	0.60	1301
XP_015970331.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Similar a enolasa 2 (c)	Glicólisis/ Gluconeogénesis	8.7	6.5	0.40	1301
XP_014508877.1/ <i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa, cloroplástica	VPF (fase oxidativa) / Metabolismo de GSH	9.4	8.3	0.33	2802

NP_001236726.2/ <i>Glycine max</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa (cl)	VPF (fase oxidativa) / Metabolismo de GSH	9.0	6.6	0.34	2802
XP_015970331.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Similar a enolasa 2 (c)	Glicólisis/ gluconeogénesis	9.1	6.5	0.25	2803
NP_001236726.2/ <i>Glycine max</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa (cl)	VPF (fase oxidativa) / Metabolismo de GSH	8.7	6.6	0.23	2803
XP_004488762.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Fosfoglicerato cinasa, citosólica	Glicólisis/ gluconeogénesis/fijación de carbono	8.5	7.5	0.28	2803
WP_058191738.1/ <i>Methylobacterium sp. GXS13</i>	Metanol deshidrogenasa (cl)	Ciclo ATC/ Metabolismo de piruvato/ Metabolismo de Met y Cys	7.6	4.3	1.00	4102*
XP_015968505.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Probable ribosa-5-fosfato isomerasa 3, cloroplástica	VPF / respuesta de defensa a bacterias	38.9	25.4	0.57	4501
XP_015945833.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Enolasa 1, isoforma cloroplástica X2	Glicólisis/ Gluconeogénesis	14.0	12.3	0.25	5802
XP_014508877.1/ <i>Vigna radiata var. radiata</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilación 2, cloroplástica	VPF/ (fase oxidativa) / Metabolismo de GSH	13.1	11.3	0.24	5802
XP_019444272.1/ <i>Lupinus angustifolius</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa 6, citosólica	Glucólisis/ Gluconeogénesis / VPF	29.3	23.7	0.16	7501
XP_003554399.1/ <i>Glycine max</i>	Triosafosfato isomerasa, cloroplástica	Ciclo de ATC / Gluconeogénesis	22.5	22.0	0.15	7501
XP_006579530.1/ <i>Glycine max</i>	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa, cloroplástica	Ciclo de ATC	20.9	19.3	0.13	7501
XP_003547334.1/ <i>Glycine max</i>	Triosafosfato isomerasa, citosólica	Glicólisis/ Gluconeogénesis	17.9	13.8	0.15	7501
XP_019444272.1/ <i>Lupinus angustifolius</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa 6, citosólica	Glicólisis/ Gluconeogénesis/ VPF	15.1	19.8	0.28	7502
XP_015942758.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Malato deshidrogenasa, cloroplástica	Ciclo ATC/ Metabolismo de piruvato/ Metabolismo de Met y Cys	10.4	7.5	0.16	7502
XP_004490785.1/ <i>Cicer arietinum</i>	UTP - glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (c)	Metabolismo de UDP-glucosa	8.1	5.3	0.14	7502
NP_001243291.1/ <i>Glycine max</i>	Similar a malato deshidrogenasa, citoplasmática	Ciclo ATC/ Metabolismo de piruvato/ Metabolismo de Met y Cys	28.8	14.6	0.19	7601
XP_004510039.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Malato deshidrogenasa, mitocondrial	Ciclo ATC/ Metabolismo de piruvato/ Metabolismo de Met y Cys	23.3	13.0	0.13	7601
XP_019444272.1/ <i>Lupinus angustifolius</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa 6, citosólica	Glicólisis/ Gluconeogénesis/ VPF	18.7	23.7	0.10	7601
XP_007139901.1/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Fosfomannomutasa (c)	Metabolismos de azúcares, amino azúcares, y azúcares nucleótidos	16.9	11.7	0.14	7601
XP_015970331.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Similar a enolasa 2 (c)	Glicólisis/ Gluconeogénesis	14.1	11.9	0.06	7601
XP_019417470.1/ <i>Lupinus angustifolius</i>	Similar a alcohol deshidrogenasa 1 (c)	Glicólisis/ Gluconeogénesis	27.1	18.3	1.00	8102
XP_014514026.1/ <i>Vigna radiata var. radiata</i>	Malato deshidrogenasa, citoplasmática (c)	Ciclo ATC/ Metabolismo de piruvato/ Metabolismo de Met y Cys	29.8	16.9	1.00	8601
XP_014504861.1/ <i>Vigna radiata var. radiata</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa, isozima citoplásmica	Glicólisis/ Gluconeogénesis/ VPF	79.4	11.2	1.00	9901
Producción de energía						
XP_003624258.1/ <i>Medicago truncatula</i>	Subunidad β , ATPasa H ⁺ , arquea /vacuolar	Transporte de protones acoplado a síntesis de	13.6	9.4	0.13	4501

		ATP				
XP_017409530.1/ <i>Vigna angularis</i>	Subunidad β ATP sintasa beta, mitocondrial	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	17.7	9.5	0.28	5802
XP_017409530.1/ <i>Vigna angularis</i>	Subunidad β ATP sintasa beta, mitocondrial	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	33.1	11.3	1.00	6301
XP_016175122.1/ <i>Arachis ipaensis</i>	Subunidad β ATP sintasa beta, mitocondrial	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	24.3	12.1	0.08	7601
Metabolismo de aminoácidos						
XP_013465236.1/ <i>Medicago truncatula</i>	Reductoisomerasa de ácido de cetol (cl)	Biosíntesis de Val, Leu y Ile	13.6	5.5	0.17	2103
XP_014523620.1/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Aldehído deshidrogenasa miembro B7 de la familia 2, mitocondrial	Síntesis y catabolismo de vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y lípidos	13.4	6.9	0.22	2802
XP_003546512.1/ <i>Glycine max</i>	Proteína 7 A1 de familia aldehído deshidrogenasa (extr)	Síntesis y catabolismo de vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y lípidos	9.2	6.5	0.33	7502
XP_003619869.1/ <i>Medicago truncatula</i>	Dominio de proteína glutamina sintetasa (c)	Biosíntesis de glutamina	32.2	9.5	0.17	7601
Metabolismo de proteínas						
XP_020222860.1/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Chaperonina CPN60-2, mitochondrial	Plegamiento de proteínas	13.5	10.3	0.11	4501
XP_012572893.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Similar a subunidad β tipo-1 del proteosoma (c)	Proteólisis	41.0	30.0	0.42	7501
XP_003526966.1/ <i>Glycine max</i>	Subunidad β tipo-5 del proteosoma (c)	Proteólisis	9.8	13.9	0.26	8201
Respuesta a estrés						
XP_015934030.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Isozima 1 catalasa (px)	Metabolismo de H ₂ O ₂	8.0	5.5	0.13	2103
XP_014510110.1/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	Monodehidroascorbato reductasa, cloroplástica	Metabolismo de Ascorbato y alderato	9.0	6.42	0.23	2803
XP_015959074.1/ <i>Arachis duranensis</i>	Lactoilglutación liasa putativa (c)	Metabolismo de glioxal	8.6	9.8	1.00	4102
XP_016206677.1/ <i>Arachis ipaensis</i>	2-Cys peroxidoredoxina BAS1, tipo cloroplástico, parcial	Metabolismo de GSH/ Metabolismo de H ₂ O ₂	23.2	30.9	1.00	4301
XP_012568885.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Probable aldo-keto reductasa 2 (n)	Metabolismo de productos de oxidación de lípidos/ Biosíntesis de hormona esteroide	8.6	8.7	0.21	7502
XP_012568885.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Probable aldo-keto reductasa 2 (n)	Metabolismo de productos de oxidación de lípidos/ Biosíntesis de hormona esteroide	20.0	12.7	0.14	7601
NP_001235877.1/ <i>Glycine max</i>	Precursor de la proteína PR-5b (ext)	Señalización celular	23.2	15.0	0.74	8201
Miscelánea						
XP_004500065.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Reactivo intermedio deaminasa A, cloroplástico	Desconocida	18.5	17.11	0.70	2103
XP_004486913.1/ <i>Cicer arietinum</i>	Probable fructoquinasa-4 (c)	Metabolismo de azúcares amino y azúcares nucleótidos	13.5	14.63	0.19	4501
XP_016184568.1/ <i>Arachis ipaensis</i>	NAD (P) H deshidrogenasa (quinona) FQR1 (n)	Actividad quinona	11.7	19.61	1.00	7401
XP_019416720.1/ <i>Lupinus angustifolius</i>	Proteína nuclear de unión a GTP (n)	Señalización celular/ Reacciones óxido-reducción	12.6	21.82	1.00	7403
XP_016207619.1/ <i>Arachis ipaensis</i>	Similar a adenosina quinasa 2 (c)	Metabolismo de purina	8.1	8.5	0.20	5802

^a Obtenido del NCBI; ^b puntaje total; ^c cobertura de secuencia (%). VPF: vía de pentosas fosfato; ciclo ATC: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; MetH: metionina sintasa; APX: Ascorbato peroxidasa; PSMR: factor relativo de espectros por proteína en cada spot.

6.3.2.1 *Metabolismo energético y de carbohidratos*

Las proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos son frecuentemente afectadas en plantas expuestas a EPT (Aloui *et al.* 2009; Dal Corso *et al.* 2013), alterando las vías metabólicas en las cuales participan. En las raíces de *A. farnesiana*, el 53% de las proteínas identificadas están involucradas en el metabolismo de carbohidratos. La localización de varias proteínas en esta categoría se predijo en cloroplastos. Este resultado podría relacionarse con la dificultad en la búsqueda de homologías de aminoácidos o con el efecto del sistema de cultivo (*in vitro*) utilizado, en el cual, las raíces quedan siempre expuestas a la luz durante el fotoperíodo. La exposición constante a la luz, es un estímulo ambiental que podría conducir a cambios hormonales en el tejido vegetal, lo que puede generar el desarrollo de cloroplastos en la raíz (Flores, 2004). Por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis*, el desarrollo de cloroplastos en tejido de raíz se regula por diversos estímulos ambientales, que conducen a cambios en el contenido de auxinas/citoquininas; los cloroplastos desarrollados contribuyen con la asimilación de carbono de la planta (Kobayashi *et al.* 2013).

En raíces de plantas bajo estrés por As, se ha observado la sobre-regulación de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, indicando su participación como parte de los mecanismos de defensa vegetal (Bona *et al.* 2011; Requejo y Tena, 2005). En general, en raíces de *A. farnesiana* no se observó una regulación de las proteínas de esta categoría, por efecto de la exposición a As^V. Varias enzimas (una probable ribosa-5-fosfato isomerasa 3, una fructosa-bisfosfato aldolasa 6 citosólica, dos isoformas de malato deshidrogenasa citoplásmicas y una UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa) se identificaron en spots donde no se observaron diferencias significativas en abundancia con respecto a plantas AF. No obstante, una isoenzima de fructosa-bisfosfato aldolasa 6 citosólica (PSMsR: 0.16), dos triosa fosfato isomerasa (PSMsR: 0.15) y una ribulosa-fosfato 3-epimerasa (PSMsR: 0.13) se encontraron en mayor abundancia (SSP 7501) por efecto del metaloide. La sobre regulación de estas enzimas relacionadas con la glucólisis/gluconeogénesis, VPF y ciclo del ATC podría relacionarse con la producción de energía durante condiciones de estrés y con la producción de moléculas con poder reductor (Dixit *et al.* 2015). Adicionalmente, se identificaron una subunidad β del componente piruvato deshidrogenasa E1 mitocondrial (PSMsR: 0.60), una enolasa citosólica (PSMsR: 0.40) y una isoforma citoplasmática de fructosa-bisfosfato aldolasa (PSMsR: 1.0) sólo en plantas bajo estrés por As (AF/As y AF+/As); lo anterior sugiere que el ciclo de ATC y la glicólisis juegan un papel clave para contrarrestar el efecto tóxico del As bioacumulado en raíces de *A. farnesiana*. Además, la abundancia de la piruvato deshidrogenasa y la enolasa

(SSP 1301) solo en plantas bajo estrés por As (Figura 18), podría contribuir al aumento detectado en la concentración de proteína total (Tabla 5). La abundancia de las enolasas podría ser resultado de una regulación post-translacional en respuesta al estrés por As, ya que el incremento de la expresión de esta enzima puede ocurrir por diversos tipos de estrés (Bestel-Corre *et al.* 2002). Similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, Bona *et al.* (2011) reportan una sobre-regulación de diversas proteínas del metabolismo de carbohidratos en raíces de *P. vittata*, entre ellas enolasa y aldehído deshidrogenasa, debido al estrés por As^V; lo anterior resultó en una mejora del metabolismo primario que, junto con la modulación de otras enzimas, contribuyen a la tolerancia de la planta y a su carácter hiperacumulador de As. En contraste, en raíces de *M. truncatula* se han identificado enzimas, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, disminuidas en abundancia por efecto de la exposición a Cd, sugiriendo un cambio en la dirección del flujo de carbono, de la glicólisis a la VPF para la regeneración de moléculas con poder reductor (NADPH) o para reducir la respiración celular durante una situación de estrés oxidante (Aloui *et al.* 2009). En raíces de *A. farnesiana*, la bajo-regulación significativa de los spots (SSP 6301 y 7601) que contienen dos subunidades de ATP sintasa β mitocondriales (Figura 18), con respecto a plantas AF, podría indicar también una regulación de la fosforilación oxidativa, reduciendo la producción de radicales libres (Aloui *et al.* 2009).

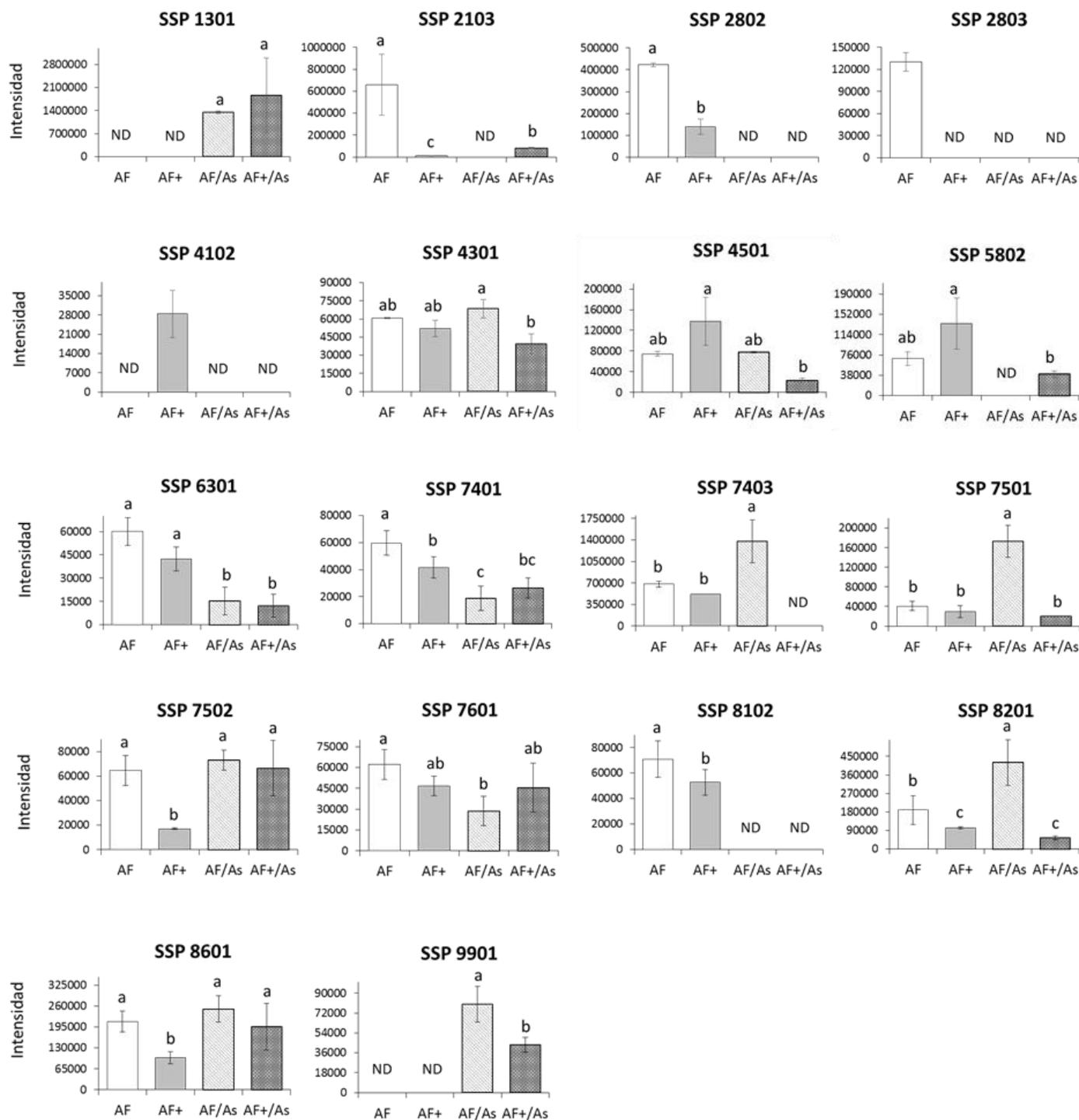


Figura 18. Comparación de la intensidad promedio de los spots seleccionados para el análisis por LC-MS/MS. La intensidad indica la cantidad de proteína en el spot. Se muestra D.E. y las diferencias significativas entre tratamientos con letras diferentes. ND: No detectado.

Entre los resultados encontrados acerca de cambios en el proteoma de raíces inducidos por la inoculación con un MO, se ha observado que la simbiosis afecta principalmente las proteínas relacionadas con la glicólisis (Molesini *et al.* 2014; Bona *et al.* 2011; Kwon *et al.* 2016). En *A. farnesiana*, contrario a lo observado en los tallos, el principal efecto de la bacteria, es la disminución de la abundancia de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. *M. oryzae* bajo-reguló la intensidad de 5 spots (SSP 2801, 7502, 8102, 8201, 8601) que contenían enzimas que participan en la glicólisis, VPF, gluconeogénesis, metabolismo de UDP-glucosa y ciclo de los ATC (Figura 18 y Tabla 7). Bona *et al.* (2011) también reportan proteínas relacionadas con la producción de energía y degradación de carbohidratos (subunidad β de ATP sintasa, endo-1,4- β glucanasa) bajo-reguladas en raíces de plantas de *P. vittata* por efecto de la inoculación con hongos micorrízicos, sin embargo, el efecto principal de la simbiosis fue la sobre-regulación y acumulación de proteínas de esta categoría. Resultados similares se encontraron en raíces de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* (Molesini *et al.* 2014) y de *P. vittata* inoculadas con *G. mosseae* (Bona *et al.* 2011). En *A. farnesiana*, se identificó también una metanol deshidrogenasa única en plantas inoculadas que, de acuerdo con los resultados en la búsqueda de homología, es una proteína bacteriana. La metanol deshidrogenasa se relaciona con la oxidación de metanol a formaldehído, y posteriormente a CO₂, el cual puede ser utilizado por la bacteria para la producción de carbohidratos. Lo anterior sugiere que el metanol es una fuente importante de carbohidratos para esta cepa de *M. oryzae*, cuando se encuentra asociada a la raíz de *A. farnesiana*, donde el metanol puede ser producido junto con la desmetilación de pectina durante el crecimiento de la planta (Nemecek-Marshall *et al.* 1995).

La bajo-regulación de spots que contienen proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, también se observó en plantas AF+/As, lo cual sugiere que dicho efecto se debe a la presencia de *M. oryzae*, independientemente de la exposición a As. Este resultado sugiere que, en raíces, al menos en las enzimas del metabolismo primario, los cambios inducidos por la presencia de la bacteria fueron contrarios a los encontrados por efecto del As. Resultados similares se observaron en plantas de *M. truncatula* expuestas a Cd, en simbiosis con *G. intraradices* (Aloui *et al.* 2009). No obstante, la alta bioacumulación de As en raíces de las plantas en simbiosis, sugiere mecanismos intracelulares que permiten a *A. farnesiana* contrarrestar la toxicidad. Una alta abundancia de una piruvato deshidrogenasa E1 mitocondrial, una enolasa citosólica y una fructosa-bisfosfato aldolasa (SSP 1301, Figura 18) sólo en plantas bajo estrés, sugiere que estas enzimas participan en la respuesta vegetal al estrés por As, independientemente de la presencia de la bacteria. Adicionalmente, la raíz de plantas AF+/As, podría recibir productos fotosintéticos provenientes del tallos y hojas, donde las proteínas relacionadas con la producción de fotosintatos y producción de energía se sobre-regularon por efecto de la bacteria (Tabla 6). Los productos de la fotosíntesis pueden

transportarse desde las hojas hacia la raíz a través del floema, y participar en la producción de energía en raíces; de hecho, se sabe que la raíz de una planta utiliza entre 20 y 40% de todos los fotosintatos producidos durante el día, en la respiración celular (Flores, 2004).

6.3.2.2 Metabolismo de aminoácidos

Además de ser las unidades formadoras de proteínas, los aminoácidos son responsables de la unión disulfuro para la función correcta de las proteínas, para la formación del grupo Fe-S en la cadena de transporte de electrones y fotosíntesis, y se utilizan como precursores de un rango de compuestos involucrados en la defensa vegetal (Dixit *et al.* 2015). Debido a lo anterior, la biosíntesis de aminoácidos es importante en la respuesta intracelular al estrés por As. Algunos estudios indican una respuesta variable del metabolismo de estas biomoléculas durante el estrés por EPT (Tripathi *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2014). En raíces, se ha observado que la exposición a As puede reducir o incrementar el contenido de aminoácidos, lo cual se relaciona con la concentración de As en el cultivo así como con el grado de bioacumulación del metaloide en la raíz. Por ejemplo, algunos estudios demuestran que el contenido de aminoácidos disminuye por la exposición a una alta concentración de As (Kumar *et al.* 2014; Dave *et al.* 2103; Dwivedi *et al.* 2010). Estos cambios en el contenido de aminoácidos por efecto del estrés, indica que las proteínas involucradas en su biosíntesis son modificadas tanto en abundancia como en actividad; por ejemplo, en plantas de *Spinacia oleracea*, la exposición a As cambió el contenido de Glu y, consecuentemente, inhibió la actividad de glutamato quinasa (Pavlík *et al.* 2010).

En raíces de *A. farnesiana*, se identificaron cuatro proteínas del metabolismo de aminoácidos: una reducto-isomerasa de ácido cetólico, una proteína B7 de aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial, una adenosina quinasa 2 y una glutamina sintetasa. La glutamina sintetasa citosólica fue la única enzima en esta categoría que se reguló significativamente por efecto del As^V, ya que se identificó en un spot (SSP 7601) disminuido en intensidad (Figura 18). Las formas citosólicas de estas enzimas son expresadas en las células vasculares de raíces y tallos, y forman glutamina a partir de amonio y glutamato durante el proceso de asimilación del nitrógeno en las plantas. Además de su participación durante la asimilación del nitrógeno, la glutamina sintetasa puede participar en la defensa vegetal contra el estrés por As, ya que la glutamina es precursor del GSH (Chaffei *et al.* 2004)- En plantas de arroz expuestas a 100 μ M As, también se identificó una glutamina sintetasa citosólica bajo-regulada (Ahsan *et al.* 2008); en la misma especie vegetal bajo estrés salino, la bajo-regulación de esta enzima se relacionó con la sensibilidad de la planta al estrés (Yan *et al.* 2005). En *A. farnesiana*, la bajo-regulación de la glutamina sintetasa por efecto del As, podría relacionarse con el incremento de H₂O₂ detectado en raíces de AF/As, de forma similar a lo observado en extractos de *Triticum aestivum* expuestos a H₂O₂ (Ishidae *et al.* 2002).

Por otro lado, el aumento del contenido de GSH en plantas AF/As sugiere una alta demanda de aminoácidos involucrados en la defensa vegetal, así como de enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. Por ejemplo, en un genotipo de arroz tolerante al As, la exposición a 10, 25 y 50 μM As^{V} durante 10 días, incrementó los niveles de GSH principalmente en las raíces y se correlacionó de forma positiva con la actividad glutamil cisteína sintasa, una enzima limitante en la biosíntesis de GSH (Tripathi *et al.* 2013). Es probable que en raíces de *A. farnesiana*, varias enzimas no detectadas, relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, estén relacionadas con el incremento de GSH. Adicionalmente, las MDH citoplásmicas en raíz, además de participar en la glicólisis, podrían jugar un papel clave en la producción de aminoácidos a través del metabolismo del oxaloacetato (Dixit *et al.* 2015), ya que dos de ellas se identificaron en spots que no mostraron diferencias significativas en la intensidad por efecto del As.

La simbiosis entre plantas y MOs también puede modificar la abundancia de proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, que participan desde la asimilación de nitrógeno hasta la síntesis de precursores de moléculas antioxidantes (Chaffei *et al.* 2004; Tripathi *et al.* 2013). En raíces de *A. farnesiana*, la bacteria disminuyó la intensidad de los spots que contienen tres proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos: reductoisomerasa de ácido de cetol, aldehído deshidrogenasa 2, y proteína 7 A1 de familia aldehído deshidrogenasa. Otras enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos se han encontrado bajo-reguladas debido a la simbiosis con MOs. Por ejemplo, en raíces de *P. vittata*, la inoculación con *Glomus mosseae*, bajo-reguló las enzimas glutamina sintetasa y S-adenosilmetionina sintetasa (Bona *et al.* 2011), mientras que en raíces de *M. truncatula*, la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*, bajo-reguló una isoforma de metionina sintetasa (Molesini *et al.* 2014). En raíces de plantas bajo diferentes tipos de estrés, los MOs también modifican la abundancia de proteínas de esta categoría (Bona *et al.* 2011; Ghabooli *et al.* 2013). En *A. farnesiana* bajo estrés por As^{V} , la presencia de *M. oryzae* podría mejorar el contenido de proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, tales como las enzimas glutamina sintetasa y malato deshidrogenasa citosólica, ambas identificadas en el spot SSP 7601, cuya intensidad sugiere que la abundancia de estas enzimas no se modificó significativamente en raíces de AF+/As, a diferencia de lo observado en plantas AF/As (Figura 18). Este resultado podría relacionarse con el alto contenido de GSH detectado en raíces de AF+/As, lo cual sugiere una mayor participación de proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos como parte de la respuesta de *A. farnesiana* durante la alta bioacumulación de As inducida por la presencia de *M. oryzae*.

Debido a los valores bajos de PSMsR obtenidos en la mayoría de las proteínas en esta categoría, la regulación de los spots donde se identificaron es una aproximación para explicar las posibles rutas metabólicas de respuesta de *A. farnesiana*. No obstante, la identificación de

cuatro enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos en plantas en simbiosis con la bacteria, sugiere un efecto importante de *M. oryzae* en el metabolismo de aminoácidos, principalmente en raíces expuestas a As^V. Para profundizar en la participación de proteínas de esta categoría se sugieren estudios posteriores, con la incorporación de análisis de transcriptómica y metabolómica.

6.3.2.3 Metabolismo de proteínas

La defensa vegetal al estrés por EPT incluye la regulación de diversos metabolismos, incluyendo el metabolismo de proteínas. La síntesis, degradación y plegamiento de estas biomoléculas puede cambiar durante la respuesta al estrés (Ramadan *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2008). En plantas bajo estrés por As, se ha observado una disminución en la abundancia de proteínas relacionadas con la biosíntesis proteica o de proteínas con actividad de chaperoninas (Ahsan *et al.* 2008; Bona *et al.* 2011). En *A. farnesiana*, la exposición a As^V, incrementó significativamente la abundancia de la subunidad β tipo-1 y subunidad β tipo-5 del proteosoma, de acuerdo con la regulación de los spots SSP 7501 y SSP 8201, en donde se identificaron respectivamente (Figura 18). Las plantas utilizan la vía del proteosoma para la degradación selectiva de proteínas, removiendo así las proteínas anormales que, en el caso de *A. farnesiana*, podrían generarse debido a la oxidación resultante de la reacción del As^{III} con los grupos tiol (Ramadan *et al.* 2009; Song *et al.* 2015). Un incremento de las proteínas del proteosoma en raíces de *A. farnesiana*, sugiere un recambio más eficiente de proteínas dañadas debido a la alta concentración de As bioacumulada.

La simbiosis con MOs afecta el metabolismo de proteínas en las plantas, por ejemplo, en el helecho *P. vittata*, un análisis transcriptómico demostró que la simbiosis con *G. mosseae* incrementó la síntesis de proteínas en raíces (Bona *et al.* 2011). En *A. farnesiana*, *M. oryzae* también modificó la abundancia de las proteínas en esta categoría. En plantas AF+, las dos subunidades del proteosoma identificadas, se encontraron bajo-reguladas por efecto de *M. oryzae*, aunque este cambio no fue significativo para la subunidad β tipo-1 (Figura 18). Esta disminución indica una regulación de la degradación de proteínas, a través de un marcaje selectivo (Song *et al.* 2015), lo cual podría evitar la eliminación de proteínas necesarias para el establecimiento de la simbiosis. En plantas en simbiosis con *M. oryzae*, también se observó la sobre-regulación de una chaperonina CPN60-2 mitocondrial, de acuerdo con el incremento en la intensidad del spot (SSP 501) donde se identificó (Figura 18); este resultado indica que la bacteria influye en el proceso de plegamiento de las proteínas de la raíz de *A. farnesiana*. Al contrario, en plantas de *P. vittata*, la simbiosis con *G. mosseae*, bajo-reguló una proteína chaperona (Bona *et al.* 2011).

En plantas que crecen en condiciones de estrés, la presencia de MOs modifica la abundancia de proteínas, lo que indica un recambio de proteínas mediado por la simbiosis, a través de su

degradación y síntesis (Bona *et al.* 2011; Aloui *et al.* 2009). En condiciones de estrés por As^V, a diferencia de las plantas no inoculadas, la disminución de proteínas del proteasoma y de la proteína chaperona, sugiere una modificación de la respuesta de defensa de la planta al estrés, mediado por la bacteria. Este efecto en enzimas proteolíticas se observó en raíces de *P. vittata* expuestas a 334 μM As^V, donde una subunidad 26S del proteasoma se bajo-reguló durante la simbiosis con *G. mosseae* (Bona *et al.* 2011). El mismo efecto se observó en raíces de *M. truncatula* tratadas con cadmio por la simbiosis con *G. intraradices* (Aloui *et al.* 2009). Los resultados encontrados en *A. farnesiana*, sugieren que la simbiosis con *M. oryzae* influye en la regulación del plegamiento y degradación de proteínas, como parte de los mecanismos de defensa en las raíces contra el estrés por As^V.

6.3.2.4 Respuesta al estrés oxidante

En general, las proteínas relacionadas con la defensa antioxidante son reguladas diferencialmente en las raíces de plantas expuestas a EPT (Requejo y Tena, 2005; Bona *et al.* 2011). En el caso particular del As, frecuentemente se ha reportado este tipo de enzimas sobre-reguladas (Bona *et al.* 2011; Ashan *et al.* 2008; Requejo y Tena 2005). En *A. farnesiana*, en general, la presencia de As^V bajo-reguló proteínas relacionadas con la defensa antioxidante, independientemente de la presencia de la bacteria. En raíces AF/As se observaron solo dos proteínas reguladas con respecto a las raíces AF, una probable aldo-keto reductasa 2 (SSP 7601) y un precursor de la proteína PR-5b (SSP 8201); encontrando sobre-regulada solo la última (Figura 18). Las proteínas PR, son expresadas durante la infección por patógenos y se relacionan con la reparación de la pared celular de las plantas, dañada por los MOs (Lim *et al.* 2010). La participación de la enzima PR-5b en raíces de *A. farnesiana* durante la respuesta al estrés por As^V, podría estar relacionada con la reparación del daño en la pared celular causado por la toxicidad del As. De hecho, las vías de señalización de la respuesta al estrés abiótico y biótico son similares (Aloui *et al.* 2009; Lim *et al.* 2010), y dicha proteína podría jugar un papel importante en la defensa contra el estrés abiótico provocado en este caso por el As. Por ejemplo, en plantas de *M. truncatula*, estas proteínas se reportaron sobre-reguladas por efecto de estrés por Cd (Aloui *et al.* 2009). Por otra parte, a diferencia de lo encontrado en tallos, una enzima aldo-keto reductasa involucrada en la detoxificación de metilglioxal (Hasanuzzaman *et al.* 2017), se identificó en un spot bajo-regulado (SSP 7601) por efecto del As (Figura 18). Otro estudio realizado en dos genotipos tolerantes de plantas de cebada, expuestos a estrés abiótico también demuestra la bajo-regulación de enzimas relacionadas con la defensa antioxidante, tales como MDHAR y APX (Witzel *et al.* 2009).

La presencia de la bacteria, bajo-reguló la mayoría de las proteínas relacionadas con la defensa al estrés: una isoenzima de catalasa, dos probables aldo-keto reductasas y un precursor de la proteína PR-5b. Este efecto ya se ha reportado en plantas inoculadas con MOs;

por ejemplo, Lim *et al.* (2010) observaron que en etapas tempranas de la interacción entre *Bradyrhizobium japonicum* y plantas de haba, el proceso de formación de nódulo está acompañado de una bajo-regulación de proteínas relacionadas con la defensa, permitiendo la interacción entre ambos simbios. Adicionalmente, la respuesta vegetal al establecimiento de una simbiosis también varía dependiendo del órgano vegetal. Similar a lo encontrado en *A. farnesiana*, Molesini *et al.* (2014), encontraron a través de análisis proteómicos, que en plantas de *M. truncatula*, el principal efecto en raíces debido a la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*, se observó en proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, mientras que en tallos la simbiosis incrementó el contenido de proteínas involucradas en la respuesta al estrés. La presencia de MOs puede cambiar la respuesta antioxidante de las plantas que crecen bajo estrés por EPT (Aloui *et al.* 2009; Bona *et al.* 2011). Por ejemplo, en plantas de *M. truncatula* expuestas a Cd, la abundancia de enzimas GPX y SOD disminuyó en respuesta a la simbiosis con el HM *G. intraradices*, en comparación con plantas no inoculadas. Lo anterior se relacionó con una disminución de la concentración de Cd en células de raíz mediada por la colonización del hongo (Aloui *et al.* 2009). En plantas de *A. farnesiana* expuestas a As^V, la presencia de *M. oryzae* disminuyó la abundancia de la mayoría de las proteínas relacionadas con la defensa vegetal: una isoenzima de catalasa, una 2-Cys peroxiredoxina BAS1, una probable aldo-keto reductasa y un precursor de la proteína PR-5b. Este resultado podría relacionarse con el efecto tóxico de la alta concentración de As bioacumulado en la raíz (Ramadan *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2008).

Otras enzimas que podrían contribuir a la defensa en plantas AF/As y AF+/As, son las aldehído deshidrogenasas. En raíces, se detectó un spot que contiene una aldehído deshidrogenasa (PSMsR: 0.14), cuya intensidad no varió significativamente en plantas bajo estrés (AF/As y AF+/As) con respecto a plantas control (AF). Aunque estas enzimas participan en diversos metabolismos, como síntesis y catabolismo de vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y lípidos, también metabolizan aldehídos endógenos y exógenos, mitigando el estrés oxidante. La expresión de las aldehído deshidrogenasas se ha observado sobre-regulada en respuesta al estrés abiótico y biótico en plantas expuestas a EPT (Singh *et al.* 2013).

A diferencia de los resultados obtenidos con el análisis proteómico, los resultados en la actividad de enzimas POX y GST, mostraron que estas enzimas son inducidas por efecto del As en raíces de *A. farnesiana*. Adicionalmente, los resultados relacionados con la concentración de GSH, GO y E_{hc}, sugieren mecanismos de detoxificación dependientes del estado redox celular, en respuesta a la alta concentración de As bioacumulado, particularmente en plantas inoculadas. Debido a lo anterior y, debido a las limitantes en la separación de proteínas por electroforesis 2-D, es probable que la regulación de los spots correspondientes a dichas enzimas no pueda detectarse de forma correcta. Por ello, para conocer los mecanismos antioxidantes involucrados en la respuesta de las raíces de *A. farnesiana* y la simbiosis *A.*

farnesiana-*M. oryzae* al estrés por As^V, se requieren estudios que incluyan análisis transcriptómicos y técnicas moleculares.

6.3.2.5 Proteínas de respuesta a microorganismos

Al igual que ocurre en el tejido fotosintético, la presencia de MOs endófitos en las raíces, induce cambios en el proteoma intracelular, los cuales varían en función del tipo de simbiosis y las condiciones de crecimiento (Bona *et al.* 2011; Aloui *et al.* 2009; Bestel-Corre *et al.* 2002). Aunque las bacterias endófitas pueden ingresar por diferentes zonas en la planta, es común el inicio de la colonización en el tejido de la raíz donde, además, se puede formar un micro-hábitat. Las plantas, se comunican a través de la raíz con las bacterias simbióticas, ya que producen exudados que estimulan la síntesis de compuestos bacterianos (Molesini *et al.* 2014). También se han reportado algunas proteínas comúnmente inducidas en respuesta al establecimiento de una simbiosis que, en el caso de las raíces, incluyen las proteínas PR, observadas en respuesta a la infección por MOs (Lim *et al.* 2010). En raíces de *A. farnesiana* se identificó la proteína PR-5b (PSMsR: 0.71) en un spot (SSP 8201) disminuido en intensidad por la presencia de la bacteria (Figura 18), lo que sugiere que esta simbiosis es un proceso que no implica el reconocimiento de la bacteria como un patógeno. La supresión de las proteínas PR se ha observado en el establecimiento de simbiosis benéficas entre bacterias y plantas, como es el caso de la simbiosis entre plantas de haba y *Bradyrhizobium japonicum* (Lim *et al.* 2010).

Otras proteínas menos reportadas durante la simbiosis son las enolasas, que participan en la glicólisis; sin embargo, también han sido reportadas como una de las proteínas más abundantes en raíces de *M. truncatula*, después de la inoculación con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* (Bestel-Corre *et al.* 2002). En *A. farnesiana*, se identificó una isoforma de enolasa (PSMsR: 0.25) en un spot (SSP 5802) regulado por la presencia de la bacteria, siendo significativamente más abundante en plantas AF+ con respecto a plantas AF+/As (Figura 18). Lo anterior, indica que *M. oryzae* aumenta la abundancia de enolasas en *A. farnesiana*, lo que podría relacionarse con una respuesta a la simbiosis. De hecho, la expresión de esta proteína puede inducirse por diferentes tipos de estrés, como consecuencia de una regulación post translacional (Bestel-Corre *et al.* 2002).

7. CONCLUSIONES

- *M. oryzae* forma una endosimbiosis con *A. farnesiana*, la cual incrementa el contenido de clorofila y la bioacumulación de As en la planta.
- La exposición de *A. farnesiana* al As^V induce estrés oxidante y un desequilibrio metabólico, que involucra la disminución de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbono y la producción de energía, la disminución del contenido de clorofila y el aumento de H_2O_2 .
- La respuesta de defensa de *A. farnesiana* al estrés por As^V , involucra la participación clave del GSH y de varias proteínas citosólicas, en particular inmunofilinas y un inhibidor de translación, así como el incremento de la actividad GST y POX.
- La endosimbiosis contribuye a compensar el requerimiento de energía durante el estrés por As y a fortalecer el sistema antioxidante de la planta, lo cual se refleja en el incremento del contenido de GSH y la disminución de H_2O_2 y de la actividad de enzimas antioxidantes (GST y POX).
- *M. oryzae* induce la expresión particularmente de proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos azufrados, ayudando a contrarrestar el desequilibrio metabólico inducido por el As^V bioacumulado.
- Dado que esta asociación endófito tiene un impacto significativo y benéfico en la fisiología de la planta y la tolerancia al estrés abiótico, este estudio puede contribuir en la fitorremediación asistida por endófitos de suelos contaminados con As ubicados en ambientes semiáridos.

8. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se plantean las siguientes perspectivas para estudios posteriores:

- Evaluar la actividad de las enzimas arsenato reductasa y superóxido dismutasa, para relacionarla con la bioacumulación de As, en *A. farnesiana* y la simbiosis *A. farnesiana-M. oryzae*.
- Determinar la concentración de especies iónicas de As (As^{III} y As^V) y relacionarla con la actividad de enzimas involucradas en la defensa antioxidante, en *A. farnesiana* y la simbiosis *A. farnesiana-M.oryzae*.
- Determinar el contenido de nitrógeno y azufre, y relacionarlo con la defensa de *A. farnesiana* y la simbiosis *A. farnesiana-M. oryzae*, al estrés por As^V , para evaluar el rol de tales elementos en los mecanismos de defensa
- Evaluar el papel de diferentes tipos de GST (GSTF y GSTU), en la tolerancia de *A. farnesiana* al As, así como la regulación diferencial de dichas enzimas por efecto de la simbiosis, a través de técnicas de proteómica y biología molecular.
- Evaluar el contenido de reguladores de crecimiento vegetal en plantas de *A. farnesiana* expuestas a estrés por As^V , y su modificación por efecto de la simbiosis con *M.oryzae*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., Schwab, W. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57: 4025–4032.
- Adriano, D.C. Trace elements in the terrestrial environment Springer. New York, U.S.A. 1986.
- Ahsan, N., Lee, D-G., Alam, I., Kim, P.J., Lee, J. J., Ahn, J-O., Kwak, S-S., Lee, I-N., Bahk J-D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S., Lee, B-H. 2008. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics.* 8: 3561–3576.
- Ahsan, N., Renaut, J., Komatsu, S., 2009. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics.* 9: 2602–2621.
- Ahsan, N., Lee, D-G., Kim, K-H., Alam, I., Lee, S-H., Lee, K-H., Lee, H., Lee, B-H. 2010. Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere.* 78: 224–231.
- Alcántara-Martínez, N., Rivera-Cabrera, F., Guizar, S., Anicacio-Acevedo, B.E., Buendía-González, L., Volke-Sepúlveda, T. 2016. Tolerance, arsenic uptake and oxidative stress in *Acacia farnesiana* under arsenate-stress. *Int. J. Phytorem.* 18: 671–678.
- Ali, W., Isayenkov, S. V., Zhao, F., Maathuis, M. J. F. 2009. Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 66: 2329–2339.
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S., Dumas-Gaudot, E. 2009. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics.* 9: 420-433.
- Aloui, A., Recorbet, G., Robert, F., Schoefs, B., Bertrand, M., Henry, C., Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Aschi-Smiti, S., 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 5 (11): 75.
- Allocati, N., Favalaro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. 2003. Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem. J.* 373: 305–311.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C. 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal.* 276: 58–75.
- Armienta, M.A., Ongley, L.K., Rodríguez, R., Cruz, O., Mango, H., Villaseño, R G. 2008. Arsenic distribution in mesquite (*Prosopis laevigata*) and huizache (*Acacia farnesiana*) in the Zimapán mining area, México. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis.* 8:191–197.
- Audet, P. y C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution.* 147: 231-237.
- Azcón, R., Perálvarez, M., De, C., Birób, B., Roldán, A., Ruíz-Lozano, J. M. 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Applied soil ecology.* 41: 168 – 177.
- Babula, P., Vojtech, A., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., Kizek, R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters.* 6:189–213.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Sidoli, C. M. D., Reeves, R. D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plant. *Resources, Conservation and Recycling.* 11: 41-49.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schafer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A. 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytology.* 180: 501–510.
- Baptista, P., Martins, A., Pais, M. S., Tavares, R. M., Lino-Neto, T. 2007. Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhizal establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tictorius*. *Mycorrhiza* 17:185–193.

- Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinso, V., Dieu, M., Jean-François, D., Van Tuinen, D., Remacle, J., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 23: 122–137.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*. 157: 22-31.
- Bona, E., Cattaneo, C., Cesaro, P., Marsano, F., Lingua, G., Cavaletto, M., Berta, G. 2010. Proteomic analysis of *Pteris vittata* fronds: two arbuscular mycorrhizal fungi differentially modulate protein expression under arsenic contamination. *Proteomics*. 10: 3811–3834.
- Bona, E., Marsano, F., Massa, N., Cattaneo, C., Cesaro, P., Argese, E., Sanita di Toppi, L., Cavaletto, L., Berta, G. 2011. Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in *Pteris vittata* roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Proteome*. 74: 1338–1350.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Gibbs, J. 2013. Rhizoreduction of arsenate and chromate in Australian native grass, shrub and tree vegetation. *Plant Soil*. 367:615–625.
- Bonnet, M., Camares, O., Veisseire, P. 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *Journal of Experimental Botany*. 51(346): 945-953.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248–258.
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., Andreoni, V. 2010. Arsenic-resistant bacteria associated with root of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:154–164.
- Camacho, F., Gonzáles V., Olivera A. Germinación y Manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonea viscosa* (L.) Jacq.). *Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria*. México, D.F. 1992. pp 1-6.
- Chaffei, Ch., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H., Masclaux-Daubresse, C. 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol*. 45(11): 1681-1693.
- Cheeseman, J. M. 2006. Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural conditions. *J Exp Bot*. 57: 2435–2444.
- Chen, B. D., Zhu, Y. G., Duan, J., Xiao, X. Y., Smith, S. E. 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ. Pollut*. 147: 374–380.
- Chen, L., Luo S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C., Zeng, G. 2010. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology*. 46:383–389.
- Chen, L., Luo, S., Li, X., Wan, Y., Chen, J., Liu, Ch. 2014. Interaction of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake. *Soil Biology & Biochemistry*. 68: 300-308.
- Chi, F., Yang, P., Han, F., Jing, Y., Shen, S. 2010. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics*. 10: 1861-1874.
- Chiboub, M., Jebara, S.H., Saadani, O., Fatnassi, I. Ch., Abdelkerim, S., Jebara, M. 2018. Physiological responses and antioxidant enzyme changes in *Sulla coronaria* inoculated by cadmium resistant bacteria. *Journal of Plant Research*. 31:99–110.
- Coleman, J. J. 2016. The *fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*. 17(2): 146–158.
- Dave, R., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Tripathi, P., Dixit, G., Sharma, Y. K., Trivedi, P.K., Corpas, F.J., Barroso, J. B., Chakrabarty, D. 2013. Arsenate and arsenite exposure modulate antioxidants and amino acids in contrasting arsenic accumulating rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Journal of Hazardous Materials*. 262: 1123– 1131.

- De Marco, P., Pacheco, C.C., Figueiredo, A.R., Moradas-Ferreira, P. 2004. Novel pollutant resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiol. Lett.* 234: 75–80.
- De la Torre, F., Cañas, R.A., Pascual, M.B., Avila, C., Cánovas, F.M. 2014. Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. *J. Exp. Bot.* 65: 5527–5534.
- De Souza, M. P., Chu, D., Zhao, M., Zayed, A. M., Ruzin, S. E., Schichnes, D., Terry, N. 1999. Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol.* 119: 565-574.
- Dixit, G., Singh, A.P., Kumar, A., Dwivedi, S., Deeba, F., Kumar, S., Suman, S., Adhikari, B., Shukla, Y., Trivedi, P.K., Pandey, V., Tripathi, R.D. 2015. Sulfur alleviates arsenic toxicity by reducing its accumulation and modulating proteome, amino acids and thiol metabolism in rice leaves. *Sci. Rep.* 5: 16205.
- Degola, F., Fattorini, L. Bona, E., Sprimuto, C. T., Argese, E., Berta, G., di Toppi, L. S. 2015. The symbiosis between *Nicotiana tabacum* and the endomycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* increases the plant glutathione level and decreases leaf cadmium and root arsenic contents. *Plant Physiology and Biochemistry.* 92: 11-18.
- Dixon, D. P., Davis, B. G., Edwards, R. 2002. Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants. 277, (34): 30859–30869.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 71: 338-350.
- Dixon, D.P., Steel P.G., Edwards, R. 2011. Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. *Plant Signaling & Behavior.* 6: (8) 1223-1227.
- Dubey, A.K., Kumar, N., Sahu, N., Verma, P.K., Ranjan, R., Chakrabarty, D., Behera, S.K., Mallick, S., 2016. Response of two rice cultivars differing in their sensitivity towards arsenic, differs in their expression of glutaredoxin and glutathione S-transferase genes and antioxidant usage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124: 393–405.
- Dominguez-Solis, J., He, Z., Lima, A., Ting, J., Buchanan, B.B., Luan, S. 2008. A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 16386–16391.
- Doty, S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist.* 179: 318–333.
- Dourado, M. N., Ferreira, A., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., Lacava, P. T. 2012. The Diversity of EndophyticMethylotrophic Bacteria in an Oil-Contaminated and an Oil-FreeMangrove Ecosystem and Their Tolerance to HeavyMetals. doi:10.1155/2012/759865.
- Dudeja, S.S, Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E. 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes, Review. *Journal of Basic Microbiology.* 52: 248–260.
- Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet-Pissaloux, A., Ledoigt, G. 2009.
- Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Tripathi, P., Kumar, A., Dave, R., Mishra, S., Singh, R., Sharma, D., Rai, U.N., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Adhikari, B., Bag, M. K., Dhankher, O. P., Tuli, R. 2010. Arsenate Exposure Affects Amino Acids, Mineral Nutrient Status and Antioxidants in Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 44 (24): 9542–9549.
- Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet-Pissaloux, A., Ledoigt, G. Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Sci.* 176: 206–213.
- Edwards, R., Dixon, D.P. 2005. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401: 169–186.
- Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E., Corbella, M., Lampis, S., Cecconi, D., Polati, R., Berta, G., Vallini, G., Furini, A. 2009. Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics.* 9: 4837–4850.
- Flores Hernández A. Introducción a la Tecnología de las Semillas.1era Edición. Universidad Autónoma Chapingo, México.2004. pp. 61-78.

Fontecave, M., Atta, M., Mulliez, E. 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* 29: 243–249.

Gadd, G.M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research.* 111: 3-49.

Garg, N., Singla, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters.* 9:303–321.

Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F.S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., Jorrín-Novo, J.V., Salekdeh, G.H. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *J. Proteome* 6: 289–301.

Gietl, C., 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1100: 217–234.

Glick, B.R. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.* Scientifica. doi.org/10.6064/2012/963401

Grichko, V.P., Filby, B., Glick, B.R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *J. Biotechnol.* 81: 45–53.

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207–212.

Habig, W.H., Jakoby, W.B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In: *Jacoby, W.B. (Ed.), Methods Enzymol. Vol. 77, pp. 398–405.*

Halušková, L., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L. 2009. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 1069–1074.

Hamilton, C.E., Gundel, P.E., Helander, M., Saikkonen, K. 2012. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity.* 54:1–10.

Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., Javed, S. 2013. Chitinases: an update. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 5: 21–29.

Han, Y.H., Fu, J.W., Chen, Y., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q. 2016. Arsenic uptake, arsenite efflux and plant growth in hyperaccumulator *Pteris vittata*: role of arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere.* 144: 1937–1942.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M.S., Mahmud, J.A., Rahman, A., Inafuku, M., Oku, H., Fujita, M. 2017. Coordinated actions of glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 200.

Huang, J. W., Cunningham S. D. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist.* 134: 75–84.

Kabata-Pendias, A. 2010. *Trace Elements in Soils and Plants.* 4th Ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 548 pp.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters.* 7: 1-19.

Konigsberg, F. M. 2008. *Radicales libre y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* Ed. Manual Moderno. México.

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I., Renaut, J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress: Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics.* 74: 1301–1322.

Kumar, A., Dwivedi, S., Singh, R.P., Chakrabarty, D., Mallick, S., Trivedi, P. K., Adhikari, B., Tripathi, R.D. 2014. Evaluation of amino acid profile in contrasting arsenic accumulating rice genotypes under arsenic stress. *Biologia Plantarum.* 58 (4): 733-742.

Kwak, M.J., Jeong, H., Madhaiyan, M., Lee, Y., Sa, T.M., Oh, T.K., Kim, J.F. 2014. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere. *PLoS One* 9, e106704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106704>.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Lal N. 2010. *Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Ed. M. Ashraf et al. India.
- Lanfranco, L., Novero, M., Bonfante, P. 2005. The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume host. *Plant Physiol*. 137:1319–1330.
- Larrainzar, E., Wienkoop, S. 2017. A Proteomic View on the Role of Legume Symbiotic Interactions. *Frontiers in Plant Science*. 8:1267.
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K. 2008. *Environmental Pollution*. 153: 497-522.
- Li, H.Y., Wei, D.Q., Shen, M., Zhou, Z.P. 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*. 54: 11–18.
- Li, G.; Peng, X., Xuan, H., Wei, L., Yang, Y., Guo, T., Kang, G. 2013. Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions. *J. Proteome Res*. 12: 4846-4861.
- Lichtenthaler, K., Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans*. 11: 591–592.
- Lim, Ch. W., Park, J. Y., Lee, S. H., Hwang, Ch., H. 2010. Comparative Proteomic Analysis of Soybean Nodulation Using a Supernodulation Mutant, SS2-2. *Journal Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74 (12): 2396-2404.
- Liu, D., Zou, J., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W. 2009. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. *Ecotoxicology*. 18: 134-143.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Vicente, J. A. F., Freitas, H. 2011. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Sychrobacter* sp. strain srs8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. *International Journal of Phytoremediation*. 13:126–139.
- Ma, J., Sheng, H., Li, X., Wang, L. 2016. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells. *Plant Physiol. Biochem*. 104: 71–80.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Wysocki, R. 2012. Arsenic and Antimony Transporters in Eukaryotes. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 3527-3548.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sa, T.M. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*. 69: 220–228.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sa, T.M. 2007b. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol*. 17:1645–1654
- Maehly A.C. 1954. *Methods of Biochemical Analysis*. Ed. Glick. Interscience Publishers. New York. 358 pp.
- Maldonado-Magaña, A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F., Volke-Sepulveda, T. L. 2011. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil*. 339: 377–389.
- Mano, H., Morisaki, H. 2008. Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes Environ*. 23 (2): 109-117.
- Mastretta, C., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Mengoni, A., Galardi, F., Gonnelli, C., Vangronsveld, J. 2009. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytorem*. 11: 251-267.
- Mazzuca, S., Spadafora, A., Filadoro, D., Vannini, C., Marsoni, M., Cozza, R., Bracale, M., Pangaro, T., Innocenti, A.M., 2009. Seagrass light acclimation: 2-DE protein analysis in *Posidonia* leaves grown in chronic low light conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 374: 113–122.
- Meagher, R.B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:153–162.

- Mench, M., Schwitzguébel, J.P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S. 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research*. 16:876–900.
- Meharg A.A., Macnair M.R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system; a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*. 43:519–524.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. *New Phytol*. 154: 29–43.
- Mendarte-Alquisira, C., Gutiérrez-Rojas, M., González-Márquez, H., Volke-Sepúlveda, T. 2017. Improved growth and control of oxidative stress in plants of *Festuca arundinacea* exposed to hydrocarbons by the endophytic fungus *Lewia* sp. *Plant and Soil*. 411: 347–358.
- Meyer, A.J., Hell, R. 2005. Glutathione homeostasis and redox regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth. Res*. 86: 435–457.
- Michel, C., Jean M., Coulon S., Dictor M-C., Delorme F., Morin, D., Garrido, F. 2007. Biofilms of As(III)-oxidising bacteria: formation and activity studies for bioremediation process development. *Appl Microbiol Biotechnol*. 77:457–467
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Trivedi, P.K. 2008. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquatic Toxicology*. 86: 205–215.
- Mishra, S., Stärk, H.J., Küpper, H. 2014. A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. *Metallomics*. 6: 444–454.
- Mishra, S., Alfeld, M., Sobotka, R., Andresen, E., Falkenberg, G., Küpper, H. 2016. Analysis of sublethal arsenic toxicity to *Ceratophyllum demersum*: subcellular distribution of arsenic and inhibition of chlorophyll biosynthesis. *J. Exp. Bot*. 67: 4639–4646.
- Molesini, B., Cecconi, D., Pii, Y., Pandolfini, T. 2014. Local and Systemic Proteomic Changes in *Medicago Truncatula* at an Early Phase of *Sinorhizobium meliloti* Infection. *J. Proteome Res*. 13: 408–421.
- Mokgalaka-Matlala, N.S., Flores-Tavizo, E., Castillo-Michel, H., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2009. Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. *Plant Physiol. Biochem*. 47: 822–826.
- Mohd, S., Shukla, J., Kushwaha, A. S., Mandrah, K., Shankar, J., Arjaria, N., Saxena, P. N., Narayan, R., Somendu, R., Roy, K., Kumar, M. 2017. Endophytic Fungi *Piriformospora indica* Mediated Protection of Host from Arsenic Toxicity. 8: 754.
- Moons, A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm*. 72: 155-202.
- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol*. 52: 195–204.
- Nath, S., Panda, P., Mishra, S., Dey, M., Choudhury, S., Sahoo, L., Panda, S. K. 2014. Arsenic stress in rice: Redox consequences and regulation by iron. *Plant Physiology and Biochemistry*. 80: 203-210.
- Nelson, D., Cox, M.M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J.J. Wojciechowski, Ch., Fall, R. 1995. Methanol Emission from Leaves. Enzymatic Detection of Gas-Phase Methanol and Relation of Methanol Fluxes to Stomatal Conductance and Leaf Development. *Plant Physiol*. 108: 1359-1 368.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R. 2005. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol*. 137: 611-622.
- Orlowska, E., Godzik, B., Turnau, K. 2012. Effect of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates on growth and arsenic accumulation in *Plantago lanceolata* L. *Environmental Pollution* 168: 121-130

- Paulose, B., Chhikara, S., Coomey, J., Jung, H., Vatamaniuk, O., Dhankher, O.P. 2013. A γ -glutamyl cyclotransferase protects *Arabidopsis* plants from heavy metal toxicity by recycling glutamate to maintain glutathione homeostasis. *Plant Cell*. 25: 4580–4595.
- Peralta-Pérez, M. del R., Volke-Sepúlveda, T. L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11:1-14.
- Prasad, V.M.N. y Freitas de O.H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (6): 122-129.
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review Phytopathology*. 49: 291-315.
- Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Yim, W. J., Kim, K.A., Sa, T.M. 2008. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 1033–1043.
- Puga, S., Sosa, M., De la Mora, A., Pinedo, C., Jiménez, J. 2006. Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22: 75-82.
- Rajkumar, M., Freitas, H., 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*. 71, 834–842.
- Rajkumar, M., Ae, N., Freitas, H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77:153–160.
- Ramadan, D., Rancy, P.C., Nagarkar, R.P., Schneider, J.P., Thorpe, C. 2009. Arsenic (III) species inhibit oxidative protein folding *in vitro*. *Biochemistry*. 48: 424-432.
- Reichman, S. M. 2007. The potential use of the legume–rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2587-2593.
- Requejo, R., Tena, M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry*. 66: 1519--1528.
- Requejo, R., Tena, M., 2006. Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots. *Proteomics*. S156–62.
- Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A., Stobiecki, M. 2014. Influence of biotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant*. 36: 1–19.
- Romano, P.G., Horton, P., Gray, J.E. 2004. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant hysiol*. 134: 1268–1282.
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett*. 529: 86–92.
- Salas, S.F. 2007. Selección *in vitro* de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Especialización en Biotecnología. 24 pp.
- Salzer, P, Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R., Boller, T. 2000. Differential Expression of Eight Chitinase Genes in *Medicago truncatula* Roots During Mycorrhiza Formation, Nodulation, and Pathogen Infection. *The American Phytopathological Society*. 7: 763–777.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero, P. M. C., Del Río, L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism-induced Changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52: 2115-2126.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med*. 30: 1191–1212.
- Seregin, I.V., Ivanov, V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48: 523–544.
- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y., Qian, M. 2008. Characterization of heavy metalresistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut*. 156: 1164–1170.

- Shi, Y., Lou, K., Li, C. 2010. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth. Res.* 105: 5–13.
- Siddiqui, F., Tandon, P.K., Srivastava, S. 2015. Analysis of arsenic induced physiological and biochemical responses in a medicinal plant, *Withania somnifera*. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 21: 61–69.
- Singh, L. P., Gill, S. S. Tuteja, N. 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Landes Bioscience.* 6(2):175-191.
- Sharma, S.S., Dietz, K. J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science.* 14: 43-50.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76–85.
- Solis-Ibarra, A. 2009. Fitorremediación de plomo por *Acacia farnesiana* (L) Willd en cultivos in vitro y determinación de enzimas antioxidantes involucradas. Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Especialización en Biotecnología. 53 pp.
- Staerck, C. Gastebois, A. Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J-F., Maxime, J., Fleury, J. 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis.* 110: 56-65.
- Srivastava, M., Ma, L.Q., Singh, N., Singh, S. 2005. Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany* 56: 1343–1349.
- Srivastava, S., Suprasanna, P., D'Souza, S.F. 2011. Redox state and energetic equilibrium determine the magnitude of stress in *Hydrilla verticillata* upon exposure to arsenate. *Protoplasma.* 248: 805–815.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K., Singh, B., Suprasanna, P., D'souza, S.F., 2013a. The effect of arsenic on pigment composition and photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Biol. Plant.* 57: 385–389.
- Srivastava, S., Verma, P.C., Chaudhry, V., Singh, N., Abhilash, P.C., Kumar, K.V., Sharma, N., Singh, N. 2013b. Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. *J. Hazard. Mater.* 262: 1039–1047.
- Sobariu D. L., Fertu, L. I. T., Diaconu, M., Pavel, L. V. Hlihor, R-M., Dragoi E. N., Curteanu S., Lenzd, M., P. F. X. Corvini, Professor, G. M. 2017. Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology.* 39: 125–134.
- Song, F., Qi, D., Liu, X., Kong, X., Gao, Y., Zhou, Z., Wu, Q. 2015. Proteomic analysis of symbiotic proteins of *Glomus mosseae* and *Amorpha fruticosa*. *Sci. Rep.* 5: 18031.
- Sy, A., Timmers, A.C., Knief, C., Vorholt, J.A. 2005. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7245–7252.
- Talano, M.A., Cejas, R.B., González, P.S., Agostini, E. 2013. Arsenic effect on the model crop symbiosis Bradyrhizobium–soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 63: 8–14.
- Tian, Y., Liu, W., Cai, J., Zhang, L-Y., Wong, K-B., Feddermann, N., Boller, T., Xie, Z-P., Staehelin, C. 2013. The Nodulation Factor Hydrolase of *Medicago truncatula*: Characterization of an Enzyme Specifically Cleaving Rhizobial Nodulation Signals. *Plant Physiology.* 163: 1179–1190.
- Tripathi, P., Tripathi, R.D., Singh, R.P., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Adhikari, B. 2013. Arsenite tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) involves coordinated role of metabolic pathways of thiols and amino acids. *Environ Sci Pollut Res.* 20:884–896.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology.* 12:364–372.
- Visoottiviset, P., Francesconi, K., Sridokchan, W. 2002. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental Pollution.* 118: 453–461.
- Vithanage, M., Dabrowska, B., Mukherjee, A., Sandhi, A., Bhattacharya, P. 2011. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environ. Chem. Lett.* 10: 217-224.

Volke Sepúlveda, T., Velasco, J. A., de la Rosa, D. A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT). 141 pp.

Volke-Sepulveda, T., Salgado, D., Bergmann, C., Wells, L., Gutierrez-Sanchez, G., Favela-Torres, E. 2016. Secretomic insight into glucose metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation. *J. Proteome Res.* 10: 3856-3871.

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. 2002. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49: 515–532.

Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., Hassan, R. U. 2015. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 2955–2965.

White, J.F., Torres, S.M. 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. *Physiol Plant.* 138:440–446.

Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G-K., Borner, A., Mock, H. P. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany.* 60 (12): 3545–3557.

Xi, J., Wang, X., Li, S., Zhou, X., Yue, L., Fan, J., Hao, D. 2006. Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. *Phytochemistry.* 67: 2341–2348.

Xu, X. Y., McGrath, S. P., Zhao, F., J. 2007. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist.* 176: 590–599.

Yan, S., Tang, Z., Su, W., Sun, W. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics.* 5: 235-244.

Yang, H-Ch., Rosen, B. P. 2016. New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal.* 39: 5-13.

Yu, Y., Zhang, S., Huang, H., Luo, I., Wen, B. 2009. Arsenic Accumulation and Speciation in Maize as Affected by Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3695–3701.

Yu X., Li, Y., Li, Y., Xu, Ch., Cui, Y., Xiang, Q., Gu, Y., Zhao, K., Zhang, X., Penttinen, P., Chen, Q. 2017. *Pongamia pinnata* inoculated with *Bradyrhizobium liaoningense* PZHK1 shows potential for phytoremediation of mine tailings. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101:1739–1751.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International.* 33: 406–413.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Proteínas reguladas, identificadas en muestras de tallo por LC-MS/MS.

No. Acceso (gi)	Nombre	Longitud de proteína (AA)	Peso molecular (kDa)	Puntaje total	Valor de P	RSAF x10E3				Regulación +/-		
						AF	AF/As	AF+	AF+/As	AF+	AF-A	AF+-As
Metabolismo de carbohidratos												
42521309	Enolasa (cl)	444	47.7	1071.0	0.362	8.0	0.9	23.8	9.8	3.0	-9.3	1.2
657382574	Fosfopiruvato hidratasa (c)	429	46.2	260.0	0.443	0.4	0.1	1.0	0.6	2.3	-6.0	1.3
388511343	Desconocida (c)	285	31.2	403.3	0.145	0.6	0.0	3.3	3.1	6.0	0.0	5.6
558695744	Triosa-fosfato isomerasa (c)	253	26.9	316.7	0.216	4.4	1.6	6.5	1.8	1.5	-2.7	-2.5
255645535	Triosefosfato (cl) Isomerasa, cloroplástica	309	33.2	335.0	0.117	0.5	0.4	2.0	0.5	3.8	-1.3	1.0
255634120	Triosefosfato isomerasa (cl)	180	19.5	233.8	0.793	0.5	0.4	2.3	0.2	4.3	-1.5	-3.0
355485140	Similar a fosfoglicerato quinasa (c)	401	42.4	342.6	0.168	0.2	0.3	2.1	1.6	13.5	2.0	10.0
355485139	Similar a fosfoglicerato (c)	479	50.0	307.1	0.271	0.5	0.3	1.4	2.3	2.6	-2.0	4.4
255635951	Fosfoglicerato quinasa, citosólica	233	25.3	255.4	0.445	1.0	0.4	3.1	4.5	3.3	-2.3	4.7
255632556	Fructosa-bisfosfato aldolasa, citoplásmica	273	29.4	234.7	0.271	0.2	0.0	0.8	0.0	3.5	0.0	0.0
217072476	Fructosa-bisfosfato aldolasa clase (cl) I	400	43.1	90.9	0.004	0.3	0.0	0.2	0.0	-2.0	0.0	0.0
388492564	Desconocida (c)	257	27.8	93.0	0.467	1.0	0.5	1.9	3.2	1.9	-2.0	3.3
388500096	Similar a malato deshidrogenasa, citoplásmica	332	35.5	632.9	0.893	14.0	3.1	13.9	14.5	-1.0	-4.6	1.0
366985127	Similar a malato deshidrogenasa, citoplásmica	328	35.2	526.2	0.078	0.8	1.2	4.4	2.6	5.8	1.5	3.4
217073248	Similar a malato deshidrogenasa (c)	332	35.5	636.0	0.084	1.7	1.8	4.0	4.4	2.3	1.1	2.6
27462762	Malato deshidrogenasa (c)	332	35.6	589.6	0.105	1.8	1.6	4.4	5.0	2.4	-1.1	2.7
726973449	Malato deshidrogenasa (m)	345	36.1	301.7	0.276	5.6	0.1	1.8	0.1	-3.1	-61.0	-61.0
5929964	Malato deshidrogenasa, mitocondrial	345	36.1	268.2	0.101	5.7	0.1	2.0	0.4	-2.8	-62.0	-15.5
255641228	Malato deshidrogenasa, cloroplástica	409	43.1	143.6	-1	0.2	0.0	0.1	0.2	-3.0	0.0	-1.5
146215968	Subunidad beta de succinil-CoA ligasa (m)	421	45.2	145.6	1	0.5	0.2	0.7	0.7	1.5	-2.0	1.5
16638	isocitrato deshidrogenasa [NADP] parcial (cl)	433	48.3	99.2	0.01	0.1	0.0	0.3	0.1	4.0	0.0	1.0
166361879	Fosfogluconato deshidrogenasa,	131	14.9	198.6	0.006	0.2	0.2	1.5	0.0	6.0	-1.0	0.0

	parcial (c)											
543176594	Similar a transaldolasa (cl)	443	48.4	291.9	0.417	0.3	0.4	0.5	0.0	1.8	1.3	0.0
217075715	De la familia transaldolasa (cl)	443	48.5	214.6	0.194	0.4	0.4	0.4	0.0	1.2	-1.0	0.0
35548657	pfkB de la familia carbohidrato quinasa (extr)	329	35.2	391.8	0.115	1.0	0.7	1.8	0.4	1.9	-1.4	-2.5
429142521	UDP-glucosa pirofosforilasa 1 (c)	471	51.4	287.8	0.022	0.2	0.3	1.2	0.6	6.0	1.3	3.0
163869663	Glucanasa ácida (v)	370	40.7	68.9	0.196	0.2	0.3	0.9	0.3	5.5	2.0	2.0
425886502	Quitinasa clase II (extr)	257	28.0	211.7	-1	0.2	0.0	0.6	0.5	2.5	0.0	2.0
298364452	Quitinasa Clase Ib (cl)	309	33.5	61.3	0.18	0.1	0.0	1.1	0.0	11.0	0.0	0.0
388492568	Desconocida (c)	167	17.0	84.3	0.223	1.1	3.6	4.6	0.8	4.0	3.2	-1.5
Energía												
255635846	Similar a potenciador de evolución de oxígeno 2 (cl)	265	28.4	318.6	0.166	10.7	2.2	6.9	1.8	-1.5	-4.9	-5.9
514252882	Subunidad beta ATP sintasa CF1 (cl)	498	53.6	258.9	0.109	0.9	0.0	0.1	0.1	-7.0	-	-7.0
657405681	Subunidad beta FOF1, ATP sintasa (m)	559	60.0	144.7	0.946	0.2	0.0	0.2	0.2	1.0	-	-1.3
270342124	Anhidrasa carbónica (cl)	330	35.5	205.9	0.554	0.6	0.2	0.8	0.3	1.3	-3.0	-2.0
217071716	Desconocida (c)	170	18.1	75.8	0.938	1.1	0.6	0.0	0.0	0.0	-2.0	0.0
Metabolismo de amino acidos												
33325957	Metionina sintasa (m)	763	84.2	882.6	0.554	0.8	0.4	8.4	1.4	10.1	-2.2	1.7
662225959	Metionina sintasa independiente de vitamina B-12 (c)	763	84.2	700.0	0.545	0.8	0.3	7.5	1.4	9.1	-2.5	1.7
29691168	Adenosil homo cisteinasa (c)	485	53.1	374.0	0.092	1.3	0.6	4.8	2.6	3.7	-2.2	2.0
29691166	Adenosil homo cisteinasa (c)	485	53.3	198.1	0.194	1.0	0.8	3.7	2.2	3.6	-1.3	2.1
169915	Aspartato aminotransferasa (cl)	463	50.5	242.1	0.728	0.3	0.1	0.5	0.0	1.8	-2.0	0.0
Metabolismo de proteínas												
529273336	Ciclofilina 1 (c)	172	18.3	452.2	0.051	5.0	5.5	24.7	12.9	5.0	1.1	2.6
355493078	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (c)	191	20.3	160.6	0.112	0.5	0.5	4.8	0.2	9.7	-1.0	-3.0
255628137	Similar a peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1 (c)	172	18.3	172.4	0.555	4.4	2.2	14.6	10.9	3.3	-2.0	2.5
388511337	Similar a peptidil-prolil cis-trans isomerasa 1 (cl)	171	17.9	181.5	0.332	4.8	2.2	16.1	11.3	3.3	-2.2	2.3
359770109	Similar a peptidil-prolil cis-trans isomerasa (cl)	172	18.1	254.6	0.224	5.9	3.3	18.3	12.2	3.1	-1.8	2.1
488726160	Similar a peptidil-prolil cis-trans isomerasa (cl)	172	18.1	480.2	0.153	1.5	3.1	11.8	1.3	8.0	2.1	-1.1

255645203	peptidil-prolil cis-trans isomerasa, cloroplástica (cl)	260	28.3	194.3	0.1	0.1	0.9	10.7	7.7	88.0	7.0	63.0
194466087	Proteína similar a GroES (cl)	202	21.2	111.4	0.966	2.5	2.2	3.1	3.3	1.3	-1.1	1.3
182375363	Mucunaina (cl)	422	46.6	182.3	0.585	1.2	0.8	1.6	1.7	1.3	-1.6	1.4
355489113	Similar a Acil-péptido hidrolasa (cl)	732	80.8	109.0	0.452	0.1	0.3	1.0	0.1	11.5	3.0	1.5
388505198	Similar a ácido perclórico soluble inhibidor de la traducción (cl)	188	19.9	435.7	0.046	4.4	7.4	27.7	56.4	6.3	1.7	12.8
194466266	Ácido perclórico soluble inhibidor de la traducción (cl)	189	20.0	320.4	0.216	14.4	18.8	34.4	61.8	2.4	1.3	4.3
123192431	Ran1 (c)	221	25.3	197.0	0.228	0.1	0.1	1.9	0.3	13.0	-1.0	2.0
Respuesta a estrés												
355511342	Proteína de choque térmico de 70 kDa (c)	653	71.5	388.7	0.003	0.0	0.0	0.6	0.0	12.0	0.0	0.0
187962068	Ascorbato peroxidasa, parcial (c)	221	23.8	234.6	0.949	3.4	1.1	4.6	1.9	1.3	-3.0	-1.8
62946783	Ascorbato peroxidasa, parcial (c)	124	13.5	225.8	0.082	1.5	1.5	5.1	0.8	3.3	-1.0	-2.0
24496465	Ascorbato peroxidasa, parcial, del estroma (cl)	361	39.6	161.1	-1	0.1	0.1	0.4	0.0	5.0	-1.0	0.0
393717541	Ascorbato peroxidasa (c)	250	27.1	112.8	0.781	0.4	0.1	0.6	0.0	1.7	-3.0	0.0
189491032	Peroxidasa biosintética de lignina (cl)	316	34.2	125.6	0.667	0.3	0.0	0.5	0.0	1.7	0.0	0.0
269980509	Similar a 2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástica (cl)	261	28.6	205.6	0.126	0.2	0.0	1.7	0.0	7.0	0.0	0.0
255626437	Peroxiredoxina-2B (c)	162	17.3	145.6	0.032	4.1	2.2	6.1	3.5	1.5	-1.9	-1.2
217071288	Glutation S-transferasa, aminodominio terminal (c)	219	25.6	226.4	0.243	8.7	4.3	15.6	20.1	1.8	-2.0	2.3
217075094	Glutation S-transferasa, aminodominio terminal, parcial (c)	219	25.5	204.3	0.455	6.2	2.9	9.4	13.5	1.5	-2.2	2.2
169805245	Glutation S-transferasa, inducible por auxina (c)	221	25.2	171.9	0.549	0.4	0.3	3.2	0.0	7.3	-1.5	0.0
220683633	Glutation S-transferasa (c)	216	25.0	120.2	0.444	7.2	3.4	10.0	13.7	1.4	-2.1	1.9
355511502	Similar a lactoilglutation liasa (c)	304	33.9	109.7	0.162	0.1	0.1	0.7	0.0	7.0	-1.0	0.0
388493080	Similar a lactoilglutation liasa (c)	274	30.6	179.1	0.002	0.5	0.1	1.6	1.6	3.5	-4.0	3.5
355524779	Similar a lactoilglutation liasa (cl)	347	38.8	138.1	0.796	1.2	0.3	1.0	1.0	-1.2	-4.3	-1.2
388522957	Probable lactoilglutation liasa, cloroplástica	346	38.5	99.8	0.293	0.6	0.1	0.7	0.4	1.3	-6.0	-1.5

	isoforma X1 (cl)											
255629031	Monodehidroascorbato reductasa (cl)	193	20.6	177.6	0.608	0.2	0.5	7.4	0.0	45.0	3.0	0.0
16974682	Fe-superoxido dismutasa (cl)	313	35.3	138.3	0.922	1.2	1.7	1.3	0.9	1.1	1.4	-1.3
168415025	Cu-Zn superóxido dismutasa, parcial (c)	108	10.9	67.4	0.667	0.3	0.0	1.2	0.0	4.0	0.0	0.0
124360836	Oxidoreductasa de la familia aldo/keto reductase (c)	339	37.4	246.2	0.142	0.4	0.3	1.0	0.7	2.8	-1.3	1.8
124360844	Oxidoreductasa de la familia aldo/keto reductase (c)	339	37.6	201.0	0.06	0.4	0.3	1.1	0.4	3.0	-1.3	1.0
217073228	Proteína del lumen tilacoidal de 29 kD (cl)	353	38.9	59.7	0.007	0.2	0.3	0.2	0.0	1.0	1.5	0.0
255631161	Sin caracterizar LOC100526924 (cl)	182	19.7	68.0	0.17	0.5	0.3	1.6	0.2	3.0	-1.5	-3.0
255635588	Desconocida (cl)	295	31.1	85.0	0.531	1.0	1.0	0.9	1.5	-1.1	-1.0	1.6
Miscelanea												
543176748	Nucleósido difosfato quinasa 1 (c)	149	16.5	400.8	0.472	0.9	1.7	4.9	2.3	5.8	2.0	2.8
388501462	Similar a 2-metileno-furan-3-uno reductasa (c)	328	35.8	261.8	0.714	0.5	0.7	0.9	0.6	1.8	1.4	1.2
388522953	Proteína de plegamiento rossmann de union a NAD(P) (cl)	329	35.7	319.8	0.538	3.8	1.4	3.8	1.9	1.0	-2.6	-2.0
255638875	Flavoproteína wrbA (n)	207	22.0	261.6	0.525	0.2	0.2	1.8	0.3	12.0	1.0	2.0
543176444	Flavoproteína wrbA (cl)	203	22.1	73.6	-1	0.2	0.0	0.3	0.0	2.0	0.0	0.0
255634492	Porfobilinógeno desaminasa, cloroplástica	350	37.7	76.7	0.983	0.2	0.2	0.4	0.0	2.0	-1.0	0.0
388502746	Arabinogalactan similar a Fasciclina (cl)	249	26.6	138.6	0.012	0.3	0.1	0.3	0.0	1.0	-2.0	0.0
255633364	6 Arabinogalactan similar a Fasciclina (extr)	250	26.5	76.7	-1	0.4	0.0	0.6	0.0	1.7	-	0.0
355485908	Sin caracterizar (c)	75	8.3	121.3	0.488	3.0	3.4	1.7	13.5	-1.8	1.1	4.6
388510078	Sin caracterizar (cl)	248	26.2	81.7	0.448	0.4	0.1	1.3	0.1	3.3	-3.0	-3.0

ANEXO 2. Características de spots regulados en muestras de raíces.

# Spot	Tratamiento	Cantidad normalizada (Promedio)	D.E.	CV (%)	# Spot	Tratamiento	Cantidad normalizada (Promedio)	D.E.	CV (%)
SSP 1401	AF+/As	58827.9	15729.1	26.7	SSP 4105	AF	406858.1	15841.5	3.9
SSP 1401	AF/As	113321.1	10917.2	9.6	SSP 4105	AF+	148247.9	52311.3	35.3
SSP 1401	AF	602397.6	490456.1	81.4	SSP 4201	AF+/As	7996353.9	7599667.1	95.0
SSP 1401	AF+	76205.5	9131.5	12.0	SSP 4201	AF/As	53635.0	55930.2	104.3
SSP 2103	AF+/As	82886.3	6056.8	7.3	SSP 4201	AF	28377.6	262.5	0.9
SSP 2103	AF	659328.8	277298.0	42.1	SSP 4201	AF+	70492.9	52618.8	74.6
SSP 2103	AF+	11763.7	3355.3	28.5	SSP 4202	AF+/As	480185.8	145794.8	30.4
SSP 2501	AF+/As	58197.9	10093.2	17.3	SSP 4202	AF/As	258266.9	147303.2	57.0
SSP 2501	AF	44941.0	18035.2	40.1	SSP 4202	AF	301039.9	16052.0	5.3
SSP 2501	AF+	33028.6	24059.2	72.8	SSP 4202	AF+	277908.6	74570.0	26.8
SSP 2801	AF	431635.4	352984.6	81.8	SSP 4301	AF+/As	39321.6	8360.0	21.3
SSP 2801	AF+	182013.7	235648.9	129.5	SSP 4301	AF/As	68473.4	7712.5	11.3
SSP 2802	AF	467820.4	78789.2	16.8	SSP 4301	AF	64193.0	3962.1	6.2
SSP 2802	AF+	96782.6	52477.8	54.2	SSP 4301	AF+	48329.6	9634.5	19.9
SSP 3101	AF+/As	21719.5	9951.3	45.8	SSP 4302	AF+/As	29346.8	5421.7	18.5
SSP 3101	AF	95000.1	7692.3	8.1	SSP 4302	AF/As	65659.3	15279.0	23.3
SSP 3101	AF+	87696.8	33703.6	38.4	SSP 4302	AF	61388.9	17880.0	29.1
SSP 3102	AF/As	798499.2	172305.9	21.6	SSP 4302	AF+	50339.4	4860.9	9.7
SSP 3102	AF	223479.2	148817.7	66.6	SSP 4501	AF+/As	22820.7	4638.4	20.3
SSP 3102	AF+	13237.0	3298.9	24.9	SSP 4501	AF/As	77893.8	1542.3	2.0
SSP 3601	AF+/As	86364.2	42989.8	49.8	SSP 4501	AF	77775.8	6508.7	8.4
SSP 3601	AF/As	95804.0	14050.9	14.7	SSP 4501	AF+	137447.4	46081.3	33.5
SSP 3601	AF	82202.0	2769.6	3.4	SSP 4502	AF+/As	26623.3	1677.7	6.3
SSP 3601	AF+	60107.4	20130.9	33.5	SSP 4502	AF	51186.4	7282.4	14.2
SSP 3801	AF	144442.2	25006.4	17.3	SSP 4502	AF+	54481.8	2628.8	4.8
SSP 3801	AF+	209991.3	90225.3	43.0	SSP 4701	AF+/As	29775.7	28127.8	94.5
SSP 3803	AF+/As	62275.5	15837.2	25.4	SSP 4701	AF/As	72629.4	1209.3	1.7
SSP 3803	AF/As	37947.7	5571.9	14.7	SSP 4701	AF	52748.7	8881.3	16.8
SSP 3803	AF	204247.0	17614.6	8.6	SSP 4701	AF+	71819.9	69171.0	96.3
SSP 3803	AF+	91945.6	85393.3	92.9	SSP 4702	AF+/As	106215.3	1479.6	1.4
SSP 3901	AF+/As	47880.7	1692.3	3.5	SSP 4702	AF	52057.5	15014.8	28.8
SSP 3901	AF/As	35050.3	559.9	1.6	SSP 4702	AF+	26802.4	6755.6	25.2
SSP 3901	AF	265223.2	100152.4	37.8	SSP 4801	AF	82368.0	84690.6	102.8
SSP 3901	AF+	136913.3	62173.9	45.4	SSP 4801	AF+	36036.7	6055.3	16.8
SSP 4103	AF/As	536573.6	163531.9	30.5	SSP 4902	AF+/As	19723.5	7536.1	38.2
SSP 4103	AF	27445.2	7961.6	29.0	SSP 4902	AF	29639.7	3138.2	10.6
SSP 4104	AF+/As	308577.7	181368.4	58.8	SSP 4902	AF+	25480.2	32608.0	128.0
SSP 4104	AF	453310.6	38019.3	8.4	SSP 5102	AF+/As	396503.1	31534.0	8.0
SSP 4104	AF+	165324.1	84424.3	51.1	SSP 5102	AF/As	165586.7	99802.6	60.3
SSP 4105	AF+/As	342448.9	211548.1	61.8	SSP 5102	AF	528365.2	70389.5	13.3

SSP 4105	AF/As	416387.9	442088.1	106.2	SSP 5102	AF+	108853.8	66184.7	60.8
SSP 5201	AF+/As	70679.1	18215.8	25.8	SSP 6301	AF+	42299.8	7963.8	18.8
SSP 5201	AF/As	217293.6	91394.8	42.1	SSP 6501	AF+/As	81996.8	9448.6	11.5
SSP 5201	AF	50725.6	15327.7	30.2	SSP 6501	AF/As	247451.1	19899.4	8.0
SSP 5201	AF+	25563.0	24434.3	95.6	SSP 6501	AF	109196.5	32798.7	30.0
SSP 5202	AF+/As	33925.7	25333.0	74.7	SSP 6501	AF+	65795.2	36255.5	55.1
SSP 5202	AF/As	53963.3	30213.0	56.0	SSP 6601	AF+/As	9173.8	725.1	7.9
SSP 5202	AF	48777.4	15386.7	31.5	SSP 6601	AF/As	45816.9	23369.5	51.0
SSP 5202	AF+	19804.0	10960.3	55.3	SSP 6601	AF	30564.4	11924.4	39.0
SSP 5301	AF+/As	18121.3	1274.3	7.0	SSP 6601	AF+	17103.3	1517.4	8.9
SSP 5301	AF/As	40884.1	41980.1	102.7	SSP 6701	AF+/As	21448.0	6614.9	30.8
SSP 5301	AF	50827.7	8426.5	16.6	SSP 6701	AF	345286.5	234457.3	67.9
SSP 5301	AF+	38813.3	16156.6	41.6	SSP 6701	AF+	123067.9	109817.2	89.2
SSP 5501	AF+/As	43503.4	2725.1	6.3	SSP 6702	AF+/As	12155.4	7096.5	58.4
SSP 5501	AF/As	156290.4	21496.4	13.8	SSP 6702	AF	18072.6	25099.7	138.9
SSP 5501	AF	55660.1	12576.7	22.6	SSP 6702	AF+	15370.8	5090.3	33.1
SSP 5501	AF+	118223.1	42134.6	35.6	SSP 6802	AF+/As	15237.9	2175.9	14.3
SSP 5502	AF+/As	30415.2	3414.2	11.2	SSP 6802	AF/As	59253.9	9003.6	15.2
SSP 5502	AF/As	103868.7	2640.5	2.5	SSP 6802	AF	67047.4	8647.5	12.9
SSP 5502	AF	121555.2	84278.8	69.3	SSP 6802	AF+	39789.6	11504.1	28.9
SSP 5502	AF+	92093.1	70006.3	76.0	SSP 6803	AF+/As	21511.3	8890.3	41.3
SSP 5503	AF/As	37571.1	6538.3	17.4	SSP 6803	AF	639829.7	90317.1	14.1
SSP 5503	AF	56175.5	27458.2	48.9	SSP 6803	AF+	224544.7	99877.1	44.5
SSP 5503	AF+	52565.3	4436.1	8.4	SSP 7201	AF+/As	13842.5	2069.7	15.0
SSP 5601	AF	46226.1	22622.2	48.9	SSP 7201	AF/As	47315.9	4114.3	8.7
SSP 5601	AF+	43320.3	24318.3	56.1	SSP 7201	AF	55554.7	17976.8	32.4
SSP 5802	AF+/As	40370.3	6132.3	15.2	SSP 7201	AF+	37559.7	14852.6	39.5
SSP 5802	AF	69248.7	12945.3	18.7	SSP 7301	AF	124227.3	77653.4	62.5
SSP 5802	AF+	134933.8	47869.8	35.5	SSP 7301	AF+	71612.8	52770.1	73.7
SSP 5803	AF+/As	59678.8	16009.6	26.8	SSP 7401	AF+/As	26463.9	7442.6	28.1
SSP 5803	AF/As	72690.9	315.7	0.4	SSP 7401	AF/As	18632.3	8948.3	48.0
SSP 5803	AF	155605.2	33410.5	21.5	SSP 7401	AF	71683.2	12030.3	16.8
SSP 5803	AF+	67517.3	25241.9	37.4	SSP 7401	AF+	41555.4	7733.9	18.6
SSP 5804	AF+/As	62508.0	9158.8	14.7	SSP 7402	AF+/As	42612.4	45152.9	106.0
SSP 5804	AF/As	37500.0	1693.5	4.5	SSP 7402	AF/As	47274.0	810.6	1.7
SSP 5804	AF	253737.3	230335.8	90.8	SSP 7402	AF	49672.6	26790.4	53.9
SSP 5804	AF+	153121.8	108916.6	71.1	SSP 7402	AF+	58208.4	8767.4	15.1
SSP 5805	AF+/As	41741.3	36403.9	87.2	SSP 7403	AF/As	1378993.0	347736.0	25.2
SSP 5805	AF	5700.1	578.7	10.2	SSP 7403	AF	735031.2	113896.4	15.5
SSP 5805	AF+	9402.9	7643.5	81.3	SSP 7403	AF+	517163.3	909.8	0.2
SSP 6101	AF+/As	49162.8	10540.9	21.4	SSP 7404	AF+/As	29448.6	4320.9	14.7
SSP 6101	AF/As	20064.2	12772.9	63.7	SSP 7404	AF	64949.9	26944.0	41.5
SSP 6101	AF	175499.4	44833.6	25.5	SSP 7404	AF+	47577.6	26740.1	56.2
SSP 6101	AF+	175516.9	59753.3	34.0	SSP 7501	AF+/As	20287.4	582.5	2.9
SSP 6301	AF+/As	12223.9	274.6	2.2	SSP 7501	AF/As	173071.0	32869.9	19.0
SSP 6301	AF/As	15280.2	590.5	3.9	SSP 7501	AF	41052.4	9537.5	23.2
SSP 6301	AF	69688.8	16851.2	24.2	SSP 7501	AF+	29465.7	12126.5	41.2

SSP 7502	AF+/As	66521.4	22567.5	33.9	SSP 8403	AF	15999.0	3740.8	23.4
SSP 7502	AF/As	73094.3	8127.6	11.1	SSP 8403	AF+	104186.6	62507.3	60.0
SSP 7502	AF	64655.0	12175.0	18.8	SSP 8501	AF+/As	203368.3	28734.0	14.1
SSP 7502	AF+	16177.0	1795.6	11.1	SSP 8501	AF	524906.4	162798.8	31.0
SSP 7503	AF/As	55407.4	47558.9	85.8	SSP 8501	AF+	228993.7	123853.0	54.1
SSP 7503	AF	72694.9	22655.5	31.2	SSP 8502	AF+/As	29223.0	18860.9	64.5
SSP 7503	AF+	34313.8	33605.9	97.9	SSP 8502	AF/As	36976.2	6753.2	18.3
SSP 7601	AF+/As	45564.5	17714.0	38.9	SSP 8502	AF	42268.2	24731.5	58.5
SSP 7601	AF/As	28700.4	10654.4	37.1	SSP 8502	AF+	31244.2	9289.3	29.7
SSP 7601	AF	62268.9	13948.6	22.4	SSP 8601	AF+/As	195381.5	72330.2	37.0
SSP 7601	AF+	46870.3	7083.8	15.1	SSP 8601	AF/As	251158.9	40956.3	16.3
SSP 7602	AF	26211.1	23916.8	91.2	SSP 8601	AF	211934.4	32434.9	15.3
SSP 7602	AF+	20900.3	2656.0	12.7	SSP 8601	AF+	92652.1	19225.9	20.8
SSP 7603	AF	16661.1	12372.6	74.3	SSP 8602	AF+/As	61628.5	25795.8	41.9
SSP 7603	AF+	18907.5	795.9	4.2	SSP 8602	AF/As	64669.5	17567.7	27.2
SSP 7803	AF+/As	40669.5	37174.6	91.4	SSP 8602	AF	55856.1	61474.7	110.1
SSP 7803	AF/As	54100.9	23304.6	43.1	SSP 8602	AF+	49799.8	29745.6	59.7
SSP 7803	AF	214017.5	3517.4	1.6	SSP 8603	AF+/As	15516.2	2418.3	15.6
SSP 7803	AF+	334444.2	73055.3	21.8	SSP 8603	AF/As	53291.2	770.9	1.4
SSP 7804	AF+/As	23544.7	7068.0	30.0	SSP 8603	AF	70706.0	15917.7	22.5
SSP 7804	AF	313540.0	56476.0	18.0	SSP 8603	AF+	70202.3	20345.2	29.0
SSP 7804	AF+	98515.2	15209.9	15.4	SSP 8604	AF/As	33244.5	4578.4	13.8
SSP 8101	AF/As	168090.8	25435.5	15.1	SSP 8604	AF	17871.7	10482.5	58.7
SSP 8101	AF	72988.2	35888.1	49.2	SSP 8801	AF+/As	54907.3	22790.8	41.5
SSP 8101	AF+	36665.1	23133.8	63.1	SSP 8801	AF/As	29332.5	1506.2	5.1
SSP 8102	AF	92238.6	38458.5	41.7	SSP 8801	AF	32910.2	30865.0	93.8
SSP 8102	AF+	52664.9	10012.4	19.0	SSP 8801	AF+	17464.7	3515.2	20.1
SSP 8103	AF+/As	14211.8	1388.6	9.8	SSP 9102	AF/As	21321.3	23578.5	110.6
SSP 8103	AF/As	42192.0	36151.9	85.7	SSP 9102	AF	52523.8	18576.5	35.4
SSP 8103	AF	139131.7	25193.1	18.1	SSP 9102	AF+	31770.9	10298.6	32.4
SSP 8103	AF+	28471.1	7346.6	25.8	SSP 9103	AF/As	232183.6	166028.6	71.5
SSP 8201	AF+/As	54622.8	9192.6	16.8	SSP 9103	AF	250848.0	56703.7	22.6
SSP 8201	AF/As	419778.5	109625.2	26.1	SSP 9103	AF+	89503.2	32127.3	35.9
SSP 8201	AF	189122.2	69322.3	36.7	SSP 9401	AF	100996.2	118462.9	117.3
SSP 8201	AF+	80917.6	25760.5	31.8	SSP 9401	AF+	31983.9	42222.6	132.0
SSP 8301	AF+/As	21868.8	4080.0	18.7	SSP 9402	AF/As	168778.1	94887.1	56.2
SSP 8301	AF/As	178072.3	51945.2	29.2	SSP 9402	AF	55228.5	42844.0	77.6
SSP 8301	AF	17063.9	3428.0	20.1	SSP 9402	AF+	166592.2	230734.3	138.5
SSP 8301	AF+	36441.5	14058.8	38.6	SSP 9501	AF/As	72172.1	28018.8	38.8
SSP 8302	AF	50846.5	13066.4	25.7	SSP 9501	AF	78427.5	6903.4	8.8
SSP 8302	AF+	23036.6	1510.7	6.6	SSP 9501	AF+	131733.4	202160.5	153.5
SSP 8401	AF/As	210682.4	97591.5	46.3	SSP 9601	AF+/As	76465.6	65897.2	86.2
SSP 8401	AF	43480.7	14365.9	33.0	SSP 9601	AF/As	139768.1	64293.5	46.0
SSP 8401	AF+	22018.0	14789.5	67.2	SSP 9601	AF	72341.3	68385.8	94.5
SSP 8403	AF+/As	69993.9	2743.3	3.9	SSP 9601	AF+	283410.8	273371.9	96.5
SSP 8403	AF/As	134900.1	19939.8	14.8	SSP 9603	AF+/As	11991.6	44.7	0.4
SSP 9603	AF/As	50735.1	12444.1	24.5					

SSP 9603	AF	75007.2	62799.2	83.7				
SSP 9603	AF+	26418.6	3767.2	14.3				
SSP 9604	AF/As	142134.3	7618.6	5.4				
SSP 9604	AF	83771.8	13811.4	16.5				
SSP 9604	AF+	46427.0	15627.0	33.7				
SSP 9701	AF/As	19907.0	5654.6	28.4				
SSP 9701	AF	73430.5	19638.3	26.7				
SSP 9701	AF+	206118.7	121220.4	58.8				

ANEXO 3. Peso molecular y punto isoeléctrico calculados para spots de muestras de raíces.

Nombre de Spot	Mr	pl	Nombre de Spot	Mr	pl
SSP 0401	21	3.4	SSP 5804	47.4	6.1
SSP 1301	19.6	4.8	SSP 6101	9.2	6.4
SSP 1401	27.5	3.5	SSP 6301	17.2	6.2
SSP 2103	10.6	3.2	SSP 6402	25.15	6.79
SSP 2601	31.87	4.53	SSP 6501	26.71	6.55
SSP 2802	49.6	4.7	SSP 6801	50.99	6.61
SSP 2803	48.9	4.8	SSP 6802	62.2	6.4
SSP 3102	9.4	5.1	SSP 7201	20.25	6.99
SSP 3202	17.83	5.38	SSP 7401	21.4	6.5
SSP 3601	32.36	4.93	SSP 7402	18.2	6.6
SSP 3701	41.55	5.39	SSP 7403	22.8	6.9
SSP 3803	59	5.1	SSP 7501	26.65	7.02
SSP 3901	117	5.2	SSP 7502	26.86	7.35
SSP 4102	16.48	6.24	SSP 7601	29.64	6.86
SSP 4103	9.2	5.2	SSP 7804	47.9	6.7
SSP 4202	11.6	5.4	SSP 8001	14.21	7.54
SSP 4301	17.2	5.4	SSP 8102	67	7
SSP 4302	17.2	5.6	SSP 8103	16.71	8.39
SSP 4501	23.2	5.3	SSP 8201	20.09	8.54
SSP 4502	25.5	5.6	SSP 8301	17	7.8
SSP 4701	40.99	5.6	SSP 8302	16	8.3
SSP 4702	37.8	5.3	SSP 8403	23.6	7.9
SSP 5102	9.4	5.7	SSP 8502	24	8.1
SSP 5201	19.7	5.91	SSP 8601	28.4	8.02
SSP 5301	17.3	5.8	SSP 8603	29.6	7.1
SSP 5501	26.74	6.28	SSP 8801	53.9	8.1
SSP 5502	27.8	6.1	SSP 9503	29.3	8
SSP 5503	32.6	6.3	SSP 9603	28.3	8.5
SSP 5702	29.7	6	SSP 9701	42.44	7.8
SSP 5802	49.5	5.9	SSP 9901	44.6	6.8
SSP 5803	49.3	6			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00199

Matrícula: 2141800813

Influencia de la asociación endófito entre *Acacia farnesiana* y *Methylobacterium oryzae* en la tolerancia y bioacumulación de arsénico.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 22 del mes de mayo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DR. ALEJANDRO ALARCON
DR. FRANCISCO FIGUEROA MARTINEZ



ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DR. ALEJANDRO ALARCON

SECRETARIO

DR. FRANCISCO FIGUEROA MARTINEZ