

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

**DETERMINACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR  
*Naganishia sp.* Y SU PAPEL EN LA PROTECCIÓN AL ESTRÉS  
POR SEQUÍA EN *Zea mays***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**TANIA STEPHANY CRUZ VÁZQUEZ**

**ASESOR: JORGE LUIS FOLCH MALLOL**

**CO-ASESOR: HELENA PORTA DUCOING**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO/2020**

Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.

**Marie Curie**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. Helena Porta Ducoing (Co tutor, IBT-UAEM)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez (IBT-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CeIB-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Tesis: **Determinación de la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* y su papel en la protección al estrés por sequía en *Zea mays*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Tania Stephany Cruz Vázquez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JORGE LUIS FOLCH MALLOL** | Fecha:2020-08-17 14:39:22 | Firmante

TJSKCE05cXPY+R6h1Cv+v8/9aiqsDS2Fu0+NE1mRuALj3CGQWNX4WEVF4DxHD18c8k0SgaHgJxPTi7NVIYd4qamLG2rasd09ZI/E0+6fmhHtaio9+7wxGVzq+kQLnIL1DQjCpx  
ecQGIl0pOiojwienMNEGMniRN0A9EgtHEmLWibrEzBAWGUL7FfScW2C5e7wu1pw1m0WZj/dkkV3ZNY/PX6y2rTIUQC+nsZ/u/ipyk6JqEoHtZkmH9M0oKDMgauY8Ew8JKVavJq  
zHN9Z+PNm9kwip+P6yj8gE1xGvOfKnP2t4gLL2bdmyT/DlJ14squOVuNvg2hmf0mQfQa/3kxjw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



6GNEtm

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FGmcpo7yzNN6YfAYhtAwU123LMFJHHxK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. Helena Porta Ducoing (Co tutor, IBT-UAEM)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez (IBT-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CeIB-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Tesis: **Determinación de la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* y su papel en la protección al estrés por sequía en *Zea mays*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Tania Stephany Cruz Vázquez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. HELENA PORTA DUCOING



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**HELENA PORTA DUCOING** | Fecha:2020-08-18 08:39:35 | Firmante

dJA9xFdncegCGhL6hanJ7ECBOf8JvZQOdJm8HqkAprp4ANJeSsTlwiiF6JxPBE0rKL4k+fPMTW/WaEq4ukmfgJGo6ttp5NFTa9ZJDt0GgxseCpmWsK+rHQvQeAh7gR/YUrtWLA/e3pcOhMuamqwvDetUHtTru3RmjbAgzX+jlukSGysS6zAxWS++tBNat0Sr4KEIal8QVGjDnqFXU1+ejKXNHjoQFLTIL8izweG1ARQzvOq2HV1+ZY9oFLnoYpF0a60gAnoQNNnHpPjwk71WtdCYAw/UU065eriHCcRZRCl63/F2OCrWOS6nIr4H+03foeXxw0qVMbVpyx+iZGQm5g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CYuORw](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hsMTfQed350lmwlmMul7ekBValsNkj1>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. Helena Porta Ducoing (Co tutor, IBT-UAEM)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez (IBT-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CeIB-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Tesis: **Determinación de la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* y su papel en la protección al estrés por sequía en *Zea mays*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Tania Stephany Cruz Vázquez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. ELIZABETH CÓRDOBA MARTÍNEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ELIZABETH CÓRDOBA MARTÍNEZ | Fecha:2020-08-20 13:06:35 | Firmante**

iz6uCXzXemU/zlukkx72Mw0ydOHojqsPNteyTPO/FoER4eB7Ns1phcXscFRreRY74X1YV6amGBz4oxe0iN9mmZYvFo3/QXs/WgbGgxmCZjbeG0G3R/ytNYIptarYxP6QoZUbu7Ma  
MEnjBxVzUHvUvUQa6GhzTJwgH1j3JZmnwGh9p/tejiYQ02XswlvaqYU7kUBpJk7f96+siQkuOIT7W45SGsNfzv3K4S1OyMKM4GUiZgje7NcAVIYPf0t2ECd+70qG4Q1/33r3hxLah  
gVZBndMSw2jpD/PXsQpkzghSK16RftZpHUFX49d8nllt4yYi6NRrvH70LYrd3rdlHXsA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



V9M2kF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/iRKBNvXPNhBdw6dnNTx2HZ4v392AfSQw>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. Helena Porta Ducoing (Co tutor, IBT-UAEM)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez (IBT-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CeIB-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Tesis: **Determinación de la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* y su papel en la protección al estrés por sequía en *Zea mays*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Tania Stephany Cruz Vázquez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2020-08-18 18:20:14 | Firmante

csvVyAmERe7MfMrDpF6ou95H2xxj+HSUabvYsDmrZjNZzSSqdkjO01QF6Lv6NUN/qIYGsLrrBCt4e+xbPEtiKsnPMOau0IAd4xAQqDk9xQ6bHQ/H1zDnkXmAZga6oJMnQsvIF1JJ4svcdLIwhk0fbf+ncQH11CGZk9TV93hqD+JtbnGaO/6WPFm+/3cu9jdunNtX3GwwLCG1GijNTtoexqH+177C4679nw5fan5+b2/9J8UaDDKTSY+5uiVhd5X6pXCogn2XfGNatMaWH2ELQN2s8y4kJ+wpmqFZjB+HqLkPqjoypFTIPfvG4zeu0DxfRiOnd97XZFivQLpKUhN3A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



v4MTCO

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/asAj0emhh8KnSdW2jepYq9ITvfmrEuWO>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. Helena Porta Ducoing (Co tutor, IBT-UAEM)

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez (IBT-UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CeIB-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Tesis: **Determinación de la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* y su papel en la protección al estrés por sequía en *Zea mays*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Tania Stephany Cruz Vázquez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

### APROBADO

ATENTAMENTE

---

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2020-08-18 19:06:44 | Firmante**

K200hV209Cms1DKdpFDmeBi2sVjMGFtK3fQsmfwJ7bCSFuJhNuj0DKxV/v78TPSiT34O+X4lCH+w6vW6892uJyLVgNC/gSWr/BA9tyUL7v0kBqc8MMrA7KG6H+0Olb29uG6MYlRTO85JLi9+KMVYhM5Gba0CzU7UPvB9Itl/MqCc+LoviG8gKcGMtoM6LobhwdG49WEsTXTRhUptwXXPqH4eIElclSgoXqEx1hKk7ok61P0PGDHYs6dTh1nVRulHE1omMJxk4J4OFsAY76XNzjLML6htofRtoKzETfD7zUrx8gHkPwU3+mm74j4DL4hCw/1cwpgupBq1EkNAmznA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3aF5vP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/eAy1QmSNqIDuV2bg8RsjO9ie41qOHaN0>



## RESUMEN

El maíz, como la mayoría de los cultivos de importancia económica se encuentra expuesto a las condiciones cambiantes del ambiente. Gran parte de la problemática del cultivo es la falta de agua, debido a que el 51% de su producción depende de las lluvias de temporal. En este trabajo proponemos una alternativa para mitigar los efectos negativos del estrés por sequía en *Z. mays*, mediante el uso de *Naganishia sp.*, un microorganismo promotor del crecimiento vegetal, para la preparación fisiológica de la planta ("*priming*"). El "*priming*" o cebado con *Naganishia sp.* ayuda a las plantas a responder mejor a la condición de estrés por sequía, a través de la activación de mecanismos de respuesta al estrés como es la autofagia. La autofagia consiste en el reciclaje y degradación de componentes celulares dañados y tóxicos que resultan de la condición de estresante, y para la cual juega un papel importante tanto a nivel celular como a nivel de planta completa en la tolerancia al estrés por sequía.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores

Dra. Helena Porta Ducoing y el Dr. Jorge Luis Folch Mallol por su dedicación en mi formación académica.

A mi comité tutorial por su valiosa aportación a nuestro proyecto de investigación.

Dra. Elizabeth Córdoba Martínez

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Dra. Irene Perea Arango

A todos los profesores que a través de sus clases me transmitían el amor por la ciencia.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-DGAPA -UNAM IN202417.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CVU 706241).

Al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarnos las instalaciones, equipos y personal para llevar a cabo nuestro proyecto de investigación y contribuir extensamente en mi formación académica.

Al Dr. Alexis Acosta Maspon por su tiempo y apoyo técnico en la medición de algunos experimentos.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y familiares por su apoyo y acompañamiento a lo largo de mi formación académica.

<b>INDÍCE</b>	
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS,</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN,</b>	<b>8</b>
<b>2. ANTECEDENTES,</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Zea mays</i> como organismo de estudio,	10
2.2 Estrés por sequía,	10
2.3 El uso de microorganismos benéficos para plantas cultivadas,	11
2.4 El género <i>Naganishia</i> y su importancia,	13
2.5 El mecanismo de autofagia,	14
2.6 Marcadores para el estudio de la autofagia,	17
2.7 Los miembros <i>ATG</i> en <i>Z. mays</i> ,	18
2.8 La autofagia y la productividad de los cultivos de interés agrícola bajo condiciones de sequía,	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN,</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS,</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS,</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo general,	23
4.2 Objetivos específicos,	23
<b>6. METODOLOGÍA,</b>	<b>24</b>
6.1 Microorganismo de estudio y material vegetal,	24
6.2 Condiciones de crecimiento de <i>Naganishia sp.</i> ,	24
6.3 Sistema <i>in vitro</i> para pruebas de promoción de crecimiento de plántulas de <i>Z. mays</i> en cocultivo con <i>Naganishia sp.</i> ,	24
6.4 Identificación de la proteína <i>ATG8</i> por la técnica de western blot,	25
6.5 Sistema <i>in vitro</i> para generar estrés hídrico e inhibición del flujo autofágico en plántulas inoculadas y no inoculadas con <i>Naganishia sp.</i> ,	26
6.6 Condiciones de crecimiento de las plántulas de <i>Z. mays</i> ,	27

6.7 Sistema de crecimiento en almácigos y sustrato para pruebas de estrés por sequía en plántulas de <i>Z. mays</i> pretratadas con <i>Naganishia sp.</i> ,	<b>27</b>
6.8 Mediciones de biomasa foliar a partir del registro fotográfico,	<b>29</b>
6.9 Mediciones del intercambio de gases con el LI-COR 6400,	<b>29</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
7.1 <i>Naganishia sp.</i> induce la autofagia en <i>Z. mays</i> in vitro,	<b>30</b>
7.2 <i>Naganishia sp.</i> induce la autofagia en <i>Z. mays</i> en el sistema experimental de crecimiento en almácigo,	<b>32</b>
7.3 Efecto de la inoculación con <i>Naganishia sp.</i> en el crecimiento de plántulas de <i>Z. mays</i> in vitro,	<b>34</b>
7.4 Efecto de la inhibición del flujo autofágico con cloroquina en plántulas de <i>Z. mays</i> inoculadas y no inoculadas con <i>Naganishia sp.</i> en condiciones control y de estrés hídrico,	<b>38</b>
7.5 El efecto de <i>Naganishia sp.</i> en condiciones de estrés por sequía en plántulas de <i>Z. mays</i> ,	<b>40</b>
7.6 <i>Naganishia sp.</i> incrementa la biomasa total fresca y seca de la parte aérea bajo condiciones de crecimiento control (Experimento 1),	<b>41</b>
7.7 <i>Naganishia sp.</i> incrementa la tasa de supervivencia de las plántulas de <i>Z. mays</i> bajo condiciones de estrés por sequía severa (Experimento 2),	<b>44</b>
7.8 <i>Naganishia sp.</i> incrementa la biomasa fresca de la raíz en condiciones de crecimiento control (Experimento 2),	<b>48</b>
7.9 El “priming” con <i>Naganishia sp.</i> disminuye la conductancia estomática e incrementa el uso eficiente de agua bajo condiciones de crecimiento control (Experimento 3),	<b>50</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Los genes de autofagia de <i>Z. mays</i> homólogos de <i>Arabidopsis</i> y levadura,	19
<b>Tabla 2.</b> Tasa de germinación de semillas de <i>Zea mays</i> ,	35
<b>Tabla 3.</b> Tasa de supervivencia a los 36 d de edad de plántulas de <i>Z. mays</i> en los diferentes tratamientos del experimento (Experimento 2),	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas del proceso de microautofagia y macroautofagia en plantas,	16
<b>Figura 2.</b> Principales proteínas ATG conservadas entre levaduras, animales y plantas,	17
<b>Figura 3.</b> Lipidación de ATG8 dependiente de <i>Naganishia sp.</i> en plántulas de <i>Z. mays</i> ,	31
<b>Figura 4.</b> Determinación de la lipidación de ATG8 dependiente de <i>Naganishia sp.</i> en raíz y parte aérea de plántulas de <i>Z. mays</i> de 9 días de edad,	33
<b>Figura 5.</b> Fotografía representativa de las plántulas de <i>Z. mays</i> (6 DPG) control (sin inocular) y medio inoculado (+ <i>Naganishia sp.</i> ),	36
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica del crecimiento de la raíz principal de plántulas de <i>Zea mays</i> crecidas en medio MS sin inóculo (control) e inoculado con <i>Naganishia sp.</i> (+ <i>Naganishia sp.</i> ) bajo condiciones de crecimiento normal durante 96 h,	36
<b>Figura 7.</b> Fenotipo de las raíces de <i>Z. mays</i> en los tratamientos: con inóculo (+ <i>Naganishia sp.</i> ) y sin inóculo (Sin inóculo),	37
<b>Figura 8.</b> Figura comparativa de plántulas de 6DPG bajo condiciones de crecimiento control y de estrés por sequía, en presencia (+CLO) o ausencia (-CLO) del inhibidor del flujo autofágico para los tratamientos: sin inoculación (sin inóculo) e inoculado (+ <i>Naganishia sp.</i> ),	39
<b>Figura 9.</b> Registro fotográfico del fenotipo de las plantas de <i>Z. mays</i> durante el curso del tiempo (Experimento 1),	42

<b>Figura 10.</b> Determinación de la biomasa total de plántulas de <i>Zea mays</i> , en condiciones de crecimiento control y en estrés por sequía, para las plantas inoculadas y no inoculadas (Experimento 1),	<b>43</b>
<b>Figura 11.</b> Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 14 días de edad (previo al estrés) en la 2da y 4ta hoja (fuente y vertedero) de plántulas inoculadas y no inoculadas con <i>Naganishia sp.</i> (Experimento 2),	<b>45</b>
<b>Figura 12.</b> Registro fotográfico del fenotipo de las plantas de <i>Z. mays</i> durante el curso del tiempo del experimento (Experimento 2),	<b>47</b>
<b>Figura 13.</b> Determinación de la biomasa de plántulas de <i>Z. mays</i> , en condiciones de crecimiento control, para las plantas inoculadas y no inoculadas (Experimento 2),	<b>49</b>
<b>Figura 14.</b> Registro fotográfico del fenotipo de las plantas de <i>Z. mays</i> durante el curso del tiempo del experimento (Experimento 3),	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b> Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 14 días de edad (previo al estrés) en la 4ta hoja (vertedero) de plántulas inoculadas y no inoculadas con <i>Naganishia sp.</i> en condición control y de estrés por sequía (Experimento 3),	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 28 días de edad (7d de recuperación después del estrés) en la 4ta hoja (vertedero) de plántulas inoculadas y no inoculadas con <i>Naganishia sp.</i> en condición control y de estrés por sequía (Experimento 3),	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Determinación de la biomasa de plántulas de <i>Z. mays</i> , en condiciones de crecimiento control, para las plantas inoculadas y no inoculadas (Experimento 3),	<b>54</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es un cultivo representativo de México por su gran importancia económica, social y cultural. En México, el cultivo de maíz se divide en maíz blanco y maíz amarillo, dentro de las cuales, la producción de maíz blanco se cubre en su totalidad por productores nacionales, mientras que para el abasto nacional de maíz amarillo sólo se cubre el 23.95% de la demanda nacional. El cultivo de maíz requiere una temperatura óptima de crecimiento de 18 a 24°C y una precipitación anual de 700 a 1,300 mm (SIAP, 2017). El maíz, como la mayoría de los cultivos de importancia económica se encuentra expuesto a las condiciones cambiantes del ambiente, y a pesar de que las plantas de *Zea mays* (*Z. mays*) son cultivos de ambientes diversos en altitud y clima (CONABIO, 2011), y que gran parte del territorio nacional es propicio para la producción de grano de maíz, esto no las excluye de sufrir estrés por sequía. Gran parte de la problemática de la producción de maíz se debe a la falta de agua. La producción de maíz depende en un 51.01% de las lluvias de temporal, mientras que sólo el 3.55% de la producción es por modalidad de riego de gravedad, el 0.19% de riego por bombeo y 45.25% de otro tipo de riego (SIAP, 2017). Por consiguiente, la búsqueda de alternativas para mitigar los efectos de la sequía en el desarrollo y producción de las plantas de cultivo se vuelve necesario.

En la búsqueda de alternativas para mitigar las condiciones de estrés por sequía, se ha implementado el uso de microorganismos benéficos como cebadores ó "*priming*", que preparan fisiológicamente a las plantas y les ayudan a responder mejor a la condición de estrés (Conrath *et al.*, 2006). La preparación fisiológica o protección cruzada, se da a través de la biomodulación o activación de procesos celulares de respuesta (vías de señalización comunes a diferentes tipos de estrés), previo a la situación de estrés y posterior al estrés, por lo que pueden conferir tolerancia para reducir el impacto negativo en el rendimiento de los cultivos (Schulz *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2014).

La cepa de *Naganishia sp.*, utilizada en este trabajo, es una levadura psicotolerante y rizosférica, cuyos efectos de promoción del crecimiento incluyen un aumento la tasa de la germinación, y del crecimiento en etapas de desarrollo iniciales de *Solanum lycopersicum* (Tapia, 2020).

La autofagia es un proceso catabólico que contribuye en la supervivencia de las plantas bajo condiciones de estrés abiótico. La autofagia es un mecanismo de reciclaje de nutrientes, y de degradación de componentes celulares dañados bajo diferentes tipos de estrés: la salinidad, la sequía, el estrés por frío, el estrés oxidativo, entre otros (Vierstra, 2012; Liu y Bassham, 2012; Tsugane, 1999; Sharma *et al.*, 2007; An *et al.*, 2012; Signorelli *et al.*, 2019). A la fecha, se ha demostrado la importancia de la autofagia para la supervivencia de plantas de interés agrícola, específicamente bajo condiciones de estrés por sequía, como es el caso de manzana (Wang *et al.*, 2017), tomate (Sun *et al.*, 2018), mijo (Li *et al.*, 2015), y cebada (Zeng *et al.*, 2017).

Por lo anterior, consideramos relevante el estudiar si el “*priming*” con *Naganisha sp.* mejora las condiciones de desarrollo y/o la respuesta al estrés de plántulas de maíz, además de determinar si el “*priming*” se relaciona con la inducción de la autofagia y en conjunto se mejora la respuesta de las plántulas al estrés por sequía.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Zea mays* como organismo de estudio

El maíz es uno de los cultivos vegetales de mayor importancia en México ya que tiene relevancia social, cultural y económica. El consumo de maíz *per cápita* es de 196 kg al año (SIAP, 2017). Sin embargo, debido a las condiciones de cambio climático, el estrés por sequía ha afectado el rendimiento de este cultivo. Esta afectación se puede dar desde establecimiento de la plántula (en edades tempranas) hasta el llenado del grano. Por lo que para asegurar la producción de maíz de temporal se ha incentivado el uso de métodos transgénicos para mejorar la variación genética a través del desarrollo de híbridos de maíz con mayor tolerancia a la sequía y resistencia a plagas (Fischer *et al.*, 2014). Además, se han iniciado trabajos en epigenética en el acondicionamiento de las variedades de maíz para abordar las limitaciones de la producción de maíz, como la sequía y el calor (Hu *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente la tecnología de reproducción convencional y transgénica requieren mucho tiempo y mano de obra. Por lo que, el uso de microorganismos como una tecnología alternativa para mejorar la tolerancia a la sequía emerge como una posible solución a la falta de agua (Ahmad *et al.*, 2016).

### 2.2 Estrés por sequía

La sequía es un tipo de estrés abiótico muy importantes, debido a que tiene un impacto negativo a diferentes niveles; puede paralizar la producción de alimentos, agotar ambientes naturales y perturbar los mercados (FAO, 2019).

La sequía que se define como: la alteración en las precipitaciones pluviales por un período prolongado de tiempo, en relación con la media anual de precipitación (NOAA, 2019). La sequía en la condición ambiental actual es una de las principales causas de estrés en los cultivos, generando pérdidas económicas a nivel mundial.

Los efectos de la sequía en las plantas dan como resultado estrés hídrico y osmótico, inhibición del crecimiento y cambios a nivel metabólico. A nivel celular, el

suministro limitado de agua incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno dañando particularmente: cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Stone et al., 2000; Rodriguez et al., 2004). Adicionalmente, como resultado del estrés por sequía, las proteínas celulares sufren daño y se acumulan en la célula, ocasionando la alteración de la homeostasis celular. Estas proteínas se vuelven tóxicas y se hace necesaria la activación de los sistemas de degradación para su desintoxicación (Vembar & Brodsky, 2008; Kamauchi et al., 2005). Usualmente, las proteínas mal plegadas son degradadas por proteasoma, sin embargo, cuando la cantidad excede se hace uso de otros sistemas de degradación (Nakajima & Suzuki, 2013), por ejemplo, la autofagia.

Por esta razón se vuelve importante la búsqueda de microorganismos como una alternativa ecológica que puede aumentar la eficiencia del uso del agua en los cultivos, así como inducir respuesta de los cultivos a la condición de estrés.

### **2.3 El uso de microorganismos benéficos para plantas cultivadas**

Comúnmente las plantas se han considerado organismos autónomos, cuyo rendimiento se ha explicado a nivel genómico y celular. Sin embargo, las plantas no se encuentran aisladas ya que proporcionan un nicho ecológico único para la microbiota en su entorno. Dentro de esta microbiota se encuentran microorganismos con los que las plantas pueden mantener una relación mutualista, adquiriendo múltiples beneficios, como una mayor eficiencia fotosintética, un mejor uso de nutrientes, agua y tolerancia al estrés abiótico y biótico (Barrow *et al.*, 2008). La importancia de la microbiota radica en su uso potencial para favorecer que las plantas sean más tolerantes a los estreses abióticos y promover su crecimiento bajo estas condiciones.

A la protección cruzada contra diferentes estreses (ya sea de tipo biótico ó abiótico), resultado de la inoculación con microorganismos, se le conoce como “*priming*” y se da gracias a la activación de vías de señalización comunes en plantas, por ejemplo, la producción de especies reactivas de oxígeno, y ésta a su vez va desencadenando

otras señales. El “*priming*” (preparación la planta), es decir, el pretratamiento de la planta, le confiere una ventaja de respuesta ante otra condición de estrés diferente, debido a que algunas respuestas ya están “encendidas” y facilita las respuestas río abajo.

Hasta el momento está bien documentado que algunos microorganismos inoculados en la rizósfera pueden tener efectos benéficos en plantas cultivadas, como es el caso de bacterias del género *Burkholderia*. La inoculación con *Burkholderia phytofirmans* estimula el crecimiento de la vid y mejora su capacidad para resistir el estrés por frío (Ait Barka *et al.*, 2006). Asimismo, las plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *Arthrobacter sp.* y *Bacillus sp.* toleran la exposición de hasta un 45 % de polietilenglicol, lo que indica que estos microorganismos del suelo favorecen la tolerancia al estrés osmótico (Sziderics *et al.*, 2007).

Los microorganismos rizosféricos también mejoran la agregación del suelo, mejorando la disponibilidad de agua para las plantas durante los períodos secos (Sandhya *et al.*, 2009), e induciendo en éstas la síntesis de proteínas de choque térmico y osmorreguladores como prolina y glicina betaína, que ayudan al mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Bano y Fatima 2009).

Al igual que las bacterias, organismos eucariotas como las levaduras también poseen la capacidad de promover el crecimiento. Un ejemplo es *Candida tropicalis* que produce ácido indol acético (IAA), solubiliza fosfato, tiene actividad enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC desaminasa), poliamidas y produce fitasa lo que genera un aumento en la biomasa radicular (Amprayn *et al.*, 2012).

Recientemente se aisló una cepa de levadura psicotolerante identificada como *Naganishia sp.* del volcán Xinantécatl, Nevado de Toluca, la cual se encontraba en la rizósfera de una planta aislada en la zona (Tesis de Doctorado, Tapia, 2020). A través del estudio de esta cepa en condiciones *in vitro*, se demostró que tiene un efecto positivo sobre la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* a 22 °C, aumentando la tasa de germinación y la velocidad de crecimiento de la radícula, en

comparación con semillas control sin inocular. Esta cepa al igual que otros organismos descritos como promotores del crecimiento, presenta actividad de enzimas celulolíticas carboximetilcelulosa (CMCasas), xilanasas y producción de IAA cuando crece a 15°C (Tapia, 2020).

## **2.4 El género *Naganishia* y su importancia**

Hasta la fecha han sido pocas las especies del género *Naganishia* descritas. Los microorganismos que pertenecen a este género poseen notables adaptaciones al medio ambiente, como es la capacidad de crecer en condiciones fluctuantes de temperatura, ciclos de congelación y descongelación, bajos niveles de pH, resistencia a dosis altas de radiación UV, la capacidad de crecer a temperaturas por debajo de 0°C y en ambientes con alturas superiores a los 6000 msnm (Schmidt et al., 2017).

En la naturaleza *Naganishia* se encuentra formando parte de la diversidad de comunidades fúngicas encontradas en salmueras hipersalinas (Borruso et al., 2018), y se ha aislado de suelos de la Antártida (Baeza et al., 2017).

Asimismo, algunos representantes del género *Naganishia* como *N. liquefaciens* forman parte de la microbiota del néctar en plantas de *Piscidia piscipula* (Canto et al., 2017). Actualmente se ha descrito que cepas de *Naganishia adeliensis* que sintetizan un perfil variable de ácidos grasos, como triacilgliceroles ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en dependencia de la temperatura, como de las diferentes fuentes de carbono a 20° y 25°C (Filippucci et al., 2016). De acuerdo con los antecedentes mostrados, resulta interesante determinar el papel que puede tener *Naganishia sp.* en la promoción de crecimiento en distintas especies vegetales (Tapia et al., 2019).

El uso de *Naganishia sp.* podría tener ventaja con respecto a otras especies debido a su capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles y de inducir respuestas fisiológicas en la planta para desencadenar respuestas para la protección al estrés abiótico.

En este trabajo se plantea el uso de *Naganishia sp.* como “*priming*” en plantas de *Z. mays*, con la finalidad de conferir resistencia a la condición de estrés por sequía mediante la activación de la autofagia. Siendo la autofagia un proceso de suma importancia para la supervivencia de la planta, a través del mantenimiento de la homeostasis celular al remover componentes dañados que son tóxicos para la célula y la planta completa (Xiong et al.,2007).

## **2.5 El mecanismo de autofagia**

Las células poseen enzimas para descomponer una variedad de macromoléculas que son importantes para el reciclaje de nutrientes y la eliminación de moléculas tóxicas y dañadas. El reciclaje intracelular es esencial para el adecuado control de los eventos celulares, ya que se eliminan los desechos celulares y se reponen los nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento (Dikic, 2017 y Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017). Para evitar la degradación inespecífica, las actividades catabólicas en células eucariotas están estrechamente reguladas y aisladas en complejos proteicos especializados como el proteasoma y a través de orgánulos líticos como en la autofagia (Kang *et al.*, 2018).

La autofagia o el "comerse a sí mismo", es un proceso catabólico que ayuda a las células a mantener la proteostasis al degradar las proteínas citoplásmicas y orgánulos disfuncionales (Chapin *et al.*, 2015).

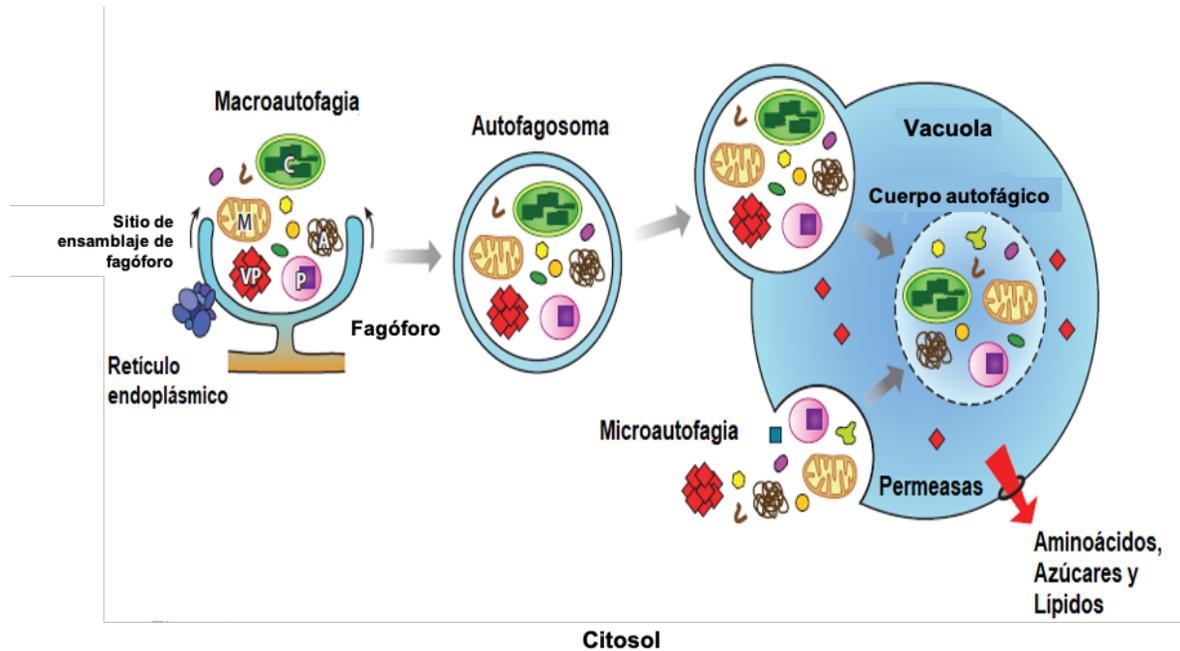
La autofagia se divide en dos tipos: la microautofagia y la macroautofagia, la primera se da por la invaginación del tonoplasto que envuelve porciones del citoplasma en cuerpos autofágicos al interior de la vacuola. La característica única de la macroautofagia (a la cual nos referiremos como autofagia) es la formación de autofagosomas: que son vesículas de doble membrana que se forman *de novo* para encapsular porciones del citoplasma, orgánulos dañados o proteínas mal plegadas, que se transportan a la vacuola en donde las hidrolasas degradan la membrana interna de autofagosoma con la carga citoplasmática. Las macromoléculas resultantes de esta degradación se exportan al citoplasma a través de permeasas

para su reciclamiento en procesos biosintéticos y para la generación de energía. La autofagia esencialmente es un proceso de remodelamiento y mantenimiento celular básico en una situación de estrés (Marshall y Vierstra, 2018).

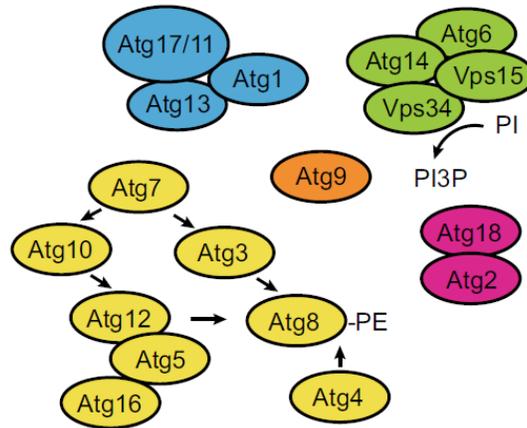
La autofagia inicia con el ensamblaje del fagóforo que es una membrana envolvente que se origina del retículo endoplásmico. El fagóforo secuestra componentes citosólicos y luego se cierra para formar el autofagosoma de doble membrana (Marshall & Vierstra, 2018). Este proceso de degradación que puede ser selectivo, al degradar complejos de proteínas como ribosomas, proteasomas y agregados de proteínas insolubles tóxicos para la célula, o no selectivo, degradando contenido citoplasmático en masa para la movilización de nutrientes durante condiciones de inanición (ver figura 1) (Hillwig *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2015). Las proteínas ATG que son las encargadas de llevar a cabo el proceso autofágico (autophagy related), responden a señales internas y externas (Li & Vierstra, 2012; Liu & Bassham, 2012; Feng *et al.*, 2015).

Las proteínas ATG se clasifican típicamente en 5 grupos jerárquicos de acuerdo a las funciones del complejo al que pertenecen (ver figura 2) y cuyos nombres se basan en la nomenclatura de levadura (Kang *et al.*, 2018). El complejo ATG1 cinasa que responde al estatus nutricional regulado por TOR y SNRK1, dos complejos transmembranales ATG9 y ATG2/ATG18 que ayudan a elongar la membrana del fagóforo a través del reclutamiento de lípidos, el complejo fosfatidilinositol cinasa conformado por ATG6/VPS34/ATG14/VPS15 que promueven la nucleación de vesículas, y el sistema de conjugación ATG8/ATG12 que envuelve la carga, expande y cierra las vesículas y posteriormente ayuda en la fusión de los autofagosomas con el tonoplasto de la vacuola. La estructura pre-autofagosomal (PAS), que es el sitio de iniciación de la autofagia y expansión del fagóforo, se genera mediante la formación de complejos jerárquicos de proteínas ATG. Posteriormente, cuando los autofagosomas están maduros se fusionan con el tonoplasto para liberar la vesícula interna (cuerpo autofágico) a la luz vacuolar, donde su carga es degradada por las hidrolasas vacuolares. Los productos de la digestión se almacenan en la vacuola o se transportan al citosol para su reutilización

(ver figura 1) (Xie & Klionsky, 2007; Nakatogawa *et al.*, 2009; Liu & Bassham, 2012; Marshall & Vierstra, 2018).



**Figura 1.** Etapas del proceso de microautofagia y macroautofagia en plantas. Abreviaturas dentro de la imagen: A, agregados de proteínas; C, cloroplasto; M, mitocondria; P, peroxisoma; VP, proteína vacuolar (Tomada de Marshall y Vierstra, 2018).



**Figura 2.** Principales proteínas ATG conservadas entre levaduras, animales y plantas. Cinco grupos de proteínas ATG se distinguen por colores: el complejo ATG1 cinasa (azul), el complejo PI3K (verde), ATG9 (naranja), el complejo ATG2-ATG18 (morado) y sistema de conjugación ATG8/12 (amarillo) (Modificada de Kang *et al.*, 2018).

## 2.6 Marcadores para el estudio de la autofagia

La proteína ATG8-PE es el marcador característico de la autofagia. De todas las proteínas que participan en la autofagia ATG8-PE es la única que se asocia específicamente con la membrana interna del autofagosoma (Klionsky *et al.*, 2012).

Para monitorear este proceso se observa la conversión de la forma ATG8 citosólica (ATG8 libre) a ATG8-PE (ATG8 lipídada) mediante western blot. El peso molecular de ATG8-PE es mayor que ATG8 de aproximadamente 13.6 kDa. La cantidad de ATG8-PE correlaciona claramente con el número de autofagosomas y por consiguiente, un aumento en la relación entre la ATG8-PE y la ATG8 indica un incremento de la autofagia en un momento dado (Slobodkin y Elazar, 2013). De la misma manera se puede hacer uso de tinciones para la localización de autofagosomas, por ejemplo, la tinción de rojo neutro que tiñe compartimentos ácidos, la cual es una característica de los autofagosomas.

## 2.7 Los miembros *ATG* en *Zea mays*

Recientemente Li y colaboradores (2015) describieron que *Z. mays* contiene 18 miembros *ATG* de los cuales *Atg2*, *Atg3*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg9*, *Atg10*, *Atg12*, *Atg16L*, *Atg101*, *ZmPI3K* y *Vps34* son genes únicos, mientras que *Atg1*, *Atg4*, *Atg6*, *Atg8*, *Atg11*, *Atg13*, *Atg15* y *Atg18* pertenecen a familias génicas, esto último indica que podría existir redundancia o subfuncionalización. En total, los genes *ATG* de *Z. mays* codifican para 43 proteínas *ATG* (ver tabla 1), que se expresan ubicuamente y que se sobrerregulan en la senescencia, durante la descomposición y el reciclaje; en condiciones de inanición, en la formación del endospermo durante el desarrollo de la semilla, durante la maduración y muerte de este, lo que indica la importancia de la autofagia en relación con la productividad de *Z. mays*. El estudio de la autofagia en la mutante de *atg12*, muestra la presencia de defectos en la expansión del fagóforo, perfiles proteicos alterados en las hojas y además la removilización de nitrógeno a la infrutescencia se altera (Li *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Los genes de autofagia de *Z. mays* homólogos, *Arabidopsis* y levadura (Li *et al.*, 2015). En verde se indican los genes *ATG* que pertenecen a familias génicas, en amarillo genes únicos.

Genes <i>ATG</i>	Proteínas <i>ATG</i>	Complejo al que pertenecen	Etapas de la autofagia en la que participan
<i>ZmATG1</i>	ZmATG1a-c	Complejo ATG1 cinasa	Iniciación y Nucleación
	ZmATG1t		Función desconocida
<i>ZmATG2</i>	ZmATG2	Complejo ATG9/ATG2/ATG18	Nucleación de la vesícula
<i>ZmATG3</i>	ZmATG3	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG4</i>	ZmAtg4a-b	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG5</i>	ZmATG5	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG6</i>	CaATG6a-b	Complejo cinasa PI3K	Nucleación de la vesícula
<i>ZmATG7</i>	ZmATG7	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG8</i>	ZmATG8a-e	Vía de conjugación ATG8	Elongación, reclutamiento del cargo, maduración y fusión con el tonoplasto
<i>ZmATG9</i>	ZmATG9	Complejo ATG9/ATG2/ATG18	Entrega de la membrana y Nucleación de la vesícula
<i>ZmATG10</i>	ZmATG10	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG11</i>	ZmATG11a-b	Complejo ATG1 cinasa	Iniciación
<i>ZmATG12</i>	ZmATG12	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG13</i>	ZmATG13a-f	Complejo ATG1 cinasa	Iniciación
<i>ZmATG16L</i>	ZmATG16L	Vía de conjugación ATG8	Elongación: Expansión del fagóforo
<i>ZmATG18</i>	ZmATG18a-j	Complejo ATG9/ATG2/ATG18	Nucleación de la vesícula
<i>ZmVPS15</i>	CaVPS15a-b	Complejo cinasa PI3K	Nucleación de la vesícula
<i>ZmVPS34</i>	CaVPS34	Vía de conjugación ATG8	Nucleación de la vesícula
<i>ZmATG101</i>	ZmATG101	Complejo ATG1 cinasa	Iniciación
<i>ZmPI3K</i>	ZmPI3K	Complejo cinasa PI3K	Nucleación de la vesícula

## 2.8 La autofagia y la productividad de los cultivos de interés agrícola bajo condiciones de sequía

Con base en los estudios realizados en *Arabidopsis* se demostró la relevancia de la autofagia tanto en el desarrollo de la planta como en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico, factores que impactan directamente sobre el rendimiento de los cultivos. Las condiciones de estrés ambiental como la sequía generan daño oxidativo, estrés osmótico e hídrico. En consecuencia, el crecimiento celular decrece, lo que lleva a la célula a conservar o movilizar sus reservas para lidiar con el agente estresante e inducir diferentes respuestas al estrés para la supervivencia. Un proceso importante dentro de estas respuestas es la autofagia, que apoya la supervivencia de la célula a través de la eliminación de estructuras celulares dañadas o potencialmente peligrosas y liberando los productos degradados, como nutrientes que pueden ser reutilizados por la célula o exportados para su uso en otras células (Scott, 2004; Neufeld, 2012). La importancia de la autofagia para el metabolismo de las plantas y el balance energético, relaciona a este proceso con el rendimiento de los cultivos, especialmente en condiciones subóptimas (Marshall y Vierstra, 2018). Recientemente se describió que en manzana (*Malus domestica*) la sobreexpresión de *MdATG3* permitió la tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico, incluyendo el hídrico, a nivel celular y en toda la planta (Wang *et al.*, 2017).

Por otro lado, Li y colaboradores (2015) demostraron que la sobreexpresión de *SiATG8a* de *Setaria itálica* en *Arabidopsis*, confirió tolerancia al estrés por sequía, disminuyendo el contenido proteico de las plantas sobreexpresoras comparadas con el tipo silvestre, lo cual indica que gracias a la autofagia hay una degradación proteica eficiente. Adicionalmente, la tasa de supervivencia en las sobreexpresoras de *SiATG8a* se incrementó, así también el contenido de clorofila y de prolina. También mostró menor contenido de malondialdehído, lo que refleja un menor contenido de lípidos oxidados. Este estudio resulta de suma importancia debido a que demuestra que la sobreexpresión de un gen relacionado con la autofagia puede mejorar la resistencia a la sequía (Li *et al.*, 2015).

Otro ejemplo del efecto positivo en la resistencia al estrés como consecuencia de sobreexpresar genes *ATG*, se observó en plantas transgénicas de tomate que portan el gen de *Malus domestica* *MdATG18a*, aumentando notablemente su tolerancia a la sequía. También se incrementó la tasa de fotosíntesis y la capacidad antioxidante cuando se compararon con las de tipo silvestre. Por otra parte, el porcentaje de proteína insoluble en proporción a la proteína total fue menor, así como el contenido de proteínas oxidadas en la línea sobreexpresora. Estas características se atribuyeron a un mayor número autofagosomas en la línea sobreexpresora, que se tradujo en una mayor degradación de proteínas oxidadas y al alivio del estrés oxidativo (Sun et al., 2018).

Del mismo modo se demostró que diferentes genes de autofagia se sobrerregulan en respuesta a la condición de estrés hídrico por sequía, como es el caso de *MdATG3a* y *MdATG3b* de *Malus domestica* (Wang et al., 2017). Otro ejemplo importante es *HvATG6* de cebada que se induce en respuesta a estrés por sequía con su máxima expresión a las 8 horas de tratamiento con PEG al 20% (Zeng et al., 2017).

Por lo anterior, podemos sugerir que la autofagia participa de manera importante en la protección de células de la planta ante el estrés por sequía, mediante la degradación de productos oxidados, ya que sin esta respuesta las plantas son incapaces de sobrevivir a dicho estrés.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas que afectan a la agricultura son las condiciones climáticas cambiantes, las cuales disminuyen el rendimiento de los cultivos generando pérdidas económicas para los agricultores. De las constantes fluctuaciones en la precipitación pluvial y su efecto en la agricultura surge nuestro interés de establecer estrategias que amortigüen el impacto de la sequía en los cultivos de interés económico, específicamente en *Z. mays*. Para contrarrestar los efectos adversos, se propone la preparación o cebado (“*priming*”) de las plantas para que puedan responder mejor al estrés hídrico a través de inducir procesos metabólicos relacionados a la respuesta al estrés. En este trabajo se propone el uso de *Naganishia sp.* como un pretratamiento para activar el proceso de autofagia, como un sistema catabólico que protege a la planta de diferentes tipos de estrés y así mejorar la tolerancia al estrés por sequía en el cultivo de *Z. mays*. Nuestra investigación puede impactar en futuras alternativas biotecnológicas para este cultivo tan importante en nuestro país.

## 4. HIPÓTESIS

*Naganishia sp.* inducirá la autofagia la cual brindará protección a *Z. mays* en condición de estrés por sequía.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar si *Naganishia sp.* induce la autofagia en *Zea mays* provocando cambios en el crecimiento y protección al estrés por sequía

### 5.2 Objetivos específicos

- Identificar el marcador de autofagia ATG8/ATG8-PE en plántulas de *Z. mays* inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* en condiciones control y de estrés por sequía.
- Determinar la promoción del crecimiento y la protección al estrés por sequía por *Naganishia sp.* en plántulas de *Z. mays*.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Microorganismo de estudio y material vegetal

Para este estudio se utilizó un cultivo axénico de la levadura *Naganishia sp.*, aislado de la rizósfera de una planta nativa del volcán Xinaltecatl (Tapia, 2019). Esta levadura se utilizó como inoculante de la variedad comercial *Z. mays* var. Costeño mejorado.

### 6.2 Condiciones de crecimiento de *Naganishia sp.*

La cepa de *Naganishia sp.* se sembró en cajas Petri de 9 cm de diámetro, con medio agar dextrosa papa, para su almacenamiento se colocan invertidas a 7°C. Se tomó una asada del cultivo en placa de *Naganishia sp.* y se inocularon 3 tubos cónicos (50 ml) con 20 ml de medio líquido comercial papa dextrosa (PDB), BD Difco™. Se incubaron a 15°C en agitación a 200 rpm. Para seguir el crecimiento de *Naganishia sp.*, se midió el crecimiento por densidad óptica a 600 nm. Como control negativo o blanco, se usó medio PDB líquido estéril. El crecimiento del cultivo se detuvo cuando alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.2, perteneciente a la fase exponencial de crecimiento de *Naganishia sp.* Las células se lavaron para remover el medio remanente del cultivo, para esto, se centrifugó el cultivo en tubos cónicos de 50 ml a 3000 rpm durante 10 min. Se realizaron 3 lavados con agua estéril, decantando el sobrenadante, la pastilla obtenida de la centrifugación se resuspendió en 20 ml de agua estéril, se midió la D.O. y se ajustó a 0.2.

### 6.3 Sistema *in vitro* para pruebas de promoción de crecimiento de plántulas de *Z. mays* en cocultivo con *Naganishia sp.*

La desinfección del material vegetal se realizó sumergiendo las semillas en hipoclorito de sodio al 20% por 20 min y posteriormente se hicieron 6-8 enjugues con agua estéril. Las semillas se sembraron directamente en cajas de Petri cuadradas (12 cm x lado) con medio Murashige y Skoog (MS) 1X y agar al 1.2 %. La inoculación con *Naganishia sp.* se realizó en la parte inferior de la caja con 200 µl de *Naganishia sp.* a una D.O. de 0.2, para la condición de tratamiento

(+*Naganishia sp.*) y sin inoculación, para la condición control (sin inóculo). Se analizaron 108 semillas para el tratamiento y el control. Se monitoreó la germinación y crecimiento diario de las plántulas de *Z. mays* con un escáner convencional durante 6 días. Las semillas se germinaron a 28°C, y con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se determinó la tasa de germinación de la siguiente manera (Número de semillas germinadas por día X100 / Número de semillas totales germinadas al final del experimento); con la finalidad de evitar el factor viabilidad de la semilla. Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de Z con un intervalo de confianza del 95 %. Con las imágenes obtenidas se midió el crecimiento a través del programa FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Los datos obtenidos se graficaron y analizaron con el programa estadístico PRISM 6 utilizando la prueba estadística *t-Student*. Las muestras se colectaron a los 6 días del tratamiento, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para la determinación de la promoción de la germinación mediante “*seed priming*” (cebado de la semilla), se procedió a la desinfección de las semillas de *Z. mays* como se describió anteriormente. Para el control (sin inóculo), las semillas se sumergieron en agua estéril por 1 min. y se sembraron en medio MS 1X (sin inóculo). Para el tratamiento (+*Naganishia sp.*), las semillas se sumergieron en 100 ml del cultivo lavado de *Naganishia sp.* a D.O. de 0.2, por 1 min y se sembraron en el medio MS 1X. Se incubaron a 28°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y se determinó la tasa germinación de las semillas (Número de semillas germinadas por día X100 / Número de semillas totales germinadas al final del experimento); con la finalidad de evitar el factor viabilidad de la semilla. Se analizaron 36 semillas para cada condición, de tratamiento (+*Naganishia sp.*) y control (sin inóculo). Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de Z con un intervalo de confianza del 95 %.

#### **6.4 Identificación de la proteína ATG8 por la técnica de western blot**

Las muestras vegetales se maceraron en morteros con nitrógeno líquido y se colocaron 100 mg del tejido macerado en microtubos de 1.5 ml. Se adicionaron 100

µl de solución CellLytic Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich). Se homogenizó el tejido con un pistilo y la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 10 min; el sobrenadante, que contiene la proteína total extraída, se transfirió a un tubo nuevo previamente etiquetado. La proteína extraída se cuantificó con el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) y se utilizaron 20 µg para la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 13.5%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Millipore, Bedford, MA). Para el control de carga de las muestras proteicas, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau. El bloqueo de la membrana se realizó con 5% de leche y 0.1% de Tween20 en PBS 1X, por 1 h y después se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Las proteínas ATG8 y ATG8-PE se detectaron utilizando el anticuerpo policlonal anti-ATG8 (Agrisera) de conejo. La membrana se incubó con el anti-ATG8 (Agrisera), a 4°C, durante toda la noche y enseguida se realizaron 3 lavados con PBS 1X con Tween al 0.2%. Posteriormente se incubó la membrana por 1 h, a temperatura ambiente, con el segundo anticuerpo HRP-conjugado de cabra anti-conejo, diluido 1:10,000 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Finalmente, la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS 1X con 0.2% de Tween. La señal se detectó usando el kit SuperSignal West Pico quimioluminiscente (Pierce, Rockford, Il) y se expuso ante una placa Hyperfilm ECL (Healthcare, UK).

### **6.5 Sistema *in vitro* para generar estrés hídrico e inhibición del flujo autofágico en plántulas inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.***

Como un primer acercamiento para determinar el papel de la autofagia en las condiciones de estrés hídrico y el efecto de *Naganishia sp.* en esta interacción, se utilizó el sistema de estrés hídrico *in vitro* (WSM) que contiene: MS 1X, 2.5% de glicerol y 0.5% de ácido algínico. Este medio genera un gradiente de potencial hídrico bajo (Eapen *et al.*, 2003). Para la inhibición del flujo autofágico se adicionó 100 µM de cloroquina al medio (+CLO), que inhibe la fusión del autofagosoma con la vacuola evitando así la degradación del contenido del autofagosoma y su posterior reciclamiento.

Se analizó el fenotipo de las plántulas de maíz bajo las condiciones antes descritas, sembrando semillas de *Z. mays* en medio WSM (condición de estrés hídrico) y medio MS 1X (condición control), en ausencia (-CLO) y presencia de cloroquina (+CLO). Se monitoreó el crecimiento y se tomaron fotografías para reportar el fenotipo de las plántulas a los 6 d post-germinación (DPG). Se realizó la medición del área total de las plántulas mediante el programa FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Los datos obtenidos se graficaron y analizaron con el programa estadístico GraphPad PRISM 6.

### **6.6 Condiciones de crecimiento de las plántulas de *Zea mays***

Las plantas de maíz se crecieron bajo condiciones de invernadero, la temperatura media de crecimiento fue de 25°C +/- 3°C con una humedad relativa de 70%. El fotoperiodo de luz/oscuridad fue de acuerdo con las condiciones medioambientales.

### **6.7 Sistema de crecimiento en almácigos y sustrato para pruebas de estrés por sequía en plantas de *Z. mays* pretratadas con *Naganishia sp.***

Se llevaron a cabo 3 experimentos (exp.) en diferentes temporadas estacionales:

#### **A) Experimento 1: Febrero-Marzo 2019 (Sequía de 7d).**

Condiciones de crecimiento

- Temperatura promedio: 25.6°C - 25.8°C
- Humedad relativa: 39% - 47%
- Luz/oscuridad: 12h/12h
- Duración del estrés: 7 d sin irrigación y posteriormente se reinició el riego normal
- n=14 plantas

#### **B) Experimento 2: Julio-Agosto 2019 (Sequía de 9d).**

Condiciones de crecimiento

- Temperatura promedio: 24°C
- Humedad relativa: 67% - 68%
- Luz/oscuridad: 13h/11h
- n=20 plantas

**C) Experimento 3: Agosto-Septiembre 2019 (Sequía de 7d).**

- Temperatura promedio: 24°C - 24.8°C
- Humedad relativa: 67% - 73%
- Luz/oscuridad: 12h/12h
- n=20 plantas

La desinfección del material vegetal se realizó sumergiendo las semillas de *Z. mays* en hipoclorito de sodio al 20%, por 5 min y posteriormente se hicieron 6-8 enjuagues con agua estéril. En una charola previamente esterilizada, se colocó papel estéril y se humedeció con agua estéril, se colocaron las semillas dejando espacio entre ellas y la charola se cubrió con papel aluminio. La charola se colocó en el cuarto de crecimiento a 28°C por 3 días. Posteriormente, en almácigos con pozos cuadrados de 6.5 cm de lado, se colocó sustrato estéril (composición: vermiculita, agrolita y tierra, 25%:15%:60%) para la siembra de las plántulas de 3 días de edad. Para el tratamiento (+*Naganishia sp.*) se inocularon las plantas con 1 ml de *Naganishia sp.* suspendida en agua a una D.O. de 0.2. A las plantas sin tratamiento (sin inóculo) se les adicionó 1 ml de agua estéril. Las plantas se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento hasta los 12 d (Exp.1) y 14 d (Exp. 2 y 3) de edad. Para el caso de las plantas en estrés por sequía se detuvo la irrigación por 7 d (Exp. 1 y 3) y 9 d (Exp. 2), mientras que las plantas control se continuaron irrigando de manera normal a lo largo del experimento. Posteriormente, para las plantas en estrés por sequía se reinició el riego durante 7 d (Exp. 1 y 3) y 13 d (Exp. 2) para analizar su recuperación.

Se registró el crecimiento de las plantas a través de fotografías, y se midieron parámetros fisiológicos en la hoja con el LI-COR 6400. Al día 26 (Exp. 1), 28 (Exp. 3) y 36 (Exp. 2) de edad, se colectó material vegetal separando la raíz y la parte

aérea para la determinación del peso fresco (inmediatamente después de la colecta), peso turgente (las plantas se colocaron en flotación por 8h, se escurrieron y se pesaron) y peso seco (el material se colocó en una estufa a 70°C por 64 h). Con los datos anteriores se determinó el contenido relativo de agua (RWC), como describió Turner (1981) y se colectó material vegetal en condiciones previas al estrés para pruebas de western blot. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron con el programa estadístico GraphPad PRISM 6.

### **6.8 Mediciones de biomasa verde a partir del registro fotográfico**

Este análisis se llevó a cabo con el registro fotográfico en lote de cada uno de los experimentos. Se utilizó la aplicación Canopeo: que es una herramienta para medir cubierta verde. La aplicación reconoce la biomasa verde marcándola con pixeles blancos y excluye con pixeles negros del fondo de la imagen, mide los pixeles blancos en la fotografía, arrojando el porcentaje de cobertura total de estos pixeles en la imagen. Los datos obtenidos se graficaron y se determinaron las diferencias de biomasa entre tratamientos.

### **6.9 Mediciones del intercambio de gases con el LI-COR 6400**

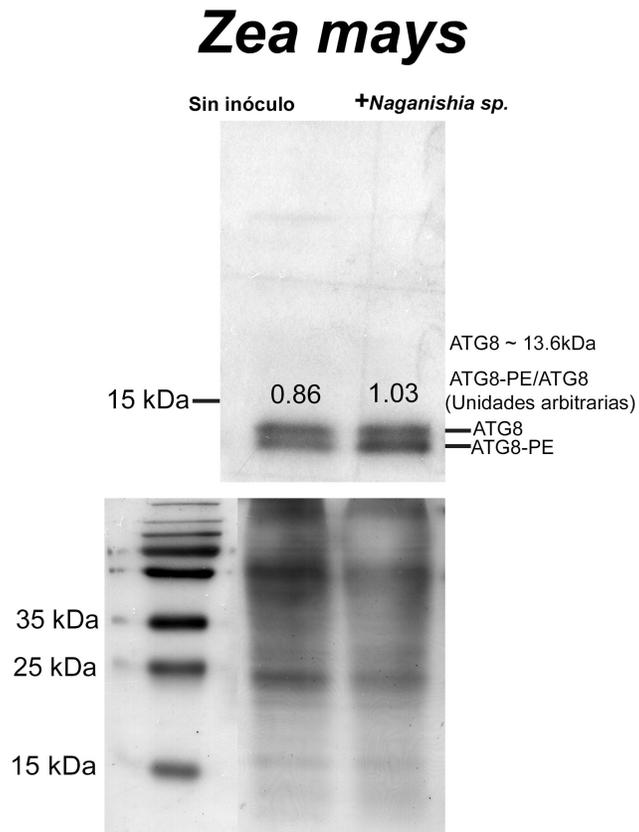
Las mediciones de intercambio de gases se llevaron a cabo por la mañana, entre las 10 y 12 PM, en la segunda (Exp. 2) y cuarta (Exp. 2 y 3) hoja de plántulas de maíz de 14 (Exp. 2 y 3), y 28 (Exp. 3) días de edad. Para las mediciones con el LI-COR 6400 se fijaron las condiciones de 25°C de temperatura de la hoja, 1000 mmol de fotones  $m^{-2} s^{-1}$  y 400 mmol de  $mol^{-1}$  de  $CO_2$  para inducir la fotosíntesis en la hoja. Se determinó la tasa fotosintética, la conductancia estomática, la tasa de transpiración y se calculó el uso eficiente del agua instantáneo (WUE; tasa fotosintética / tasa de transpiración) (Tambussi et al., 2007).

## 7. RESULTADOS

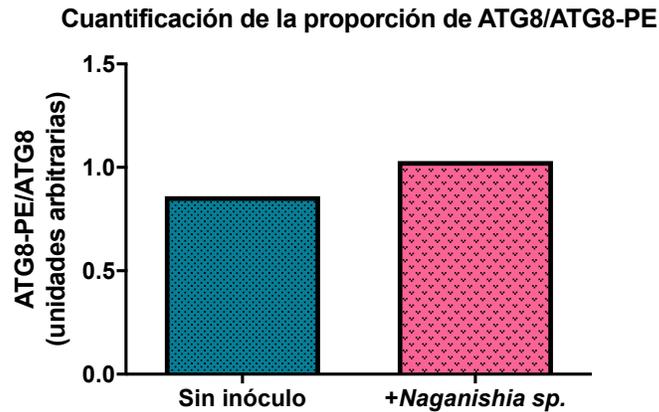
### 7.1 *Naganishia sp.* induce la autofagia en *Z. mays in vitro*

Para definir si *Naganishia sp.* induce la autofagia en plantas de *Z. mays*, se llevó a cabo el análisis por western blot para la identificación de la proteína ATG8 y ATG8-PE las cuales son el indicativo del estatus general del proceso de autofagia en el organismo. Para este estudio se colectaron 6 plántulas completas de *Z. mays* (6 DPG) en condición control y tratamiento con *Naganishia sp.* Los resultados mostraron que en *Z. mays* la cantidad de proteína ATG8-PE, es decir, la cantidad de proteína ATG8 lipidada es mayor en la condición de tratamiento (relación ATG8-PE/ATG8=1.03), indicando que *Naganishia sp.* indujo la autofagia (figura 3). Esta inducción de la autofagia podría estar relacionada al mayor crecimiento de raíces laterales (figura 5).

A)



B)



**Figura 3.** Lipidación de ATG8 dependiente de *Naganishia sp.* Niveles de ATG8 y ATG8-PE en plántulas de *Z. mays*. Las plántulas se crecieron en medio MS 1X sin inóculo e inoculado con *Naganishia sp.* por 6 días. Control (sin inóculo); Tratamiento con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*). A) Se realizó un análisis de SDS-PAGE e inmunoblot. Cada carril se cargó con 20  $\mu$ g de proteína.

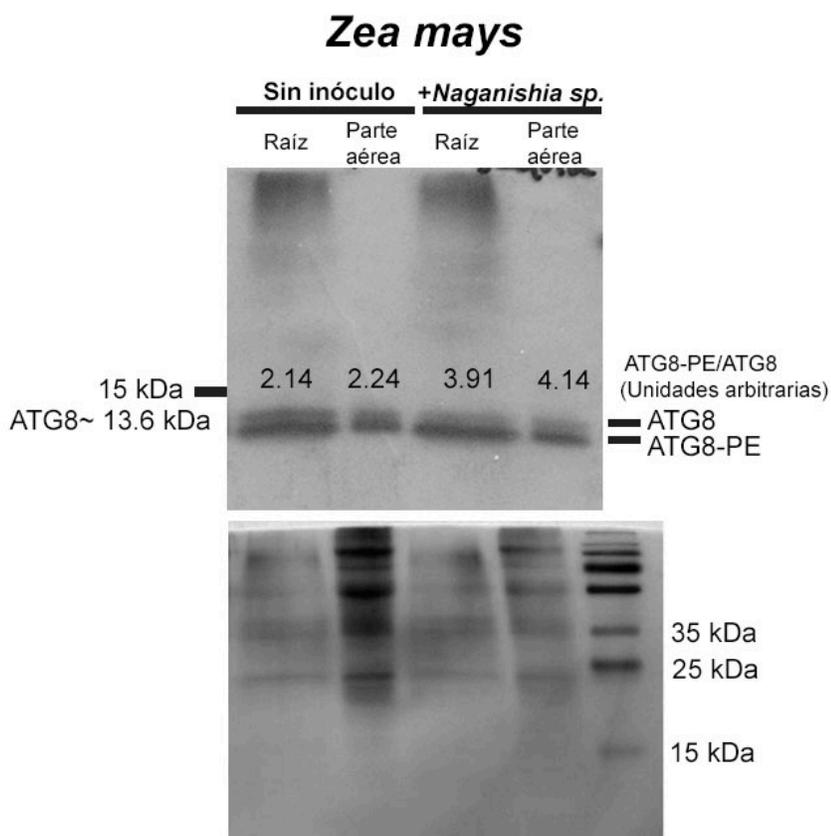
Imagen superior: Film de detección de la señal. Imagen inferior: Membrana teñida con rojo de Ponceau como control de carga B) Cuantificación de la proporción de ATG8/ATG8-PE

## **7.2 *Naganishia sp.* induce la autofagia en *Z. mays* en el sistema experimental de crecimiento en almácigo**

Previamente demostramos que *Naganishia sp.* induce la autofagia en plántulas de *Z. mays in vitro*. Sin embargo, para demostrar que nuestro sistema experimental de crecimiento en almácigo y la inoculación de *Naganishia sp.* era capaz de inducir la autofagia. Se determinó por análisis de western blot el estatus del proceso de autofagia en plantas de 9 días de edad bajo condiciones normales de crecimiento (sin estrés) en condiciones de invernadero en almácigo.

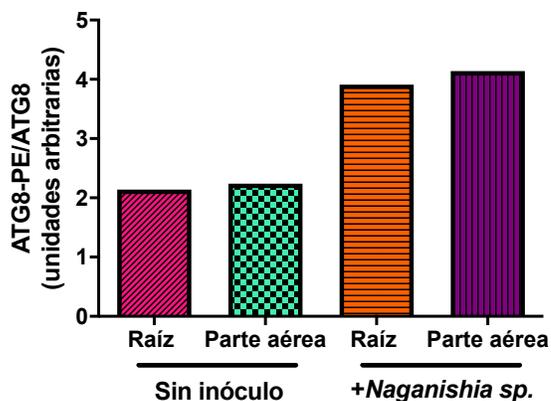
Se determinó la acumulación de la proteína ATG8-PE que nos indica la lipidación de la proteína ATG8 como resultado de la activación de la autofagia. Encontramos que para las plantas inoculadas y crecidas en sustrato se presentó una mayor acumulación de la proteína ATG8-PE en la raíz y la parte aérea, lo cual sugiere que la inoculación con *Naganishia sp.* indujo autofagia (ver figura 4).

A)



B)

**Cuantificación de la proporción de ATG8/ATG8-PE**



**Figura 4.** Determinación de la lipidación de ATG8 dependiente de *Naganishia sp.* en raíz y parte aérea de plántulas de *Z. mays* de 9 días de edad. La inoculación de las plantas se llevó a cabo a los 3 días de edad para el tratamiento con inóculo (+*Naganishia sp.*) y sin inóculo, para la condición control. Las plantas se crecieron en almácigos bajo condiciones de crecimiento normal en invernadero (descritas en la metodología). A) Se realizó un análisis de SDS-PAGE e inmunoblot. Cada carril se cargó con 20  $\mu$ g de proteína. Imagen superior: Film de detección de la señal. Imagen inferior: membrana teñida con Ponceau como control de carga B) Cuantificación de la proporción de ATG8/ATG8-PE

### **7.3 Efecto de la inoculación con *Naganishia sp.* en el crecimiento de plántulas de *Z. mays in vitro***

Para determinar el papel de *Naganishia sp.* como microorganismo promotor del crecimiento en *Z. mays*, se determinó la tasa de germinación usando a *Naganishia sp.* como inoculante y como cebador de la semilla (“*seed priming*”).

De acuerdo con los datos obtenidos se determinó que *Naganishia sp.* no favoreció la tasa de germinación de *Z. mays* cuando se usa como inoculante en el medio de cultivo, ya que no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Por el contrario, para el caso del “*seed priming*” a pesar de no encontrar diferencias significativas encontramos que al día 1 (ver tabla 2), las semillas con “*seed priming*” presentaron un porcentaje mayor de germinación que las semillas control (sin inóculo).

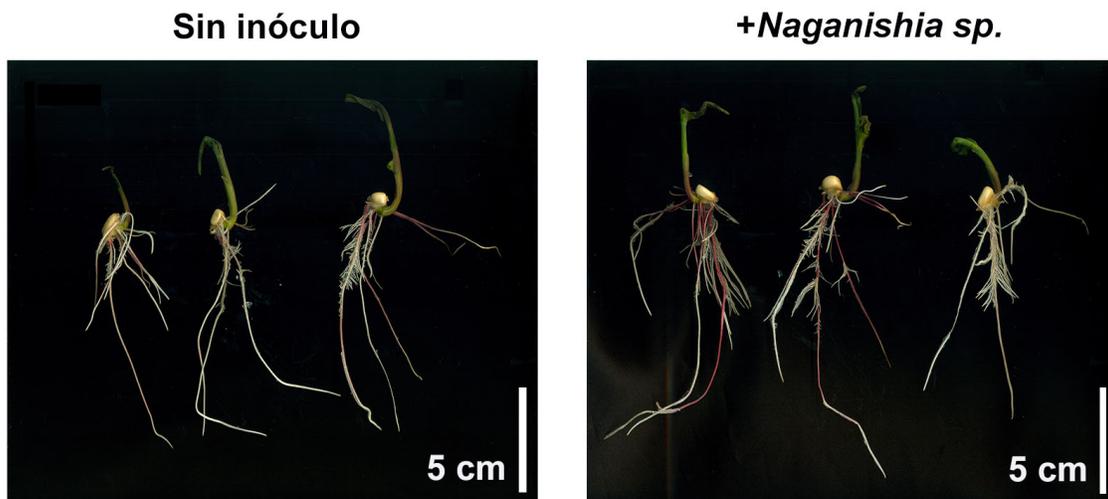
Al mismo tiempo, se realizaron las mediciones de la longitud de la raíz principal a lo largo del tiempo (por 96 h) para el control (sin inóculo) y con tratamiento (+*Naganishia sp.*). En el análisis del crecimiento de la raíz principal se determinó que tanto la condición control como el tratamiento es similar al no encontrarse diferencias significativas (figura 6). Por otro lado, también se cuantificó el número de raíces seminales escutelares y de raíces de la corona; encontrando que no hay cambios significativos en el número de raíces entre tratamientos (figura 7). Previamente Tapia (2020), demostró que *Naganishia sp.* sintetiza IAA. La biosíntesis de IAA por *Naganishia sp.* puede inducir un cambio en la arquitectura de la raíz, lo que explicaría la mayor abundancia de raíces laterales en las plantas inoculadas (ver figura 5).

**Tabla 2.** Tasa de germinación de semillas de *Z. mays*, crecidas en medio MS control (sin inóculo) e inoculado con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*) y usando a *Naganishia sp.* como “seed priming”.

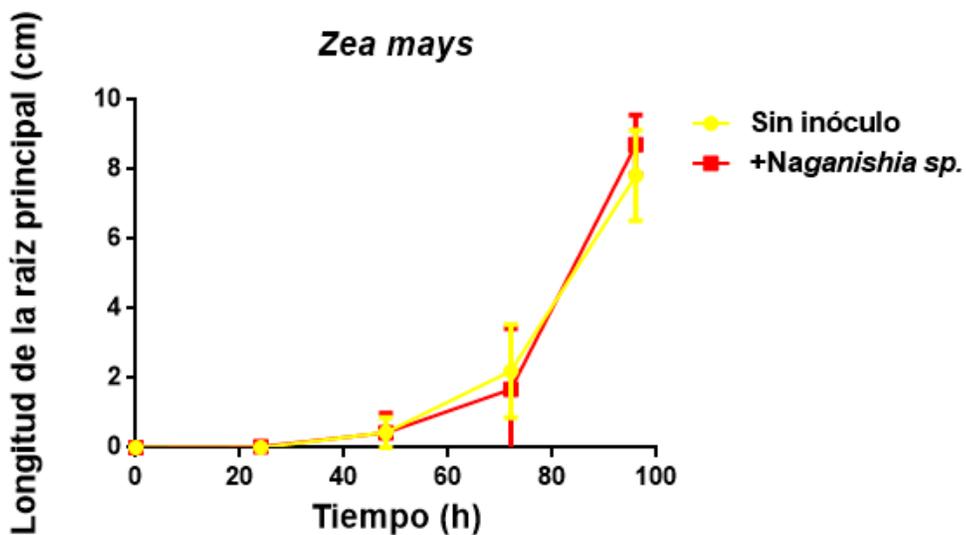
Tasa de germinación				
DPG	Sin inóculo		Inoculación + <i>Naganishia sp.</i>	
	Número de semillas	Porcentaje	Número de semillas	Porcentaje
1	9/108	9.7	8/108	8.2
2	89/108	96.7	89/108	91.7
3	91/108	98.9	94/108	96.9
4	92/108	100	97/108	100
	<i>n</i> =92		<i>n</i> =97	

Tasa de germinación				
DPG	Sin inóculo		“Seed priming” con <i>Naganishia sp.</i>	
	Número de semillas	Porcentaje	Número de semillas	Porcentaje
1	1/36	3.3	5/36	14.7
2	29/36	96.6	30/36	88.2
3	29/36	96.6	34/36	100
4	30/36	100	34/36	100
	<i>n</i> =30		<i>n</i> =34	

En la tabla se presentan los datos del monitoreo de germinación diario: el número de semillas y la tasa de germinación para el uso de *Naganishia sp.* como inoculante y en “seed priming”. \*Diferencias significativas se calcularon con la prueba de Z con un intervalo de confianza del 95%.

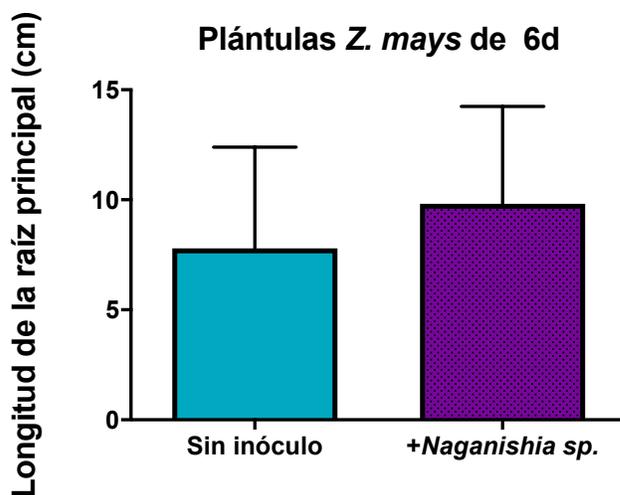


**Figura 5.** Fotografía representativa de las plántulas de *Z. mays* (6 DPG) en medio control (sin inóculo) e inoculado (+*Naganishia sp.*).

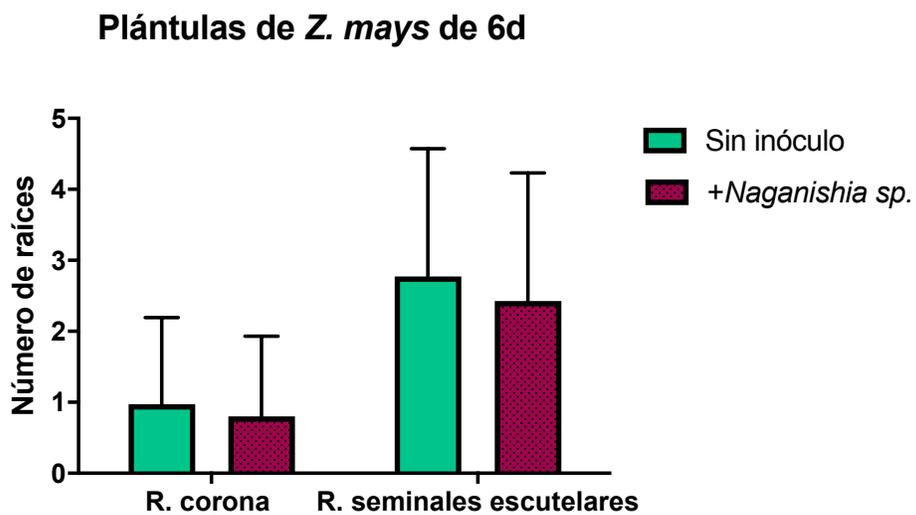


**Figura 6.** Representación gráfica del crecimiento de la raíz principal de plántulas de *Z. mays* crecidas en medio MS sin inóculo (control) e inoculado con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*) bajo condiciones de crecimiento normal durante 96 h.

A)



B)

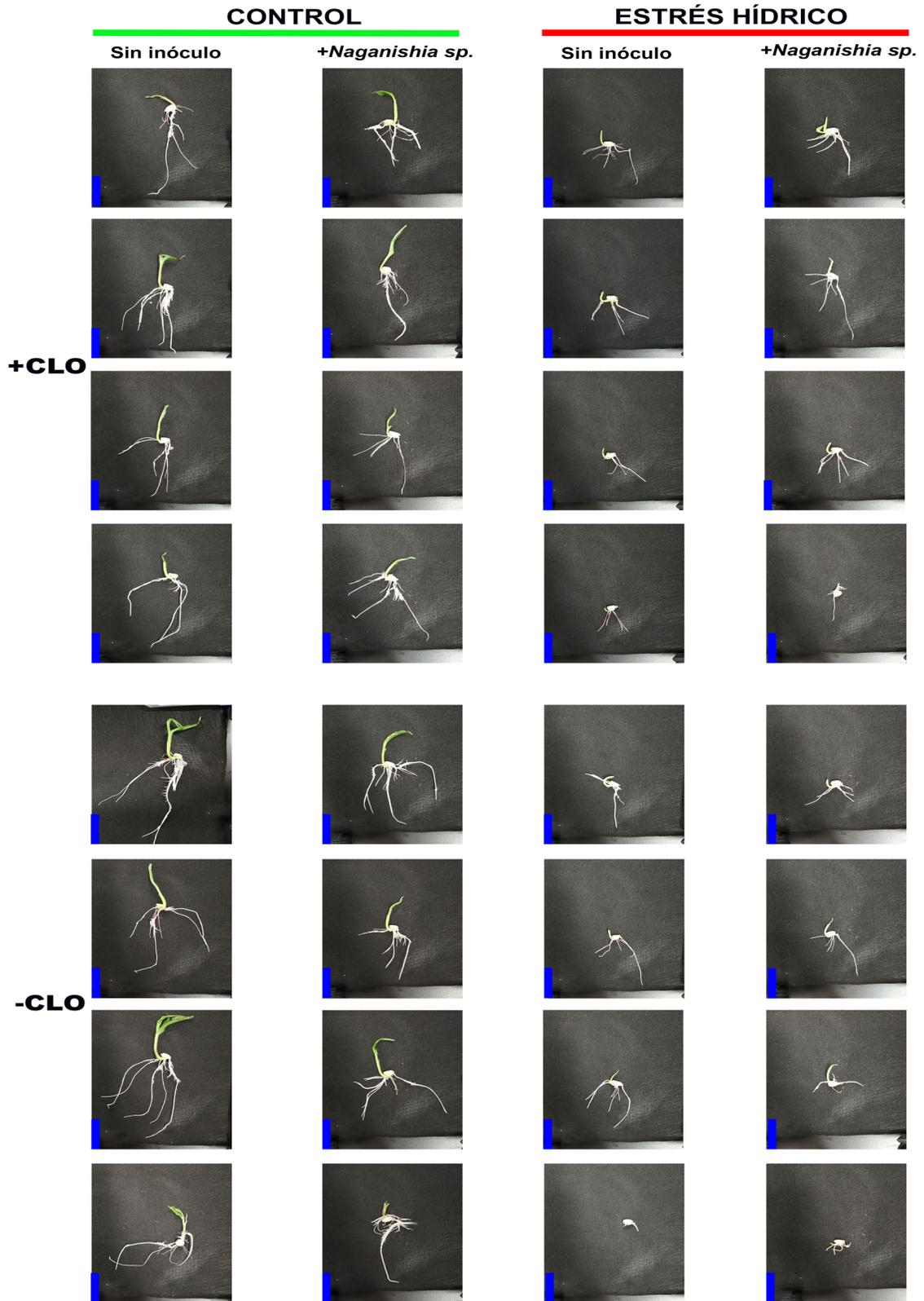


**Figura 7.** Fenotipo de las raíces de *Z. mays* en los tratamientos: con inóculo (*+Naganishia sp.*) y sin inóculo (Sin inóculo). A) Representación gráfica de la longitud de la raíz principal de plántulas de *Z. mays* a los 6 DPG *in vitro*. B) Representación gráfica del número de raíces de la corona y raíces seminales escutelares de plántulas de *Z. mays* a los 6 DPG. n=9 y n=30 respectivamente.

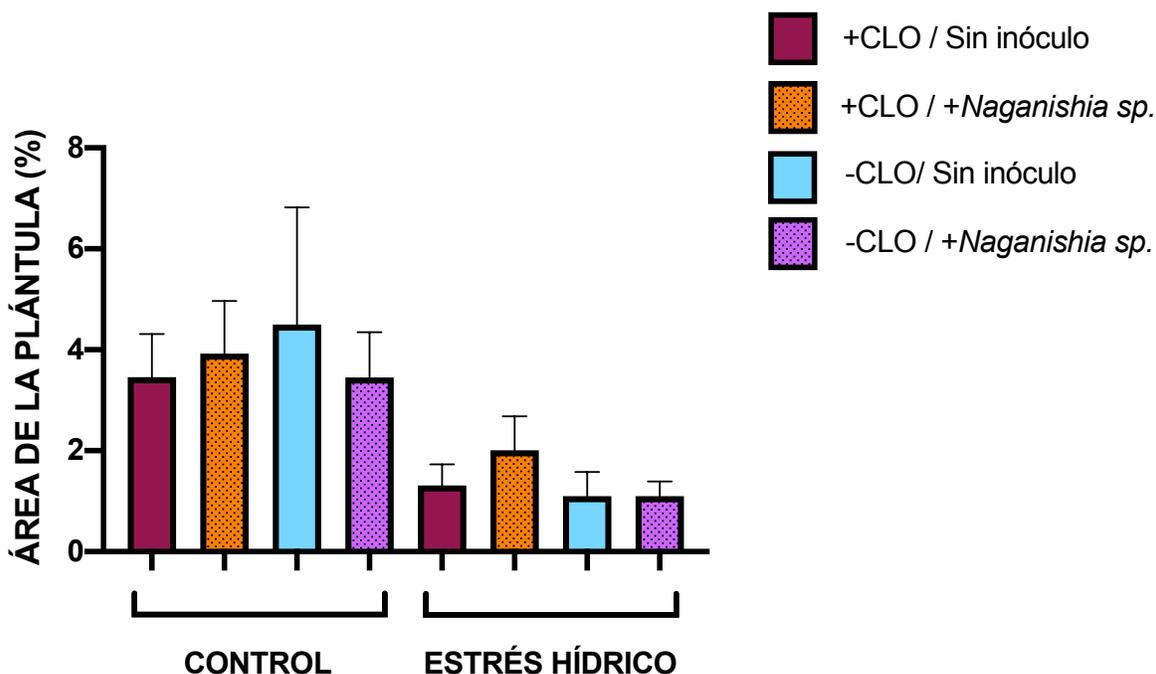
#### **7.4 Efecto de la inhibición del flujo autofágico con cloroquina en plántulas de *Z. mays* inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* en condiciones control y de estrés hídrico.**

Como una primera aproximación para determinar el papel de la autofagia, la condición del estrés hídrico y la inoculación con *Naganishia sp.* se utilizó el sistema *in vitro* WSM (descrito en la metodología) y el inhibidor del flujo autofágico cloroquina. Las plántulas se sometieron a condiciones control y de estrés hídrico, sin inocular (sin inóculo) e inoculadas con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*) en presencia (+CLO) o ausencia de cloroquina (-CLO). Se analizó el fenotipo de las plántulas a los 6 DPG mediante la medición del área de las plántulas. Observamos que bajo la condición control (sin estrés hídrico) tanto en presencia (+CLO) como la ausencia de cloroquina (-CLO) en plantas inoculadas y sin inocular no mostraron cambios en el crecimiento, lo que indicó que la inhibición del flujo autofágico y la presencia de *Naganishia sp.* no tiene un efecto en el crecimiento de las plántulas (ver figura 8 A y B). Para el caso de la condición de estrés hídrico, se observó una disminución del crecimiento general tanto de la raíz como de la parte aérea de todas las plántulas en todos los tratamientos, cuando se comparó con la condición control. Lo anterior, podría sugerir que se requiera de una mayor concentración de cloroquina *in vitro* (Ravanan *et al.*, 2017) o el uso de otro inhibidor de la autofagia. Del mismo modo, la ausencia de efecto por la inoculación con *Naganishia sp.* se podría atribuir a la condición de crecimiento *in vitro* generada, por la presencia de cloroquina y el sistema WSM, que pudieron interferir en los mecanismos directos e indirectos de promoción de crecimiento *Naganishia sp.*

A)



B)



**Figura 8.** Figura comparativa de plántulas de 6 DPG inoculadas (+*Naganishia sp.*) y no inoculadas (sin inóculo) crecidas bajo condiciones de crecimiento control y de estrés por sequía, en presencia (+CLO) o ausencia (-CLO) de cloroquina (inhibidor del flujo autofágico). A) Fotografía de las plántulas analizadas B) Representación gráfica del área de las plántulas de *Z. mays* en los diferentes tratamientos  $n=4$  plantas.

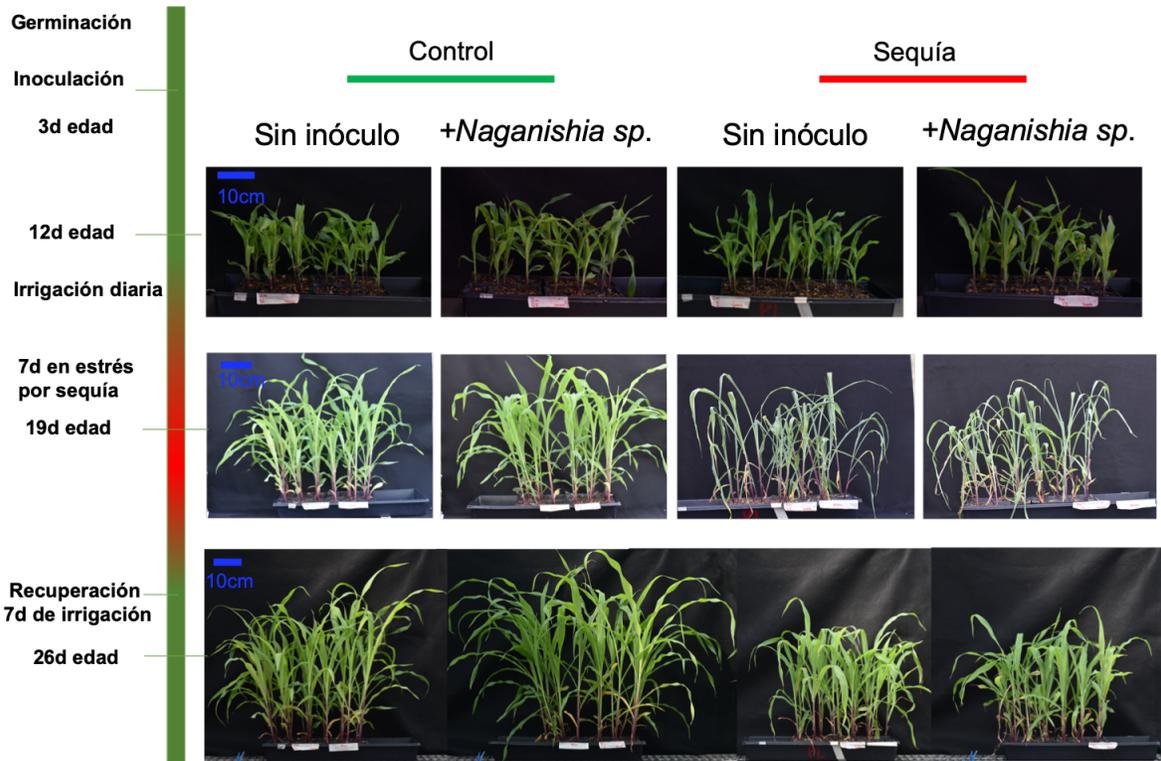
### 7.5 El efecto de *Naganishia sp.* en condiciones de estrés por sequía en plántulas de *Z. mays*

Con el fin de determinar si *Naganishia sp.* participa en la protección de las plántulas de *Z. mays* en condición de estrés por sequía, se llevaron a cabo experimentos con plantas de *Z. mays* expuestas a sequía con o sin la inoculación de *Naganishia sp.* En este estudio se realizaron 3 experimentos en diferentes temporadas del año y se analizaron de manera independiente. El análisis consistió en el monitoreo y registro fotográfico de los cambios morfológicos y la medición de parámetros fisiológicos de las plántulas de *Z. mays* en la condición control y de estrés por sequía. Se enlistan a continuación.

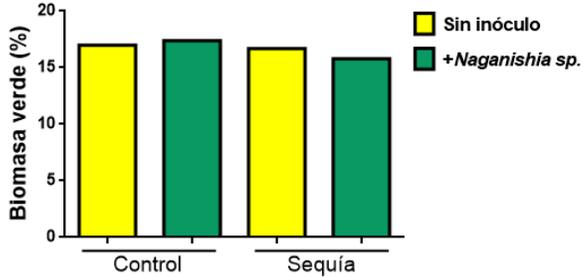
- A) Experimento 1: Febrero-Marzo 2019 (Sequía de 7d; ver figura 9),
- B) Experimento 2: Julio-Agosto 2019 (Sequía de 9d; ver figura 12),
- C) Experimento 3: Agosto-Septiembre 2019 (Sequía de 7d; ver figura 14).

### **7.6 *Naganishia sp.* incrementa la biomasa total fresca y seca de la parte aérea bajo condiciones de crecimiento control (Experimento 1).**

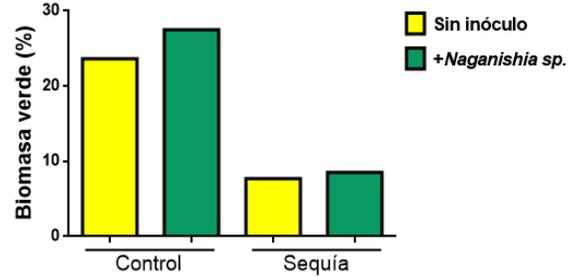
Para comprender el efecto de la inoculación de *Naganishia sp.* y la sequía en plántulas de *Z. mays*, plántulas de 12d (días) de edad (inoculadas o sin inocular) se sometieron a una condición de restricción hídrica por 7d, y posteriormente se inició la recuperación de las plántulas mediante el riego normal por 7 días más. A partir de este experimento se observó que, durante las condiciones de crecimiento control, las plantas inoculadas con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*) presentaron una tendencia al incremento de biomasa total fresca y seca de la parte aérea, en comparación con las plantas no inoculadas (sin inóculo), en condición control. En la condición de estrés por sequía las plantas control y bajo tratamiento de sequía presentaron un fenotipo de marchitamiento similar, y sin diferencias entre la biomasa de raíz y de la parte aérea (ver figura 9). Finalmente, a los 26d de edad, se determinó el contenido relativo de agua (RWC) de las raíces y la parte aérea en las diferentes condiciones (ver figura 10). Se encontró que las plantas inoculadas y sometidas a estrés por sequía tuvieron un mayor contenido relativo de agua, lo cual es indicativo de una mayor capacidad de los tejidos para retener agua.



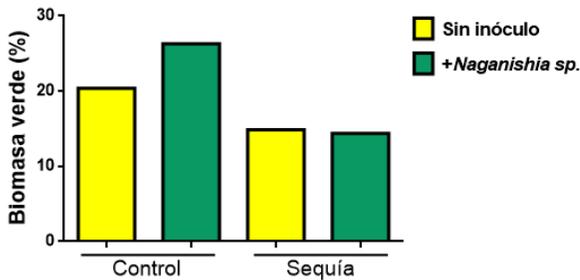
ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 12d



ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 19d

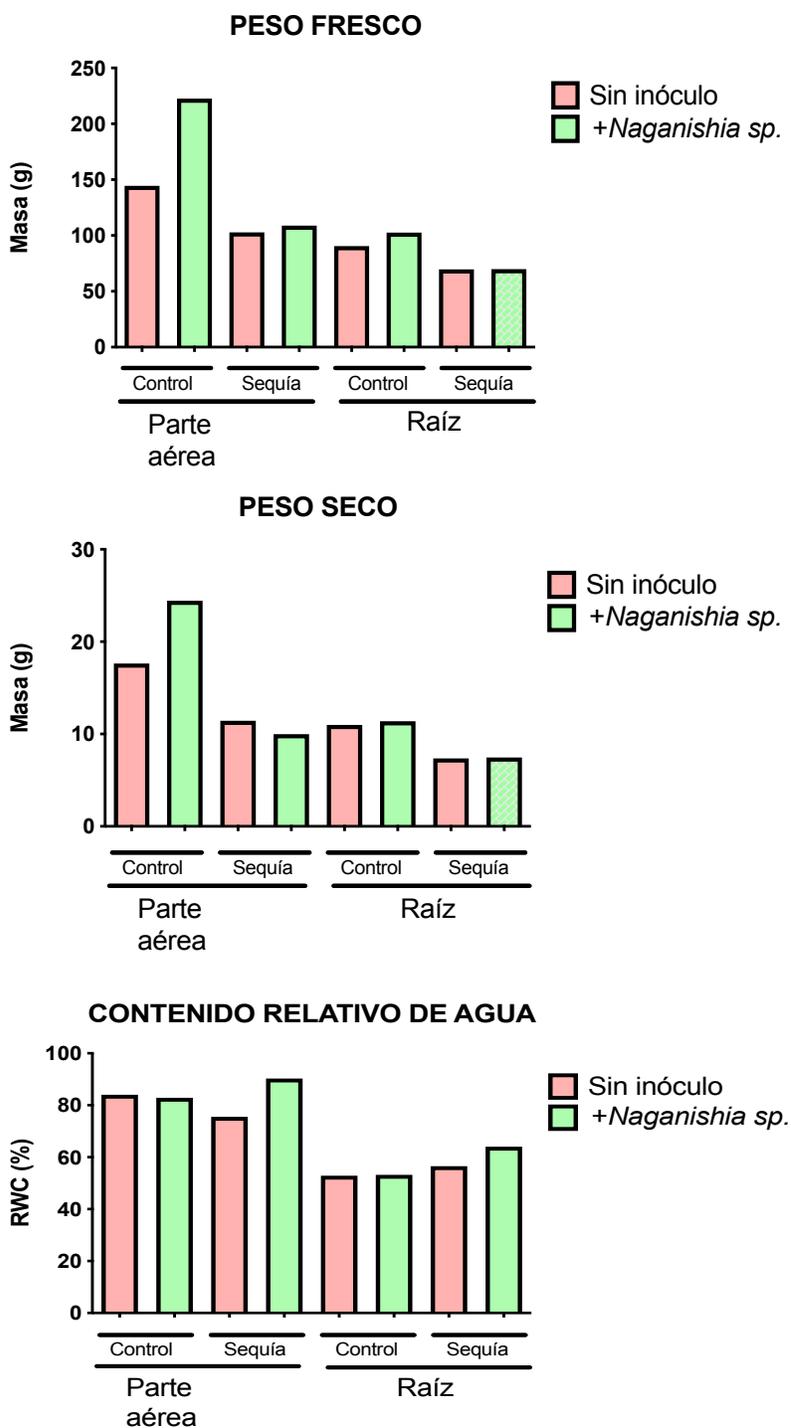


ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 26d



**Figura 9.** Registro fotográfico del fenotipo de las plantas de *Z. mays* durante el curso del tiempo (Experimento 1). Las barras azules indican una escala de 10 cm para todas las fotografías. A la izquierda se muestra la barra del tiempo que indica la edad de la planta en días (d) y los sucesos del experimento. Abajo se muestran las gráficas del análisis de cubierta verde (determinación biomasa

verde / follaje) determinado con Canopeo (Patrignani y Ochsner, 2015) de cada condición.  $n=14$  plantas por condición.

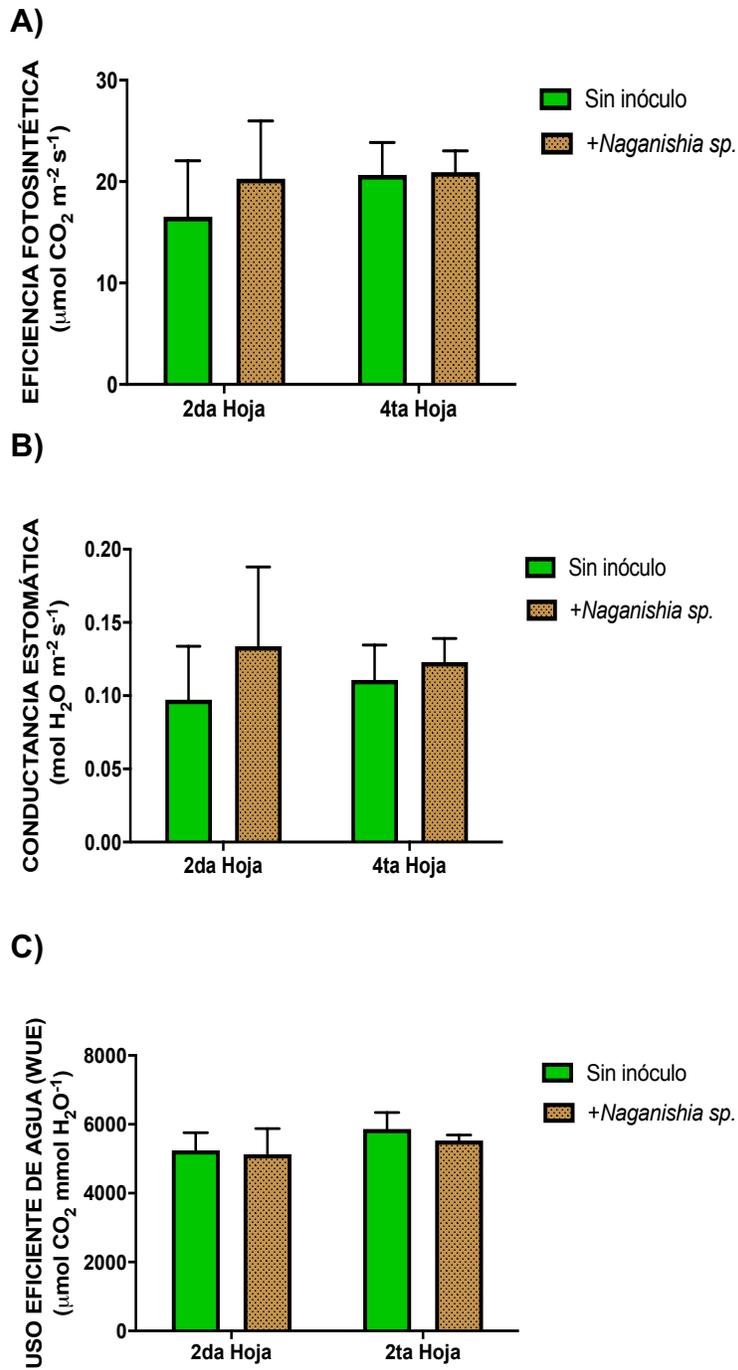


**Figura 10.** Determinación de la biomasa total de plántulas de *Z. mays*, en condiciones de crecimiento control y en estrés por sequía, para las plantas inoculadas y no inoculadas. (Experimento 1) El

análisis se realizó mediante la determinación del peso fresco, seco y el RWC de la raíz y parte aérea total de plántulas de *Z. mays* de 26 días de edad, en condiciones de crecimiento control y de estrés por sequía, inoculadas con *Naganishia sp.* (+*Naganishia sp.*) y no inoculadas (SIN INÓCULO).  $n=14$  plantas por tratamiento.

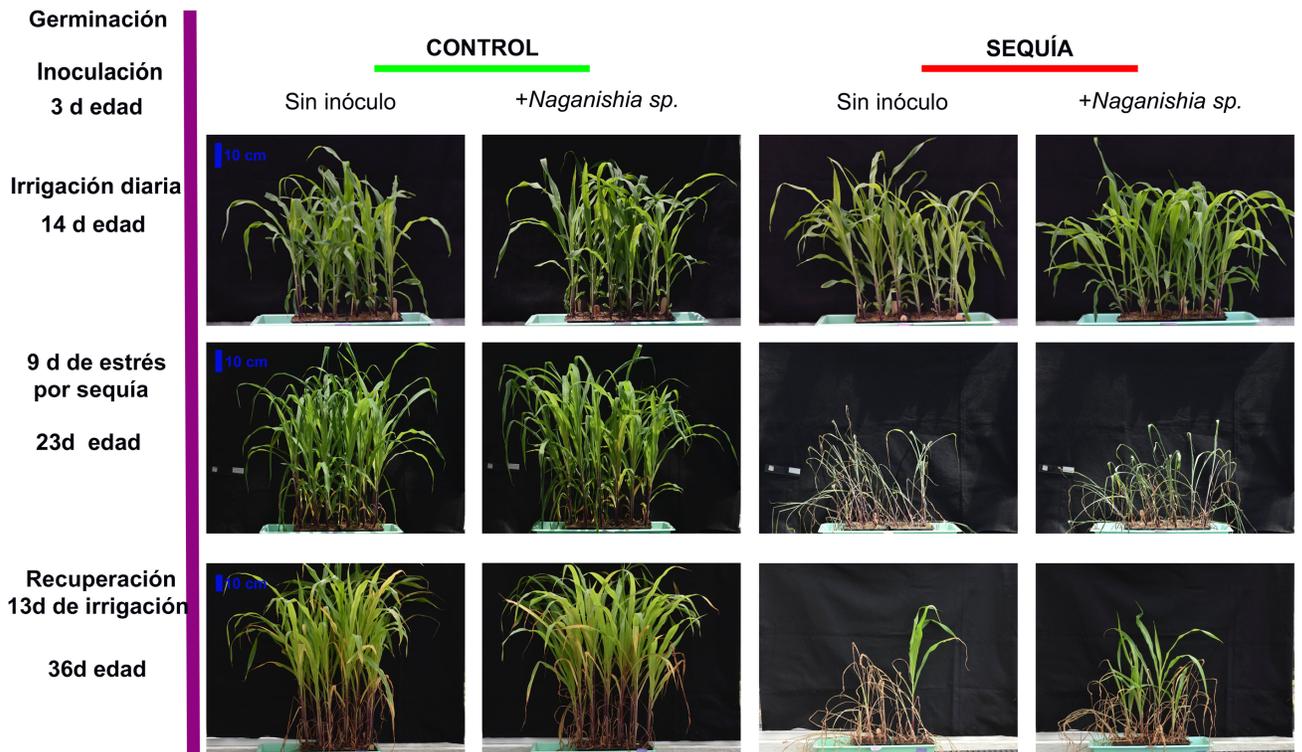
### **7.7 *Naganishia sp.* incrementa la tasa de supervivencia de las plántulas de *Z. mays* bajo condiciones de estrés por sequía severa (Experimento 2).**

Para conocer el estado fisiológico de las plantas inoculadas y no inoculadas bajo condiciones de crecimiento normal a los 14d, es decir, previo al estrés, se llevaron a cabo mediciones del intercambio de gases en la segunda (2<sup>da</sup>) y cuarta (4<sup>ta</sup>) hoja de las plántulas de maíz (hojas fuente y vertedero, respectivamente), lo anterior nos permitió determinar si hay un efecto de “*priming*” (preparación fisiológica) resultado de la inoculación temprana (3d) con *Naganishia sp.* De acuerdo con los datos obtenidos, se determinó que la inoculación incrementa la tasa fotosintética y la conductancia estomática en la segunda hoja, mientras que el uso eficiente de agua es similar para la condición sin inóculo e inoculada. Para el caso de la 4<sup>ta</sup> hoja, no se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros mencionados. Con lo anterior, podemos concluir que la inoculación podría tener un efecto en la tasa fotosintética y la conductancia estomática en las plantas pretratadas con *Naganishia sp.* en la segunda hoja, considerada como tejido fuente (ver figura 11).

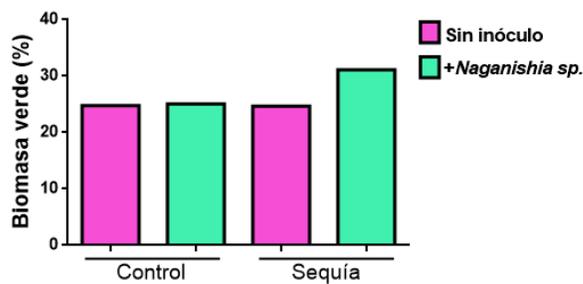


**Figura 11.** Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 14 días de edad (previo al estrés), en la 2da y 4ta hoja (fuente y vertedero), de plántulas inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* (Experimento 2). A) Gráfica de la tasa fotosintética, B) Gráfica de la conductancia estomática, C) Gráfica del uso eficiente de agua (WUE). n=3 plantas por condición, 2<sup>da</sup> y 4<sup>ta</sup> hoja por planta.

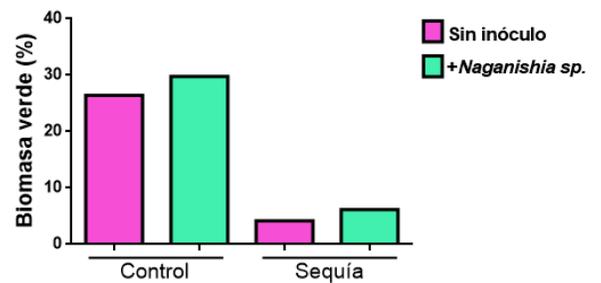
Para investigar el efecto de *Naganishia sp.* en condiciones severas de estrés por sequía, y dado que la variedad de maíz utilizada en este estudio no es susceptible al estrés por sequía, se decidió incrementar el número de días sin irrigación, de 7 a 9 días, y analizar la presencia de cambios en el fenotipo de las plantas sometidas a la inoculación con *Naganishia sp.* (figura 12). Las plántulas en condición control se mantuvieron en irrigación a lo largo del experimento, mientras que las plantas sometidas a la condición de estrés por sequía se dejaron de irrigar durante 9 días y posteriormente se retomó el riego para analizar su recuperación (13 días de riego). De acuerdo con el registro fenotípico, observamos que el incremento en la duración de la sequía tuvo un efecto drástico para la supervivencia de las plantas, encontrando que las plantas inoculadas presentaron una tasa de supervivencia del 25%, mientras que para las plantas no inoculadas fue del 5% (Ver tabla 3).



ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 14d



ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 23d



ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 36d

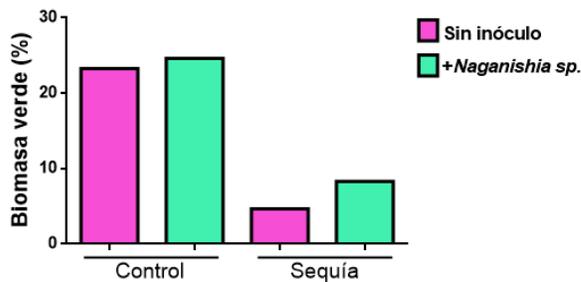


Figura 12. Registro fotográfico del fenotipo de las plantas de *Z. mays* (Experimento 2) durante el curso del tiempo del experimento. Las barras azules indican la escala de 10 cm para todas las

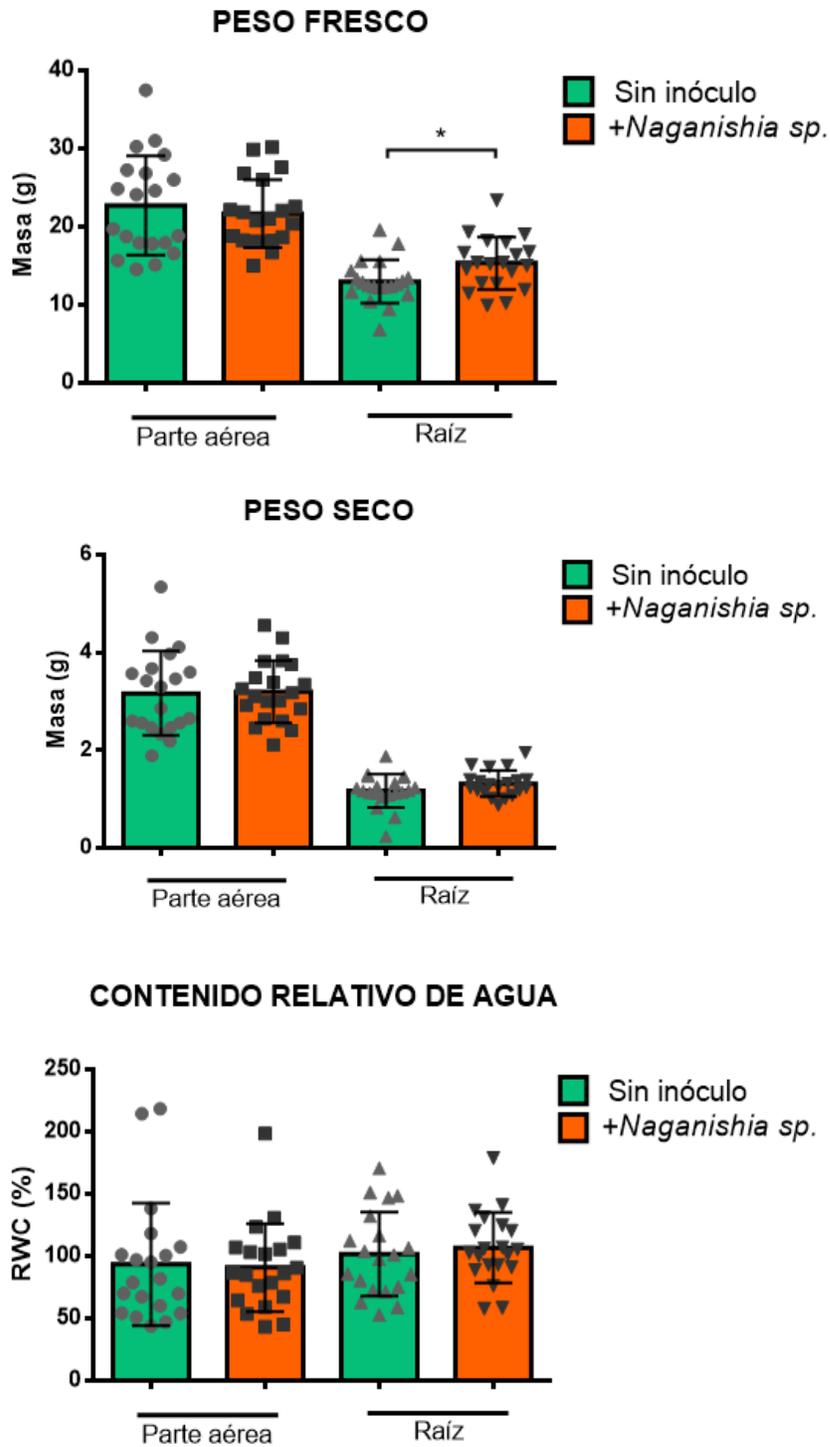
fotografías. A la izquierda se muestra la barra del tiempo en el que se indica la edad de la planta en días (d) y los sucesos del experimento. Abajo se muestra el análisis de cubierta verde (determinación biomasa verde/ follaje) determinado con Canopeo (Patrignani y Ochsner, 2015) de cada condición.  $n=20$  plantas por condición.

**Tabla 3.** Tasa de supervivencia a los 36 d de edad de plántulas de *Z. mays* en los diferentes tratamientos del experimento (Experimento 2).

Condición	Número plantas vivas	Porcentaje de supervivencia
Control sin inóculo	20/20	100%
Control + <i>Naganishia sp.</i>	20/20	100%
Sequía sin inóculo	1/20	5%
Sequía + <i>Naganishia sp.</i>	5/20	25%

### **7.8 *Naganishia sp.* incrementa la biomasa fresca de la raíz en condiciones de crecimiento control (Experimento 2)**

En continuación con el análisis fenotípico de las plantas crecidas en condición control, en los tratamientos inoculado (+*Naganishia sp.*) y no inoculado (sin inóculo), cuya tasa de supervivencia fue de 100%, se prosiguió con la determinación del peso fresco, peso seco y contenido relativo de agua (RWC) (ver figura 13). Los datos obtenidos indicaron que existe un incremento significativo en la biomasa de las raíces inoculadas con *Naganishia sp.*, lo cual puede estar relacionado con el cambio en la arquitectura radicular al producir más raíces laterales. Por el contrario, no se observaron cambios en el peso seco y contenido relativo de agua de la raíz y la parte aérea (figura 13).



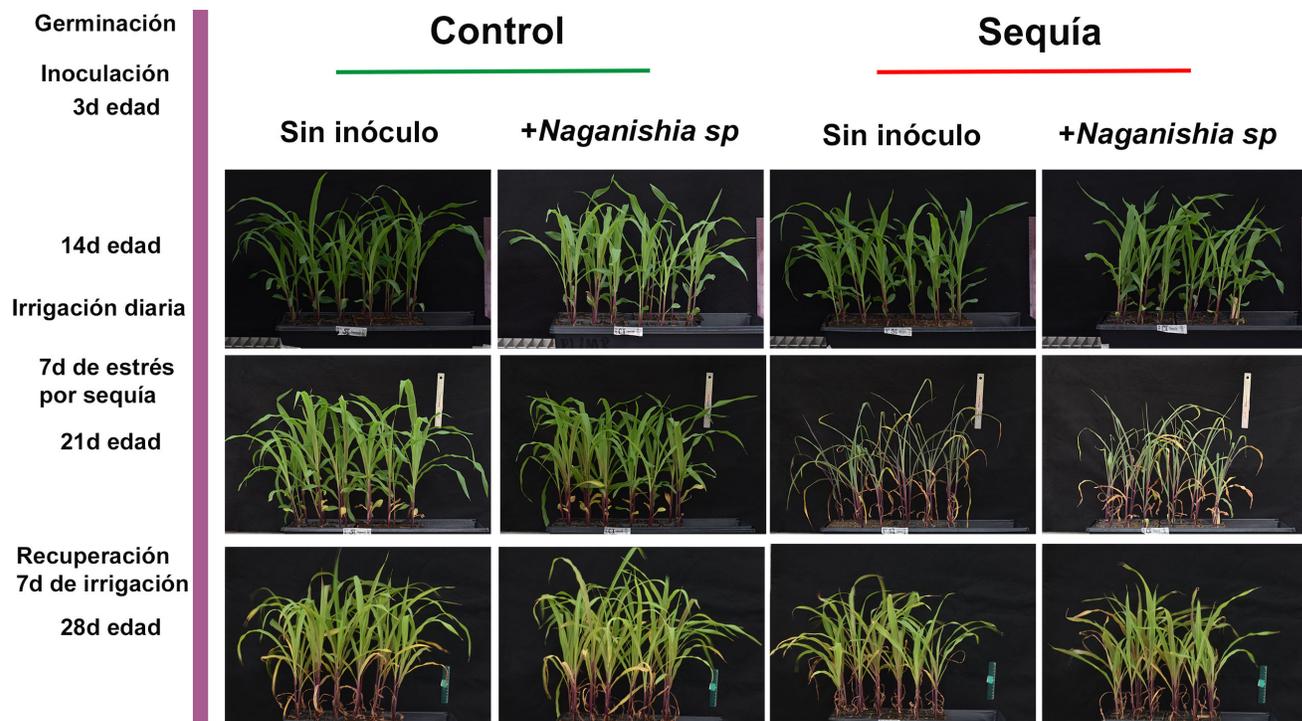
**Figura 13.** Determinación de la biomasa de plántulas de *Z. mays*, en condiciones de crecimiento control, para las plantas inoculadas y no inoculadas (Experimento 2). El análisis se realizó mediante la determinación del peso fresco, seco y el RWC de raíz y la parte aérea total de plántulas de *Z. mays* de 36 días de edad n=20 plantas por tratamiento. \*Diferencia significativa al nivel de  $P < 0.05$ .

### **7.9 El “*priming*” con *Naganishia sp.* disminuye la conductancia estomática e incrementa el uso eficiente de agua bajo condiciones de crecimiento control (Experimento 3)**

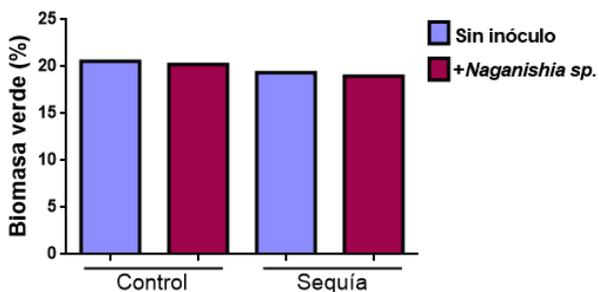
Finalmente, para determinar el estatus fisiológico, así como el fenotipo de las plántulas inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* antes (14d) y después de la recuperación al estrés por sequía (28d), se analizaron los parámetros del intercambio de gases en estos dos tiempos. De acuerdo con los datos obtenidos de las mediciones con el LI-COR 6400, se encontró que las plantas inoculadas de 14d (que no se han sometido al estrés) tienen una menor conductancia estomática y un uso eficiente de agua mayor, en comparación con las plantas no inoculadas. Sin embargo, para el caso de la eficiencia fotosintética las plantas no inoculadas superan a las inoculadas con *Naganishia sp.* a los 14d de edad (ver figura 15).

Por otro lado, en cuanto al estado fisiológico de las plantas después de recuperación al estrés (7 días de irrigación normal), se evidenció que tanto en condición normal como en condición de sequía, la eficiencia fotosintética así como la conductancia estomática de las plantas inoculadas como las no inoculadas, fue similar. Además, para el caso de uso eficiente de agua (WUE) las plantas inoculadas (28d) en condición control, presentaron un decremento en este parámetro cuando se les comparó con las plantas no inoculadas (Ver figura 16).

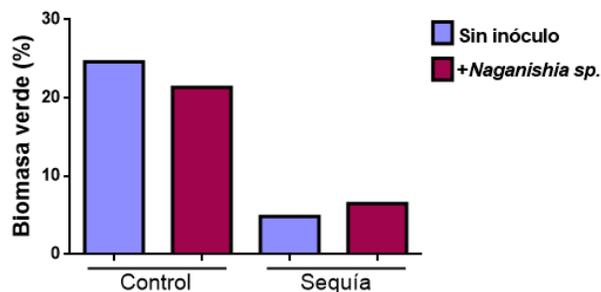
Adicionalmente para determinar diferencias fenotípicas entre tratamientos, se realizó el registro fotográfico de las plantas a lo largo del experimento (ver figura 14) y se determinaron rasgos morfológicos como el peso fresco, peso seco y contenido relativo de agua (RWC) de las plántulas en los diferentes tratamientos (figura 17). Como se observa en las gráficas (ver figura 17), es claro como la condición de estrés por sequía tiene un efecto en la reducción de biomasa, hablando de peso fresco y seco, tanto en la raíz como en la parte aérea y en los tratamientos inoculados y no inoculados, los cuales no se presentaron cambios. Asimismo, el peso fresco y seco fue similar en condición control para las plantas inoculadas y no inoculadas. En cambio, en cuanto al RWC, observamos que la raíz en condición control sin inóculo, presentó una mayor acumulación de agua en este tejido.



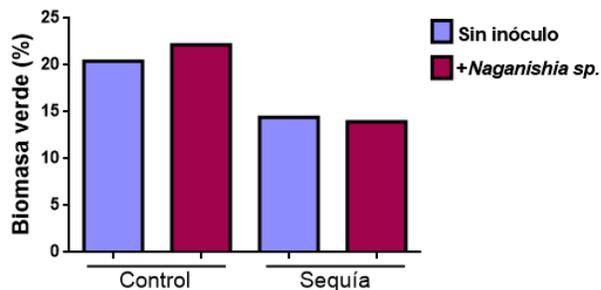
ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 14d



ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 21d

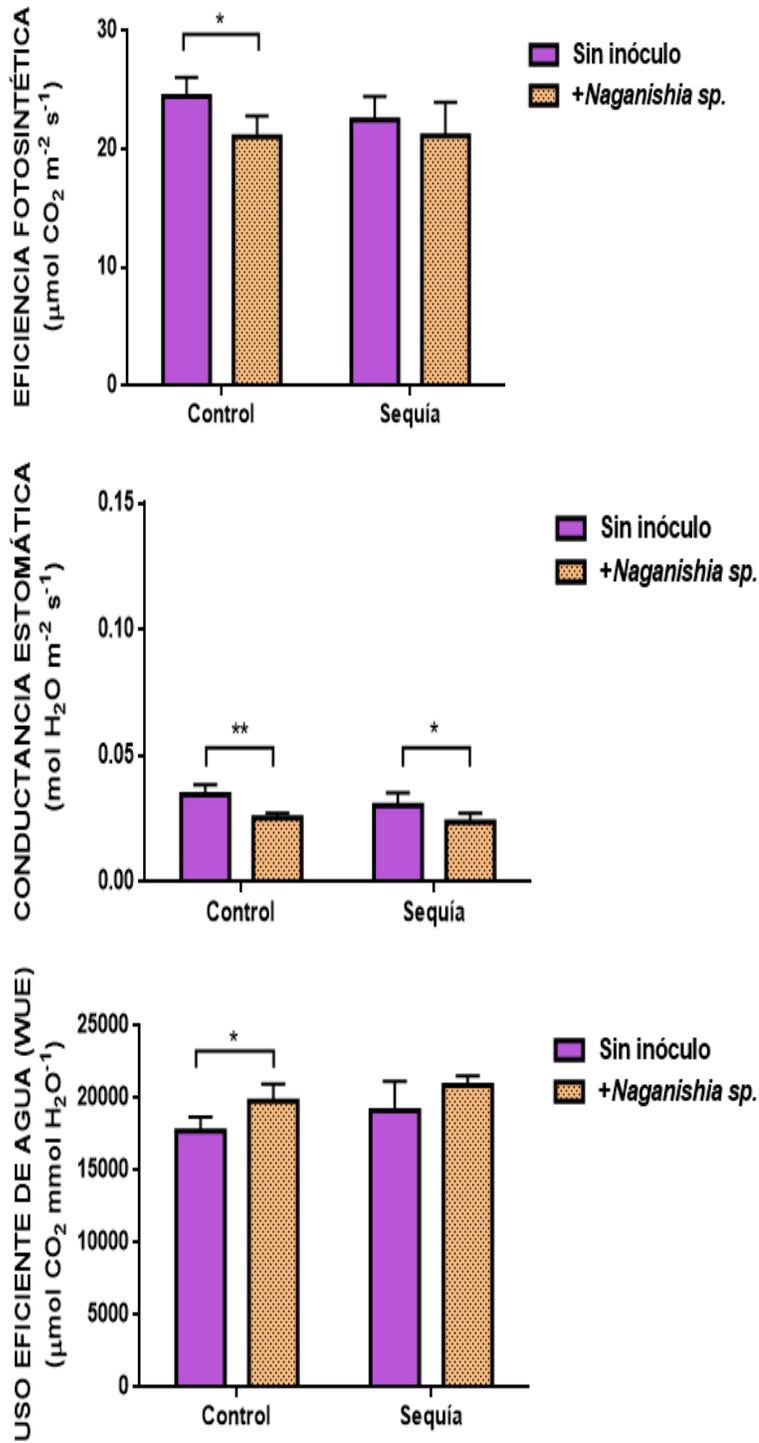


ANÁLISIS DE CUBIERTA VERDE CON Canopeo 28d



**Figura 14.** Registro fotográfico del fenotipo de plantas de *Z. mays* (Experimento 3) durante el curso del tiempo del experimento. A la izquierda se muestra la barra del tiempo en el que se indica la edad de la planta en días (d) y los sucesos del experimento. Abajo se muestra el análisis de cubierta verde

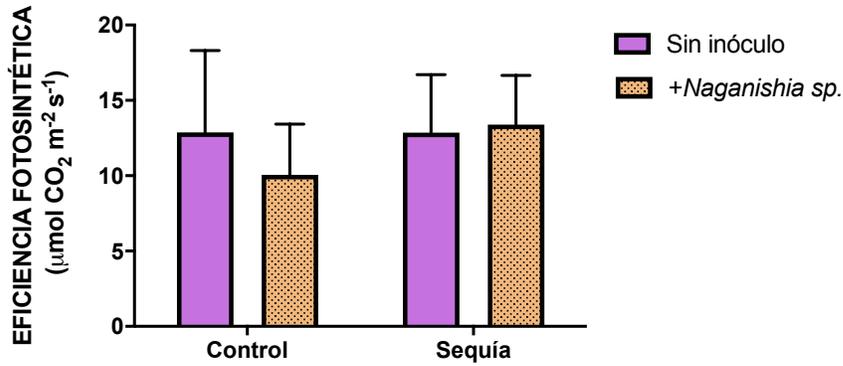
(determinación biomasa verde/ follaje) determinado con Canopeo (Patrignani y Ochsner, 2015) de cada condición.  $n=20$  plantas por condición.



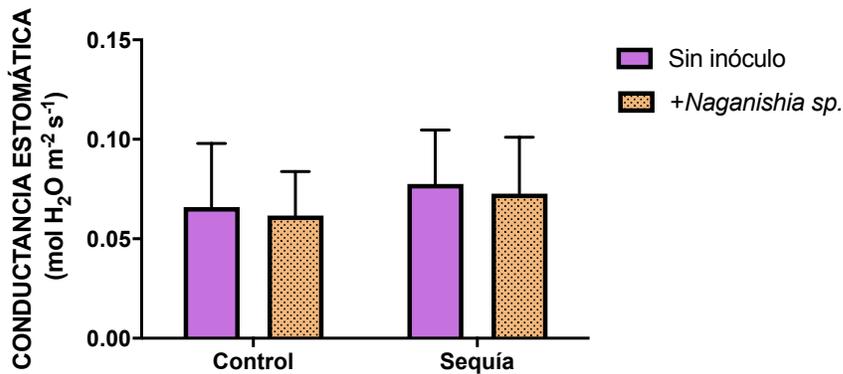
**Figura 15.** Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 14 días de edad (previo al estrés) en la 4ta hoja (vertedero) de plántulas inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* en

condición control y de estrés por sequía (Experimento 3). A) Gráfica de la tasa fotosintética, B) Gráfica de la conductancia estomática y C) Gráfica del uso eficiente de agua (WUE). \*Diferencias significativas al nivel de  $P < 0.05$ .

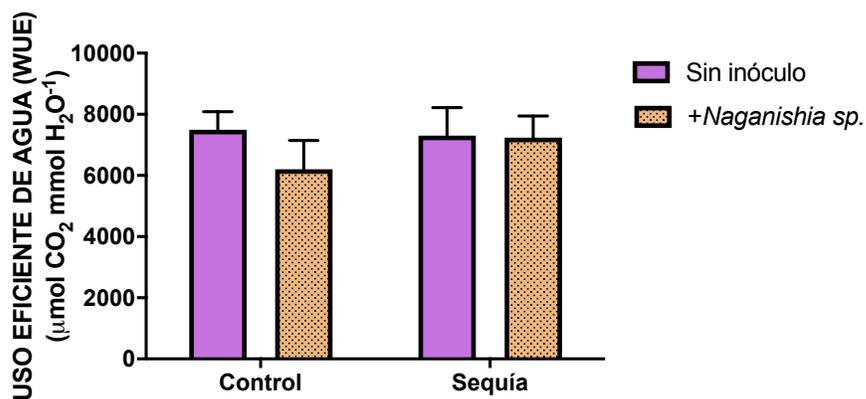
A)



B)



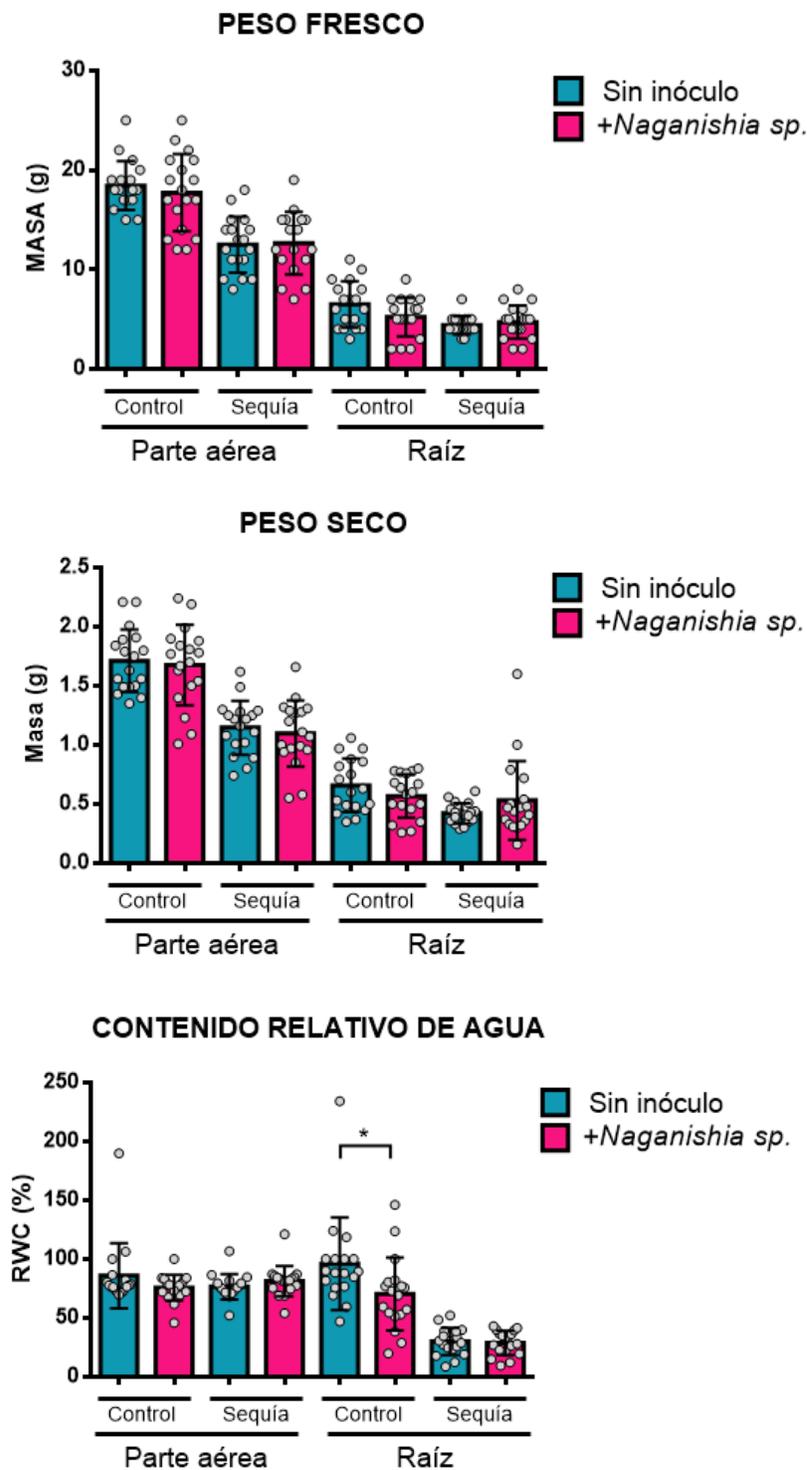
C)



**Figura 16.** Mediciones de intercambio de gases con el LI-COR 6400 a los 28 días de edad (7d de recuperación después del estrés) en la 4<sup>ta</sup> hoja (vertedero) de plántulas inoculadas y no inoculadas con *Naganishia sp.* en condición control y de estrés por sequía (Experimento 3). A) Gráfica de la tasa

fotosintética, B) Gráfica de la conductancia estomática, C) Gráfica del uso eficiente de agua (WUE).

\*Diferencias significativas al nivel de  $P < 0.05$ .



**Figura 17.** Determinación de la biomasa de plántulas de *Z. mays*, en condiciones de crecimiento control, para las plantas inoculadas y no inoculadas (Experimento 3). El análisis se realizó mediante

la determinación del peso fresco, seco y el RWC de raíz y la parte aérea total de plántulas de *Z. mays* de 36 días de edad. n=20 plantas por tratamiento. \*Diferencias significativas al nivel de  $P < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

Una de las alternativas para mitigar el impacto del estrés hídrico por sequía es el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, los cuales confieren múltiples beneficios a las plantas. Se ha demostrado que las experiencias con estímulos de tipo biótico o “*priming*” puede mejorar la tolerancia a la sequía en las plantas a través de la activación de vías de señalización comunes (Vargas et al., 2014). De igual forma, en este proyecto fue de nuestro interés el determinar si *Naganishia sp.* podía biomodular la activación de la autofagia en *Z. mays* y así mejorar la respuesta de la planta a estrés por sequía.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante western blot para el análisis de ATG8/ATG8-PE para determinar la actividad de la autofagia, encontramos que, tanto en condición de crecimiento *in vitro* como en almácigo de plantas de *Z. mays* inoculadas con *Naganishia sp.*, la acumulación de ATG8-PE mostró un incremento. Por lo anterior, podemos sugerir una posible regulación de la autofagia en las plantas de *Z. mays* como resultado de la inoculación con *Naganishia sp.* Hasta la fecha se ha demostrado que la autofagia es indispensable para la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés por sequía (Wang et al., 2017; Zeng et al., 2017; Sun et al., 2018), por lo que la inducción de autofagia previa a la condición estresante puede ser de ventaja para la planta, ya que al inducirse, la planta podría responder más rápido a la acumulación de agregados proteicos y orgánulos dañados, resultado de la condición de estrés (Nakajima & Suzuki, 2013; Luo *et al.*, 2017).

La limitada disponibilidad de agua durante el estrés por sequía se caracteriza por una reducción del potencial hídrico de los tejidos de la planta, lo que lleva a cambios morfológicos y fisiológicos, por ejemplo, cambios en la tasa de crecimiento, acumulación de ABA, así como cambios en la conductancia estomática, la actividad fotosintética y la transpiración (Pirasteh-Anosheh et al. 2016). Las respuestas de la planta a la sequía dependen de la severidad del estrés, el genotipo de la planta y la

incidencia del estrés en la etapa de desarrollo de la planta (Neumann, 2002). Aunado a lo anterior, la interacción con microorganismos promotores del crecimiento también favorece cambios fisiológicos y morfológicos que podrían ayudar no sólo a modular el crecimiento sino a proteger a las plantas del estrés mediante mecanismos directos e indirectos que involucran la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas (Goswami et al., 2016). Sin embargo, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal poseen cierta especificidad, es decir, los efectos de promoción de crecimiento y protección al estrés se ven reflejados cuando la planta es capaz de proveer componentes para sustentar al inoculante. Para los microorganismos rizosféricos, la composición de los exudados de la raíz es primordial para la interacción planta-microorganismo para favorecer la producción de reguladores de crecimiento y metabolitos secundarios (Zhang et al., 2015). Por esta razón resultó relevante determinar el efecto de *Naganishia sp.* tanto en la promoción del crecimiento como para la protección al estrés por sequía en *Z. mays*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en experimentos *in vitro*, determinamos que *Naganishia sp.* no mejora la tasa de germinación en *Z. mays*, cuando se utiliza como “seed priming” e inoculante del medio; en contraste a lo reportado previamente para *Solanum lycopersicum*, en el que usando a *Naganishia sp.* como inoculante se obtuvo una tasa de germinación mejorada (Tapia et al., 2020). No obstante, para el caso de *Z. mays* podríamos sugerir el análisis de la velocidad de germinación, debido a que se observó una sutil diferencia para 1 DPG, con este dato se podría esclarecer si *Naganishia sp.* tiene un efecto en la germinación. De manera interesante, se pudo observar que las plantas inoculadas *in vitro* con *Naganishia sp.* presentaron alteraciones en la arquitectura de la raíz, es decir, una mayor cantidad de raíces laterales (figura 5) y una ligera disminución en el número de raíces escutelares y de la corona (figura 7). Lo anterior podría ser resultado de la alteración del balance de auxinas en la planta, debido a que *Naganishia sp.* produce IAA (ácido indolacético). En la literatura existen antecedentes de microorganismos que producen IAA, como es el caso de *Pseudomonas putida* que tiene efecto en las plantas de canola y “mug bean”, generando cambios en la

estructura de la raíz (Patten & Glick, 2002), lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo.

Para el caso de plantas crecidas en almácigos en condición de invernadero, se analizaron 3 experimentos con diferente estacionalidad (es decir en diferentes temporadas del año). Para el primer experimento (Febrero-Marzo) encontramos que la inoculación con *Naganishia sp.* mostró un efecto en la promoción del crecimiento de la parte aérea de plántulas de *Z. mays*. Este efecto se observó únicamente en las plántulas inoculadas con *Naganishia sp.* de 26 días de edad que crecieron bajo condiciones óptimas de riego, las cuales incrementaron su biomasa total fresca y seca de la raíz y de la parte aérea. Por lo tanto, el efecto promotor de crecimiento de *Naganishia sp.* en la raíz y la parte aérea se observó sólo en condiciones de crecimiento sin estrés. Con lo anterior se concluyó que *Naganishia sp.* no promueve el crecimiento de las plantas en condición de estrés por sequía, por lo menos en esta etapa de la plántula.

De manera interesante, al analizar el contenido relativo de agua de las raíces y parte aérea de las plantas inoculadas con *Naganishia sp.* que se sometieron a estrés por sequía, éste fue mayor en el tejido foliar y radicular, demostrando que *Naganishia sp.* después de la recuperación al estrés (26d), podría favorecer la tolerancia al estrés por sequía en plantas de *Z. mays* (figura 9), como un mecanismo indirecto de protección a estrés abiótico (Goswami et al., 2016).

Con la finalidad de analizar el efecto de la inoculación en sequía severa en plántulas de *Z. mays*, se impuso una condición de estrés de 9d sin riego y su posterior recuperación. Previamente al tratamiento de estrés se evaluaron aspectos fisiológicos (plantas de 14d) en la 2da y 4ta hoja, para determinar posibles diferencias entre las plantas inoculadas y las no inoculadas. Se reconoce que las funciones entre las hojas evaluadas (2ª y 4ª) son diferentes, la 2ª hoja se considera tejido fuente, mientras que la 4ª se funciona como vertedero de nutrientes. Demostramos que las plantas inoculadas tienen un incremento en la tasa fotosintética y la conductancia estomática en la 2ª hoja, mientras que el uso eficiente de agua es similar para la condición sin inóculo e inoculada. Para la 4ª hoja, no se

encontraron diferencias en ninguno de los parámetros mencionados (figura 11). Finalmente, se determinó que la inoculación puede incrementar la supervivencia de las plantas en condición de sequía severa en un 25%, comparada con las no inoculadas que fue de 5%. Lo anterior podría ser resultado del “*priming*” con *Naganishia sp.* que mejoró la eficiencia fotosintética y por consiguiente provocó una mayor cantidad de fotoasimilados que podrían tener un papel en la tolerancia a la sequía.

En el experimento número 3 se analizó el estado fisiológico de las plantas en la condición previa y posterior al estrés por sequía (figura 15 y 16). En este estudio se decidió analizar únicamente la 4ª hoja (vertedero), debido a que la 2ª hoja muere y limita las mediciones posteriores a los 14d.

El estatus fisiológico de las plantas previo a la condición de estrés señala que la inoculación con *Naganishia sp.* provocó un decremento en la tasa fotosintética, en la conductancia estomática e incrementó el uso eficiente de agua. Lo anterior podría sugerir el papel de *Naganishia sp.* en la regulación de los niveles de hormonas vegetales, como es el ácido abscísico (ABA) que es esencial para el cierre de estomas como primera respuesta de la planta a la escasez de agua para minimizar la pérdida de ésta durante la transpiración (Ahmad et al., 2016). Este resultado concuerda con lo reportado por Porcel y colaboradores (2014), en el que determinan que *Bacillus megaterium* una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, regula los niveles de hormonas como ABA y etileno en su actividad promotora del crecimiento. Por otro lado, para el caso del uso eficiente de agua (WUE), este rasgo resulta importante en suelos con baja disponibilidad de agua, ya que, ser más eficiente indica que el agua asimilada puede ser eficientemente consumida para asimilar carbono, para producir biomasa o rendimiento del grano, que son parámetros cruciales para la producción agrícola (Tambussi et al., 2007).

Seguidamente, se analizó el estatus fisiológico de las plantas después de un periodo de recuperación al estrés con riego óptimo (7d), en el que se encontró que la eficiencia fotosintética fue similar tanto en condición control como la condición de sequía (sin cambios significativos). Además, se observó que la conductancia

estomática se mantuvo baja aun después de la recuperación, en la condición control y sequía de plantas inoculadas con *Naganishia sp* (figura 16). Para el caso de las plantas sin inóculo; la conductancia estomática disminuyó en condiciones control y sequía (28d), comparado con la medición de la conductancia estomática de las plantas previo al estrés por sequía (14d). De acuerdo con estos resultados, sugerimos que *Naganishia sp.* podría modular la conductancia estomática como un mecanismo indirecto para mejorar la respuesta a la sequía (adaptaciones fisiológicas).

## 9. CONCLUSIÓN

Se demostró que *Naganishia sp.* es capaz de promover el crecimiento vegetal y favorecer el uso eficiente de agua en plantas de *Z. mays* en condiciones óptimas de crecimiento en invernadero.

El “*priming*” con *Naganishia sp.* demostró el mantenimiento de niveles bajos para la conductancia estomática, tanto en la condición control como en la recuperación al estrés por sequía.

Se determinó que la inoculación con *Naganishia sp.* incrementa la tasa de supervivencia en condición de estrés por sequía.

Se demostró la inducción de la autofagia por *Naganishia sp.* tanto en el sistema *in vitro* como en el de almácigos.

Por lo anterior, sugerimos que *Naganishia sp.* puede funcionar como cebador ó “*priming*” de *Z. mays* para contrarrestar el estrés hídrico inducido por la sequía y en consecuencia, asegurar la supervivencia de la planta.

## 10.PERSPECTIVAS

- El uso de mutantes de autofagia para tener un mejor acercamiento del papel de la autofagia cuando *Z. mays* interactúa con *Naganishia sp.*, en condición normal y de estrés por sequía.
- Analizar la expresión de genes de autofagia en la interacción de *Z. mays* con *Naganishia sp.*, en condición normal y de estrés por sequía.

## 11. REFERENCIAS

**Ahmad, N.**, Malagoli, M., Wirtz, M., y Hell, R. (2016). Drought stress in maize causes differential acclimation responses of glutathione and sulfur metabolism in leaves and roots. *BMC Plant Biology*, 16(1), 2-15. doi: 10.1186/s12870-016-0940-z

**Amprayn, K.**, Rose, M., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H., y Kennedy, I. (2012). Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, 295-299. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.11.009

**An, D.**, Yang, J., y Zhang, P. (2012). Plant genomics Transcriptome profiling of low temperature- treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress. *BMC Genomics*, 13(1), 2-24. doi: 10.1186/1471-2164-13-64

**Barka, E. A.**, Nowak, J., y Clément, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7246-7252. doi: 10.1128/AEM.01047-06

**Baeza, M.**, Barahona, S., Alcaíno, J., y Cifuentes, V. (2017) Amplicon-metagenomic analysis of fungi from antarctic terrestrial habitats. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2017.02235

**Bano, A.**, y Fatima, M. (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (L) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*. 45, 405-413. doi: 10.1007/s00374-008-0344-9

**Barrow, J. R.**, Lucero M. E., Reyes-Vera, I., y Havstad, K. M. (2008). Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? *Communicative & Integrative Biology*, 1(1), 69-73. doi: 10.4161/cib.1.1.6238

**Borruso, L.**, Sannino, C., Selbmann, L., Battistel, D., Zucconi, L., Azzaro, M., Turchetti, B., Buzzini, P., y Guglielmin, M. (2018). A thin ice layer segregates two distinct fungal communities in Antarctic brines from Tarn Flat (Northern Victoria Land). *Scientific Reports*, 8(1), 1-9. doi: 10.1038/s41598-018-25079-3

**Canto, A.**, Herrera, C. M., y Rodríguez, R. (2017). Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. *PeerJ*, 5(3517), 1-22. doi: 10.7717/peerj.3517

**Chapin, H.**, Okada, M., Merz, A. J., y Miller, D. L. (2015). Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*. *Aging*, 7(6), 419-432. doi: 10.18632/aging.100765

**Conrath, U.**, Beckers, G., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M., Pieterse, C., Poinssot, B., Pozo, M., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., y Mauch-Mani, B. (2006) Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10). 1062–1071. doi: 10.1094/MPMI-19-1062

**Cruz de Carvalho, M.** (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156-165. doi: 10.4161/psb.3.3.5536

**Demiral, T.** y Turkan, I., (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 247-257. doi: 10.1016/j.envexpbot.2004.03.017

**Dikic, I.** (2017). Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 193-224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908

**Eapen, D.,** Barroso, M. L., Campos, M. E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J. G., y Cassab, G. I. (2003). A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(2), 536-546. doi: 10.1104/pp.011841

**Feng, Y.,** Yao, Z., y Klionsky, D. J. (2015). How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 354-363. doi: 10.1016/j.tcb.2015.02.002

**FAO. (2019).** Sequía. FAO. <http://www.fao.org/emergencias/tipos-de-peligros-y-de-emergencias/sequia/es/>

**Filippucci, S.,** Tasselli, G., Scardua, A., Di Mauro, S., Cramarossa, M. R., Perini, D., Buzzini, P., Turchetti, B., Onofri A., Forti, L., y Buzzini, P. (2016). Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-14. doi: 10.1186/s13068-016-0672-1

**Fischer, R.,** Byerlee, D., y Edmeades, G. O. (2014). *Crop yields and global food security: Will yield increase continue to feed the world?* Recuperado de [https://aciagov.au/sites/default/files/legacy/mn158\\_web\\_5\\_0.pdf](https://aciagov.au/sites/default/files/legacy/mn158_web_5_0.pdf)

**Galli, V.,** Messias, R., dos Anjos e Silva, S. D., y Rombaldi, C. V. (2013). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in maize grains. *Plant Cell Reports*, 32(12), 1869–1877. doi: 10.1007/s00299-013-1499-x

**Goswami, D.,** Thakker, J. N., y Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1-19. doi: 10.1080/23311932.2015.1127500

**Hillwig, M.**, Contento, A. L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D. C., y Macintosh, G. C. (2011). RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1093-1098. doi: 10.1073/pnas.1009809108

**Hu, H.**, y Xiong, L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought resistant crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 715-741. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040000.

**Kang, S.**, Shin, K. D., Kim, J. H., y Chung, T. (2018). Autophagy-related (ATG) 11, ATG9 and the phosphatidylinositol 3-kinase control ATG2-mediated formation of autophagosomes in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 37(4), 653–664. doi: 10.1007/s00299-018-2258-9

**Klionsky, D.** et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1-222. doi: 10.4161/auto.19496

**Li, W.**, Chen, M., Zhong, L., Liu, J., Xu, Z., Li, L., Zhou, Y., Guo C., y Ma, Y. (2015). Overexpression of the autophagy-related gene SiATG8a from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and drought stress in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 800-806. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.035

**Liu, Y.**, y Bassham, D. C. (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 215-237. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105441

**Liu, Y.**, Xiong, Y., y Bassham, D. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7), 954-963. doi: 10.4161/auto.5.7.9290

**Luo, L.**, Zhang, P., Zhu, R., Fu, J., Su, J., Zheng, J., Wang, Z., Wang, D., y Gong, Qingqiu. (2017). Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*. 8. 1459. doi: 10.3389/fpls.2017.01459.

**Masclaux-Daubresse, C.**, Chen, Q., y Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 8-17. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.001

**Marshall, R. S.**, Li, F., Gemperline, D. C., Book, A. J., y Vierstra, R. D. (2015). Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 58(6), 1053-1066. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.023

**Marshall, R.**, y Vierstra, R. (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 173-208. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040606

**Mittler, R.**, Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., y Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007.

**Patrignani, A.**, y Ochsner, T. E. (2015). Canopeo: A powerful new tool for measuring fractional green canopy: cover. *Agronomy Journal*, 107(6), 2312-2320. doi: 10.2134/agronj15.0150

**Porcel, R.**, Barea, J.M., y Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Antioxidant activities on mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, 157(1), 135-143. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00658.x

**Nakatogawa, H.**, Suzuki, K., Kamada, Y., y Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 458-467. doi: 10.1038/nrm2708

**Neufeld, T. P.** (2012). Autophagy and cell growth - the yin and yang of nutrient responses. *Journal of Cell Science*, 125(10), 2359-2368. doi: 10.1242/jcs.103333

**Neumann, P. M.** (2008). Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Annals of Botany*, 101(7), 901-907. doi: 10.1093/aob/mcn018

**National Centers for Environmental Information** (2019). Definition of Drought. NOAA. <https://www.ncdc.noaa.gov/monitoring-references/dyk/drought-definition>

**Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P.** (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life sciences*, 188, 53-67. doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029

**Rodriguez R., Redman R.S., y Henson, J.M.** (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9(3), 261-272. doi: 10.1023/B:MITI.0000029922.31110.97

**SAGARPA.** (2015). Producción de Chile mexicano. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/produccion-del-chile-mexicano>

**Sandhya, V., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., y Venkateswaralu, B.** (2009) Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP–P45. *Biology and Fertility of Soils*, 46(1), 17-26. doi: 10.1007/s00374-009-0401-z

**SAGARPA.** (2017). Maíz grano blanco y amarillo mexicano. Gobierno de México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B\\_sico-Ma\\_z\\_Grano\\_Blanco\\_y\\_Amarillo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf)

**Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. y Frise, E.** (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019

**Sharma, N., Cram, D., Huebert, T., Zhou, N., y Parkin, I. A. P.** (2007). Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress. *Plant Molecular Biology*, 63(2), 171-184. doi: 10.1007/s11103-006-9080-4

**Sziderics, A., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., y Wilhelm, E.** (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum*

annuum L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 53(11), 1195-1202. doi: 10.1139/W07-082

**Slobodkin, M.**, y Elazar, Z. (2013). The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays in Biochemistry*, 55, 51-64. doi: 10.1042/bse0550051

**Tambussi, E. A.**; Bort, J. y Araus, J. L. (2007). Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology*. 150(3), 307-321. doi: 10.1111/j.1744-7348.2007.00143.x

**Tapia, I.** (2020) Prospección y caracterización de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes promotores del crecimiento vegetal aislados del volcán Xinantécatl (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

**Turner, N. C.** (1981). Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, 58(1), 339-366. doi: 10.1007/BF02180062

**Tsugane, K.**, Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., y Kobayashi, H. (1999). A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11, 1195-1206. doi: 10.1105/tpc.11.7.1195

**Schulz, B.**, Rommert A., Dammann, U., Aust, H., y Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103(10), 1275-1283. doi: 10.1017/S0953756299008540

**Stone J.**, Bacon C. W., y White, J. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En *Microbial Endophytes* (1ra ed., p. 3-29). New York: Marcel Dekker

**Wang, P.**, Sun, X., Jia, X., y Ma, F. (2017). Apple autophagy-related protein MdATG3s afford tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant Science*, 256, 53-64. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.12.003

**Vargas, L.,** Santa Brigida, A., Mota Filho, J., de Carvalho, T., Rojas, C., Vanechoutte, D., Van Bel, M., Farrinelli, L., Ferreira P., Vandepoele, K., y Hemerly, A. (2014). Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. *PLOS One*, 9(12), 1-37. doi: 10.1371/journal.pone.0114744

**Xie, Z.,** y Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102-1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102

**Xiong Y,** Contento A. L., Nguyen P. Q. y Bassham, D. C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143(1), 291-299. doi: 10.1104/pp.106.092106

**Zhang, N.,** Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q., y Zhang, R. (2015). Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC genomics*, 16(1), 685. doi: 10.1186/s12864-015-1825-5

**Zeng, X.,** Zeng, Z., Liu, C., Yuan, W., Hou, N., Bian, H., Zhu, M., y Han, N. (2017). A barley homolog of yeast ATG6 is involved in multiple abiotic stress responses and stress resistance regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 97-106. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.03.013