



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**ACTIVIDAD ACC DESAMINASA Y DETECCIÓN DEL GENE
acdS EN ESPECIES DEL GÉNERO *Burkholderia*, SU
EXPRESIÓN Y EFECTO EN ASOCIACIÓN CON LA PLANTA
DE TOMATE**

**Tesis que presenta para obtener el grado de Doctora en
Ciencias Biomédicas**

JANETTE ONOFRE LEMUS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JESÚS CABALLERO-MELLADO

NOVIEMBRE DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Caballero-Mellado principalmente por haber confiado en mí, y haberme permitido formar parte de su grupo de investigación. Aprecio enormemente la motivación, la paciencia, y el apoyo que me brindó en todo momento para desarrollar ideas, disfrutar logros y superar las dificultades que se presentaron en el proceso de mi formación académica.

A los miembros del comité tutorial la Dra. Ma. de Lourdes Girard Cuesy y el Dr. Juan Miranda Ríos por la disposición e interés que mostraron en el proyecto y por brindarme siempre críticas constructivas que favorecieron la consolidación de los objetivos de este trabajo.

Al Dr. Ismael Hernández-Lucas, por revisar y discutir ampliamente diferentes aspectos del proyecto de investigación.

Al Dr. Miguel Angel Ramírez por su enorme disponibilidad y orientación proporcionada en diversos aspectos académicos.

A mis sinodales, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis doctoral, por sus comentarios y críticas.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio que facilitaron mi estancia en el CCG, gracias por su ayuda fraternal y desinteresada.

A toda mi querida familia y amigos.

A mi mamá, gracias por tu apoyo continuo e incondicional, la educación y amor que me has transmitido día a día, me regaló la oportunidad de crecer moral y profesionalmente.

A la memoria de mi amado padre

A Sandy por la lealtad y solidaridad que me ha brindado como hermana y como amiga

A Demian, por los incontables abrazos tan afectuosos que hemos compartido, que han iluminado y sensibilizado mis ideas acerca de la vida.

A Miriam y Octavio por el ejemplo que me han dado con su calidez y humanismo

Y muy especialmente a Daniel, mi más profunda admiración y agradecimiento por todo el amor, paciencia, ayuda y comprensión que me ha brindado siempre y que dulcemente facilitaron el inicio, desarrollo y culminación de esta etapa tan importante.

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Antecedentes	12
Objetivos	26
Resultados	27
Discusión	43
Conclusiones	48
Perspectivas	48
Resultados adicionales	50
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	52
Anexo 3.....	65
Anexo 4.....	71
Referencias	75

RESUMEN

En las últimas décadas se ha tratado de incrementar la producción agrícola para satisfacer la demanda de alimentos de la población a nivel mundial. Para maximizar esta producción, la agricultura moderna se ha valido del uso masivo de fertilizantes químicos y pesticidas los cuales están contaminando y modificando severamente el ambiente. Una alternativa para incrementar los rendimientos agrícolas sin agravar la problemática actual, es el uso de microorganismos asociados de manera natural con las plantas, algunos de los cuales se ha comprobado que son capaces de promover el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos. Las bacterias del género *Burkholderia*, principalmente los miembros del complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) tienen un gran potencial agrícola, biotecnológico e industrial, pero debido a su característica de patógenos oportunistas, en casos de fibrosis quística, no han sido utilizados comercialmente. En contraste, las características benéficas relevantes que presentan las diversas especies de *Burkholderia* diazótrofes y ambientales, alejadas filogenéticamente de los patógenos oportunistas, son desconocidas. En este trabajo se demostró que la presencia del gene *acdS* y la funcionalidad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa son características comunes en las especies de *Burkholderia*. La secuencia del gene *acdS* en 18 especies de *Burkholderia* analizadas mostró alta conservación a nivel de nucleótidos (76 a 99% de identidad). El análisis filogenético del gene *acdS* mostró la separación de dos grandes grupos, uno de ellos formado por las especies pertenecientes al complejo Bcc y el otro integrado por diferentes especies de *Burkholderia* diazótrofes y asociadas a plantas. También, se observó que la actividad enzimática ACC desaminasa varía de acuerdo a la especie y cepa analizadas, detectándose en un rango de 2 a 15 μ moles de α -cetobutirato/h/mg de proteína, lo cual sugiere que la mayor parte de especies analizadas podrían modular los niveles de etileno en las plantas. Para conocer el efecto del gene *acdS* en asociación con las plantas fue construida una mutante sin actividad ACC desaminasa (*acdS*⁻) en la cepa tipo de *B. unamae*. Los resultados mostraron que la cepa silvestre *B. unamae* MTI-641^T, a diferencia de la cepa mutante *acdS*⁻, fue capaz de promover significativamente el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. saladette), bajo distintas condiciones de crecimiento. Los parámetros analizados fueron realizados en diferentes etapas de desarrollo e incluyeron peso seco de raíz y parte aérea, contenido de clorofila y longitud de las raíces. A través de fusiones transcripcionales con el gene *gusA* fue analizada la inducción *in vitro* del gene *acdS* y la expresión del mismo en asociación con plantas de tomate. También se demostró la

capacidad de colonización de *B. unamae* MTI-641^T en diferentes plantas mediante la inoculación de la cepa *s7p-gusA*. En este estudio se concluye que *B. unamae*, entre otras especies de *Burkholderia* analizadas, tiene gran potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal. Sin embargo, aunque el efecto benéfico producido en las plantas fue observado bajo condiciones de laboratorio e invernadero, es necesario confirmar los estudios a nivel de campo.

ABSTRACT

In the last decade, agricultural production has been increased to satisfy food industry requests in the world. To increase yield production, modern farmers have used chemical fertilizers and pesticides that produce a negative impact on the environment. Some beneficial bacteria associated closely with plants are able to promote plant growth offering a clean and friendly alternative to improve agricultural production. Bacteria of *Burkholderia* genus, particularly species belonging to *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) have potential features of agricultural, biotechnological and industrial interest. However, the commercial use of Bcc members has not been approved due to their capacity to become opportunistic pathogens in patients with cystic fibrosis. In contrast, the beneficial traits expressed among the plant associated, and diazotrophic *Burkholderia* species located phylogenetically distant from opportunistic pathogens are unknown. In this work, we showed that the presence of the *acdS* gene and the ACC deaminase activity are common traits in *Burkholderia* genus. The *acdS* gene sequences analyzed in 18 *Burkholderia* species were highly conserved showing identity levels between 76-99%. Additionally, the phylogenetic analysis of *acdS* gene revealed the presence of two main clusters, the opportunistic pathogens formed one cluster, and the second group was integrated by diazotrophs, and plant-associated bacteria. The ACC deaminase activity found in *Burkholderia* species ranges between 2 to 15 μmol of α -ketobutyrate/h/mg protein with differences among the specie and strain analyzed. The results suggest that most of the *Burkholderia* species analyzed in this work could modulate ethylene levels in plants. To know the effect of *acdS* gene in association with plants, a mutant without ACC deaminase activity in the *B. unamae* MTI-641^T strain was constructed. The results showed that the wild-type strain of *B. unamae* MTI-641 was able to promote plant tomato growth, under controlled conditions. The analyzed parameters were dry shoot and root weight, chlorophyll content and root elongation. These parameters were determined under different growth stages and growth conditions. Furthermore, transcriptional fusions were used to analyze the *acdS* gene induction and its expression in association with tomato (*Lycopersicon esculentum* var. saladette) plants. The seedlings colonization patterns of *B. unamae* MTI-641^T were determined also in two important crops thorough inoculation of the strain *s7p-gusA*. Finally, we concluded that *Burkholderia* species analyzed in this work and notably, *B. unamae* are potential plant growth promoting bacteria. However, the beneficial effect produced on tomato plants under field conditions should be investigated.

INTRODUCCION

En la actualidad, existe gran interés en expandir la producción agrícola para satisfacer la demanda de alimentos de la población a nivel mundial. Para maximizar dicha producción la agricultura moderna se ha valido del uso masivo de fertilizantes químicos y pesticidas los cuales están contaminando y modificando severamente el ambiente (Tildman *et al.*, 2002). El uso excesivo de fertilizantes químicos está asociado a la contaminación de mantos acuíferos y a problemas de eutroficación de lagos y ríos. Además, la mayor parte de los pesticidas utilizados para el control de fitopatógenos son altamente persistentes en el ambiente y son tóxicos para los animales y humanos (Glick, 2004).

En los próximos años, el incremento en el precio de los alimentos será el primer indicador económico global de la crisis ambiental que involucra a la población mundial y a los recursos naturales de los que dependen. Por lo anterior, es necesario implementar estrategias de producción de tecnologías limpias en el sector agrícola para promover el uso sostenible de los recursos naturales. Una alternativa para incrementar los rendimientos agrícolas sin agravar la problemática actual de contaminación ambiental, es el uso de microorganismos asociados de manera natural con las plantas, algunos de los cuales principalmente rizosféricos, se ha comprobado que son capaces de promover el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos (Glick, 2004).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, siglas en inglés), representan numerosas especies del suelo y al igual que muchas especies de hongos, particularmente micorrízicos, se encuentran asociadas con la mayoría de las especies de plantas y comúnmente en casi todo tipo de ambientes. Las especies de PGPR mas estudiadas son las que colonizan la superficie de las raíces. Algunas de las especies de PGPR tienen la capacidad de penetrar y proliferar en el interior de las raíces, trasladarse a través del sistema vascular y sin causar daño, establecerse y desarrollar poblaciones endófitas en los tejidos internos, ya sea tallo, hojas u otros órganos (Caballero-Mellado, 2006). En los años recientes, se ha propuesto que las bacterias endófitas, por estar protegidas del ambiente rizosférico altamente competitivo y estresante, podrían ejercer un importante papel benéfico sobre el desarrollo de las plantas, debido a que los productos de su actividad fisiológica y metabólica serían excretados directamente en el interior de los tejidos vegetales (Döbereiner, 1992). Sin embargo, las poblaciones más altas de las PGPR existen típicamente alrededor de las raíces, en la rizosfera, probablemente debido

a los altos niveles de nutrientes exudados por las raíces de las plantas (hasta 40% de los fotosintatos) que pueden ser utilizados por las bacterias para su crecimiento (Whipps, 1990; Nelson, 2004).

Las PGPR favorecen el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos (Fig. 1) los cuales son descritos a continuación.

Mecanismos Indirectos. La capacidad de algunas PGPR de actuar como agentes de biocontrol contra fitopatógenos y así estimular indirectamente el crecimiento vegetal es consecuencia de la expresión de una o varias actividades bacterianas entre las cuales se describe la producción de antibióticos (Whipps, 1997), la síntesis de sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular que captan con alta afinidad la mayor parte de hierro disponible en la rizosfera, impidiendo la proliferación de patógenos en la vecindad de las raíces por la carencia de hierro disponible (Dowling *et al.* 1996). Algunas bacterias producen enzimas como β 1, 3-glucanasa, quitinasas, proteasas o lipasas siendo todas capaces de facilitar la lisis de paredes celulares de hongos (Chet & Inbar, 1994). Otras bacterias pueden proteger a las plantas mediante la competencia por nutrientes y nichos sobre la superficie de las raíces previniendo efectivamente la unión de dichos patógenos y consecuentemente la infección. Además las PGPR son estimuladores de la resistencia sistémica inducida (ISR, siglas en inglés) en las plantas, disminuyendo el daño producido por los fitopatógenos (Van Loon *et al.* 1997).

Mecanismos Directos. Existen diversos mecanismos que influyen directamente sobre el crecimiento de las plantas. Algunos microorganismos pertenecientes a los dominios archaea y bacteria tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y reducirlo a amonio por medio de la enzima nitrogenasa, proceso denominado como fijación biológica del nitrógeno. En las bacterias, este proceso es llevado a cabo en vida libre o en simbiosis con plantas leguminosas o actinorrhizas. La asociación simbiótica resulta en la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos en donde el nitrógeno fijado es proporcionado a la planta y esta a su vez proporciona a la bacteria fuentes de carbono. Las bacterias asociativas o de vida libre capaces de colonizar el interior de los tejidos y/o las raíces de las plantas pueden fijar N_2 sin formar una simbiosis. Sin embargo, ha sido sugerido que las bacterias endófitas en relación con las rizosféricas, contribuyen de manera más significativa el aporte de nitrógeno a la planta (Döbereiner, 1992).

Los PGPR pueden sintetizar fitohormonas como citocininas, giberelinas y auxinas, particularmente ácido indolacético (IAA), que favorece el crecimiento de las raíces y la proliferación de los pelos radicales, mejorando la absorción del agua y minerales del suelo y con ello un mejor y mayor desarrollo de la planta. De forma similar, la solubilización de compuestos insolubles en el ambiente rizosférico, principalmente fosfatos di y tri-cálcicos entre otros minerales, favorecen el crecimiento vegetal. En menor grado, la producción de sideróforos también podría aportar hierro directamente a la planta, la cual puede transportar el complejo bacteriano hierro-sideróforo al interior de los tejidos. No obstante, algunos estudios han mostrado que existe una fuerte competencia en el ambiente rizosférico entre los microorganismos y las plantas. En los últimos años, ha sido sugerido, que la enzima bacteriana 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa puede disminuir los niveles de etileno elevados y nocivos en plantas estresadas o en desarrollo, favoreciendo la formación de raíces más largas que se traduce en un mejor crecimiento vegetal (Glick *et al.* 1998). De esta manera, los PGPR pueden afectar directa o indirectamente el crecimiento y desarrollo de las plantas utilizando uno o varios de estos mecanismos, a través del ciclo de vida de la planta, y dependiendo de las condiciones ambientales.

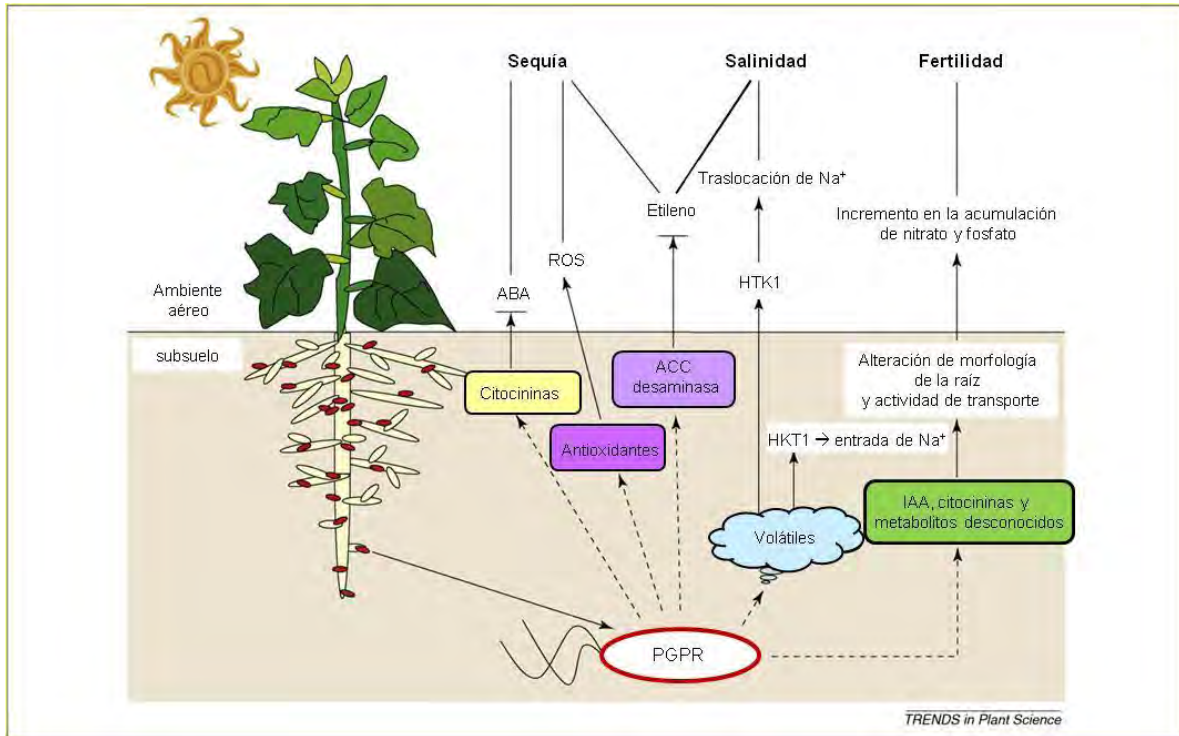


Figura 1. Tolerancia sistémica inducida estimulada por PGPR contra diferentes tipos de estrés como la sequía, salinidad, fertilidad en el suelo (raíces) y en el ambiente aéreo (hojas, tallos, frutos). Las líneas punteadas indican los compuestos bioactivos producidos por los PGPR; las líneas continuas indican los compuestos de las plantas afectados por los componentes bacterianos. Algunas cepas de PGPR indicadas en rojo sobre las raíces de las plantas producen citocininas y antioxidantes como catalasa, lo cual resulta en la acumulación de ABA y la degradación de ROS respectivamente. La degradación del precursor del etileno (ACC) mediante la enzima ACC desaminasa reduce el estrés en las plantas permitiendo así su crecimiento bajo condiciones desfavorables. Las sustancias volátiles emitidas por los PGPR reprimen la expresión de *hkt1* en las raíces pero la induce en la parte aérea, orquestando la disminución de los niveles de Na^+ en la planta completa bajo condiciones de estrés salino. Además, las PGPR también producen IAA o determinantes desconocidos que pueden incrementar el número, la longitud y el área de de la superficie de las raíces, lo cual favorece la entrada de nutrientes como por ejemplo el fósforo y el nitrato. Abreviaciones: ABA, ácido abscísico; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato; HKT1, transportador de K^+ de alta afinidad; IAA, ácido indolacético; PGPR, bacterias promotoras del crecimiento de las plantas; ROS, especies de oxígeno reactivas (Figura modificada, Yang *et al.* 2009).

El etileno, biosíntesis, efectos fisiológicos y modo de acción

El desarrollo normal y la sobrevivencia de todos los seres vivos dependen de la capacidad de los organismos en percibir y responder al ambiente. Las respuestas a las señales internas y externas son frecuentemente inducidas por las hormonas, promoviendo cambios fisiológicos dando cabida en un hábitat cambiante.

De las diversas hormonas que rigen el desarrollo vegetal, la más simple en estructura es el alqueno gaseoso, etileno. El etileno conocido como la hormona “del estrés”, es una molécula de señalización esencial que participa en un amplio rango de procesos fisiológicos entre los cuales destacan la germinación de las semillas, elongación de la raíz, formación de xilema, diferenciación del tejido, floración, y senescencia. Además de ser importante en el desarrollo de las plantas, participa en la respuesta al estrés biótico y abiótico. Algunos de estos procesos actúan a través de la interacción del etileno con otras hormonas por ejemplo; en conjunto con auxinas, el etileno regula la iniciación de raíces laterales y exudación de resinas y gomas (Abeles *et al.* 1992; Arshad & Frankenberger, 2002; Matoo & Suttle, 1991; Johnson & Ecker, 1998). Existen múltiples instancias de sinergia-antagonismo entre las fitohormonas y las diversas respuestas de señalización forman una red compleja de interacciones (Glick *et al.* 2007).

El etileno es sintetizado en respuesta a diferentes tipos de estímulos y es producido en dos fases o picos (Abeles *et al.* 1992). El primer pico de etileno es pequeño y generalmente ocurre dentro de pocas horas después de iniciado el estrés y es a menudo difícil de detectarlo (Fig. 2). Ha sido sugerido que el primer pico de etileno actúa como una señal para encender la transcripción de genes que codifican para proteínas que facilitan la protección de una planta contra un patógeno por ejemplo, esto como parte de un mecanismo de resistencia sistémica inducida (Van Loon & Glick, 2004; Van Loon *et al.* 1997). El segundo pico del etileno es mucho más grande que el primero y generalmente ocurre varios días después de iniciado el estrés y dirige una respuesta deletérea en la planta (Fig. 2). Como parte de la respuesta al estrés, el etileno inhibe la elongación de la raíz, nodulación y el transporte de auxinas, además induce hipertrofia y senescencia. Diferentes estudios han mostrado que los niveles de etileno elevados están asociados con un incremento en el daño a la planta por el agente estresante, es decir, el etileno exacerba las presiones ambientales (Abeles *et al.* 1992; Glick, 2004). De forma ideal, parece ventajoso para las plantas sintetizar el primer pico de etileno en respuesta a un estrés ambiental, pero no el segundo, lo cual podría activar algunas de las respuestas de

defensa de las plantas y al mismo tiempo evitar cualquier respuesta de senescencia. Sin embargo, para algunos de los procesos biológicos, el etileno es estimulador y para otros es inhibitorio. En general, los niveles de etileno elevados son deletéreos para el crecimiento de las plantas particularmente en las que son sensibles al etileno (Czarny *et al.* 2006).

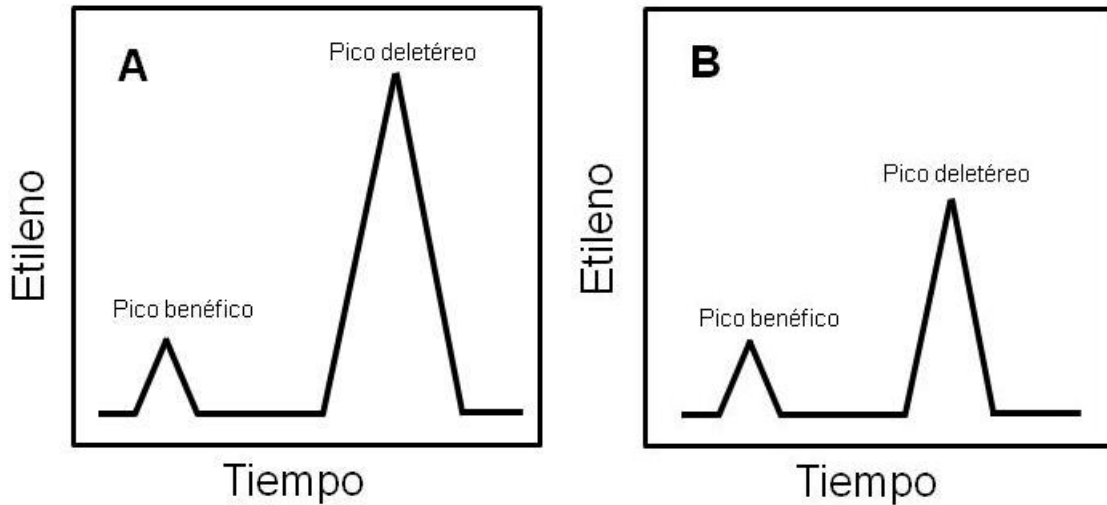


Figura 2. La producción del etileno en plantas en función del tiempo después de un estrés ambiental. **A.** En la ausencia de bacterias exógenas. **B.** En la presencia de PGPR productoras de ACC desaminasa. En ambos casos, es producido un pico inicial de etileno (a menudo difícil de detectar), el cual activa la transcripción de genes de defensa en plantas; tiempo después, es producido un pico de etileno mucho mayor que puede causar respuestas adversas en la planta. La cantidad de etileno producido en respuesta a un estrés ambiental está relacionado con la edad de la planta, así como también la naturaleza y severidad del estrés (Glick *et al.* 2007).

La mayor parte de los tejidos de las plantas superiores tienen la capacidad de producir etileno, aunque en la mayoría de los casos la cantidad de etileno es muy baja. La tasa de producción de la hormona dependerá de la especie de planta, tipo de órgano y tejido, así como también su estadio de desarrollo. En general, las regiones meristemáticas y nodales son las más activas en la biosíntesis. Las tasas de síntesis varían desde niveles muy bajos ($<0.05 \mu\text{L/L}$) en condiciones normales de crecimiento hasta niveles muy altos ($>100 \mu\text{L/L}$) en frutos maduros (De Paepe & Van Der Straeten, 2005; Abeles *et al.* 1992). La distribución del etileno ocurre a través de espacios intercelulares y puede difundir a través de membranas. Por tratarse de una molécula hidrosoluble puede ser transportado a

través del xilema, sin embargo comúnmente la distribución a larga distancia es realizada transportando el precursor directo de la síntesis del etileno (ACC) al sitio de acción en donde es convertido a etileno. Por ejemplo, en tomates anegados el ACC es sintetizado en las raíces y es transportado a través de xilema a las hojas en donde es convertido a etileno (Finlayson *et al.* 1991; Grinchko & Glick, 2001b).

El etileno es derivado del aminoácido metionina, el que primero es convertido a S-adenosil-metionina (SAM) por una SAM-sintetasa (Fig. 3). En seguida, la ACC sintasa (ACS) convierte el SAM en ACC, generalmente es la reacción limitante en la biosíntesis del etileno. Después, el ACC es oxidado a través de la ACC oxidasa (ACO) a etileno produciendo CO₂ y cianuro. También, el ACC puede ser conjugado a N-malonil-ACC o glutamil-ACC para limitar la disponibilidad de sustrato en la producción de etileno. Las enzimas ACS y ACO son codificadas por familias multigénicas cuyos miembros son expresados y regulados diferencialmente de acuerdo al estímulo inductor (Abeles *et al.* 1992; De Paepe & Van Der Straeten, 2005). El mecanismo de acción del etileno ocurre a través de una cadena de eventos que involucra la síntesis de la hormona, la percepción y la transducción de la señal con destino final en el núcleo, lo que conduce a la inducción de genes que responden a etileno promoviendo una respuesta apropiada hacia el estímulo original (Johnson & Ecker, 1998). En *Arabidopsis*, un estudio de perfiles transcripcionales y análisis de microarreglos revelaron que el etileno regula la transcripción de un amplio número de genes determinantes en el metabolismo de lípidos y de la pared celular,

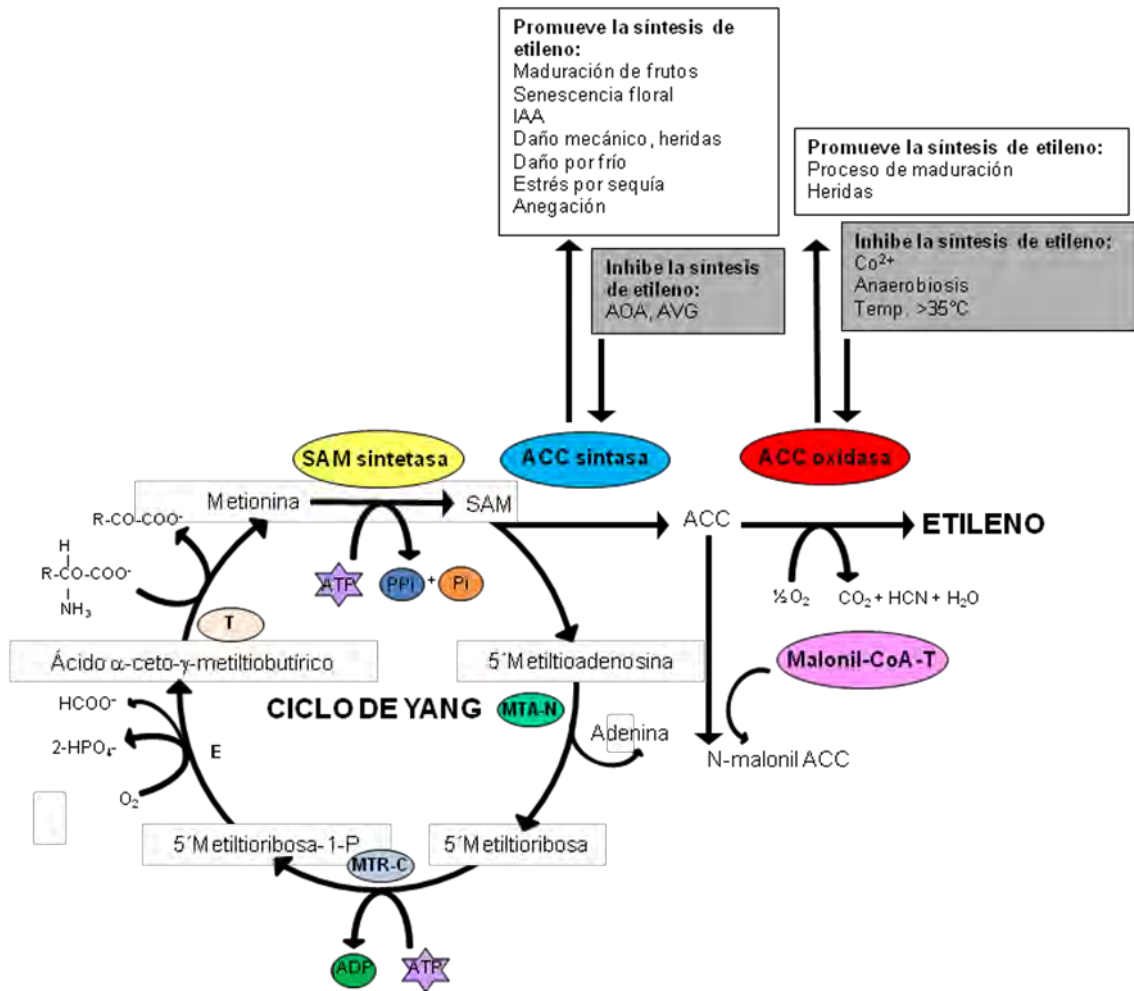


Figura 3. Vía de biosíntesis del etileno y ciclo de Yang. SAM, S-adenosil-L-metionina; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato, Malonil-CoA-T, ACC N-malonil-transferasa; IAA, Ácido indolacético; AOA ácido amino-oxiacético; AVG, aminoetoxi-vinilglicina; MTA-N, Metiltioadenosina nucleosinasa; MTR-C, Metiltioribosa cinasa; E, reacción espontánea; T, Transaminasa.

degradación de proteínas a través del proteasoma y ubiquitina, transporte de agua, localización celular de iones y péptidos, señalización y otros procesos básicos celulares (De Paepe *et al.* 2004). También se observó que de 6,000 genes analizados el 7% son regulados por el etileno (Zhong & Burns, 2003).

ANTECEDENTES

I. La enzima ACC desaminasa

Diversas PGPR contienen la enzima ACC desaminasa (Saleem *et al.* 2007). La ACC desaminasa (E.C. 4.1.99.4) es una enzima multimérica con masa molecular de 35-42 KDa por subunidad, la cual utiliza piridoxal 5-fosfato como cofactor esencial. La ACC desaminasa cataliza la desaminación del ACC, precursor inmediato en la síntesis de etileno en plantas, a través de la ruptura del anillo ciclopropano para formar α -cetobutirato (α -KB) y amonio (Fig. 4). Los valores de Km para la enzima ACC desaminasa han sido estimados en un intervalo que varía entre 1.5 a 9.2 mM, la temperatura y pH óptimos son de 25-30°C y de 8.5, respectivamente (Honma & Shimomura, 1978; Jacobson *et al.* 2004; Hontzeas *et al.* 2004).

Como fue referido con anterioridad, las bacterias que expresan la ACC desaminasa son capaces de disminuir los niveles de etileno elevados en plantas estresadas o en desarrollo. El modelo propuesto sugiere que las PGPR se unen a las semillas o a las raíces de las plantas. En respuesta a los exudados radicales, incluyendo algunos aminoácidos como el triptófano, algunas bacterias sintetizan ácido indolacético (IAA). El IAA bacteriano, en conjunto con el IAA endógeno de la planta estimulan la proliferación y elongación celular. Además, el IAA puede favorecer la transcripción de la enzima productora de ACC (ACS). Parte del ACC sintetizado es exudado junto con otras moléculas y metabolizado por las bacterias con ACC desaminasa que a su vez utilizan los productos de la hidrólisis como fuente de carbono y nitrógeno. Por lo tanto, los niveles de ACC en los exudados son reducidos y para mantener el equilibrio entre los niveles de ACC en el interior y exterior de la planta, las bacterias favorecen la exudación del ACC disminuyendo consecuentemente la producción de etileno. En este modelo, las bacterias disminuyen los niveles de ACC tanto endógeno, como el que es producido a través de la estimulación vía IAA (Glick *et al.* 1998; Glick *et al.* 2007). Sin embargo, no todas las PGPR descritas en la actualidad que producen ACC desaminasa sintetizan IAA (Fig. 4).

En el estudio de Glick *et al.* (2007) fue sugerido que las bacterias con ACC desaminasa pueden disminuir selectivamente el nivel de etileno (deletéreo), producido en la segunda fase, sin afectar algunas de las respuestas de defensa que son activadas por

el etileno producido en la primera fase (Fig. 2). Esta hipótesis, está basada en diversos estudios en donde ha sido demostrado que la enzima ACC desaminasa generalmente

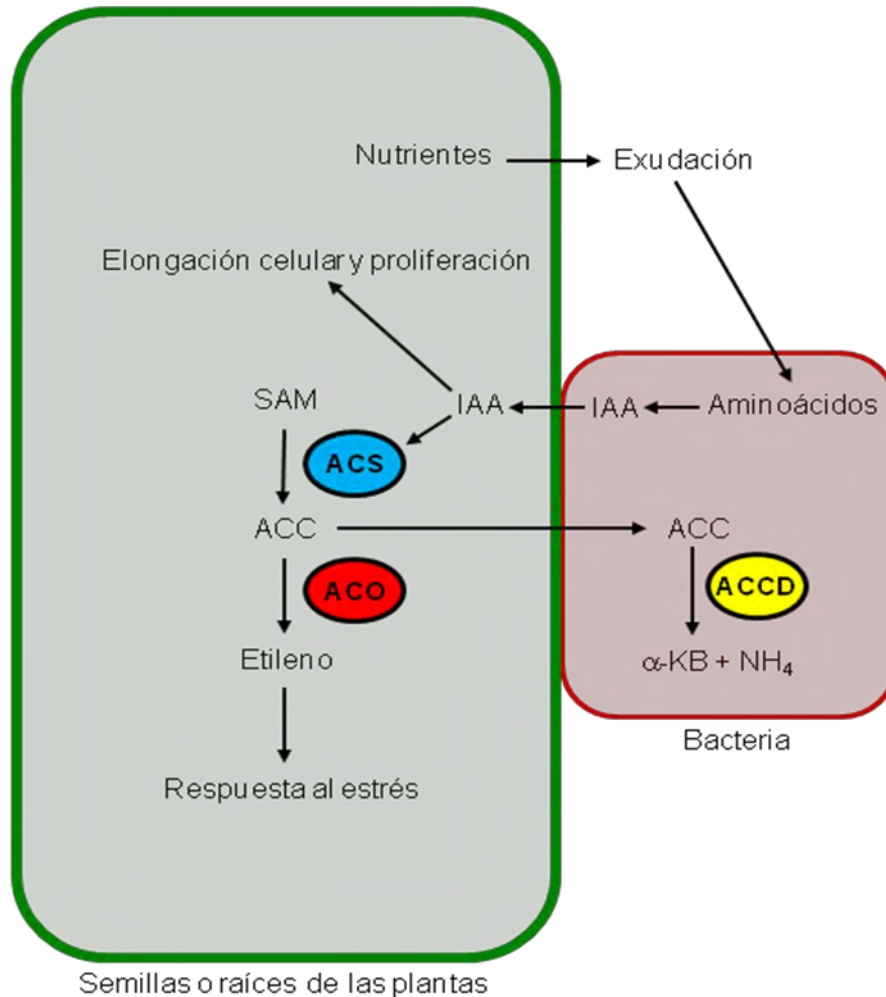


Figura 4. Modelo que describe la función de la enzima ACC desaminasa en la promoción del crecimiento de las plantas. SAM, S-adenosil-metionina; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato; ACS, ACC sintasa; ACO, ACC oxidasa; IAA, Acido Indolacético; ACCD, ACC desaminasa; α -KB, alfa-cetobutirato. La enzima ACC desaminasa comúnmente está presente en las bacterias a bajos niveles antes de ser inducida. La inducción de la actividad enzimática ocurre a través de un proceso lento y complejo que requiere de la presencia del ACC. Después de la inducción de las enzimas biosintéticas del etileno (ACS y ACO), una mayor cantidad de ACC es producida, lo cual favorece la síntesis de la enzima ACC desaminasa y esta a su vez disminuye la concentración del precursor (ACC) y la síntesis de etileno. Además, algunas bacterias producen ácido indolacético (IAA) el cual al ser asimilado por las plantas favorece la elongación y proliferación de las células vegetales. El modelo sugiere que adicionalmente, el IAA favorece la síntesis del ACC. Sin embargo, las

bacterias que contienen ACC desaminasa al hidrolizar el ACC mantienen el equilibrio de la concentración del etileno dentro de las plantas (Figura modificada Glick *et al.* 1998).

está presente en las bacterias a niveles muy bajos y la inducción de la actividad enzimática es un proceso lento (8-10 horas) y complejo que requiere de la presencia del ACC (Honma & Shimomura, 1978; Jacobson *et al.* 1994; Ma *et al.* 2003b).

II. La ACC desaminasa y el estrés en plantas

Algunas bacterias que contienen ACC desaminasa promueven el crecimiento de diversas plantas bajo condiciones de estrés. Por ejemplo, protegen contra la inhibición del crecimiento causado por anegación, hidrocarburos poliaromáticos, bifenilos policíclicos, hidrocarburos totales, la presencia de diversos metales como níquel, plomo, zinc, cobre, cadmio, cobalto y arsénico, así como por salinidad, sequía, y ataque por patógenos. Los efectos producidos por las PGPR incluyen el incremento en germinación, peso fresco y seco de partes aéreas y raíces, longitud de la raíz, contenido de clorofila, y proteínas totales (Grinchko & Glick, 2001a; Huang *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005; Burd *et al.* 2000; Belimov *et al.* 2005; Jalili *et al.* 2009; Zahir *et al.* 2008; Wang *et al.* 2000). El efecto positivo varía de acuerdo al factor estresante, a la especie de planta, y está relacionado con la disminución del daño producido en comparación con las plantas no inoculadas con la PGPR (Glick, 2004; Hall *et al.* 1996). Un estudio realizado en canola por Hontzeas *et al.* (2004) mostró que una PGPR que contiene ACC desaminasa induce la expresión de genes involucrados en la división celular, proliferación en raíces y reprime algunos genes que participan en la respuesta de defensa.

Por otro lado, la introducción del gene ACC desaminasa (*acdS*) en bacterias que no expresan dicha actividad como *Azospirillum brasilense* Cd y *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 produce un efecto adicional en la habilidad de ambas cepas para promover el crecimiento vegetal (Holguin & Glick, 2001; Ma *et al.* 2004; la inoculación con la cepa *A. brasilense* Cd transformada incrementó la elongación de las raíces de tomate y canola con respecto a la cepa no transformada, y *S. meliloti* Rm1021 mejoró la eficiencia de nodulación y competitividad en plantas de alfalfa. También se observó que una cepa no promotora del crecimiento de las plantas como *E. coli* DH5 α transformada con el mismo gene adquirió la característica de promover el crecimiento de raíces de canola (Holguin & Glick, 2001).

Como alternativa al uso de las bacterias, existen plantas transgénicas de tomate, canola, tabaco y petunia que expresan la ACC desaminasa regulada por distintos promotores de plantas y bacterias. Las plantas transgénicas también han mostrado tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico y a ciertos patógenos. En esta instancia, las plantas transgénicas responden de manera similar a las plantas no transformadas tratadas con PGPR que contienen ACC desaminasa. Además, en muchos casos las plantas inoculadas con microorganismos superan el efecto producido por las plantas transgénicas. Es probable que esto se deba a que las bacterias favorecen el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos y no exclusivamente por medio de la ACC desaminasa (Grinchko & Glick, 2001c; Grinchko *et al.* 2005; Rodríguez *et al.* 2008; Zang *et al.* 2008).

III. Distribución de genes *acdS*

La ACC desaminasa es una enzima común entre los microorganismos del suelo. En la actualidad ha sido reportado que el gene que codifica para la enzima ACC desaminasa (*acdS*) está presente en diversos géneros pertenecientes a las α , β y γ *Proteobacterias*, en algunas firmicutes y actinobacterias, así como también en levaduras y hongos. La habilidad de los microorganismos para utilizar ACC como fuente de nitrógeno ha sido utilizada como herramienta para aislar potenciales PGPR de diversos ambientes, principalmente de suelos rizosféricos. Cabe resaltar que dentro de géneros y especies particulares de microorganismos, algunos conservan la actividad y otros no. Este hallazgo ha sido la base para sugerir la existencia de una amplia transferencia horizontal del gene *acdS* entre las bacterias del suelo (Hontzeas *et al.* 2005; Blaha *et al.* 2006; Dell'Ámico *et al.* 2008; Minami *et al.* 1998; Jia *et al.* 1999). Sin embargo, en la mayor parte de los estudios realizados, las secuencias de los genes son incompletas, problema aunado al uso de estrategias de clasificación taxonómica insuficientes, lo cual impide la descripción correcta de los microorganismos analizados.

El avance en la secuenciación de los genomas de los seres vivos ha permitido identificar por homología de secuencia a una gran cantidad de genes probables que codifican para ACC desaminasas. En contraste, solo un pequeño número de las proteínas codificadas por estos genes han sido caracterizadas experimentalmente. Existen por ejemplo algunos organismos como el extremófilo *Pyrococcus horikoshii*, la enterobacteria *E. coli* K12, o algunas plantas como el tomate y *Arabidopsis* que contienen probables

genes *acdS*. Las secuencias de estas ACC desaminasas putativas comparten entre 20-40% de identidad a nivel de aminoácidos con respecto a enzimas bacterianas ya caracterizadas. En los estudios realizados por Fujino *et al.* (2004); Todorovic & Glick, (2008) y Riemenschneider *et al.* (2005), ninguna de estas enzimas mostró actividad catalítica hacia el ACC. Sin embargo, existe un estudio contradictorio en donde fue detectada la actividad ACC desaminasa en extractos de plantas de *Arabidopsis* que sobre expresan el gene At1g48420 (McDonnell *et al.* 2009), identificado previamente como una D-cisteína desulfidrasa (Riemenschneider *et al.* 2005). Por todo lo anterior, es necesario tener precaución al asignar una función enzimática basada exclusivamente en homología de secuencia. Más aún, para poder utilizar a los microorganismos en un escenario de investigación aplicada es necesario comprender las relaciones entre plantas y bacterias a nivel básico, destacando la caracterización de los genes involucrados, mutantes negativas en dichos genes y el impacto fisiológico que producen en las plantas. En la actualidad existen pocos estudios con mutantes deficientes en la actividad ACC desaminasa (Li *et al.* 2000; Ma *et al.* 2003a; Sun *et al.* 2009; Uchiumi *et al.* 2004). Existen versiones mutantes del gene *acdS* en *Burkholderia*, *Pseudomonas* y Rhizobia. Los experimentos desarrollados demostraron que las cepas de Rhizobia deficientes en el gene *acdS* disminuyen la capacidad de nodulación y el peso seco de la parte aérea en plantas de chícharo y en competitividad por la ocupación del nódulo en *Lotus japonicus*, comparadas con las cepas silvestres (Ma *et al.* 2004; Uchiumi *et al.* 2004). En los estudios de Li *et al.* (2000); Sun *et al.* (2009) observaron que las mutantes *acdS* *P. putida* UW4 y *B. phytofirmans* PsJN, consideradas como PGPR, no fueron capaces de promover la elongación de las raíces de canola, demostrando la participación del gene *acdS* en la promoción del crecimiento vegetal.

En un estudio con plantas de pepino, la cepa silvestre *P. putida* UW4 en co-inoculación con *Gigaspora rosea* mostraron un incremento en la colonización del hongo micorrízico y en la abundancia de los arbusculos. Por el contrario, la co-inoculación de *G. rosea* con la cepa de *Pseudomonas* deficiente en la actividad ACC desaminasa no mostraron dicha estimulación, lo que sugirió la participación de la ACC desaminasa en el establecimiento de la simbiosis a través de la modulación de la síntesis de etileno en plantas de pepino (Gamalero *et al.* 2008).

En otro estudio, se observó que la inoculación del chícharo con la cepa *Variovorax paradoxus* 5C-2 mejoró el crecimiento, la producción y eficiencia del uso de agua en las

plantas bajo condiciones de estrés por sequía. En contraste, la cepa mutante con actividad ACC desaminasa disminuida no produjo el mismo efecto y los parámetros de crecimiento fueron similares a los obtenidos en las plantas no inoculadas (Belimov *et al.* 2009).

Además de las PGPR, la ACC desaminasa también ha sido encontrada en los genomas de varios patógenos de plantas, animales y humanos desconociéndose la función que desempeña en estos organismos (Blaha *et al.* 2006; Pringet-Combaret *et al.* 2008). Reportes recientes mostraron que la cepa *P. brassicacearum* Am3 con actividad ACC desaminasa es patógena oportunista en plantas de tomate a concentraciones de inóculo de 10^8 células/g de suelo, pero en asociación con plantas de mostaza india, colza y chícharo actúa como PGPR. Sin embargo, cuando es aplicada en tomate a concentraciones de inóculo menores se comporta como una PGPR. Belimov *et al.* (2008) mostraron que la cepa mutante Am3 con actividad ACC desaminasa disminuida no fue capaz de producir el efecto de elongación en las raíces de tomate aún a bajas concentraciones de inóculo, y no mostró síntomas de enfermedad aún en casos de inhibición del crecimiento radical a altas concentraciones del mismo. Por lo anterior, fue propuesto que la ACC desaminasa es capaz de enmascarar las propiedades fitopatogénicas de *P. brassicacearum* Am3 en plantas de tomate disminuyendo el estrés inducido por las toxinas e impidiendo el reconocimiento de la planta como un patógeno oportunista. Se desconoce si la degradación del ACC y la fitopatogenicidad es una circunstancia casual o independiente y la participación de la ACC desaminasa en la patogenicidad requiere mayor investigación.

IV. 1 Regulación transcripcional de los genes *acdS*

Ha sido reportado que el gene *acdS* comúnmente está localizado en una región genómica que contiene un gene *lrpL* codificado en dirección opuesta (Pringent-Combaret *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2008). En *E. coli*, la proteína Lrp regula la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos y en funciones relacionadas con el estrés. En algunos casos la regulación involucra la participación de I-leucina (Brinkman *et al.* 2003). La proteína Lrp, ha sido analizada en *Pseudomonas putida* UW4 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, encontrándose como un componente esencial en la expresión del gene *acdS* (Li & Glick, 2001; Ma *et al.* 2003a). También en *P. putida* UW4 ha sido demostrada la participación indirecta de reguladores transcripcionales

como FNR (reducción de fumarato-nitrato), y CRP (proteína receptora de cAMP) en la regulación del gene *acdS* (Li & Glick, 2001). Apoyando el estudio anterior, un análisis *in silico* realizado en diferentes α , β y γ proteobacterias mostró potenciales sitios de unión a CRP, FNR y Lrp en la región regulatoria del gene *acdS* (Pringet-Combaret *et al.* 2008). Sin embargo, en diferentes cepas de *R. leguminosarum*, no fue posible detectar todos los elementos regulatorios reportados para *P. putida* UW4 (Duan *et al.* 2009), y a diferencia de *Pseudomonas* y *Rhizobium* en *M. loti* MAFF 303099 se encontró que el gene *acdS* está regulado por el promotor de *nifA*, el cual es expresado exclusivamente en bacteriodes (Uchiumi *et al.* 2004; Nukui *et al.* 2006), lo que sugiere la presencia de diferentes mecanismos regulatorios en la expresión del gene *acdS*.

A través de un sistema de dos híbridos, Cheng *et al.* (2008) encontraron una nueva proteína, AcdB (glicerofosforil-diester-fosfodiesterasa), que se une a la proteína LrpL (también nombrada como AcdR), e interactúa directamente con el ACC y con la región de ADN corriente arriba del gene *acdS*. Mediante geles de retardo demostraron la unión de dicho complejo (AcdB-AcdR) a la región regulatoria del gene *acdS*, únicamente en la presencia del ACC. Por otro lado, se observó que la unión de AcdR a la región regulatoria del gene *acdS* no es afectada por la presencia del ACC, pero puede ser eliminada por la presencia de L-leucina. Con base en lo anterior fue sugerido un modelo en el cual AcdR y AcdB co-regulan la expresión del gene *acdS* (Fig. 5).

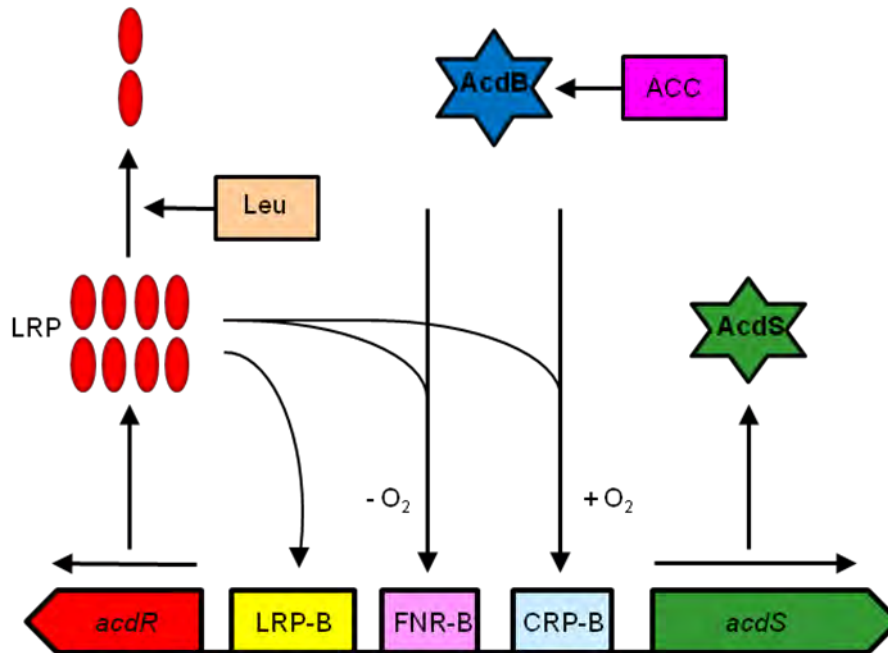


Figura 5. Modelo de la regulación transcripcional de la expresión de la enzima ACC desaminasa en *Pseudomonas putida* UW4 (Cheng *et al.* 2008). El gene *acdR* codifica una proteína Lrp la cual se cree que funciona como un octámero. Cuando hay un exceso de la proteína Lrp esta puede unirse a una secuencia de ADN conocida como caja LRP que empalma con el promotor del gene *acdR*, previniendo la transcripción del mismo, o puede unirse al complejo AcdB-ACC, y en conjunto Lrp y AcdB pueden unirse al ADN y activar la transcripción del gene *acdS*. La unión a FNR es favorecida bajo condiciones anaeróbicas, mientras que la unión a CRP es favorecida bajo condiciones aeróbicas. La ACC desaminasa sintetizada hidroliza el ACC y se produce amonio y α -cetobutirato, siendo el último compuesto utilizado como precursor en la síntesis de aminoácidos ramificados incluyendo la leucina. Finalmente, en la presencia de altos niveles de leucina en la célula, el octámero LRP es disociado en una forma dimérica inactiva, lo que impide la posterior inducción de la transcripción del gene *acdS*. LRP, proteína reguladora que responde a leucina; Leu, leucina; AcdB, glicerofosforil-diester-fosfodiesterasa; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato; AcdS, ACC desaminasa; $-O_2$, sin oxígeno; $+O_2$, con oxígeno; *acdR*, gene *lrpL*; LRP-B, caja de unión a LRP; FNR-B, caja de unión a FNR; CRP, caja de unión a CRP; *acdS*, gene que codifica para la enzima ACC desaminasa.

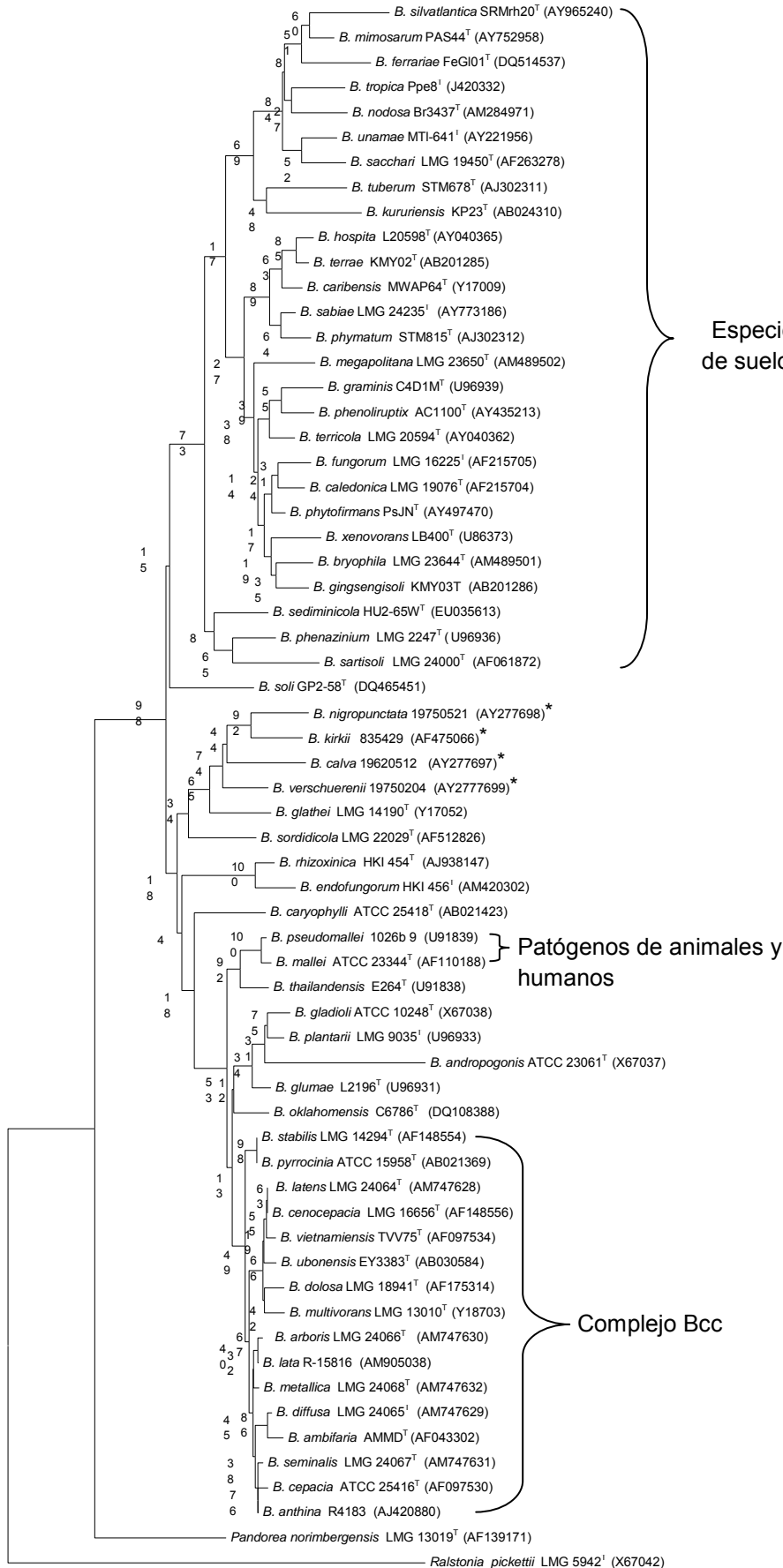
V. *Burkholderia*

El género *Burkholderia* fue propuesto por Yabuuchi *et al.* (1992), comprende un grupo de bacterias gram negativas que pertenece a la familia *Burkholderiaceae* y está ubicado en la subclase de las β -proteobacterias. En la actualidad existen 58 especies de *Burkholderia* descritas oficialmente y 4 nuevas especies "Candidatus"; *B. calva*, *B. kirkii*, *B. nigropunctata* y *B. vershuerenii* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>;

<http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>). En este género, existe un grupo de 16 especies denominado el “complejo *Burkholderia cepacia*” (Bcc) cuyos miembros están estrechamente relacionados (Fig. 6) y la correspondiente identificación de cada especie pueden llevarse a cabo únicamente mediante métodos moleculares.

Los miembros del género *Burkholderia* habitan diversos nichos ecológicos, por ejemplo el suelo, agua, insectos, hongos y ambientes inhóspitos (Coenye *et al.* 2001; Eilmus & Heil, 2009; Lim *et al.* 2003, Valderde *et al.* 2006; Van Borm *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2000). Las especies del complejo Bcc, principalmente *B. cenocepacia* y *B. multivorans* han sido aislados como patógenos oportunistas en humanos inmunosuprimidos y las especies *B. mallei* y *B. pseudomallei* son capaces de causar enfermedades en animales y humanos (Manenthiralingam *et al.* 2002; Holden *et al.* 2004; Nierman *et al.* 2004). Además, han sido reportadas diferentes especies de *Burkholderia* asociadas con diferentes plantas, en vida libre colonizando la rizosfera o el ambiente endófito, y también como simbioses y fitopatógenos (Caballero-Mellado *et al.* 2007; Lim *et al.* 2009; Van Oevelen *et al.* 2002).

El género *Burkholderia* se caracteriza por tener una gran versatilidad ecológica, debido probablemente a la amplitud de los genomas (4.7 a 9.7 Mb) contenidos en uno o varios replicones circulares (Compant *et al.* 2008; Martínez-Aguilar *et al.* 2008), y a la presencia de múltiples secuencias de inserción que confieren plasticidad al ADN (Compant *et al.* 2008). En la actualidad están publicados los genomas de 5 especies de *Burkholderia*, las cuales incluyen a *B. cenocepacia* J2315^T, *B. glumae* BGR1, *B. mallei* ATCC 23344, *B. pseudomallei* K96243, y *B. xenovorans* LB400^T (Chain *et al.* 2006; Holden *et al.* 2004; Holden *et al.* 2009; Lim *et al.* 2009; Nierman *et al.* 2004). También, están disponibles los genomas completos de *B. ambifaria* MC40-6, *B. cenocepacia* (cepas AU 1054, HI2424, MC0-3), *B. cepacia* (cepas 383 y AMMD), *B. mallei* (cepas NCTC 10229, NCTC 10247 y SAVP 1), *B. multivorans* ATCC 17616, *B. phymatum* STM815^T, *B. phytofirmans* PsJN^T, *B. pseudomallei* (cepas 1106a, 1710b, y 668), *B. thailandensis* E264, *B. vietnamiensis* G4 (R1808), y están en progreso 57 proyectos de secuenciación de 25 miembros del grupo *B. pseudomallei* (incluye *B. oklahomensis* y *B. thailandensis*), 7 cepas de *B. mallei*, 9 cepas de diferentes especies del complejo Bcc, *Burkholderia graminis* C4D1M^T, *B. plantarii* MAFF301723, *B. silvatlantica* SRMrh-20^T, *B. tuberum* STM-678^T, *B. ubonensis* Bu, *B. unamae* MTI-641^T y 10 cepas de *Burkholderia* sp (<http://www.genomesonline.org/gold.cgi>).



Especies ambientales aisladas comúnmente de suelos, no patógenas, asociadas a plantas, PGPR

Patógenos de animales y humanos

Complejo Bcc

Figura 6. Árbol filogenético basado en secuencias completas del gene 16S rRNA del género *Burkholderia*. El árbol fue construido utilizando el método de NJ. La robustez nodal del árbol fue realizada con 1000 replicas. La barra representa la sustitución de un nucleótido por cada 100 nucleótidos. El número de acceso (NCBI genebank) de la secuencia del gene 16S para cada especie está mostrada entre paréntesis. Las especies marcadas con asterisco son especies "Candidatus". La especie *B. contaminans* no fue incluida en el árbol, ya que fue clasificada con base en la secuencia del gene *recA* y la secuencia del gene 16S no está disponible (Estrada-de los Santos, resultados no publicados).

La mayoría de las especies de *Burkholderia* son conocidas como patógenos de plantas y bacterias del suelo. *B. cepacia* fue la primera especie descrita y fue aislada como fitopatógeno de plantas de cebolla (Yabuuchi *et al.* 1992). No obstante, todas las especies del complejo Bcc, *B. gladioli* y *B. fungorum* son patógenos oportunistas en pacientes con fibrosis quística. Los miembros del complejo Bcc pueden causar infecciones respiratorias severas en pacientes inmunosuprimidos, encontrándose a *B. cenocepacia* y *B. multivorans* como especies dominantes, siendo la primera la más virulenta (Mahenthiralingam *et al.* 2002). Las especies *B. mallei* y *B. pseudomallei* son patógenos en humanos y animales (Holden *et al.* 2004; Nierman *et al.* 2004). *B. mallei* es el agente etiológico de una enfermedad llamada glanders y *B. pseudomallei* causa melioidosis. Ambas especies son altamente infecciosas, y producen cuadros de septicemia que a menudo son fatales. Además han sido utilizadas como armas biológicas en diferentes guerras, por lo que son bacterias de gran interés clínico (Rotz *et al.* 2002). Otras especies de *Burkholderia* son patógenos de plantas, por ejemplo *B. andropogonis*, *B. cepacia*, *B. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. glumae* y *B. plantarii*, causan diferentes enfermedades en arroz, cebolla, sorgo, maíz, tomate, entre otros. Las especies de *B. endofungorum*, *B. fungorum*, *B. sordidicola* han sido aisladas como endosimbiontes de los hongos fitopatógenos, *Rhizopus microsporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, y *Phanerochaete sordida*, respectivamente. No obstante, aunque dichas especies están asociadas a los hongos, no son las responsables directas de producir la enfermedad en las plantas (Compant *et al.* 2008). Existe otro tipo de relaciones mutualistas entre insectos y bacterias del género *Burkholderia*. Kikuchi *et al.* (2005) reportaron la presencia de diferentes aislados de *Burkholderia* spp. que dominan la microbiota presente en el intestino de diversas chinches de la familia Alydidae. Dada la prevalencia y la colonización específica de estas bacterias en el intestino de las chinches, sugieren que dicha interacción es importante para el crecimiento y desarrollo de estos insectos (Kikuchi *et al.* 2007).

Sin embargo, la diversidad de los miembros del género *Burkholderia* indica la existencia de interacciones complejas entre las bacterias y sus hospederos. En algunos casos las interacciones parecen estar restringidas a un tipo de hospedero, mientras otras tienen un rango amplio de hospederos, y el tipo de interacción puede variar, por ejemplo puede ser patógeno, simbiote o ambos (Compant *et al.* 2008).

La caracterización de las especies del género *Burkholderia* en el ambiente ha estado limitada en comparación con la investigación relacionada con las especies de interés clínico. No obstante, se conoce que algunas especies de *Burkholderia* y particularmente los miembros del complejo Bcc podrían ser de gran importancia en la agricultura, en la industria, y en diversos aspectos biotecnológicos. Por ejemplo; *B. sacchari* acumula polihidroxicanoatos, compuestos biodegradables con propiedades termoplásticas (Brämer *et al.* 2001). Las especies *B. cepacia*, *B. kururiensis*, *B. phenoliruptrix*, *B. vietnamiensis*, *B. xenovorans* y *Burkholderia* spp. tienen gran potencial biotecnológico como agentes de bioremediación ya que son capaces de degradar diversos compuestos xenobióticos, por ejemplo hidrocarburos policíclicos aromáticos, herbicidas (ácidos 2-4-diclorofenoxiacético, 2,4,5-triclorofenoxiacético), bifenilos policlorados, y tricloroetileno (Chiarini *et al.* 2006; O' Sullivan & Mahenthalingam, 2005; Somtrakoon *et al.* 2008) Algunas cepas de *B. phytofirmans*, así como también *B. bryophila*, *B. megapolitana* y diferentes especies del complejo Bcc tienen los atributos de las PGPR, son capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana, y podrían ser utilizados potencialmente como agentes de biocontrol de hongos fitopatogénicos contra *Phyitium* spp., *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, y *Verticillium dahliae*. La capacidad para suprimir enfermedades de plantas ha sido observada en diferentes cultivos como, algodón, chícharo, maíz, tomate, papa, pimienta y uva (Compant *et al.* 2008). También existen algunas especies de *Burkholderia* que inhiben el crecimiento de algunas bacterias, protozoarios y nematodos (Cain *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2000).

Las especies *B. mimosarum*, *B. nodosa*, *B. phymatum* y *B. tuberum*, y ocasionalmente *B. caribensis*, han sido aisladas de nódulos de diferentes especies de leguminosas de la familia Fabaceae, principalmente mimosoideas (Chen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005; Vandamme *et al.* 2002). Más aún, ha sido demostrada la participación activa de *B. mimosarum* y *B. phymatum* en la formación de los nódulos y en la fijación de nitrógeno (Chen *et al.* 2005; Elliott *et al.* 2007, 2009). Las especies "Candidatus" *B. calva*, *B. kirkii* y *B. nitropunctata* fueron encontradas en nódulos de hojas de *Psychotria* spp (Van Oevelen

et al. 2002; 2004). Estudios posteriores demostraron que los cultivos de tejido de *Psychotria* sp. sin las bacterias mostraban diversos desordenes fisiológicos, lo que demostró la asociación obligada entre *Burkholderia* spp. y *Psychotria* spp. (Van Oevelen *et al.* 2003). También, diferentes aislados de *Burkholderia* spp. han sido encontrados como endosimbiontes de diferentes hongos ectomicorrízicos (Izumi *et al.* 2007).

La gran mayoría de los miembros del genero *Burkholderia* están asociados a diversas especies de plantas, sin causar daño alguno, colonizando la rizosfera y el ambiente endófito de varios cultivos de interés agrícola, principalmente en gramíneas, siendo uno de los hábitats más comunes para estas bacterias (Compant *et al.* 2008).

A pesar de los indudables beneficios de utilizar a las diferentes especies del complejo Bcc en la agricultura y la biotecnología, existe una moratoria para su uso y dispersión debido a la potencial capacidad de estas especies de causar infecciones oportunistas, lo que ha representado un dilema que ha estado sujeto a considerables debates (Parke & Gurian-Sherman, 2001; Chiarini *et al.* 2006). Por otro lado, el papel ecológico que desempeñan la gran mayoría de especies de *Burkholderia* no patógenas no ha sido estudiado y en algunos casos, por ejemplo las especies *B. kururiensis*, *B. sacchari*, *B. phenoliruptrix*, *B. phymatum* fueron descritas con base en el análisis de un aislado, por lo que consecuentemente su distribución ambiental es desconocida.

En contraste, Estrada-de los Santos *et al.* (2001) describieron la existencia de un grupo de bacterias diazótrofes del género *Burkholderia*, distantes filogenéticamente de las especies oportunistas del Bcc y de los patógenos de animales y humanos. Las bacterias fijadoras de nitrógeno fueron aisladas en asociación con la rizosfera de plantas de maíz, y cafeto, encontrándose algunas también en el interior de tallos y raíces. Las especies aisladas presentaron una amplia distribución geográfica en distintas zonas de México y posteriormente fueron clasificadas como *B. tropica* (Reis *et al.* 2004), *B. unamae* (Caballero-Mellado *et al.* 2004) y *B. xenovorans* (Goris *et al.* 2004). Las especies de *B. tropica* y *B. unamae* también han sido aisladas de diferentes variedades de caña de azúcar en México y Brasil (Perin *et al.* 2006). En un estudio más reciente, se reportaron aislados de las tres especies diazótrofes mencionadas con anterioridad en plantas de tomate (Caballero-Mellado *et al.* 2007). Cabe resaltar que estas especies exhibieron diferentes actividades *in vitro* involucradas en bioremediación, promoción del crecimiento de las plantas y control biológico. La mayor parte de especies diazótrofes de *Burkholderia* producen sideróforos y solubilizan fosfatos. Cabe resaltar que *B. kururiensis* y *B. unamae*

son capaces de crecer con fenol y benceno como única fuente de carbono y la presencia de los genes que codifican para la síntesis de oxigenasas aromáticas ya ha sido confirmada (Caballero-Mellado *et al.* 2007). Más aún, en ensayos de laboratorio que están en progreso ha sido detectada la producción de IAA en la especie *B. unamae*, y en *B. kururiensis* ya fue reportada la producción de esta fitohormona (Mattos *et al.* 2008). También ha sido detectada la actividad ACC desaminasa y el gene correspondiente (*acdS*) en algunas cepas de *B. unamae* y *B. xenovorans* (Caballero-Mellado *et al.* 2007).

Por lo anterior, es importante ampliar el conocimiento de las características y funciones relevantes en especies diazótrofes (ambientales) del género *Burkholderia*, para en un futuro poder explotar el potencial agrícola, biotecnológico y de bioremediación que representan. Además, el aporte en el conocimiento científico acerca de la ecología y el funcionamiento de las bacterias en el ambiente brinda la oportunidad de comprender diferentes tipos de interacciones entre microorganismos y en la asociación planta-bacteria.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la función de la ACC desaminasa en especies fijadoras de N₂ del género *Burkholderia* sobre el crecimiento de plantas de tomate.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar en las especies de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno la capacidad de crecer en medios de cultivo con ACC como única fuente de nitrógeno.
- 2.-Determinar *in vitro* la actividad ACC desaminasa expresada por las especies diazótroficas del género *Burkholderia* capaces de crecer con ACC.
- 3.- Localizar y aislar el gene *acdS* en la especie de *Burkholderia* fijadora de N₂ que exprese la más alta actividad ACC desaminasa.
- 4.- Visualizar la distribución de la bacteria y analizar la expresión del gene (*acdS*) en asociación con la planta.

RESULTADOS

A continuación se presenta un Resumen de los resultados obtenidos. Las Figuras, Tablas, Gráficas y Fotografías resultantes de esta tesis doctoral están descritas y discutidas en el artículo “ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity a widespread trait in *Burkholderia* and its growth promoting effect on tomato”. **Onofre-Lemus J.**, I. Hernández-Lucas, L. Girard, & J. Caballero-Mellado. 2009. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (20): 6581-6590.

La detección de la capacidad de crecer en medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno en diferentes especies diazótrofes del género *Burkholderia* fue realizada utilizando 10 cepas representativas de *B. unamae*, *B. vietnamiensis*, *B. tropica*, así como también las cepas tipo de *B. kururienensis*, *B. phymatum*, *B. tuberum*, y 3 cepas de *B. xenovorans*. Los resultados de este ensayo mostraron que todas las especies y cepas diazótrofes analizadas, excepto las cepas de *B. tropica*, tienen la capacidad de utilizar el ACC como única fuente de nitrógeno.

Con el objetivo de analizar si la fuente de carbono tiene influencia sobre la expresión de la enzima ACC desaminasa se realizaron ensayos con las especies *B. unamae* y *B. vietnamiensis*, sustituyendo en el medio mínimo con ACC la fuente de carbono (ácido succínico) por ácido málico, glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol y manitol. Estas fuentes de carbono fueron seleccionadas ya que comúnmente se encuentran formando parte importante de los exudados radicales de distintas plantas de interés agrícola, entre las que se incluye el tomate. En este ensayo se observó que todas las cepas analizadas de las dos especies bacterianas son capaces de utilizar ACC como única fuente de nitrógeno con las fuentes de carbono probadas (Tabla 1, Anexo 1).

La determinación *in vitro* de la actividad ACC desaminasa fue analizada en las diferentes especies de *Burkholderia* mencionadas con anterioridad. Considerando dichos resultados se decidió ampliar el estudio y fueron analizadas las cepas tipo de especies no diazótrofes del género *Burkholderia*, incluyéndose especies ambientales asociadas a plantas y patógenas oportunistas en humanos. Este análisis mostró que excepto en *B. tropica*, la actividad enzimática varía de acuerdo con la especie y cepa analizada (Tabla 1 Onofre-Lemus *et al.* 2009; Tabla 2, Anexo 1). Sin embargo, los niveles de expresión son similares con respecto a los reportados en especies de otros géneros bacterianos. En el caso de las cepas de *B. tropica* no se detectó actividad ACC desaminasa.

Para realizar el aislamiento del gene completo ACC desaminasa, fue seleccionada la cepa tipo de la especie *B. unamae*. Esta especie además de encontrarse filogenéticamente alejada de los patógenos oportunistas expresa *in vitro* diferentes actividades involucradas en bioremediación, promoción del crecimiento de las plantas y control biológico. Al inicio del estudio, las secuencias de ADN de probables genes ACC desaminasa anotados en los genomas disponibles de algunas especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas* fueron alineadas y se diseñaron oligonucleótidos degenerados basados en regiones conservadas. El producto de amplificación por PCR mostró una banda de 0.8 kb correspondiente con el tamaño esperado. Después, el producto de amplificación por PCR fue subclonado en un vector suicida (pUX19*acdS*) e integrado en el genoma de *B. unamae* MTI641^T para la obtención de las secuencias flanqueantes. La predicción del gene y la proteína ACC desaminasa en *B. unamae* MTI-641^T mostraron tamaños correspondientes con los genes (1017 pb) y proteínas de ACC desaminasas (338 AA) de otras especies ya reportadas, encontrándose entre 80% y 92% de similitud y entre 66% y 87% de identidad a nivel de proteína. También fue obtenida la secuencia de un gene homólogo a un regulador transcripcional que responde a leucina (LRP) corriente arriba del gene ACC desaminasa en *B. unamae* que podría estar implicado en su regulación. Además, los oligonucleótidos diseñados permitieron la amplificación de genes *acdS* en diferentes cepas de las especies *B. xenovorans* y *B. unamae*, resultados que fueron publicados en el estudio: “Caballero-Mellado J, J. **Onofre-Lemus**, P. Estrada-de los Santos & L. Martínez-Aguilar. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5308–5319 (Anexo 2).

Con la finalidad de conocer la secuencia completa del gene *acdS* en diferentes especies de *Burkholderia*, nuevos oligonucleótidos degenerados fueron diseñados, y en el alineamiento de secuencias del gene *acdS* fue incluida la de *B. unamae*. Con los oligonucleótidos 5'ACC, 3'ACC; F-*acdS*, R-*acdS*; NF-*acdS*, NR-*acdS* diseñados en este trabajo fueron analizadas 45 cepas de 20 especies de *Burkholderia* fijadoras y no fijadoras de nitrógeno de las cuales fueron obtenidas 25 secuencias que incluyen 6 parciales y 19 completas (Onofre-Lemus *et al.* 2009). Las secuencias obtenidas son altamente conservadas, mostrando entre 82% y 98% de similitud a nivel de nucleótidos. De esta manera y con los análisis de actividades enzimáticas fue demostrada la presencia y funcionalidad de estos genes en numerosas especies de *Burkholderia* analizadas, lo que indica que este gene es una característica común del género *Burkholderia*.

Una cepa mutante de *B. unamae* deficiente en la actividad ACC desaminasa fue obtenida a través de la interrupción del gene *acdS* con un cassette de resistencia a kanamicina. A través de un ensayo tipo Southern blot y la determinación de la actividad enzimática ACC desaminasa, fue comprobada la pérdida de la funcionalidad del gene *acdS*. La cepa mutante deficiente en la actividad ACC desaminasa fue denominada *acdS::ΩKm*. También fue comparado en un medio rico el patrón de crecimiento de la cepa mutante con el de la cepa silvestre, no encontrándose diferencias significativas, lo que demostró que la cepa mutante no fue afectada en su crecimiento, particularmente en la utilización de fuentes de nitrógeno diferentes al ACC.

Con base en lo anterior se evaluó el efecto de la mutante *acdS::ΩKm* sobre el crecimiento de las plantas. La cepa silvestre de *B. unamae* MTI-641^T y la cepa mutante *acdS::ΩKm* fueron utilizadas para inocular semillas de tomate bajo condiciones gnotobióticas en macetas con arena. Después de un periodo de crecimiento, las plantas fueron sometidas a tratamientos de estrés como anegación y salinidad (NaCl 100 mM). También fueron analizadas plantas irrigadas cada tercer día con agua estéril a saturación (tratamiento sin estrés). En todos los tratamientos tanto la cepa mutante como la cepa silvestre fueron capaces de colonizar las raíces del tomate en un rango aproximado de 6.4-6.9 log c. f. u. /g de tejido fresco sin encontrarse diferencias estadísticas significativas. El efecto de la inoculación de la cepa mutante y la silvestre sobre el crecimiento vegetal fue analizado mediante la comparación de los pesos secos de la parte aérea y las raíces, así como también el contenido de clorofila total en hojas de plantas inoculadas y no inoculadas en cada uno de los tratamientos.

En cada uno de los tratamientos; salinidad, anegación y condiciones sin estrés el efecto de la inoculación de las plantas con la cepa silvestre mostró un incremento en el crecimiento de las plantas a niveles estadísticamente significativos comparadas con las plantas inoculadas con la cepa mutante y con las plantas sin inocular. También se observó que el contenido de clorofila fue mayor en las plantas inoculadas con ambas cepas. Con estos ensayos fue posible determinar que la enzima ACC desaminasa tiene un papel importante en la promoción del crecimiento vegetal de la planta de tomate bajo distintas condiciones ambientales como la salinidad, anegación y sin estrés.

También se analizó el papel de la enzima ACC desaminasa sobre la elongación de la raíz de las plantas. Este ensayo fue realizado con semillas de tomate mantenidas sobre papel filtro e inoculadas con las cepa silvestre, la mutante (*acdS::ΩKm*) o la cepa

complementada en la mutación del gene *acdS* (*acdS::ΩKm pFacdS⁺*). Como controles fueron utilizadas plántulas sin inocular. Los resultados mostraron diferencias significativas en la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con todas las cepas con respecto a las plantas sin inocular. Además, la longitud de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa silvestre MTI-641^T y la cepa complementada (*acdS::ΩKm pFacdS⁺*) fueron significativamente mayores que la longitud de las plantas inoculadas con la cepa mutante (*acdS::ΩKm*). Sin embargo, este análisis no reflejó diferencias significativas entre la longitud de la raíz de plantas inoculadas con la cepa silvestre y la cepa complementada. Las 3 cepas inoculadas MTI-641^T, (*acdS::ΩKm*) y (*acdS::ΩKm pFacdS⁺*) fueron capaces de colonizar las raíces del tomate en un intervalo aproximado de 6.1-6.4 log c. f. u. /g de tejido fresco, no existiendo diferencias significativas entre las poblaciones.

El análisis de la expresión del gene *acdS* en asociación con las plantas fue desarrollado utilizando fusiones transcripcionales construidas en un vector de expresión estable (pFAJ1700) para bacterias gram negativas. Las construcciones fueron nombradas *acdSp-gusA*, que contiene el promotor del gene *acdS* fusionado al gene reportero GUS (*uidA*); *gusA⁻* como control negativo que contiene al gene *uidA* en un vector de expresión sin promotor y *s7p-gusA* como control positivo que expresa al gene reportero constitutivamente.

Las cepas marcadas con los plásmidos que contienen las fusiones de interés fueron cultivadas en distintos medios y bajo distintas condiciones para determinar la actividad enzimática β-glucuronidasa del gene reportero *gusA*. Los ensayos mostraron que el promotor del gene *acdS* es inducible en medio mínimo con ACC. También fue posible detectar la inducción del promotor del gene *acdS* bajo las mismas condiciones a partir de las 6 horas de cultivo, con un incremento gradual con respecto al tiempo hasta las 24 horas. La concentración mínima requerida para la inducción del promotor *acdS* es de 500 nM y el nivel máximo de inducción fue obtenido con ACC 1 mM. En el caso de los cultivos mantenidos en medio mínimo con NH₄Cl la actividad del promotor *acdS* fue siempre menor a 3.1 % con relación a la detectada en los cultivos con ACC. Con respecto a la construcción que contiene el gene reportero GUS sin promotor se observó que la expresión basal bajo cualquier condición analizada fue menor al 3 %.

Por otro lado, fueron realizados algunos ensayos adicionando al medio dos fuentes de nitrógeno, ACC 3 mM y NH₄Cl en exceso (4.5 y 10 mM). El análisis de la actividad β-

glucuronidasa mostró que en presencia de ACC 3 mM y NH₄Cl en exceso, la actividad del promotor del gene *acdS* fue menor al 10%, con respecto al cultivo que contiene ACC 3 mM como única fuente de nitrógeno. Los resultados obtenidos sugieren que aunque el promotor del gene *acdS* es inducido por ACC aún en la presencia de NH₄Cl en exceso, dicha inducción está disminuida significativamente comparada con la obtenida en cultivos inducidos con ACC como única fuente de nitrógeno. Esto es debido probablemente a la preferencia en el consumo de fuentes de nitrógeno de asimilación rápida como el NH₄Cl. Cabe resaltar que utilizando la cepa silvestre MTI-641^T, cultivada en medio mínimo con NH₄Cl 3 mM, nunca fue posible detectar actividad ACC desaminasa.

El patrón de colonización y la distribución de la bacteria en asociación con las plantas fue analizado a través de la inoculación de plantas de tomate bajo distintas condiciones de crecimiento utilizando las cepas marcadas con las fusiones transcripcionales. En los ensayos de crecimiento en tubos de ensaye con arena, todas las cepas analizadas (*acdSp-gusA*, *gusA*⁻ y *s7p-gusA*) colonizaron las raíces de tomate en un rango aproximado de 6.4-6.6 log c. f. u. /g de peso fresco, sin observarse diferencias estadísticas significativas. En el caso de las plántulas inoculadas con la cepa que contienen al gene reportero GUS sin promotor (*gusA*⁻) no fue observada la expresión en ningún tejido. Las plántulas inoculadas con la cepa que contiene el promotor constitutivo fusionado a GUS (*s7p-gusA*) mostraron expresión intensa distribuida a través de las raíces de las plántulas y principalmente en zona de emergencia de raíces laterales y cuello del tallo. En las plántulas inoculadas con la cepa que contiene el gene GUS fusionado al promotor del gene *acdS* (*acdSp-gusA*) fue observada la expresión del gene reportero en algunas pocas zonas de emergencia de raíces laterales y la zona del cuello del tallo; la expresión fue similar en todas las plantas analizadas y generalmente baja.

Además, algunas plántulas cultivadas en cajas con papel filtro fueron analizadas histoquímicamente. La expresión de GUS fue observada en los pelos absorbentes que rodean a las semillas de las plántulas inoculadas con la cepa que contiene el promotor constitutivo fusionado a GUS (*s7p-gusA*), obteniéndose la expresión más fuerte en la zona de emergencia de la radícula, sitio principal de liberación de nutrientes. El patrón de expresión en plántulas inoculadas con la cepa *acdSp-gusA* fue similar, sin embargo la intensidad de la expresión fue significativamente menor. Las plántulas inoculadas con la cepa *gusA*⁻ no mostraron expresión del gene reportero. De la misma forma que en el

ensayo anterior, las diferentes cepas colonizaron las plántulas de tomate en un rango de 7.3-7.4 log c. f. u. /g de tejido, sin encontrarse diferencias significativas entre cepas.

Con los resultados obtenidos fueron cubiertos los objetivos planteados en el proyecto de investigación.

La descripción detallada de medios de cultivo y protocolos para la determinación de actividades enzimáticas están descritos en Anexo 4.

ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants[∇]

Janette Onofre-Lemus,¹ Ismael Hernández-Lucas,² Lourdes Girard,¹ and Jesús Caballero-Mellado^{1*}

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal No. 565-A, Cuernavaca, Morelos, México,¹ and Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México²

Received 30 May 2009/Accepted 13 August 2009

The genus *Burkholderia* includes pathogens of plants and animals and some human opportunistic pathogens, such as the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), but most species are nonpathogenic, plant associated, and rhizospheric or endophytic. Since rhizobacteria expressing ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase may enhance plant growth by lowering plant ethylene levels, in this work we investigated the presence of ACC deaminase activity and the *acdS* gene in 45 strains, most of which are plant associated, representing 20 well-known *Burkholderia* species. The results demonstrated that ACC deaminase activity is a widespread feature in the genus *Burkholderia*, since 18 species exhibited ACC deaminase activities in the range from 2 to 15 μmol of α -ketobutyrate/h/mg protein, which suggests that these species may be able to modulate ethylene levels and enhance plant growth. In these 18 *Burkholderia* species the *acdS* gene sequences were highly conserved (76 to 99% identity). Phylogenetic analysis of *acdS* gene sequences in *Burkholderia* showed tight clustering of the Bcc species, which were clearly distinct from diazotrophic plant-associated *Burkholderia* species. In addition, an *acdS* knockout mutant of the N_2 -fixing bacterium *Burkholderia unamae* MTI-641^T and a transcriptional *acdSp-gusA* fusion constructed in this strain showed that ACC deaminase could play an important role in promotion of the growth of tomato plants. The widespread ACC deaminase activity in *Burkholderia* species and the common association of these species with plants suggest that this genus could be a major contributor to plant growth under natural conditions.

Burkholderia is a common genus in the bacterial communities present in agricultural and polluted soils (24, 56, 63) and includes over 40 properly described species (18). While some of these species are opportunistic pathogens of humans (for example, species in the *Burkholderia cepacia* complex [Bcc]) and others are phytopathogenic (17), most species have neutral or beneficial interactions with plants (18). For a long time, the ability of bacteria belonging to the genus *Burkholderia* to fix N_2 was found only in the species *B. vietnamiensis* (36), a member of the Bcc (17). At present, several diazotrophic plant-associated *Burkholderia* species have been validly described, including *B. unamae* (6), *B. xenovorans* (41), *B. tropica* (62), and *B. silvatlantica* (60), all of which are able to colonize the rhizosphere and/or the endophytic environment of a wide range of host plants (6, 7, 36, 59, 60, 62). In addition, legume-nodulating N_2 -fixing strains have formally been classified as novel species, including *B. phymatum*, *B. tuberum* (68), *B. mimosarum*, and *B. nodosa* (12, 13). It is worth noting that most of the plant-associated *Burkholderia* species are phylogenetically distant from the Bcc species and exhibit potential activities of interest in agrobiotechnology (7). Among the plant-associated *Burkholderia*, *B. unamae* has relevant features, such as colonization of the rhizosphere and internal tissues of taxonomically unrelated host plants, including maize, coffee, sugarcane, and to-

mato, has a wide distribution in different geographical regions, and exhibits several potential activities involved in plant growth promotion, bioremediation, or biological control (6, 7, 59).

The bacterial enzyme ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase promotes plant growth by lowering plant ethylene levels (37, 39). This enzyme catalyzes the conversion of ACC, the immediate precursor of ethylene synthesis in plants, to ammonia and α -ketobutyrate (α -KB). ACC is exuded from seeds or plant roots and then metabolized by bacteria expressing ACC deaminase activity, which stimulates plant ACC efflux, decreasing the root ACC concentration and root ethylene evolution and increasing root growth (39). Moreover, it has been reported that some ACC deaminase-producing bacteria promote plant growth under a variety of stressful conditions, such as flooding (42), saline conditions (54), and drought (55). In addition, this enzyme has been implicated in enhancing nodulation in pea (51) and alfalfa (50) plants.

Growth on a minimal medium with ACC as the sole N source is indicative of ACC deaminase-containing bacteria (38). Based on this criterion, it has been postulated that soil bacteria capable of degrading ACC are relatively common (2, 38).

The *acdS* gene, encoding ACC deaminase, has been isolated from different species and strains of genera belonging to the *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria*, as well as the *Firmicutes* and *Actinobacteria* (3, 25, 28, 44, 64). However, the identification of most *acdS* genes has been based only on partial sequences, and some of the strains analyzed have been poorly characterized taxonomically. Moreover, it is notewor-

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (52 777) 329-17-03. Fax: (52 777) 317-55-81. E-mail: jesuscab@ccg.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 21 August 2009.

TABLE 1. Sources of *Burkholderia* species and strains analyzed and ACC deaminase activities

Species or strain	Relevant characteristics of species	Reference(s)	ACC deaminase activity ($\mu\text{mol } \alpha\text{-KB/h/mg}$ protein) ^a
<i>B. unamae</i> ^b	Rhizospheric; endophyte; N ₂ fixer	6	3.78 \pm 0.66 ^h
<i>B. xenovorans</i> ^c	Rhizospheric; biphenyl degrader; N ₂ fixer	41	8.62 \pm 2.26 ^h
<i>B. tropica</i> ^d	Rhizospheric; endophyte; N ₂ fixer	62	ND
<i>B. silvatlantica</i> ^e	Rhizospheric; endophyte; N ₂ fixer	60	12.40 \pm 2.34 ^h
<i>B. phymatum</i> STM815 ^T	Legume nodulating	68	3.55 \pm 0.78
<i>B. tuberum</i> STM678 ^T	Legume nodulating	68	4.63 \pm 0.59
<i>B. vietnamiensis</i> ^f	Rhizospheric; endophyte; opportunistic human pathogen; N ₂ fixer	32, 36	5.10 \pm 1.62 ^h
<i>B. caribensis</i> MWP64 ^T	Soil; exopolysaccharide producer	1	3.91 \pm 1.03
<i>B. phenoliruptrix</i> LMG 22037 ^T	Soil; 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degrader	14	2.13 \pm 0.71
<i>B. fungorum</i> LMG 16225 ^T	Fungus; aromatic compound degrader	15	2.46 \pm 0.13
<i>B. graminis</i> C4D1 M ^T	Maize roots; environmental grasses	70	10.19 \pm 0.51
<i>B. caledonica</i> LMG 19076 ^T	Rhizosphere soil	15	12.11 \pm 3.25
<i>B. terricola</i> LMG 20594 ^T	Agricultural soil	40	12.59 \pm 0.46
<i>B. phytofirmans</i> PsJN ^T	Endophyte; plant growth-promoting rhizobacterium	65	12.03 \pm 0.43
<i>B. stabilis</i> LMG 14294 ^T	Opportunistic human pathogen; rhizospheric	18, 69	11.85 \pm 1.58
<i>B. cenocepacia</i> J2315 ^T	Rhizospheric; opportunistic human pathogen (cystic fibrosis)	17, 24	2.63 \pm 0.23
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416 ^T	Rhizospheric; opportunistic human pathogen (cystic fibrosis)	5, 18	4.85 \pm 0.41
<i>B. caryophylli</i> LMG 2155 ^T	Plant pathogen (carnation)	74	5.53 \pm 1.05
<i>B. ambifaria</i> 6991	Soil, maize roots; opportunistic human pathogen (cystic fibrosis)	16	ND
<i>B. kururiensis</i> ^g	Trichloroethylene degrader; endophyte; N ₂ fixer	7, 32, 75	5.17 \pm 0.31

^a The data are the means \pm standard deviations of three independent assays performed in duplicate. ND, not detected.

^b The strains analyzed were *B. unamae* MTI-641^T, SCCu-23, CGC-72, SCZa-211, M2Cy-71, CAC-98, SCZa-39, CAC-382, CGC-321, and MeD-9573 (6).

^c The strains analyzed were *B. xenovorans* LB400^T, CAC-124, and LMG16224 (41).

^d The strains analyzed were *B. tropica* Ppe8^T, MTo-293, MOc-725, MXo-435 (62), BM16, and BM273 (31).

^e The strains analyzed were *B. silvatlantica* SRMrh-20^T, AB48, and PPCR-2 (60).

^f The strains analyzed were *B. vietnamiensis* TVV75^T, TVV69, MMi-324, CCE-101, SXo-702, and MMi-344 (32, 36).

^g The strains analyzed were *B. kururiensis* KP23^T and M130 (7, 32, 75).

^h Average of the activities obtained for the strains analyzed.

thy that the beneficial effect of ACC deaminase on plant growth has usually been tested using wild-type isolates with ACC deaminase activity; only a few studies have used ACC deaminase-negative mutants (49, 51, 67).

Although the presence and activity of ACC deaminase in few nonpathogenic *Burkholderia* strains (65, 7) and in some Bcc strains (3) have been analyzed, nothing is known about the expression of this enzyme in association with plants. Similarly, the effect of ACC deaminase-negative mutants of plant-associated *Burkholderia* strains on plant growth is unknown.

In this work, the ACC deaminase activities and *acdS* gene sequences of most of the novel rhizospheric, endophytic diazotrophic, and legume-nodulating *Burkholderia* species, as well as of non-N₂-fixing *Burkholderia* strains (mainly plant associated), were analyzed. In addition, we analyzed the effect of an *acdS* knockout mutant of *B. unamae* and the expression of the ACC deaminase gene by use of a *gusA* (*uidA*) reporter gene fusion on tomato plants grown under different conditions. The colonization patterns of a constitutive *gusA*-marked strain in tomato roots were examined as well.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture conditions, and mating. Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1 and Table 2, respectively. Since most of the *Burkholderia* species listed in Table 1 were proposed on the basis of one to three isolates analyzed (59), in this work only the type strain of the majority of the species was examined. In addition to type strains, several previously characterized strains of *B. unamae* (6), *B. xenovorans* (41), *B. tropica* (62), *B. silvatlantica* (60), *B. vietnamiensis* (32, 36), and *B. kururiensis* (7) were included in the analysis (Table 1). For phenotypic identification of the *acdS* gene, *Burkholderia* isolates were grown on selenite medium (SM) plates (7) supplemented with 3.0 mM ACC; the plates were incubated for 5 to 6 days at 29°C. *Burkholderia* strains

able to grow on ACC as a sole nitrogen source were analyzed for the presence of the *acdS* gene. For triparental mating, *B. unamae* strains, *Escherichia coli* DH5 α (donor), and *E. coli* M607 (with helper plasmid pRK600) were cultured in Luria-Bertani medium, and antibiotics were added as required at the following concentrations: kanamycin, 50 $\mu\text{g/ml}$; tetracycline, 15 $\mu\text{g/ml}$; gentamicin, 30 $\mu\text{g/ml}$; and chloramphenicol, 20 $\mu\text{g/ml}$. These experiments were performed as described previously (11). Growth kinetics for wild-type and derivative strains were determined at least three times. Strains were grown in liquid BSE medium or SM as described previously (7). Cells were collected and washed, and the initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to 0.02. The cultures were incubated at 29°C with reciprocal shaking (250 rpm), and the growth over time was determined by quantifying the number of cells.

ACC deaminase activity assay. Cultures of *Burkholderia* strains used for ACC deaminase assays were grown as described previously (7). ACC deaminase activity was measured by measuring the production of α -KB as described by Honma and Shimomura (43). The protein concentration in cell extracts was determined by the Bradford method (4).

PCR amplification and sequencing of *acdS* genes in *Burkholderia*. For PCR amplification of partial *acdS* genes, primers 5'ACC and 3'ACC were used, as described previously (7). To obtain the complete *acdS* gene sequences, the following two sets of degenerate primers were designed: primers F-*acdS* (5'ATGAAYCTSCARCAGHTTY3') and R-*acdS* (5'TYARCCGTYSYCGRAARRT3'); and primers NF-*acdS* (5'ATGAAYCTSCARMRHTTY3') and NR-*acdS* (5'TYARCCGTYGCGRARATV3'). PCR assays were performed using 50- μl reaction mixtures with PFX polymerase (Invitrogen) under the following conditions: initial denaturation for 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 1 min at 72°C and then a final 5-min elongation at 72°C. The amplified products were cloned into the vector pCR 2.1 (Invitrogen), and the *acdS* gene sequences were determined at the Biotechnology Institute, UNAM (Mexico). Multiple-sequence alignments of *acdS* sequences were constructed with CLUSTALW2 software (48). The tree topology was inferred by the neighbor-joining method, and a distance matrix analysis was performed as described by Jukes and Cantor using the program MEGA, version 3.1 (47).

Isolation of a genomic region harboring the regulatory region and the *acdS* structural gene of *B. unamae* MTI-641^T. A 785-bp segment containing the central region of the *acdS* gene was amplified by PCR (using primers 5'ACC and 3'ACC) and cloned into the Km^r suicide vector pUX19 (71). The resulting

TABLE 2. Strains and plasmids used in this work

Strain/genotype or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or source
Strains		
MTI-641 ^T	<i>B. unamae</i> wild-type strain	6
<i>acdS</i> ::ΩKm	MTI-641 ^T ACC deaminase-negative mutant, Km ^r	This study
<i>acdS</i> ::ΩKm(p <i>FacdS</i> ⁺)	MTI-641 ^T ACC deaminase-negative mutant complemented with wild-type <i>acdS</i> gene, Km ^r Tc ^r	This study
<i>acdSp-gusA</i>	MTI-641 ^T containing p <i>FacdSp-gusA</i> , GUS tagged	This study
<i>s7p-gusA</i>	MTI-641 ^T containing p <i>Fs7p-gusA</i> , GUS tagged	This study
<i>gusA</i> negative	MTI-641 ^T containing p <i>FgusA</i> ⁻ , GUS tagged	This study
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1</i> φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>gvrA96</i>	Gibco BRL
Plasmids		
pRK600	Helper plasmid, Mob Cm ^r	35
pCR2.1	TA cloning vector for PCR products, Amp ^r Km ^r	Invitrogen
pUX19	Suicide vector, Km ^r	71
pJQ200mp18	Suicide vector for gene replacement, <i>sacB</i> Mob Gm ^r	61
pHP45Ω-Km	ΩKm ^r vector, Ap ^r	34
pVO155	Suicide vector containing the <i>uidA</i> gene, Km ^r	57
pACYC184	Cloning vector, Cm ^r Tc ^r	10
pUX-UD	pUX19 derivative containing genome sequences flanking the <i>acdS</i> gene from strain MTI-641 ^T , Km ^r	This study
pUX19 <i>acdS</i>	pUX19 derivative containing a partial <i>acdS</i> gene sequence (785 bp) of <i>B. unamae</i> MTI-641 ^T , Km ^r	This study
pACY1 <i>rlpL-acdS</i>	pACYC184 derivative containing a 2.2-kb region with the <i>rlpL</i> and <i>acdS</i> genes from MTI-641 ^T , Cm ^r Tc ^r	This study
pACY <i>acdS</i> ::ΩKm	pACYC184 derivative containing the <i>acdS</i> gene interrupted by a kanamycin resistance cassette, Cm ^r Tc ^r Km ^r	This study
pJQ <i>acdS</i> ::ΩKm	pJQ200mp18 derivative containing the <i>acdS</i> gene interrupted by a kanamycin resistance cassette Gm ^r Km ^r	This study
pACY1 <i>rlpL-acdSp-gusA</i>	pACYC184 <i>rlpL-acdS</i> derivative containing the <i>gusA</i> gene cloned in the coding region of <i>acdS</i> gene, Cm ^r Tc ^r Km ^r	This study
pFAJ1700	RK2 broad-host-range vector, Tc ^r	27
p <i>FacdSp-gusA</i>	pFAJ1700 derivative containing the upstream <i>acdS</i> regulatory sequence fused to the <i>uidA</i> gene, Tc ^r	This study
p <i>FgusA</i> ⁻	pFAJ1700 derivative containing promoterless <i>gusA</i> gene, Tc ^r	This study
p <i>FacdS</i> ⁺	pFAJ1700 derivative containing the structural and regulatory region of the <i>acdS</i> gene, Tc ^r	This study
p <i>Fs7p-gusA</i>	pFAJ1700 derivative containing a constitutive promoter fused to the <i>gusA</i> gene, Tc ^r	This study

^a GUS, β-glucuronidase.

plasmid (pUX19*acdS*) was transferred by triparental mating into *B. unamae* MTI-641^T, and recombinant strains were selected in the presence of kanamycin. The total DNA of a single-recombinant strain was digested with restriction enzyme BclI (Invitrogen); the BclI restriction site was absent in the pUX*acdS* vector, which allowed incorporation of sequences upstream and downstream of the *acdS* gene into the vector. The digested DNA was religated and transformed into *E. coli* DH5α. Ten Km^r colonies were purified, and the clones were digested with BclI. One of these clones (pUX-UD) was sequenced by primer walking to verify that sequences surrounding the *acdS* gene were cloned. In silico analysis of the resulting sequence was performed with the programs FGENESB, BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), and virtual footprint promoter analysis version 3.0 (http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php).

Construction of *B. unamae* MTI-641^T *acdS* mutant and complementation experiments. A DNA fragment containing the structural and regulatory region of the *acdS* gene was amplified by PCR using primers *Xba*-404 (5'GCTCTAGAC CAGGCCACACCATCATC-3') and *Xba*-2631 (5'GCTCTAGAAGTTACCAG TTGCCAGTT3'); the 2,261-bp PCR product was cloned in pACYC184, and the *acdS* gene was then disrupted with the Km^r gene of pHP45Ω-Km (34). The interrupted gene was cloned in the suicide vector pJQ200mp18 (61). The suicide plasmid harboring the interrupted gene was introduced into strain MTI-641^T, and double crossover, Km^r sucrose-resistant clones were selected. The gene replacement was confirmed by Southern blot hybridization. To complement the *acdS* mutant, an 1,864-bp fragment harboring the complete *acdS* gene and its 5' regulatory sequence was cloned in the broad-host-range vector pFAJ1700 (27), and the resulting plasmid (p*FacdS*⁺) was used for complementation experiments.

Construction of transcriptional *gusA* reporter fusions. To determine bacterial *acdS* gene expression in plants, a transcriptional fusion was constructed. A

653-bp fragment from MTI-641^T containing the upstream *acdS* regulatory region, as well as 150 bp of the *acdS* coding sequence, was fused to *gusA* as follows. The *gusA* gene from pVO155 (57) was inserted 102 nucleotides downstream of the start codon of the *acdS* gene to obtain a transcriptional fusion, which was subsequently cloned into pFAJ1700 (p*FacdSp-gusA*) and introduced into strain MTI-641^T (*acdSp-gusA*). To obtain a constitutive *gusA*-marked strain, the promoter region (839 bp) of the *s7* ribosomal gene from *B. xenovorans* LB400^T was cloned into the promoterless p*FgusA* vector, resulting in p*Fs7p-gusA*. To generate a negative control for *gusA* expression, the *gusA* gene was cloned into the promoterless vector pFAJ1700, resulting in the p*FgusA*⁻ plasmid. Fusions were introduced by conjugation into *B. unamae* MTI-641^T, and the strains were designated the *s7p-gusA*, *acdSp-gusA*, and *gusA* strains (Table 2). Transcriptional gene fusions were sequenced to verify the correct DNA sequences.

Plasmid stability. Stationary-phase cultures of *B. unamae* were diluted to obtain an OD₆₀₀ of 0.02 in 6 ml of fresh BSE liquid medium without antibiotics and cultivated for 8 h, and 100-μl aliquots of these cultures were inoculated into fresh BSE liquid medium and incubated for 24 h; this procedure was repeated once, but the culture was incubated for 48 h, and then samples were diluted and plated on BAc agar (32) without antibiotics. Two hundred colonies were picked onto plates with tetracycline or without an antibiotic, and the pFAJ1700 stability frequency in *B. unamae* derivatives was based on the total number of recovered colonies on medium without an antibiotic compared to the number of colonies resistant to tetracycline.

β-Glucuronidase activity measurement. The *Burkholderia acdSp-gusA* and *gusA* strains were grown for 18 h at 29°C in BSE liquid medium with reciprocal shaking (200 rpm); the initial OD₆₀₀ of the cultures were adjusted to 0.02 (approximately 6.30 log CFU/ml) in SM broth supplemented with ACC (100 nM to 3 mM) or NH₄Cl (3 mM) as a single nitrogen source, and the cultures were

TABLE 3. Effect of *B. unamae* wild-type strain MTI-641^T and an ACC deaminase-negative mutant (*acdS::ΩKm*) on tomato plants grown under different conditions^a

Treatment	Inoculated strain	Shoot dry wt (mg)	Root dry wt (mg)	Chlorophyll concn (mg/g [fresh wt])	Log CFU/g root (fresh wt)
Control	Wild type	88 ± 7.8 a	48 ± 4.4 a	0.55 ± 0.01 a	6.81 ± 0.13 a
	<i>acdS::ΩKm</i> mutant	61 ± 8.1 b	38 ± 4.1 b	0.56 ± 0.06 a	6.43 ± 0.51 a
	Not inoculated	65 ± 7.5 b	40 ± 4.7 b	0.35 ± 0.05 b	ND
100 mM NaCl	Wild type	77 ± 9.3 a	49 ± 2.5 a	0.48 ± 0.05 a	6.51 ± 0.45 a
	<i>acdS::ΩKm</i> mutant	61 ± 10.8 b	41 ± 1.7 b	0.49 ± 0.03 a	6.41 ± 0.39 a
	Not inoculated	60 ± 2.6 b	40 ± 3.5 b	0.35 ± 0.02 b	ND
Water saturation	Wild type	70 ± 7.3 a	50 ± 5.0 a	0.57 ± 0.03 a	6.88 ± 0.13 a
	<i>acdS::ΩKm</i> mutant	53 ± 7.0 b	35 ± 6.2 b	0.55 ± 0.009 a	6.90 ± 0.05 a
	Not inoculated	57 ± 3.6 b	37 ± 6.0 b	0.41 ± 0.05 b	

^a The shoot and root dry weight data are the averages ± standard deviations of five pot replicates with three seedlings per pot for each treatment. The chlorophyll content data are the averages ± standard deviations of three samples, which were obtained from different plants and independently processed. The CFU data are the averages ± standard deviations of three replicates, where two seedlings served as a replicate, for each treatment. Plant data followed by the same letter in a column for each treatment do not differ significantly at $P \leq 0.05$, as determined using one-way analysis of variance, followed by Tukey's analysis. CFU values followed by the same letter for each treatment do not differ significantly at $P \leq 0.05$, as determined using Student's *t* test. Statistical differences ($P \leq 0.05$) among control plants without stress and plants grown in the presence of NaCl or water saturation treatments were not found using one-way analysis of variance, followed by Tukey's analysis. ND, not detected.

grown for 6, 18, and 24 h at 29°C. The cultures were centrifuged and resuspended in a salt wash solution supplemented with 100 µg/ml chloramphenicol. Quantitative β-glucuronidase assays were performed with the *p*-nitrophenyl glucuronide substrate as described previously (73). The protein concentration was determined by the Bradford method (4). Three independent experiments were performed in duplicate.

Inoculation of tomato plants with *B. unamae* wild-type and mutant strains. *B. unamae* MTI-641^T and derivative strains were grown in BSE liquid medium (supplemented with tetracycline or kanamycin when necessary) and incubated at 29°C for 18 h. The cells were collected and resuspended in sterile 10 mM MgSO₄ · 7H₂O, and the concentration was adjusted to 7 log CFU/ml. Germinated seeds were sown after immersion in the bacterial suspension for 1 h.

Tomato gnotobiotic assay. Seeds of tomato variety saladet were surface disinfected by soaking them in 1.5% sodium hypochlorite for 15 min, thoroughly rinsed in sterile distilled water, and germinated on agar plates. Germinated seeds were soaked for 1 h in a 10 mM MgSO₄ · 7H₂O solution (noninoculated) or in a bacterial suspension (wild-type strain or the *acdS::ΩKm* mutant). After inoculation, three germinated seeds were aseptically transferred to 500-ml plastic pots containing sterilized river sand (approximately 1 kg) moistened with 140 ml Fahraeus solution (33) supplemented with NH₄Cl (7.5 mg N/pot), and 1 ml of a bacterial suspension (7 log CFU/ml) was added to each seed. The plants were maintained under greenhouse conditions, and 80 ml of sterile water was applied every 3 days. After 25 days of growth, the plants were treated either with 80 ml of a sterile saline solution (100 mM NaCl) every 3 days or with 80 ml of sterile water (water saturation) daily; 80 ml of sterile water applied every 3 days was used for the control treatment. The plants were harvested 15 days after each treatment, and the root length, chlorophyll content, and dry weight were analyzed. The chlorophyll content was determined as described by Wellburn (72).

Root elongation assay. Tomato seeds were surface disinfected as described above and transferred to petri dishes containing filter paper moistened with 5 ml of a Farheus-bacterium suspension containing wild-type, *acdS::ΩKm*, or *acdS::ΩKm*(p*FacdS*⁺) bacteria or with Farheus solution without bacteria. After 5 days of incubation in the dark at 29°C, root lengths were measured.

Histochemical localization of β-glucuronidase activity. The expression of the *gusA* reporter gene was monitored in plants inoculated with *gusA*-marked strains (the *acdSp-gusA*, *s7p-gusA*, and *gusA* strains). One assay was carried out as described above for the root elongation test, but β-glucuronidase activity was analyzed instead of root length. In addition, inoculated germinated tomato seeds were sown aseptically in assay tubes containing sand and Fahraeus solution with NH₄Cl (1.0 mg N/tube). The seedlings were grown in a greenhouse for 3 weeks. Localization of bacterial β-glucuronidase activity was determined using X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid) as the substrate, as described by Jefferson et al. (46). After the samples were washed in phosphate buffer, the plant tissues were examined and photographed using a light microscope (Zeiss).

Enumeration of bacteria associated with roots. Enumeration of root-associated bacteria was performed in all of the plant-inoculation assays. Roots of seedlings were weighed and homogenized in a sterile 10 mM MgSO₄ solution with a mortar and pestle. Homogenates were serially diluted and plated in selective BAc medium. After incubation for 3 days at 29°C, the number of

colonies of each strain was determined. In addition, amplified 16S rRNA gene restriction profiles for five colonies grown on the selective medium inoculated with the highest dilution were determined as previously described (32) in order to confirm the identity of the inoculated strain.

Statistical data analysis. Unless otherwise indicated, plant and bacterial population data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Tukey's analysis, using the Minitab 15 statistical software. Bacterial population data were log transformed before statistical analysis. All analyses were performed using a *P* value of ≤ 0.05 . The numbers of replicates and seedlings or plants sampled in each experiment for statistical data analysis are indicated in Tables 3 and 4.

Nucleotide sequence accession numbers. Twenty-one *acdS* gene sequences (15 complete sequences and 6 partial sequences) have been deposited in the EMBL/GenBank database under accession numbers EU886299 through EU886320. Specific accession numbers of each strain are shown in Fig. 1.

RESULTS

Growth on ACC as a nitrogen source and ACC deaminase activity. Of 45 *Burkholderia* strains belonging to 20 species (Table 1), 38 were able to grow on ACC as a sole nitrogen source. These 38 strains, belonging to 18 species, expressed ACC deaminase activity at levels ranging from 2 to 15 µmol α-KB/h/mg protein (Table 1). All of the *B. tropica* strains and *B. ambifaria* 6991 were not able to grow on ACC, and neither of these species expressed ACC deaminase activity.

TABLE 4. Root lengths in 5-day-old tomato seedlings inoculated with *B. unamae* MTI-641^T and derivatives^a

Strain inoculated	Root length (cm)	Root length difference (%)	Log CFU/g (fresh wt) root
None	3.97 ± 0.08 a		ND
Wild type	5.32 ± 0.05 c	34	6.49 ± 0.16 a
<i>acdS::ΩKm</i> (p <i>FacdS</i> ⁺)	5.28 ± 0.02 c	33	6.11 ± 0.17 a
<i>acdS::ΩKm</i> mutant	4.87 ± 0.06 b	23	6.27 ± 0.29 a

^a Root length assays were performed with five replicates; one petri dish containing 20 seeds served as a replicate. The root lengths are averages ± standard deviations of five replicates. The CFU data are averages ± standard deviations of three replicates, where five seedlings served as a replicate, for each strain. Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P \leq 0.05$, as determined using one-way analysis of variance, followed by Tukey's analysis. ND, not detected.

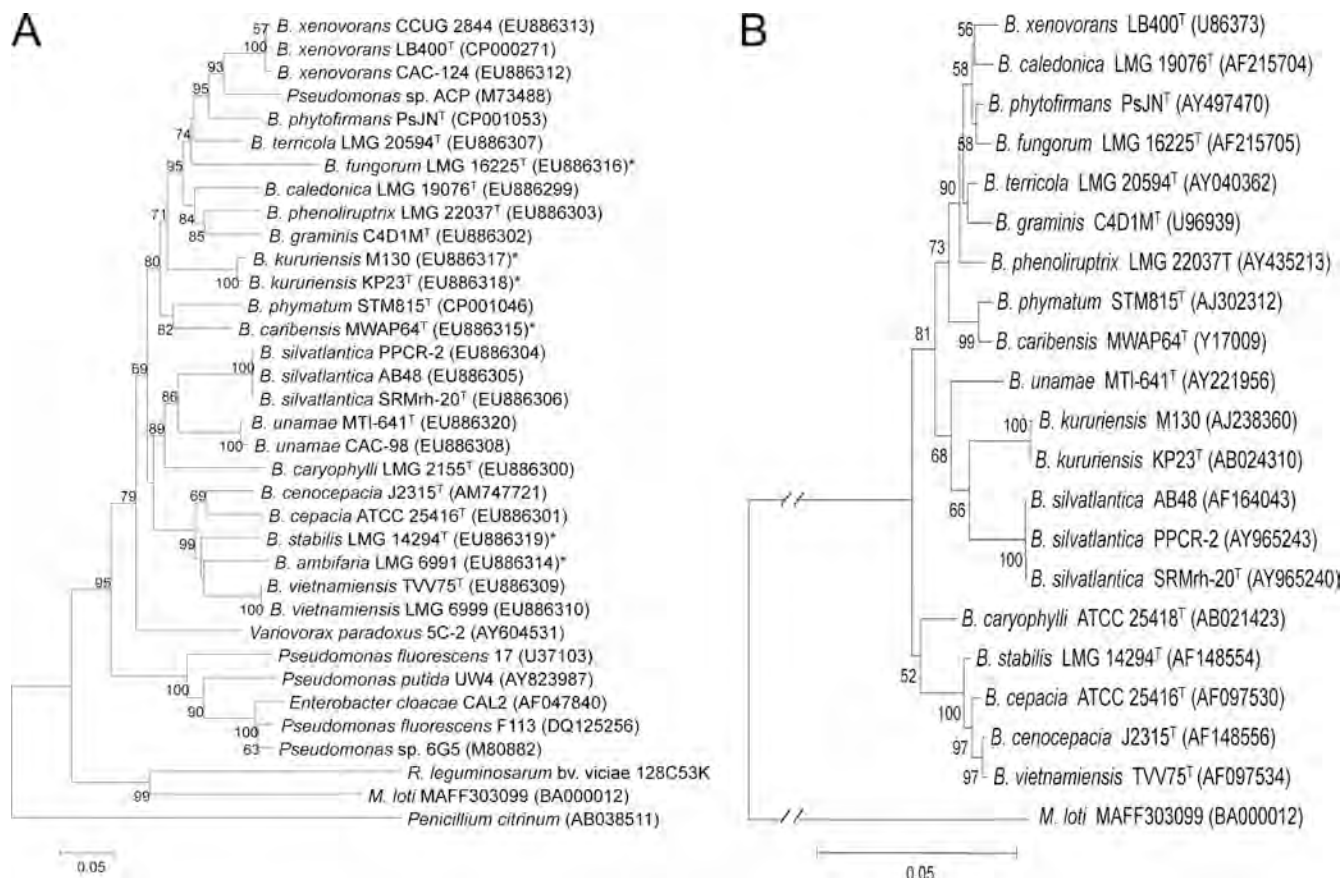


FIG. 1. (A) Phylogenetic tree based on complete *acdS* gene sequences (1,017 bp) of *Burkholderia* species and *acdS* gene partial sequences (785 bp) (indicated by an asterisk). (B) Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1,310 bp) of *Burkholderia* species. The trees were constructed using the neighbor-joining method. The nodal robustness of the trees was assessed using 1,000 bootstrap replicates. For both phylogenetic trees the bar indicates 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides. The NCBI GenBank accession number for each strain is shown in parentheses.

PCR amplification and sequencing of *acdS* genes in *Burkholderia*. PCR amplification of *acdS* genes encoding ACC deaminase from 25 representative strains analyzed belonging to 18 *Burkholderia* species was performed using three sets of primers. Although ACC deaminase activity was found in *B. tuberum* STM678^T, the *acdS* gene sequence was not obtained with any of the primer sets tested. The sequences of *Burkholderia* species were highly conserved, with levels of identity between 76 and 99% at the nucleotide level. Phylogenetic analysis of the *acdS* gene sequences showed that there were robust clusters containing strains having different origins and from different sources, including plant-associated diazotrophic, non-N₂-fixing species and opportunistic pathogens (Fig. 1). Phylogenetic trees based on *acdS* and 16S rRNA gene sequences of *Burkholderia* species showed similar topologies (Fig. 1).

ACC deaminase gene and regulatory sequences in *B. unamae* MTI-641^T. Analysis of the sequence of 2.2-kb pUX-UD revealed two putative open reading frames, one of which is 1,017 bp long and encodes an ACC deaminase with high levels of identity (69 to 87%) with other complete ACC deaminases (8, 66, 67). The second open reading frame (501 bp), transcribed in the opposite direction from *acdS*, encodes a putative polypeptide that showed 74% identity to Lrp (leucine-respon-

sive regulatory protein) of *Pseudomonas putida* UW4. In silico analysis of the *acdS-lrpL* intergenic region showed that these genes contain putative σ^{70} -dependent promoters and that the transcriptional start sites of *acdS* and *lrpL* were located 75 and 42 bp upstream of the corresponding ATG initiation codon. Two putative Lrp-binding sites were located upstream of *acdS*. L-B1 overlapped the -10 box, and L-B2 was localized 84 bp upstream of the ATG initiation codon (Fig. 2); these sites had 11 and 10 identical nucleotides compared to the consensus sequence (YAGHAWATTWTDCTR) in *E. coli* (22).

Characterization of *B. unamae* MTI-641^T, an *acdS* mutant, and a complemented strain. ACC deaminase activity was not detected in the *acdS* mutant (*acdS*:: Ω Km). However, in a liquid rich medium, the growth of the *acdS* mutant and the growth of wild-type strain MTI-641^T were not significantly different ($P \leq 0.05$, Student's *t* test) after 12 h of incubation, reaching concentrations of 8.61 ± 0.02 and 8.74 ± 0.09 log CFU/ml, respectively. In the complemented *acdS*:: Ω Km(p*FacdS*⁺) strain the ACC deaminase activity was restored (4.32 ± 0.73 μ mol α -KB/h/mg protein) to a level similar to that in the wild-type strain (4.87 ± 0.34).

Vector stability of *gusA*-marked strains. Plasmid frequency analysis showed that there was 100% stability of pFAJ1700 in

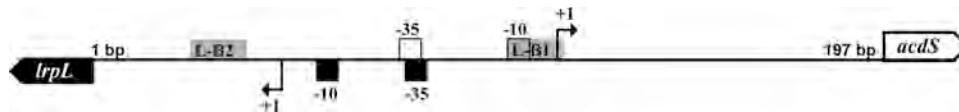


FIG. 2. In silico analysis of the upstream region (197 bp) of the *acdS* gene of *B. unamae* MTI-641^T. The putative *acdS* and *lrpL* -10 and -35 sequences (TACCATN₂₃TTGGCA and TACGTTN₁₇TTGCCA) are indicated by open and filled boxes, respectively. The transcriptional start sites are indicated by bent arrows. Putative Lrp-binding sites L-B1 (TACCATCTTTGCAT) and L-B2 (CTGAAAATGTTTCGAC) are indicated by gray boxes.

B. unamae without selective pressure; the results were virtually identical for all of the cultures analyzed. The growth patterns of the *acdSp-gusA* strain in liquid SM medium with 3 mM ACC after 48 h of incubation were similar to those of wild-type strain MTI-641^T. While the *acdSp-gusA* strain reached concentrations of 8.25 ± 0.03 log CFU/ml, the wild-type strain concentrations were on the order of 8.18 ± 0.08 log CFU/ml; the concentrations were not statistically different ($P \leq 0.05$, Student's *t* test).

Expression profile of the *acdS* promoter region and enzymatic ACC deaminase activity. Transcriptional fusions were evaluated in the presence of ACC and NH₄Cl. In the presence of ACC, transcriptional *acdS* activity was detected at 6, 18, and 24 h; in contrast, no activity was detected with NH₄Cl (Fig. 3A). These results were in agreement with the ACC deaminase activity of wild-type strain MTI-641^T, since the ACC deaminase did not produce α -KB when the bacterium was grown with 3 mM NH₄Cl as the sole nitrogen source (Fig. 3B). Transcriptional assays with different ACC concentrations (100 nM to 1,000 μ M) showed that the maximal *acdS* activity ($1,030 \pm 107.61$ nmol *p*-nitrophenyl/min/mg protein) was obtained with 1,000 μ M ACC; 1,000 μ M NH₄Cl and ACC concentrations lower than 0.5 μ M did not induce *acdS* transcription (Fig. 3C). At the highest concentration (1,000 μ M) and at 1 μ M ACC, no transcriptional activity was detected in the promoterless *gusA* strain (Fig. 3C).

Inoculation of tomato plants with *B. unamae* wild-type and mutant strains. The *B. unamae* MTI-641^T (wild type) and *acdS::* Ω Km mutant populations on tomato plants grown under different conditions were not significantly different (Table 3). The shoot and root dry weights of tomato plants inoculated with strain MTI-641^T were significantly higher ($P \leq 0.05$) than those of plants inoculated with the *acdS::* Ω Km mutant and of noninoculated plants for all the treatments (Table 3). In addition, the chlorophyll contents of plants inoculated with both strains were statistically increased compared to those of noninoculated plants (Table 3). Moreover, statistical differences ($P \leq 0.05$) were not found among control plants without stress and plants grown either in the presence of NaCl or with water saturation treatments (Table 3).

Effect of *acdS* gene encoding ACC deaminase on tomato root elongation. Root growth was enhanced by all bacterial treatments compared to the growth of noninoculated seeds (Table 4). However, root length was significantly greater with the wild-type and *acdS::* Ω Km(p*FacdS*⁺) treatments than with the *acdS::* Ω Km mutant treatment, although the bacterial populations associated with the roots from inoculated seedlings were not significantly different (Table 4).

Histochemical localization of β -glucuronidase activity. For the seedlings grown on filter paper and inoculated with the

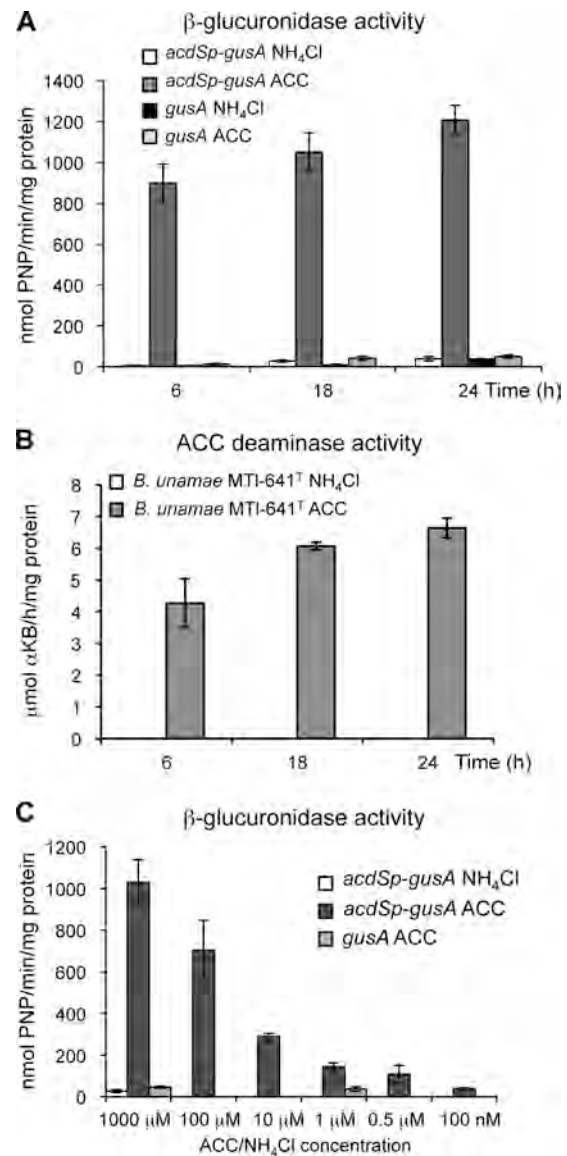


FIG. 3. *acdS* promoter expression and ACC deaminase activity. (A) Transcriptional activities of the *B. unamae acdSp-gusA* and promoterless *gusA*-negative strains. (B) ACC deaminase activities of *B. unamae* strain MTI-641^T. For panels A and B, cultures were grown in SM broth supplemented with 3 mM ACC or 3 mM NH₄Cl as a nitrogen source. (C) Expression profile for the *B. unamae acdSp-gusA* strain grown in SM broth supplemented with ACC at different concentrations or 1 mM NH₄Cl. The promoterless *gusA*-negative strain was tested using 1,000 μ M and 1 μ M ACC, and no activity was detected. The cultures were grown for 18 h before transcriptional activities were analyzed. PNP, *p*-nitrophenyl. For all of the experiments, the bars indicate the means of three independent assays performed in duplicate.

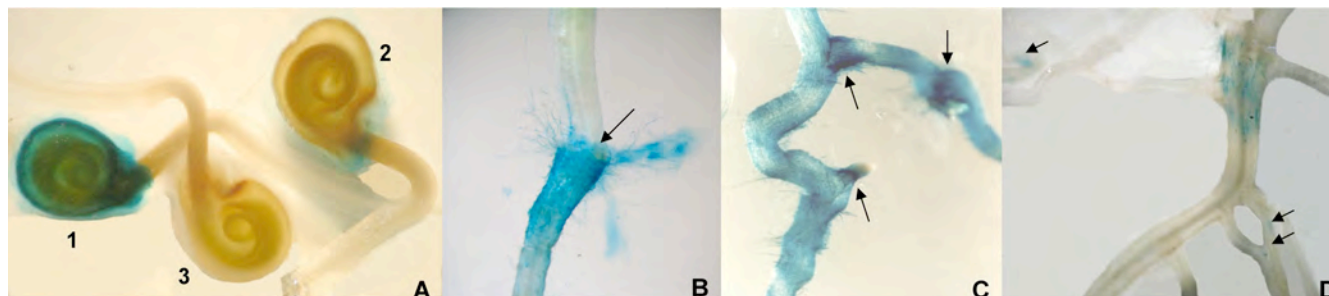


FIG. 4. Histochemical β -glucuronidase assays for localization of bacterial β -glucuronidase activity. (A) Germinated seeds grown on filter paper. Seedling 1, seed inoculated with the *s7p-gusA* strain (constitutive *gusA* strain); seedling 2, seed inoculated with the *acdSp-gusA* strain; seedling 3, seed inoculated with a promoterless *gusA* strain. (B and C) Seedlings grown in sand-filled tubes inoculated with the *s7p-gusA* strain. The arrows indicate the strongest β -glucuronidase activity at the stem base and points of emergence of lateral roots. (D) Inoculation of seedlings with the *acdSp-gusA* strain. The arrows indicate *gusA* expression on a reduced number of root sections.

s7p-gusA strain (constitutive *gusA* strain) there was an intense blue color on the whole surface of germinated tomato seeds and at the base of the radicle (Fig. 4A, seedling 1), while for the seedlings inoculated with the *acdSp-gusA* strain there was a very light blue color on the seed surface and a blue color at the base of radicle that was more intense than the color on the seed surface (Fig. 4A, seedling 2) but less intense than the color observed with the *s7p-gusA* strain. As expected, no blue color was detected on seedlings inoculated with a promoterless *gusA*-marked strain (Fig. 4A, seedling 3). Similar numbers of the three *gusA*-marked strains colonized the seedlings (7.37 ± 0.08 , 7.32 ± 0.24 , and 7.41 ± 0.25 log CFU/g root for the *acdSp-gusA*, *s7p-gusA*, and *gusA* strains, respectively). The root systems of seedlings grown on sand and inoculated with the *s7p-gusA* strain were well colonized (6.44 ± 0.12 log CFU/g roots), as revealed by intense blue staining of the tissue. The blue staining was most intense at the stem base and where lateral roots emerged (Fig. 4B and C). In contrast, the root systems of seedlings treated with the *acdSp-gusA* strain appeared to have less intense blue staining on fewer root sections (Fig. 4D). However, the root colonization by this strain (6.59 ± 0.14 log CFU/g root) was not statistically different from the root colonization of the plants inoculated with the *s7p-gusA* and *gusA* (6.59 ± 0.21 log CFU/g roots) strains used as positive and negative *gusA* expression controls, respectively. No blue color was detected on seedlings inoculated with the *gusA* strain (data not shown).

DISCUSSION

Considering the limited availability of *Burkholderia* strains, and since the genomic and phenotypic characteristics of strains of a particular bacterial species are the same or highly similar (1, 6, 12), only the type strains of most *Burkholderia* species were analyzed in this work. The results showed that ACC deaminase activity and the *acdS* gene are widely distributed in *Burkholderia* species. Since an activity of 20 nmol α -KB/h/mg protein has been reported (58) to be sufficient to cause plant growth promotion and activities of 2 to 15 μ mol α -KB/h/mg protein were detected for the strains tested, it appears that most of the plant-associated *Burkholderia* strains analyzed in this study, either rhizospheric (e.g., *B. xenovorans*, *B. phenoliruptrix*, and *B. graminis*) or endophytic (*B. unamae*, *B. silvatlan-*

tica, and *B. kururiensis*), could be considered potential plant growth-promoting bacteria. Similarly, the legume-nodulating species *B. phymatum* and *B. tuberum* could contribute to enhanced nodulation through ACC deaminase activity, as observed in pea plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (51) and in alfalfa plants inoculated with a *Sinorhizobium meliloti* strain expressing an introduced *acdS* gene (50). Homologs of *acdS* genes have been found in whole-genome sequences of *B. xenovorans* LB400^T (accession no. CP000271), *B. phymatum* STM815^T (accession no. CP001046), and *B. cenocepacia* J2315^T (accession no. AM747721), and their ACC deaminase activities were demonstrated in this work.

Interestingly, the topology of the *acdS* phylogenetic tree was fairly congruent with that of the bacterial 16S rRNA tree. Phylogenetic trees based on 16S rRNA and *acdS* sequences show separation of the genus *Burkholderia* into two major clusters, one of which is represented mainly by human-pathogenic species, including the opportunistic Bcc species (17). The second major cluster, phylogenetically distant from the Bcc, is formed solely by environmental nonpathogenic species, including mainly plant-associated, rhizospheric and/or endophytic bacteria, many diazotrophic organisms (53), and/or legume-nodulating species (13, 30, 68). Phylogenetic analysis indicated that *acdS* gene sequences of *Burkholderia* strains were highly conserved, even though the strains were isolated from different sources and from distant geographic regions. It is worth noting that there is tight clustering of the Bcc species analyzed in this work; their *acdS* gene sequences were clearly distinct from those of the plant-associated *Burkholderia* species, even *B. unamae* and *B. silvatlantica*. Although the cluster formed by *Burkholderia* species (*Betaproteobacteria*) was well separated from clusters containing a variety of *Alphaproteobacteria* (*R. leguminosarum* bv. *viciae* and *Mesorhizobium loti*) and *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas* spp. and *Enterobacter cloacae*), *Pseudomonas* sp. strain ACP (accession no. M73488) formed a cluster with *B. xenovorans* strains, and the *acdS* sequences of these strains were closely related to those of *B. phytofirmans* and *B. terricola*. Analysis based on nucleotide and protein sequences revealed high levels of identity (90 to 91% and 94 to 96%, respectively) between *B. xenovorans* strains CAC-124 and CCUG 2844 obtained in this work and *B. xenovorans* LB400^T (accession no. CP000271.1), TCo-382, and TCo-26 described previously (7). In contrast, alignment of the

acdS sequence of *Pseudomonas* sp. strain ACP and reported sequences of *P. putida* UW4 (accession no. AF0477710), *Pseudomonas fluorescens* 17 (accession no. UFU37103), *P. fluorescens* F113 (accession no. DQ125256), and *Pseudomonas* sp. strain 6G5 (accession no. M80882) showed levels of identity of 73 to 74% and 81 to 82% for nucleotide and protein sequences, respectively. Based on these data, lateral transfer of the *acdS* gene between *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*) and *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) has been suggested (3). Nevertheless, although the *acdS* gene sequence of strain ACP has been well characterized, we cannot exclude the possibility that this strain belongs to the genus *Burkholderia*, since strain ACP was tentatively classified as *Pseudomonas* sp. using a very limited set of phenotypic tests (43); to our knowledge, the exact taxonomic status of this strain has never been defined. Recently, a partial *acdS* gene sequence (797 nucleotides; accession no. DQ125247) of *B. caledonica* LMG 19076^T was reported (3). However, our results show that *B. caledonica* forms a tight cluster with *B. phenoliruptrix* and *B. graminis* (Fig. 1), but not with several *Pseudomonas* species described by Blaha et al. (3). Moreover, in a previous study (7) and in this study, we were unable to detect ACC deaminase activity and presence of the *acdS* gene in our original strain *B. tropica* BM-273 (31), as previously reported (3). The absence of ACC deaminase activity and of the *acdS* gene was confirmed using other six *B. tropica* strains (62). Our analyses based on 15 complete and 6 partial *acdS* sequences from *Burkholderia* strains belonging to 15 species and on the genomes of four other species (*B. xenovorans* LB400^T, *B. phytofirmans* PsJN^T, *B. phymatum* STM815^T, and *B. cenocepacia* J2315^T) do not support the lateral transfer hypothesis for such a gene in this genus, as previously suggested (3), although lateral transfer appears to have happened between bacteria belonging to other genera (44).

Although the N₂-fixing species *B. unamae* exhibited low ACC deaminase activity (however, the activity was high enough to promote plant growth), this species was chosen to assess the effect of the enzyme on tomato plant growth due to its phylogenetically distant relationship with the Bcc species and relevant features (6, 7, 59) compared to other *Burkholderia* species analyzed in this work. *B. unamae* wild-type strain MTI-641^T and derivative strains had very similar growth patterns in culture media and very similar abilities to colonize tomato roots. On this basis, the higher shoot and root dry weights of tomato plants inoculated with wild-type strain MTI-641^T could be attributed to the ACC deaminase activity, since the values for these parameters were significantly lower for plants inoculated with the ACC deaminase-negative mutant (*acdS*::ΩKm) and for noninoculated plants. A beneficial effect on tomato root elongation was consistently observed in plants inoculated with the wild-type strain and the complemented *acdS* mutant [*acdS*::ΩKm(p*FacdS*⁺)], as these two strains were similarly able to promote root elongation compared to the noninoculated plants and plants inoculated with the *acdS* mutant (*acdS*::ΩKm) strain. However, an additional plant growth-promoting mechanism seems to be expressed by *B. unamae* MTI-641^T, since the presence of the *acdS*::ΩKm mutant also increased, although at a lower rate than the wild type and the complemented strain, the root length of inoculated plants compared to noninoculated plants. A similar effect on the chloro-

phyll content of the plants inoculated with the *acdS*::ΩKm mutant compared to noninoculated plants was observed as well. Such an additional beneficial mechanism could be related to the ability of *B. unamae* MTI-641^T to synthesize auxins like indoleacetic acid (IAA), which is produced in culture media (unpublished results). The participation of bacterial IAA in plant growth promotion has been demonstrated in plant-rhizobacterium interactions in many studies (26). Thus, whether IAA synthesized by *B. unamae* MTI-641^T partially masked the positive effect of ACC deaminase on tomato plant growth could be demonstrated by engineering an *acdS* and IAA-negative mutant in further studies. Although it has been reported that some ACC deaminase-producing bacteria promote plant growth under stressful conditions, such as flooding (42) and saline conditions (54), in this work these stress conditions caused no significant differences in shoot or root dry weights between controls and stress treatments. It is possible that the method used to apply stress treatments was not strong enough to cause a significant reduction in the growth parameters analyzed and, as a consequence, plants could gradually undergo an adaptive process in response to mild or moderate stress without major changes in their growth (9, 21).

Tomato inoculation assays with the constitutive *gusA* strain (*s7p-gusA*) confirmed the ability of *B. unamae* to colonize seeds during germination and seedling roots, mainly at the radicle and stem base, as well as at the points of emergence of lateral roots. It has long been known that increased exudation of many organic compounds occurs in natural wounds, such as cracking of seed coats and damage by radicle and lateral root emergence (23). The colonization pattern and infection sites observed with *B. unamae* seem to be common features in plant-bacterium interactions; for instance, they occur with the endophytic bacteria *G. diazotrophicus* (45) and *Azoarcus* sp. strain BH72 (29) in association with gramineous plants and with *Burkholderia* sp. (currently *B. phytofirmans*) strain PsJN associated with *Vitis vinifera* (19). Although compared to the constitutive *gusA* strain a lower level of *gusA* expression was observed for the *acdSp-gusA* strain on germinating seeds and at the base of the radicle, the results presented here suggest that the concentration of ACC exuded was at least 0.5 μM (the minimum concentration required for induction of the *acdS* gene) just after the seed germinated, as well as in natural wound sites. Micromolar levels of ACC (range, 1 to 100 μM) were sufficient to induce expression of *AcdS* in *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K (52). Similarly, while *gusA* expression was observed along the root system (plants grown in sand) with the constitutive *gusA* strain, a reduced number of root sites showing *gusA* expression (which notably was highest at the base of the radicle and stem) were observed with the *acdSp-gusA* strain. It is known that root exudates differ in chemical composition and quantity, which vary at specific sites on roots (23). In addition, the impact of *AcdS* apparently is modest, and *AcdS* probably specifically affects local regulatory mechanisms, such as the mechanisms controlling root hair elongation in *Arabidopsis* inoculated with *Rhizobium* and *Pseudomonas* (20). Accordingly, this could explain the limited number of root sites where *gusA* expression was observed with the *acdSp-gusA* strain in a quantity of ACC sufficient to induce the *acdS* promoter induction at localized root sites. Even so, the localized effect produced by *B. unamae* MTI-641^T was enough to im-

prove seedling growth, as described above for the tomato inoculation experiments with wild-type strain MTL-641^T, and the root length observed with the *acdS*:: Ω Km(p*FacdS*⁺) strain.

Although the beneficial effect of ACC-expressing bacteria on plant growth, illustrated in this study with *B. unamae*, needs to be confirmed in field experiments, the widespread ACC deaminase activity in *Burkholderia* species and the common association of these species with plants suggest that this genus could be a major contributor to plant growth under natural conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Martínez-Aguilar for technical assistance and V. M. Hernández-Velázquez (CEIB-UAEM) for his valuable advice on statistical data analysis. We are grateful to Michael Dunn (CCG-UNAM) for reading the manuscript.

J.O.-L. is a Ph.D. student at the Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM and acknowledges fellowships from the CONACYT and the DGEP-UNAM.

REFERENCES

- Achouak, W., R. Christen, M. Barakat, M.-H. Martel, and T. Heulin. 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:787–794.
- Belimov, A. A., V. I. Safronova, T. A. Sergeeva, T. N. Egorova, V. A. Matveyeva, V. E. Tsyganov, A. Y. Borisov, I. A. Tikhonovich, C. Kluge, A. Preisfeld, K. J. Dietz, and V. V. Stepanok. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.* **47**:642–652.
- Blaha, D., C. Pringet-Combaret, M. S. Mirza, and Y. Moëgne-Loccoz. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**:455–470.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Burkholder, W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**:115–118.
- Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, and P. Estrada-de los Santos. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1165–1172.
- Caballero-Mellado J., J. Onofre-Lemus, P. Estrada-de los Santos, and L. Martínez-Aguilar. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5308–5319.
- Campbell, B. G., and J. A. Thomson. 1996. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:207–210.
- Cayuela, E., M. T. Estañ, M. Parra, M. Caro, and M. C. Bolarin. 2001. NaCl pre-treatment at the seedling stage enhances fruit yield of tomato plants irrigated with salt water. *Plant Soil* **230**:231–238.
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141–1156.
- Charles, T. C., and T. M. Finan. 1990. Genetic map of *Rhizobium meliloti* megaplasmid pRMeSU47B. *J. Bacteriol.* **172**:2469–2476.
- Chen, W.-M., S. M. de Faria, E. James, G. N. Elliott, K.-Y. Lin, J.-H. Chou, S.-Y. Sheu, M. Cnockaert, J. I. Sprent, and P. Vandamme. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:1055–1059.
- Chen, W.-M., E. K. James, T. Coenye, J.-H. Chou, E. Barrios, S. M. de Faria, G. N. Elliott, S.-Y. Sheu, J. I. Sprent, and P. Vandamme. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1847–1851.
- Coenye, T., D. Henry, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2004. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:623–627.
- Coenye, T., S. Laevens, A. Willems, M. Ohlén, W. Hannant, J. R. W. Govan, M. Gillis, E. Falsen, and P. Vandamme. 2001. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1099–1107.
- Coenye, T., E. Mahenthalingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1481–1490.
- Coenye, T., and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **5**:719–729.
- Compant, S., J. Nowak, T. Coenye, C. Clement, and E. A. Barka. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:607–626.
- Compant, S., B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, and E. Ait Barka. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1685–1693.
- Contesto, C., G. Desbrosses, C. Lefoulon, G. Béna, F. Borel, M. Galland, L. Gamet, F. Varoquaux, and B. Touraine. 2008. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Sci.* **175**:178–189.
- Cuartero, J., M. C. Bolarin, M. J. Asins, and V. Moreno. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *J. Exp. Bot.* **57**:1045–1058.
- Cui, Y., Q. Wang, G. D. Stormo, and J. M. Calvo. 1995. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* **177**:4872–4880.
- Curl, E. A., and B. Truelove. 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Dalmastrri, C., L. Chiarini, C. Cantale, A. Bevivino, and S. Tabacchioni. 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microb. Ecol.* **38**:273–284.
- Dell'Amico, E., L. Cavalca, and V. Andreoni. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* **40**:74–84.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, J. Caballero-Mellado, J. F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brenner, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**:871–879.
- Dombrecht, B., J. Vanderleyden, and J. Michiels. 2001. Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:426–430.
- Duan, J., K. M. Müller, T. C. Charles, S. Vesely, and B. R. Glick. 2009. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microb. Ecol.* **57**:423–436.
- Egener, T., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 1999. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**:813–819.
- Elliott, G. N., W. M. Chen, C. Bontemps, J. H. Chou, J. P. W. Young, J. I. Sprent, and E. K. James. 2007. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. *Ann. Bot.* **100**:1403–1411.
- Estrada, P., P. Mavingui, B. Cournoyer, F. Fontaine, J. Balandreau, and J. Caballero-Mellado. 2002. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can. J. Microbiol.* **48**:285–294.
- Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, and J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2790–2798.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**:379–381.
- Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**:147–154.
- Finan, T. M., B. Kunkel, G. F. de Vos, and E. R. Signer. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**:66–72.
- Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebban, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and M. P. Fernandez. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:274–289.
- Glick, B. R., C. B. Jacobson, M. M. K. Schwarse, and J. J. Pasternak. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**:911–915.
- Glick, B. R., D. M. Karaturovic, and P. C. Newell. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* **41**:533–536.
- Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Theor. Biol.* **190**:63–68.
- Goris, J., W. Dejonghe, E. Falsen, E. De Clerck, B. Geeraert, A. Willems, E. M. Top, P. Vandamme, and P. De Vos. 2002. Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pMET1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia*

- hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 25:340–352.
41. Goris, J., P. De Vos, J. Caballero-Mellado, J. Park, E. Falsen, J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and P. Vandamme. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400^T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1677–1681.
 42. Grincko, V. P., and B. R. Glick. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39:11–17.
 43. Honma, M., and T. Shimomura. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agric. Biol. Chem. 42:1825–1831.
 44. Hontzeas, N., A. O. Richardson, A. Belimov, V. Safranov, M. M. Abu-Omar, and B. R. Glick. 2005. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes. Appl. Environ. Microbiol. 71:7556–7558.
 45. James, E. K., V. M. Reis, F. L. Olivares, J. I. Baldandi, and J. Döbereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Bot. 45:757–766.
 46. Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901–3907.
 47. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5:150–163.
 48. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. ClustalW2 and ClustalX version 2. Bioinformatics 23:2947–2948.
 49. Li, J., D. H. Ovakim, T. C. Charles, and B. R. Glick. 2000. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. Curr. Microbiol. 41:101–105.
 50. Ma, W., T. Charles, and B. R. Glick. 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. Appl. Environ. Microbiol. 70:5891–5897.
 51. Ma, W., F. C. Guinel, and B. R. Glick. 2003. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. Appl. Environ. Microbiol. 69:4396–4402.
 52. Ma, W., S. B. Sebastianova, J. Sebastian, G. I. Burd, F. C. Guinel, and B. R. Glick. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. Antonie van Leeuwenhoek 83:285–291.
 53. Martínez-Aguilar, L., R. Díaz, J. J. Peña-Cabriales, P. Estrada-de los Santos, M. F. Dunn, and J. Caballero-Mellado. 2008. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. Appl. Environ. Microbiol. 74:4574–4579.
 54. Mayak, S., T. Tirosh, and B. R. Glick. 2004. Plant growth promoting bacteria that confer resistance in tomato to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42:565–572.
 55. Mayak, S., T. Tirosh, and B. R. Glick. 2004. Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. Plant Sci. 166:525–530.
 56. Nogales, B., E. R. Moore, E. Lobet-Brossa, R. Rosello-Mora, R. Amann, and K. N. Timmis. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. Appl. Environ. Microbiol. 67:1874–1884.
 57. Oke, V., and S. R. Long. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. Mol. Microbiol. 32:837–849.
 58. Penrose, D. M., and B. R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118:10–15.
 59. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, R. Castro-González, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. Appl. Environ. Microbiol. 72:3103–3110.
 60. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes, J. I. Baldani, P. Estrada-de los Santos, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. 2006. *Burkholderia silvaticana* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1931–1937.
 61. Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. Gene 127:15–21.
 62. Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V. L. D. Baldani, M. Schmid, J. I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann, and J. Caballero-Mellado. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2155–2162.
 63. Salles, J. F., J. A. van Veen, and J. D. van Elsland. 2004. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. Appl. Environ. Microbiol. 70:4012–4020.
 64. Saravanakumar, D., and R. Samiyappan. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. J. Appl. Microbiol. 102:1283–1292.
 65. Sessitsch, A., T. Coenye, A. V. Sturz, P. Vandamme, E. Ait Barka, J. F. Salles, J. D. Van Elsland, D. Faure, B. Reiter, and B. R. Glick. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1187–1192.
 66. Sheehy, R. E., M. Honma, M. Yamada, T. Sasaki, B. Martineau, and W. R. Hiatt. 1991. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. J. Bacteriol. 173:5260–5265.
 67. Uchiumi, T., T. Ohwada, M. Itakura, H. Mitsui, N. Nukui, P. Dawadi, T. Kaneko, S. Tabata, T. Yokoyama, K. Tejima, K. Saeki, H. Omori, M. Hayashi, T. Maekawa, R. Sriprang, Y. Murooka, S. Tajima, K. Simomura, M. Nomura, A. Suzuki, Y. Shimoda, K. Sioya, M. Abe, and K. Minamisawa. 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. J. Bacteriol. 186:2439–2448.
 68. Vandamme, P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, and A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 25:507–512.
 69. Vandamme, P., E. Mahenthalingam, B. Holmes, T. Coenye, B. Hoste, P. de Vos, D. Henry, and D. P. Speert. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin. Microbiol. 38:1042–1047.
 70. Viallard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Ophel-Keller, and J. Balandreau. 1998. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of (*Pseudomonas*) *phenazine*, (*Pseudomonas*) *pyrocincta*, and (*Pseudomonas*) *glathai* as *Burkholderia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:549–563.
 71. Vieira, V., and J. Messing. 1991. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. Gene 100:189–194.
 72. Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers. J. Plant Physiol. 144:307–313.
 73. Wilson, K. J., S. G. Huges, and R. A. Jefferson. 1992. The *Escherichia coli* *gus* operon, induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria, p. 7–23. In S. R. Gallagher (ed.), *Gus protocols, using the gus gene as a reporter of gene expression*, vol. 1. Academic Press, San Diego, CA.
 74. Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36:1251–1275.
 75. Zhang, H., S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:743–749.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que la actividad ACC desaminasa, así como la presencia del respectivo gene están ampliamente distribuidos en diferentes especies de *Burkholderia* tanto ambientales, como asociadas a plantas y en patógenos oportunistas. Sobre esta base, la mayor parte de especies analizadas podrían ser consideradas como potenciales bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, será necesario ampliar el estudio en el conocimiento de las características benéficas, las interacciones planta-bacteria y la ecología de cada especie analizada para en un futuro poder explotar su uso en la agricultura.

Comprender las diferencias genéticas entre las bacterias patógenas y las bacterias benéficas es un tema básico que de manera general ha recibido poca atención. En algunos estudios se ha encontrado la presencia del sistema de secreción tipo-III e islas genéticas en especies de bacterias no patógenas, incluyendo algunos simbioses (Ockman & Moran, 2001; Mazurier *et al.* 2004; Rezzonico *et al.* 2004). Dichas características habían sido consideradas específicas de bacterias patógenas. Sin embargo, en algunas especies rizobiales existen proteínas conocidas colectivamente como Nops (del inglés, nodulation outer proteins) que en respuesta a los flavonoides son secretadas a través del sistema de secreción tipo-III y están involucradas en la determinación del tipo de hospederos, en la modulación de la respuesta de defensa en las plantas y en la eficiencia simbiótica. Estos hallazgos sugieren que algunos rizobios pueden manipular la respuesta metabólica del hospedero utilizando mecanismos comunes a los utilizados por los patógenos (López-Bahena *et al.* 2009). De forma similar, ciertos genes asociados con interacciones benéficas por ejemplo los genes *nifU* y *nifS* son esenciales para la viabilidad del patógeno *Helicobacter pilory* causante de úlceras estomacales en humanos (Olson *et al.* 2000). Como fue mencionado con anterioridad, la mayor parte de las especies analizadas en este trabajo han sido encontradas en asociación con diferentes plantas incluyendo algunas especies del complejo Bcc como por ejemplo *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, y *B. vietnamiensis*. Estas especies expresaron la enzima ACC desaminasa activa. Así mismo, los probables genes *acdS* están presentes en los genomas de diferentes cepas de *B. mallei* (no. acc. CP000011) y *B. pseudomallei* (no. acc. CP000573), ambas especies patógenas de animales y humanos (Pringet-Combaret *et al.* 2008). Sin embargo, la síntesis del ACC parece estar limitado al

metabolismo vegetal y no hay evidencia de la producción de este aminoácido en animales y humanos (Koch *et al.* 2001), por lo que la función de la ACC desaminasa putativa en estas especies es desconocida.

El análisis de las secuencias de los genes *acdS* generó árboles filogenéticos parcialmente similares a los árboles obtenidos basados en la secuencia del gene 16S, mostrando dos grandes grupos con una clara separación entre el grupo de los patógenos oportunistas (complejo Bcc) y el grupo de las especies ambientales, fijadoras de nitrógeno y asociadas a plantas. También, el análisis filogenético del gene *acdS* mostró alta conservación entre diferentes especies del género *Burkholderia* aisladas de diversas fuentes y regiones geográficas. Además, el grupo de genes *acdS* formado por las especies de *Burkholderia* que pertenecen a la subdivisión de las β -proteobacterias mantuvo una clara separación del grupo de las especies de α -proteobacterias como *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti* así como también de algunas γ -proteobacterias, por ejemplo algunas especies de *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Por otro lado, se encontró que el gene *acdS* de *Pseudomonas* sp. ACP forma un grupo con los genes *acdS* de diferentes cepas del género *Burkholderia* analizadas, particularmente de *B. xenovorans*. Estos resultados apoyarían la propuesta de transferencia lateral de genes *acdS* entre diferentes especies de las β y γ proteobacterias, e incluyendo algunas cepas de especies de *Burkholderia* (Blaha *et al.* 2006; Hontzeas *et al.* 2005). No obstante, las conclusiones obtenidas en los estudios referidos estuvieron basadas en su mayoría en secuencias de genes *acdS* incompletas, incluyendo algunas cepas cuya clasificación taxonómica es dudosa, ya que fueron descritas solamente con base en un número limitado de pruebas fenotípicas, como es el caso de *Pseudomonas* sp. ACP (Honma & Shimomura, 1978). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran discrepancias importantes con relación al estudio de Blaha *et al.* (2006). Por ejemplo, la secuencia parcial del gene *acdS* de *B. caledonica* 19076^T mostró 76% de identidad a nivel de nucleótidos comparada con la secuencia completa (1017 pb) de la misma cepa analizada en nuestro trabajo; tampoco observamos relación de este gene con los genes de diversas cepas de *Pseudomonas* como fue descrito previamente. A diferencia del trabajo de Blaha *et al.* (2006), en nuestro estudio no fue detectada la actividad ACC desaminasa ni el gene *acdS* en ninguna de las cepas de *Burkholderia tropica* analizadas, incluyendo las 2 evaluadas por estos autores. Por todo lo anterior, además de la alta conservación que se observó entre los genes *acdS* de diferentes especies de *Burkholderia* analizadas en este

trabajo, no existe evidencia suficiente para apoyar la hipótesis de transferencia lateral extensiva entre diferentes especies del género, aunque no se descarta la posibilidad de que haya ocurrido entre bacterias de otros géneros (Hontzeas *et al.* 2005).

Debido a la presencia de la actividad ACC desaminasa y a las características de PGPR observadas en *B. unamae*, la cepa MTI-641^T fue seleccionada para aislar el gene *acdS* completo, incluyendo las secuencias regulatorias, y también para analizar el efecto del gene *acdS* sobre el crecimiento del tomate.

La enzima ACC desaminasa y el probable regulador transcripcional LRP en *B. unamae* MTI-641^T mostraron la misma organización genómica con respecto a lo reportado en otros estudios (Li & Glick, 2001; Ma *et al.* 2003a). La proteína LRP fue descrita como una proteína esencial para la expresión del gene *acdS* en las bacterias *P. putida* UW4 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K (Li & Glick, 2001; Ma *et al.* 2003a). También, en *P. putida* UW4 y *A. lipoferum* 4B ha sido descrita la presencia de cajas de unión a otros reguladores transcripcionales como CRP y FNR (Li & Glick, 2001; Pringet-Combaret *et al.* 2008). Por el contrario, en un análisis realizado con otras 10 cepas de *R. leguminosarum* no se encontraron todos los elementos regulatorios referidos, lo cual podría sugerir un mecanismo de regulación diferente en esta especie (Duan *et al.* 2009). En la región intergénica localizada entre los genes *acdS* y *lrpI* de la cepa MTI-641^T fueron encontradas dos probables cajas de unión a LRP y promotores dependientes de σ -70. Estos resultados apoyan la posibilidad de que el gene *acdS* pueda estar regulado bajo el control de LRP. Sin embargo, en el análisis de la secuencia intergénica no se encontró la presencia de las cajas de unión a CRP y FNR por lo que el mecanismo de regulación del gene *acdS* propuesto previamente (Li & Glick, 2001; Cheng *et al.* 2008) parece tener algunas variantes entre cepas y especies.

El crecimiento de plantas de tomate inoculadas con la cepa silvestre comparado con el de las plantas inoculadas con la cepa mutante (*acdS*:: Ω Km) fue significativamente mayor. Los efectos de la mutación del gene *acdS* producen efectos fisiológicos similares en plantas de canola y chícharo inoculadas con bacterias mutantes en el gene *acdS* (Li *et al.* 2000; Ma *et al.* 2003a). Así mismo, la cepa complementada en la mutación del gene *acdS* [*acdS*:: Ω Km (pFacdS+)] restauró la habilidad de promover la elongación en las raíces de

las plantas, demostrando la participación de la enzima ACC desaminasa de *B. unamae* MTI-641^T en la promoción del crecimiento vegetal.

La disminución en el efecto promotor del crecimiento de las plantas producido por la cepa mutante no está relacionado con la alteración del metabolismo general de las bacterias, ya que la tasa de crecimiento observada en esta cepa fue similar a la encontrada en la cepa silvestre. También se observó que no hubo diferencias significativas en la capacidad de ambas cepas para colonizar las raíces del tomate, confirmando resultados previos (Belimov *et al.* 2008; 2009) en donde la carencia de la actividad ACC desaminasa no afecta la colonización y la distribución de las bacterias *Variovorax paradoxus* 5C-2 y *Pseudomonas brassicacearum* Am2 asociadas a las raíces de diferentes plantas.

Cabe resaltar, que existen diferentes mecanismos bacterianos en la cepa *B. unamae* MTI-641^T que podrían actuar de forma coordinada, favoreciendo el crecimiento vegetal (Caballero-Mellado *et al.* 2007). Por ejemplo, la cepa mutante *acdS*:: Ω Km fue capaz de promover la elongación de la raíz y el contenido de clorofila en plantas de tomate, en comparación con las plantas no inoculadas. El efecto promotor de la cepa *acdS*:: Ω Km deficiente en la actividad ACC desaminasa podría deberse a la producción de IAA, ya que en estudios previos fue posible detectar la producción de esta hormona en la cepa *B. unamae* MTI-641^T (resultados no publicados). Es conocido, que las auxinas favorecen la iniciación y elongación de las raíces (Jackson, 1991). De acuerdo a estos datos, es probable que el IAA producido por *B. unamae* MTI 641^T esté involucrado en la promoción de la elongación de la raíz del tomate, aunque la participación del IAA tendría que ser evaluada mediante la construcción de mutantes deficientes en la vía de síntesis de esta hormona.

La colonización bacteriana exitosa de las raíces de las plantas es una característica necesaria para producir efectos benéficos en el crecimiento vegetal. Por lo anterior, es importante conocer la distribución de las bacterias en las raíces y localizar los sitios de adhesión e interacción. En este estudio, fue posible observar la colonización bacteriana de las raíces del tomate a través de análisis microscópicos monitoreando una cepa de *B. unamae* marcada con el gene reportero *gusA* (Fig. 1-3, Anexo 3). Los resultados mostraron la distribución de las bacterias a lo largo de la epidermis de las raíces del

tomate, formando agregados notables principalmente en el cuello del tallo, y en los sitios de emergencia de las raíces laterales, alcanzando poblaciones de $7.4 \log$ c. f. u. / g de raíz, suficientes para producir un efecto benéfico en el metabolismo vegetal (Okon & Itzigsohn, 1995). Sin embargo, no fue posible detectar con exactitud la localización bacteriana en los tejidos internos, debido a la calidad de los cortes obtenidos. También, fue posible detectar la expresión del gene *acdS* en asociación con plantas de tomate. Bajo las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo, se encontró que la expresión del gene *acdS* fue baja, no obstante, suficiente para producir efectos benéficos en el crecimiento de las plantas.

CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo demuestran que la presencia del gene *acdS*, y la actividad ACC desaminasa es una característica común del género *Burkholderia*. También, fue demostrada la inducción de la expresión del gene *acdS* y los efectos benéficos producidos por la enzima ACC desaminasa de *B. unamae* MTI-641^T en asociación con plantas de tomate.

PERSPECTIVAS

1.- El papel de la ACC desaminasa en el metabolismo bacteriano de los patógenos y sus hospederos es desconocido, por lo que sería de gran interés detectar la actividad ACC desaminasa en estas bacterias y ampliar el estudio de la participación de esta enzima en diversos nichos ecológicos.

2.- La funcionalidad de los elementos regulatorios encontrados corriente arriba del gene *acdS* deben ser confirmados a través de la construcción de mutantes en el gene *lrpI* y el análisis de la secuencia intergénica con mutaciones puntuales, deleciones y ensayos de retardo de proteínas utilizando al regulador LRP.

3.- Detectar la actividad *in vitro* del gene reportero *gusA* en plantas inoculadas con la cepa *acdSp-gusA*. Será interesante analizar la expresión de la enzima ACC desaminasa en asociación con plantas de tomate en diversas etapas de crecimiento y bajo distintas condiciones ambientales, por ejemplo estrés más severo.

4.- Determinar la actividad ACC desaminasa en las bacterias asociadas a raíces de plantas inoculadas con diferentes especies de *Burkholderia* benéficas y no patógenas.

5.- La probable participación del IAA bacteriano en la promoción del crecimiento del tomate tendría que ser evaluada mediante la construcción de mutantes deficientes en la vía de síntesis de esta hormona. Además, sería interesante evaluar si existe alguna interacción entre algunos reguladores del crecimiento vegetal como las auxinas, y la enzima ACC desaminasa de *B. unamae*.

6.- Determinar la posición taxonómica exacta a través de un enfoque polifásico en las cepas analizadas en estudios filogenéticos anteriores para evitar confusiones futuras.

7.- Analizar la existencia de correlación positiva entre los niveles de actividad ACC desaminasa y la promoción de la elongación de las raíces de las plantas utilizando diferentes especies y cepas de *Burkholderia*.

8.- Analizar y procesar muestras de raíces inoculadas con *B. unamae* MTI-641^T para la obtención de cortes finos y ultrafinos de alta calidad. Corroborar mediante análisis inmunohistoquímicos e histológicos la colonización endófito y rizoférica de *B. unamae* MTI-641^T en el tejido vegetal.

RESULTADOS ADICIONALES

ANEXO 1

Tabla 1. Origen of especies y cepas de *Burkholderia* analizadas y la capacidad de crecimiento en medio mínimo con ACC utilizando diversas fuentes de carbono.

Especie y cepa		Fuente de aislamiento y características relevantes ^A	Ref. ^B	Crecimiento en SM-ACC 3 mM ^C
<i>B. unamae</i>	MTI-641 ^T	Rizosfera de maíz; endófito; PGPR*	32	1
	CAC-98	Rizosfera de café	32	1
	CAC-382	Rizoplano de café	32	1
	CGC-72	Rizoplano de café	32	1
	CGC-321	Rizosfera de café	32	1
	M2Cy-711	Rizosfera de maíz	12	1
	MEd-9573	Tallo de maíz; endófito	12	1
	SCCu-23	Raíz de caña de azúcar; endófito	12	1
	SCZa-39	Tallo de caña de azúcar; endófito	12	1
	SCZa-211	Tallo de caña de azúcar; endófito	12	1
	<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75 ¹	Rizosfera de arroz; PGPR*	36
CCE-101		Rizoplano de café	32	2
CCE-211		Raíz de café	32	2
MMi-324		Rizosfera de maíz	32	2
MMi-344		Raíz de maíz	32	2
MMi-1547		Rizoplano de maíz	32	2
SXo-702		Planta de sorgo	32	2
TVV69		Rizosfera de arroz	36	2
TVV72		Rizosfera de arroz	36	2

A. Todas las cepas analizadas en las dos especies de *Burkholderia* son bacterias fijadoras de nitrógeno.

B. Número de Referencia.

C. SM, medio mínimo sólido de sales minerales con ACC 3 mM. **1**, crecimiento en medio mínimo utilizando 0.2% de ácido azelaico, succinato, malato, glicerol, manitol, glucosa, fructuosa o sacarosa como única fuente de carbono y ACC como única fuente de nitrógeno. **2**, crecimiento en medio mínimo utilizando 0.2% de succinato, malato, glicerol, manitol, glucosa, fructuosa o sacarosa como única fuente de carbono y ACC como única fuente de nitrógeno.

*PGPR. Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

Tabla 2. Actividad ACC desaminasa en especies del género *Burkholderia*

Espece-cepa	Actividad ACC desaminasa μmol αKB/h/mg proteína
<i>B. ambifaria</i> 6991	ND
<i>B. caledonica</i> LMG 19076 ^I	12.11 ± 3.25
<i>B. caribensis</i> MWAP64 ^T	3.91 ± 1.03
<i>B. caryophylli</i> LMG 2155 ^I	5.49 ± 0.18
<i>B. cenocepacia</i> J2315 ^I	2.63 ± 0.23
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416 ^T	4.84 ± 0.41
<i>B. fungorum</i> LMG 16225 ^I	2.46 ± 0.13
<i>B. graminis</i> C4D1M ^T	10.19 ± 0.51
<i>B. kururiensis</i> KP23 ^I	5.17 ± 0.31
<i>B. phenoliruptrix</i> LMG 22037 ^I	2.13 ± 0.71
<i>B. phymatum</i> STM 815 ^T	3.88 ± 0.46
<i>B. phytofirmans</i> PsJN ^I	12.03 ± 0.43
<i>B. silvatlantica</i> SRMrh-20 ^T	15.03 ± 0.66
<i>B. silvatlantica</i> AB48	10.52 ± 0.78
<i>B. silvatlantica</i> PPCR-2	11.67 ± 0.18
<i>B. stabilis</i> LMG 14294 ^I	11.85 ± 1.58
<i>B. terricola</i> LMG 20594 ^I	12.59 ± 0.46
<i>B. tropica</i> Ppe8 ^T	ND
<i>B. tropica</i> BM16	ND
<i>B. tropica</i> BM273	ND
<i>B. tropica</i> MOc-725	ND
<i>B. tropica</i> MTo-293	ND
<i>B. tropica</i> MXo-435	ND
<i>B. tuberum</i> STM 678 ^I	4.63 ± 0.59
<i>B. unamae</i> MTI-641 ^T	4.52 ± 0.26
<i>B. unamae</i> CAC-98	4.21 ± 0.32
<i>B. unamae</i> CAC-382	4.31 ± 0.02
<i>B. unamae</i> CGC-72	4.44 ± 0.46
<i>B. unamae</i> CGC-321	2.62 ± 0.31
<i>B. unamae</i> M2Cy-711	2.96 ± 0.41
<i>B. unamae</i> MEd-9573	3.55 ± 0.42
<i>B. unamae</i> SCCu-23	4.46 ± 0.26
<i>B. unamae</i> SCZa-39	3.66 ± 0.37
<i>B. unamae</i> SCZa-211	3.68 ± 0.31
<i>B. vietnamiensis</i> TVV75 ^T	7.21 ± 0.32
<i>B. vietnamiensis</i> LMG-6999	4.16 ± 0.45
<i>B. vietnamiensis</i> CCE-101	6.40 ± 0.52
<i>B. vietnamiensis</i> MMi-324	3.41 ± 0.44
<i>B. vietnamiensis</i> MMi-344	4.00 ± 0.13
<i>B. vietnamiensis</i> SXo-702	3.74 ± 0.3
<i>B. vietnamiensis</i> TVV69	6.77 ± 0.7
<i>B. xenovorans</i> LB400 ^T	11.21 ± 0.37
<i>B. xenovorans</i> CAC-124	7.94 ± 0.2
<i>B. xenovorans</i> LMG16224	6.71 ± 0.11

ND. No detectada

ANEXO 2. Artículo

Caballero-Mellado J, **J. Onofre-Lemus**, P. Estrada-de los Santos & L. Martínez-Aguilar. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol* 73: 5308–5319.

The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation[∇]

Jesús Caballero-Mellado,* Janette Onofre-Lemus, Paulina Estrada-de los Santos,
and Lourdes Martínez-Aguilar

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Received 8 February 2007/Accepted 20 June 2007

Burkholderia strains are promising candidates for biotechnological applications. Unfortunately, most of these strains belong to species of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) involved in human infections, hampering potential applications. Novel diazotrophic *Burkholderia* species, phylogenetically distant from the Bcc species, have been discovered recently, but their environmental distribution and relevant features for agro-biotechnological applications are little known. In this work, the occurrence of N₂-fixing *Burkholderia* species in the rhizospheres and rhizoplanes of tomato plants field grown in Mexico was assessed. The results revealed a high level of diversity of diazotrophic *Burkholderia* species, including *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, and two other unknown species, one of them phylogenetically closely related to *B. kururiensis*. These N₂-fixing *Burkholderia* species exhibited activities involved in bioremediation, plant growth promotion, or biological control in vitro. Remarkably, *B. unamae* and *B. kururiensis* grew with aromatic compounds (phenol and benzene) as carbon sources, and the presence of aromatic oxygenase genes was confirmed in both species. The rhizospheric and endophyte nature of *B. unamae* and its ability to degrade aromatic compounds suggest that it could be used in rhizoremediation and for improvement of phytoremediation. *B. kururiensis* and other *Burkholderia* sp. strains grew with toluene. *B. unamae* and *B. xenovorans* exhibited ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase activity, and the occurrence of *acdS* genes encoding ACC deaminase was confirmed. Mineral phosphate solubilization through organic acid production appears to be the mechanism used by most diazotrophic *Burkholderia* species, but in *B. tropica*, there presumably exists an additional unknown mechanism. Most of the diazotrophic *Burkholderia* species produced hydroxamate-type siderophores. Certainly, the N₂-fixing *Burkholderia* species associated with plants have great potential for agro-biotechnological applications.

It is well known that hundreds of thousands of bacterial species remain to be discovered and cultured, representing a substantial reservoir of genetic diversity and great potential for biotechnological applications. Although most of the bacteria inhabiting common environments (e.g., agricultural soils and plants) have not yet been grown in culture, many of them could be cultivated using standard methods. However, for many environments, research on microbial taxonomy and ecology is lacking. Unfortunately, novel bacterial species are often described based on the analysis of a very limited set of isolates (59), commonly one to three. This is true for many bacterial species, including several belonging to the genus *Burkholderia*. For example, the species *B. kururiensis* (80), *B. sacchari* (9), *B. phenoliruptrix* (16), *B. terrae* (79), *B. tuberum*, and *B. phymatum* (73) were recently described on the basis of a single isolate analyzed, and consequently, their environmental distribution and ecological role are unknown. *B. kururiensis* and *B. sacchari* were described as species with abilities to degrade trichloroethylene and to biotechnologically produce polyhydroxyalkanoic acids, respectively, but new studies related to their ecologies or applications are largely lacking. The nitrogen-

fixing species *B. xenovorans* was described on the basis of three isolates (32); strain LB400^T was isolated from polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated soil in Moreau, NY, strain CAC-124 was isolated from the rhizosphere of a coffee plant cultivated in Veracruz, Mexico, and strain CCUG 28445 was recovered from a blood culture in Sweden. Although strain LB400^T is the best-studied PCB degrader, and its pathways for degradation of these compounds have been extensively characterized at the genetic and molecular levels (25, 35), strains CAC-124 and CCUG 28445 have been only partially analyzed and do not share the biphenyl-biodegrading capacities of strain LB400^T (32). Recently, one *B. xenovorans* isolate was recovered from the rhizosphere of maize cultivated in The Netherlands (62). Although the complete genome of *B. xenovorans* LB400^T was recently sequenced (12), it is noteworthy that the four extant *B. xenovorans* strains described in diverse studies have been randomly recovered from different environments and widely distant geographical regions, and there are no studies on the distribution of this PCB-degrading, nitrogen-fixing species or its association with plants. Emphasis has been given to studies of the isolation, taxonomy, and distribution of *Burkholderia* species related to human opportunistic pathogens, especially the *B. cepacia* complex species found in cystic fibrosis patients (33, 45, 52; for reviews, see references 15 and 42). In contrast, few studies have been performed on the overall diversity of the genus *Burkholderia* (61, 63), even though non-pathogenic *Burkholderia* species are frequently recovered from

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (52 777) 329 17 03. Fax: (52 777) 317 55 81. E-mail: jesuscab@cegenam.mx.

[∇] Published ahead of print on 29 June 2007.

TABLE 1. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the rhizospheres of Saladet variety tomato plants cultivated in different geographical regions of Mexico

Locality	Species	Strain	Source
Coatlán del Río, Morelos	<i>B. xenovorans</i>	TCo-26	Rhizoplane
Coatlán del Río, Morelos	<i>B. xenovorans</i>	TCo-213	Rhizosphere
Coatlán del Río, Morelos	<i>B. xenovorans</i>	TCo-39	Rhizosphere
Coatlán del Río, Morelos	<i>B. xenovorans</i>	TCo-382	Rhizosphere
Atlatlahuacan, Morelos	<i>B. unamae</i>	TAtl-371	Rhizosphere
Atlatlahuacan, Morelos	<i>B. unamae</i>	TAtl-3711	Rhizoplane
Atlatlahuacan, Morelos	<i>B. unamae</i>	TAtl-3742	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>B. unamae</i>	TNe-832	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>B. unamae</i>	TNe-873	Rhizosphere
Santa Inés, State of Mexico	<i>B. unamae</i>	TSi-883	Rhizosphere
Tetecala, Morelos	<i>B. unamae</i>	TTe-829	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>B. tropica</i>	TNe-865	Rhizoplane
Nepantla, State of Mexico	<i>B. tropica</i>	TNe-831	Rhizosphere
Santa Inés, State of Mexico	<i>B. tropica</i>	TSi-882	Rhizoplane
Santa Inés, State of Mexico	<i>B. tropica</i>	TSi-887	Rhizoplane
Santa Inés, State of Mexico	<i>B. tropica</i>	TSi-888	Rhizoplane
Tetecala, Morelos	<i>B. tropica</i>	TTe-791	Rhizosphere
Tetecala, Morelos	<i>B. tropica</i>	TTe-797	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp. (Bkr)	TNe-834	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp. (Bkr)	TNe-841	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp. (Bkr)	TNe-8641	Rhizoplane
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp. (Bkr)	TNe-8682	Rhizosphere
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp. (Bkr)	TNe-878	Rhizoplane
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp.	TNe-861	Rhizoplane
Nepantla, State of Mexico	<i>Burkholderia</i> sp.	TNe-862	Rhizoplane

different environments (6, 40, 70), and despite their biotechnological potential in bioremediation and other applications (34, 70; for a review, see reference 48). Knowledge of novel diazotrophic *Burkholderia* species (11, 32, 50, 54), including legume nodule symbionts (14, 73), phylogenetically greatly distant from the *B. cepacia* complex species, has come very recently, but their environmental distribution and relevant features for agronomic and environmental applications are little known (13, 27, 32, 49).

Bacteria are involved in degradation processes of many aromatic compounds released into the environment by the decay of plant material or by anthropogenic activity. Phenolic compounds and polymers containing benzene rings (e.g., lignins) are natural aromatic compounds (21, 29). However, phenol is a man-made aromatic compound and along with its derivatives is considered a major hazardous compound in industrial wastewater. Similarly, aromatic hydrocarbons like benzene and toluene are common pollutants of soil and groundwater (78). Soil microorganisms are capable of using aromatic compounds as sole carbon sources, owing to aerobic biodegradation catalyzed by mono- or dioxygenases (3, 78). In the last few years, rhizoremediation (microbial degradation of hazardous compounds in the rhizosphere) and phytoremediation (the use of plants to extract and degrade harmful substances) have been considered alternatives for decontamination of soils. In addition, bacteria are able to exert positive effects on plants through various mechanisms. For instance, nitrogen fixation (the natural transformation of atmospheric N₂ to ammonia) contributes organic nitrogen for plant growth (28), while the bacterial enzyme 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase hydrolyzes ACC (the immediate precursor of ethylene) and lowers the levels of ethylene produced in developing or stressed plants, promoting root elongation (30). Some

bacteria solubilize insoluble minerals through the production of acids, increasing the availability of phosphorus and other nutrients to plants in deficient soils (55). Several bacteria improve plant growth through suppression of pathogens by competing for nutrients, by antibiosis, or by synthesizing siderophores, which can solubilize and chelate iron from the soil and inhibit the growth of phytopathogenic microorganisms (23).

This work was aimed at revealing the occurrence of nitrogen-fixing *Burkholderia* species associated with tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants cultivated in different locations in Mexico. We found that the rhizosphere of tomato is a reservoir of different known and unknown diazotrophic *Burkholderia* species that are able to exhibit in vitro some activities involved in bioremediation, plant growth promotion, and biological control.

MATERIALS AND METHODS

Crop and locations. Saladet variety tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants were collected in Atlatlahuacan and Tetecala (two collections from different farms), Morelos, and Nepantla and Santa Inés, State of Mexico, Mexico (Table 1).

Tomato plant samples. Eight to 10 complete flowering plants, field grown 20 m apart in each region, were randomly collected. Care was taken to keep the rhizosphere intact around the root. Samples of the rhizospheres and rhizoplanes (root surfaces) of the tomato plants were analyzed for recovery of the N₂-fixing isolates 4 to 5 hours after collection.

Media, culture conditions, and diazotrophic *Burkholderia* isolation. Rhizosphere and plant samples were treated as described previously (27). Purified colonies were assayed for nitrogenase activity by the acetylene reduction activity (ARA) method (10) with vials containing 5 ml of N-free semisolid *Burkholderia* malate-glucose-mannitol (BMGM) medium (27). ARA-positive colonies were maintained in 20% glycerol at -80°C prior to characterization.

Total DNA isolation and 16S rRNA-specific primers. Genomic DNA was isolated from bacterial cells by using published protocols (2). ARA-positive isolates were presumptively assigned to the genera *Burkholderia* and *Ralstonia* by

amplifying the 16S rRNA gene with the specific primers BuRa-16-1 and BuRa-16-2, using PCR conditions described previously (5). In addition, a new specific primer pair was designed in order to get a PCR-amplified product larger than the 409-bp amplicon obtained with primers BuRa-16-1/BuRa-16-2. *Burkholderia-Ralstonia* 16S rRNA genes were amplified using the PCR primer GB-F (5'-AG TAATACATCGGAACRTGT-3'), described previously (49), and a primer named GB-R (5'-GGSTTGGCRACCTCTGTT-3'), designed in the present study. The specificity of the GB-F/GB-R primer pair was tested with most (31 out of 40) of the well-known *Burkholderia* species as well as with *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia solanacearum* strains. The PCR mixtures contained 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, a 250 μM concentration of the deoxynucleoside triphosphates, 5 pmol of each primer, and 1.0 U of *Taq* polymerase. PCR conditions were as follows: initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 45 s at 58°C, and elongation for 1 min at 72°C, followed by a final 5-min elongation at 72°C. The reaction amplified a 1,100-bp fragment.

ARA-positive isolates were confirmed as belonging to the genus *Burkholderia* by amplifying the 16S rRNA genes with the GB-F/GBN2-R-specific primer pair, using PCR conditions described previously (49).

ARDRA. Primers fD1 and rD1 were used for amplifying the 16S rRNA gene (77), using PCR conditions described previously (27). The PCR-amplified 16S rRNA genes (ca. 1.5 kb) were restricted with seven enzymes (AluI, DdeI, HaeIII, HhaI, HinfI, MspI, and RsaI), and the restriction fragments were separated as described previously (27). The restriction patterns were compared, and each isolate was assigned to an amplified 16S rRNA gene restriction analysis (ARDRA) genotype, defined by the combination of the restriction patterns obtained with the seven restriction endonucleases (27). Similarities among the 16S rRNA gene sequences were estimated from the proportions of shared restriction fragments by using the method of Nei and Li (47). A dendrogram was constructed from the resulting distance matrix by using the unweighted pair group method with averages (67).

16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Representative acetylene-reducing strains corresponding to each ARDRA genotype identified among isolates recovered from tomato plants were chosen for 16S rRNA gene sequencing. To obtain 16S rRNA sequences, PCR products were cloned as described previously (49), and the 16S rRNA gene sequences were determined at the Biotechnology Institute, UNAM (Mexico). The 16S rRNA gene sequences were deposited in the EMBL/GenBank database. These sequences were compared with previously published 16S rRNA gene sequences from *Burkholderia* species and related bacteria, such as *Ralstonia* and *Pandorea*. The multiple alignments of the sequences were performed with CLUSTAL W software (69). The tree topology was inferred by the neighbor-joining method (60), based on 1,310 DNA sites, and distance matrix analyses were performed according to Jukes and Cantor (38), using the program MEGA version 2.1 (41).

SDS-PAGE of whole-cell proteins. Preparation of whole-cell proteins from diazotrophic isolates and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) assays were performed as described previously (27).

PCR amplification of *nifH* genes. Primers IGK (51) and NDR-1 (71) were used for the amplification of the *nifH* genes, using PCR conditions described previously (49). The reaction amplified a 1.2-kb fragment comprising the entire *nifH* gene, the intergenic spacer region, and the 5' end of the *nifD* gene (71).

Growth on aromatic compounds. Nitrogen-free semisolid BAz mineral medium (composition in grams/liter: azelaic acid, 2.0; K₂HPO₄, 0.4; KH₂PO₄, 0.4; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2; CaCl₂, 0.02; Na₂MoO₄ · H₂O, 0.002; FeCl₃, 0.01; bromothymol blue, 0.075), usually used for enrichment of nitrogen-fixing *Burkholderia* species (11, 27, 49, 54), was modified for testing bacterial growth on aromatic compounds. The mineral medium was supplemented with ammonium sulfate (0.05%), the azelaic acid was omitted, and aromatic compounds were included as sole carbon sources; this medium was named SAAC (salts-ammonium-aromatic compound). For growth in agar (1.8% [wt/vol]) plates, 150-μl volumes of the volatile aromatic compounds benzene, isopropylbenzene (cumene), and toluene were independently added on filter paper circles (6-cm diameters) placed in the lids of petri dishes, which were sealed with polyethylene tape and incubated upside down within closed polypropylene containers at 29°C. Naphthalene and biphenyl were tested similarly, but using 50 mg of crystals. Phenol (0.05%) was directly added to the SAAC mineral medium. SAAC medium without a carbon source was used as a negative control for bacterial growth; succinic acid (0.2%) as a carbon source was a positive control. The isolates were grown in BSE liquid medium (27) for 18 h at 29°C with reciprocal shaking (250 rpm). The cultures were harvested and the pellets washed with 10 mM MgSO₄ · 7H₂O and adjusted to an optical density (OD) of 0.25 at 600 nm (approximately 2 × 10⁸ cells per ml). Aliquots of the cultures were inoculated with a multipoint replicator on SAAC

medium plates containing the aromatic compounds described above and incubated for 4 to 10 days.

PCR amplification and sequencing of aromatic oxygenase genes. All of the isolates that were capable of growing with aromatic compounds as sole carbon sources, as well as type and reference strains of well-known diazotrophic *Burkholderia* species, were analyzed for the presence of di- and monooxygenase genes. Toluene/biphenyl dioxygenase genes were PCR amplified with the bphA668-3/bphAr1153-2 primers, using conditions described previously (78). Primers RDEG-F/RDEG-R and RMO-F/RMO-R were used for amplification of the sequences of the large subunits of toluene monooxygenases and primers PHE-F/PHE-R for amplification of phenol monooxygenases, using the PCR conditions described by Baldwin et al. (3). The reactions amplify a 466-bp fragment with both the RDEG and the RMO primer pairs and a 206-bp product with the PHE primer pair. PCR products from one or two strains from each species were cloned into the pCR2.1 vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen), and the aromatic oxygenase gene sequences were determined at the Biotechnology Institute, UNAM (Mexico). These gene sequences were deposited in the EMBL/GenBank database and compared with previously published sequences.

PCR amplification of *acdS* (encoding ACC deaminase) genes. Putative ACC deaminase gene sequences annotated (NCBI GenBank database) in the complete genomes of *B. xenovorans* LB400^T (accession number NC_007952), *B. vietnamiensis* G4 (NZ_AAEH000000000), *Burkholderia* sp. strain 383 (NC_007511), *B. mallei* ATCC 23344 (NC_006349), *B. pseudomallei* K96243 (NC_006351), and *Pseudomonas* sp. strain ACP (M73488) were aligned, and primers with minimal degeneracies (5' ACC [5'ACGCCGATCCARCCGCTM 3'] and 3' ACC [5'TCCAGCGTGCCSTCGTTC3']) were designed for PCR amplification of *acdS* genes. The PCR mixture was composed of 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 25 μM of each deoxynucleoside triphosphate, 5 pmol of each primer, and 1.0 U of *Taq* polymerase. PCR conditions were as follows: initial denaturation for 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of denaturation for 45 s at 95°C, annealing for 45 s at 67°C, and elongation for 1 min at 72°C, followed by a final 5-min elongation at 72°C. The reaction amplified a 785-bp fragment.

ACC deaminase activity assay. The isolates were grown in BSE liquid medium (27) for 18 h at 29°C with reciprocal shaking (250 rpm). The cultures were harvested and the pellets washed twice with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). The pellets were resuspended in 20 ml salts medium (composition in grams/liter: succinic acid, 2.0; K₂HPO₄, 1.0; KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; CaCl₂, 0.13; FeSO₄, 0.013) supplemented with either 3.0 mM ACC or 3.0 mM NH₄Cl, pH, 5.7, and then the cultures were grown as described above. The cells were collected and the pellets washed twice with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) before being resuspended in 1 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) (65) and ruptured using a French press at 900 lb/in². Crude extracts were harvested by centrifugation, and the ACC deaminase activity was measured by following the production of α-ketobutyrate as described by Honma and Shimomura (37). Total protein content in extracts was determined using the method described by Bradford (8).

Phosphate solubilization. Isolates were tested using NBRIP medium agar plates containing insoluble tricalcium phosphate [Ca₃(PO₄)₂] as the sole phosphorus source (46). Phosphate solubilization assays were carried out with NBRIP medium strongly buffered with MES (morpholineethanesulfonic acid) buffer (4.4 g/liter) and on unbuffered medium. The isolates were grown in iron-restricted Casamino Acids (CAA) liquid medium (44) supplemented with succinic acid (3 g/liter) for 18 h at 29°C. The cultures were harvested and the pellets washed with 10 mM MgSO₄ · 7H₂O and adjusted to an OD of 0.25 at 600 nm. Aliquots of the cultures were inoculated on NBRIP agar plates with a multipoint replicator. The solubilization haloes around colonies and colony diameters were measured after 3, 5, and 7 days of incubation at 29°C. Halo size was determined by subtracting the colony diameter from the total diameter.

Siderophore production. The method used to detect siderophores was adapted from the universal chemical assay on chrome azurol S (CAS) agar plates (64). The time-consuming and laborious deferrization process of solutions was omitted, and piperazine was not added; MM9 growth medium was replaced by CAA medium supplemented with succinic acid (3 g/liter). The isolates were grown in CAA liquid medium for 18 h at 29°C with reciprocal shaking (250 rpm). The cultures were harvested and the pellets washed and adjusted to an OD of 0.25 as described for the phosphate solubilization assays. Aliquots of the cultures were inoculated with a multipoint replicator on modified CAS medium (CAS-CAA) and then incubated for 72 h at 29°C. Orange haloes that formed around the colonies on blue agar were considered indicative of siderophore production. Halo size was determined by subtracting the colony diameter from the total diameter. Similarly, the isolates were grown in CAA liquid medium and hydroxamate-type siderophores were identified using the Czáký test (19), after hydro-

lysis with 3 N sulfuric acid at 120°C for 30 min (53), and buffered with 3 ml of 35% sodium acetate (19). Catechol-type siderophores were identified using the Arnow test (1).

Nucleotide sequence accession numbers. The 16S rRNA gene sequences were deposited in the EMBL/GenBank database under accession numbers EF139178, EF139179, EF139180, and EF139181 for *B. unamae* strains TNe-873, TATl-3742, TSi-883, and TATl-371, respectively; the accession numbers for *B. tropica* strains TNe-865 and TSi-887 were EF139182 and EF139183, respectively; *Burkholderia* sp. strains TNe-862, TNe-878, and TNe-841 were deposited under accession numbers EF139184, EF139185, and EF139186, respectively; and the accession numbers for *B. xenovorans* strains TCo-382 and TCo-26 were EF139187 and EF139188, respectively. The phenol hydroxylase (aromatic oxygenase) gene sequences were deposited in the EMBL/GenBank database under accession numbers EF151008, EF151009, EF151010, and EF158449 for *Burkholderia* sp. strain TNe-862, *B. unamae* strains TSi-883 and MTI-641^T, and "*B. brasiliensis*" M130, respectively. Toluene-3-monooxygenase gene sequences were deposited under accession numbers EF151011, EF151012, and EF151013 for "*B. brasiliensis*" M130, *B. kururiensis* KP23^T, and *Burkholderia* sp. strain TNe-862, respectively. The *acdS* gene sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers EF408192 and EF408193 for *B. xenovorans* strains TCo-26 and TCo-382, respectively, and EF408194 for *B. unamae* TATl-3742.

RESULTS

Isolation. Enrichment cultures for N₂-fixing *Burkholderia* were made in N-free semisolid BAz medium, followed by further isolation and colony purification on BAc agar plates (27). Screening of 420 colonies allowed the recovery of a total of 54 isolates that showed consistent nitrogenase activity as measured by the ARA method. Although it is possible that a few isolates did not show ARA, due to suboptimal growth conditions or loss of plasmids, ARA-negative colonies were discarded, and no attempt was made to determine their taxonomic positions.

16S rRNA-specific primers. ARA-positive isolates gave PCR-amplified products of the correct size (409 bp) with primers BuRa-16-1/BuRa-16-2, confirming their taxonomic statuses as members of the genera *Burkholderia*-*Ralstonia*. In addition, use of the specific primer pair GB-F/GB-R (designed in the present study to get a PCR-amplified product of around 1,100 bp) confirmed that the ARA-positive isolates belong to the genera *Burkholderia*-*Ralstonia*. The specificity of the GB-F/GB-R primer pair was confirmed with all of the 31 type strains of the known *Burkholderia* species tested and of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia solanacearum* (data not shown). All of the 54 ARA-positive isolates were confirmed as belonging to the genus *Burkholderia* by amplifying the 16S rRNA genes with the GB-F/GBN2-R specific primer pair, described previously (49).

ARDRA. A total of eight ARDRA profiles were identified from among the 54 acetylene-reducing *Burkholderia* isolates recovered from the rhizosphere and rhizoplane of tomato (data not shown). One ARDRA profile identified among 11 acetylene-reducing isolates (e.g., TCo-26 and TCo-382) differed slightly from the profile of *B. xenovorans* LMG 16224. Three ARDRA genotypes identified among 11 isolates were identical to genotypes 16 (1 isolate), 17 (3 isolates), and 19 (7 isolates), described previously as belonging to the species *B. tropica* (54). Two ARDRA genotypes (14 isolates) were slightly different from that of strain MTI-641^T and from other genotypes of *B. unamae* described previously (11). One ARDRA profile similar to that of *B. kururiensis* KP23^T was identified among 12 ARA-positive isolates (e.g., TNe-841 and TNe-878), hereafter referred to in the text as *B. kururiensis*-resembling

(Bkr) group or Bkr-type isolates. One ARDRA profile (six isolates) was different from those ARDRA profiles observed in other known diazotrophic *Burkholderia* species, hereafter referred to in the text as *Burkholderia* sp.

Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. The 16S rRNA genes from one to four acetylene-reducing strains of each ARDRA genotype identified among the isolates recovered from tomato plants cultivated on different farms were sequenced and then compared with available 16S rRNA sequences from all of the *Burkholderia* species. Analysis of the 16S rRNA genes from strains TCo-26 and TCo-382 showed 98 to 99% identity with strain LB400^T of *B. xenovorans* (NCBI sequence database accession number U86373; P. C. K. Lau and H. Bergeron, unpublished; CP000271 chromosome 2 and CP000270 chromosome 1, complete sequence), which strongly suggested that they belong to this species (Fig. 1). Similarly, 16S rRNA gene sequences from strains TSi-873, TNe-883, TATl-371, and TATl-3742, all having ARDRA profiles slightly different from that of *B. unamae* MTI-641^T, showed 98 to 99% identity with this and other strains of *B. unamae* (e.g., NCBI accession numbers AY221955, AY221956, and AY221957) (11), and isolates TNe-865 and TSi-887 showed 99% identity with *B. tropica* strains (e.g., accession numbers AJ420332, AY128103, AY321306, AY128105, and AY128104) (54). Likewise, 16S rRNA gene sequences from strains TNe-841 and TNe-878 (Bkr group) showed 97.9% identity with *B. kururiensis* KP23^T (accession number AB024310) (80) and 97.8% identity with "*B. brasiliensis*" M130 (accession number AJ238360) (unpublished), which is a species not officially validated but referred to in the relevant literature (17, 39, 57, 58, 61). According to 16S rRNA gene sequencing, the strain TNe-862 showed 98% identity with *Burkholderia* sp. legume-nodulating strains mpa3.2 and mpa2.1a (accession numbers DQ156081 and DQ156080, respectively) and 97% identity with type strain SRMrh-20^T of *B. silvatlantica* (accession number AY965240) (50).

SDS-PAGE of whole-cell proteins. Whole-cell protein extracts were prepared from 25 representative acetylene-reducing *Burkholderia* isolates (recovered from diverse tomato plants and farms) showing different ARDRA profiles and their protein profiles compared with those from type and reference strains of *Burkholderia* species that showed identical or very similar ARDRA profiles. The protein patterns of some representative strains are shown in Fig. 2. In general, the similarity in whole-cell protein profiles between isolates recovered in this study and those profiles from type or reference strains of a particular diazotrophic *Burkholderia* species is striking (for example, *B. xenovorans* LMG 16224 and strains TCo-382 and TCo-213 [Fig. 2A], isolated in this work). Similar results were observed among *B. unamae* MTI-641^T as well as *B. tropica* Ppe8^T and strains recovered from the environment of tomato plants (Fig. 2B and C). It is remarkable that *B. kururiensis* KP23^T and "*B. brasiliensis*" M130 show almost identical protein profiles (Fig. 2D). In contrast, Bkr isolates (those with ARDRA profiles similar to that of *B. kururiensis* KP23^T) showed major differences between their protein patterns and KP23^T profiles. Similarly, strains TNe-862 and TNe-861 (Table 1) showed significant differences in their SDS-PAGE profiles from those of the phylogenetically closest species, *Burkholderia* sp. strain mpa2.1a and *B. silvatlantica* strains (data not shown).

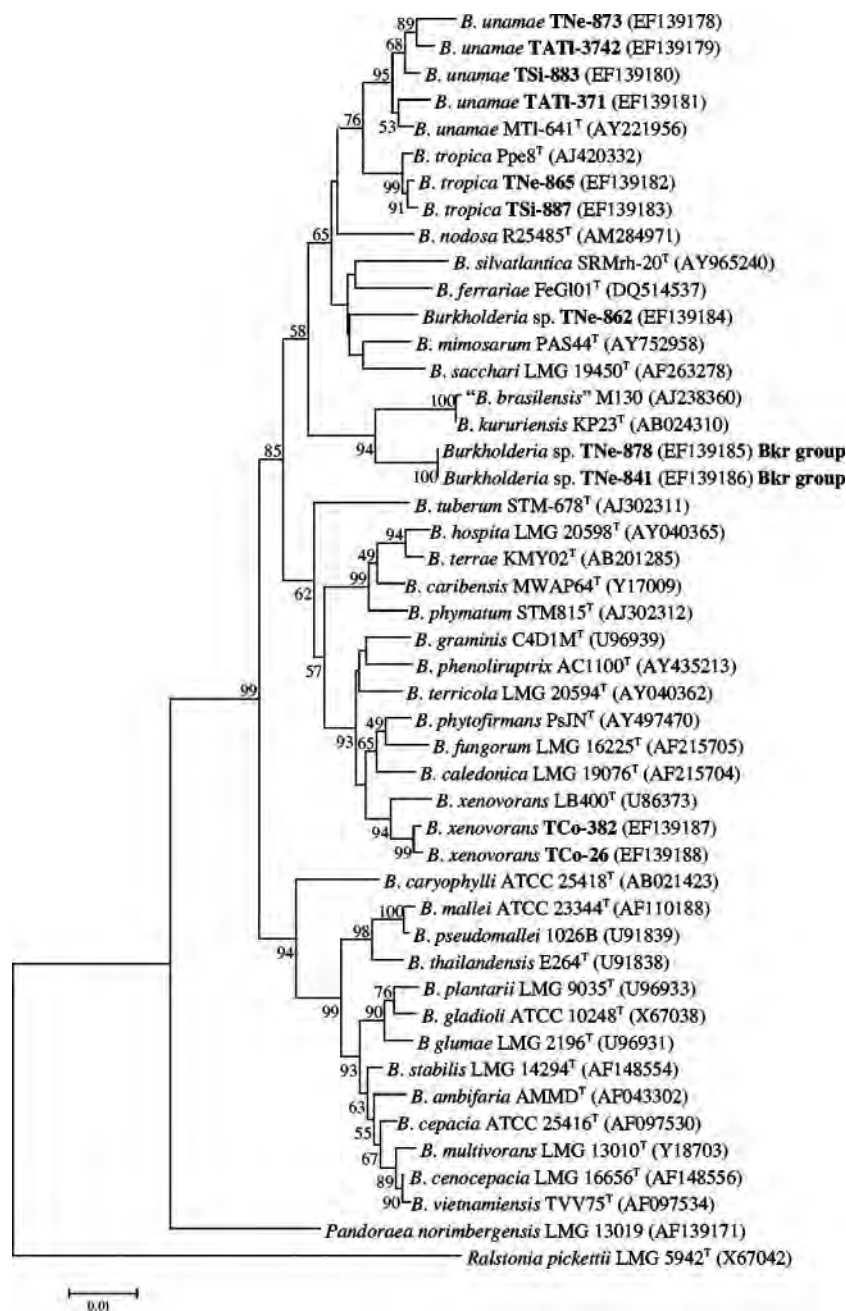


FIG. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relatedness among the nitrogen-fixing *Burkholderia* species associated with tomato plants (strain designations in bold) and related *Burkholderia* species. The bar represents one nucleotide substitution per 100 nucleotides. The nodal robustness of the tree was assessed using 1,000 bootstrap replicates. The NCBI GenBank accession number for each strain is shown in parentheses.

Bkr isolates as well as strains TNe-862 and TNe-861 appear to represent two novel diazotrophic *Burkholderia* species.

PCR amplification of *nifH* genes. Twenty-five representative acetylene-reducing *Burkholderia* isolates were analyzed (Table 1), yielding a PCR product of the expected size of 1.2 kb (data not shown) with the *nifH* primers used. These results confirmed the nitrogen-fixing abilities of the *Burkholderia* isolates.

Growth with aromatic compounds. The abilities of the diazotrophic *Burkholderia* species to grow on aromatic com-

pounds as carbon sources were variable and dependent on each species (Table 2). *B. xenovorans* strains recovered from tomato plants (Table 2) and reference strains CAC-124 and CCUG 28445 (data not shown) were unable to grow with aromatic compounds; type strain LB400^T grew with biphenyl as expected but not with any other aromatic compound tested. Interestingly, all of the *B. unamae* isolates recovered from tomato plants, except strains Tatl-3711 and Tatl-3742, were able to grow with benzene and phenol but not with biphenyl or

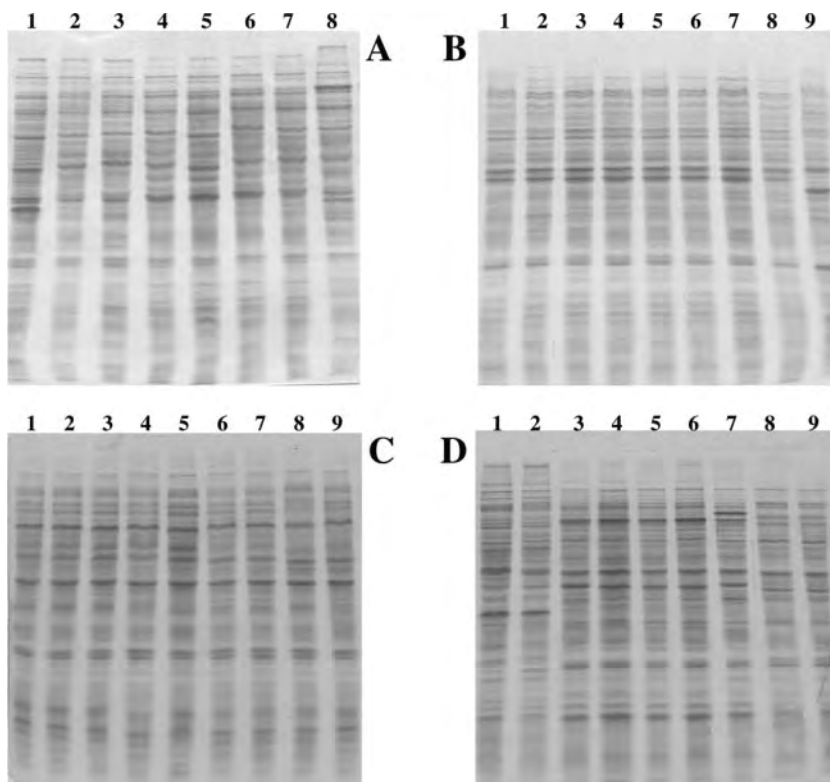


FIG. 2. Whole-cell protein profiles of representative acetylene-reducing isolates recovered in the present study, type and reference strains of known diazotrophic *Burkholderia* species, and other closely related species. (A) Lanes 1 to 7, *B. xenovorans* LB400^T, CAC-124, LMG 16224 (type and reference strains) (32), TCo-26, TCo-39, TCo-382, and TCo-213; lane 8, *B. caledonica* LMG19076^T. (B) Lanes 1 to 8, *B. unamae* TSi-883, MTL-641^T, CGC-321 (reference strain) (11), TAtl-3742, TTe-829, TNe-873, TAtl-3711, and TNe-832; lane 9, *B. sacchari* IPT101^T. (C) Lanes 1 to 9, *B. tropica* TSi-888, TSj-882, Ppe8^T, TSi-887, TTe-797, TTe-791, MTo-672 (reference strain) (54), TNe-865, and TNe-831. (D) Lane 1, “*B. brasilensis*” M130; lane 2, *B. kururiensis* KP23^T; lanes 3 to 7, *Burkholderia* sp. (Bkr group) strains TNe-8641, TNe-8682, TNe-878, TNe-841, and TNe-834; lanes 8 and 9, *Burkholderia* sp. strains TNe-862 and TNe-861.

other aromatic compounds tested (Table 2), and this feature was confirmed for seven other *B. unamae* strains, including the type strain, isolated from different plants and locations described previously (11). All of the *B. tropica* isolates recovered from tomato plants and seven other strains of this species

isolated from different plants cultivated in widely distant regions (54) were unable to grow with any aromatic compound. While Bkr isolates were able to grow only with benzene as a carbon source, *B. kururiensis* KP23^T and “*B. brasilensis*” M130 grew on toluene and phenol (Table 2). *Burkholderia* sp. strains

TABLE 2. Growth with aromatic compounds as carbon sources and PCR amplification of genes encoding aromatic oxygenases in N₂-fixing *Burkholderia* species associated with tomato plants^a

Species or strain (n)	Presence (+) or absence (-) ^b of:						PCR amplification of genes encoding:		
	Growth with aromatic compound:						Aromatic		
	Toluene	Phenol	Cumene	Benzene	Biphenyl	Naphthalene	monooxygenase		Aromatic dioxygenase (biphenyl)
							Toluene	Phenol	
<i>B. unamae</i> (5)	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>B. unamae</i> (7) ^c	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>B. xenovorans</i> (4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. xenovorans</i> LB400 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Bkr group (4)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. kururiensis</i> KP23 ^T	+	+	-	+	-	-	+	+	-
“ <i>B. brasilensis</i> ” M130	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>B. tropica</i> (7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. tropica</i> (7) ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. (2)	+	+	-	+	-	-	+	+	-

^a PCR amplification of the toluene monooxygenase gene was obtained with primers RMO-F/RMO-R but not with primers RDEG-F/RDEG-R.

^b +, good growth or gene presence; -, no growth or gene absence.

^c Includes type and reference strains.

TNe-862 and TNe-861 grew on toluene, phenol, and benzene (Table 2).

PCR amplification and sequencing of aromatic oxygenase genes. None of the nitrogen-fixing *Burkholderia* isolates associated with tomato plants (Table 1), including the *B. xenovorans* strains, yielded a PCR-amplified product with the bphAf668-3/bphAr1153-2 primers, used to amplify toluene/biphenyl dioxygenase genes (Table 2), while these primers gave PCR products of the correct sizes (525 to 531 bp) with *B. xenovorans* LB400^T as described previously (78). Diazotrophic *Burkholderia* strains that were able to grow using phenol or toluene as a carbon source yielded PCR products of the expected sizes with the specific primer pair used to amplify the corresponding aromatic oxygenase gene (Table 2). Subsequent gene sequencing and BLASTN analysis with available sequences deposited at the NCBI database confirmed the presence of phenol hydroxylases in *B. unamae* strains MTI-641^T and TSi-883, *B. kururiensis* KP23^T, “*B. brasiliensis*” M130, and *Burkholderia* sp. strain TNe-862 as well as the presence of toluene-3-monooxygenases in *B. kururiensis* KP23^T, “*B. brasiliensis*” M130, and *Burkholderia* sp. strain TNe-862. Phylogenetic trees derived from aromatic oxygenase-related sequences are illustrated in Fig. 3A and B. Although several replicates were done with different clones, the phenol hydroxylase gene fragments (203 bp) from *B. unamae* strains MTI-641^T and TSi-883 (associated with tomato) were, surprisingly but very interestingly, widely dissimilar. In contrast, the phenol hydroxylase gene fragments of *B. kururiensis* KP23^T and “*B. brasiliensis*” M130 analyzed in this work as well as the phenol hydroxylase gene sequence from *B. kururiensis* KP23^T reported previously (81) were almost identical. *B. kururiensis* KP23^T and “*B. brasiliensis*” M130 differed very slightly (99.34% identity) between their toluene-3-monooxygenase gene sequences, and these were closely related to the sequence from *Burkholderia* sp. strain TNe-862 (associated with tomato), and all of these toluene-3-monooxygenase sequences were more closely related to *B. cepacia* as well as *Ralstonia eutropha* and *R. pickettii* than to other toluene-degrading bacterial species.

PCR amplification and sequencing of *acdS* genes and ACC deaminase activity. Each of the *B. unamae* and *B. xenovorans* isolates analyzed (Table 1) yielded a 785-bp DNA fragment (data not shown) by use of the specific primer pair 5'ACC/3'ACC (designed in the present study). Gene sequencing and BLASTN analysis confirmed the presence of *acdS* genes in representative *B. unamae* and *B. xenovorans* strains associated with tomato plants. ACC deaminase activity levels were 22.93 (standard deviation [SD] = 01.68) and 25.42 (SD = 0.30) μ M α -ketobutyrate/h/mg protein in *B. unamae* strains TAtI-3742 and TSi-883, respectively, and 24.91 (SD = 0.73) μ M α -ketobutyrate in *B. xenovorans* TCo-26. All of these data clearly support the presence of the ACC deaminase enzyme and its expression in the *B. unamae* and *B. xenovorans* species.

Phosphate solubilization. Phosphate solubilization ability was variable among the diazotrophic *Burkholderia* species associated with tomato plants (Table 3). *B. tropica* exhibited the most notable phosphate-dissolving capability, showing the largest halo diameter in medium with Ca₃(PO₄)₂ as the sole P source in either the absence or the presence of MES buffer after incubation for 72 h. Although *B. unamae* TATI-371 exhibited a small solubilization halo (2 mm) in the presence of

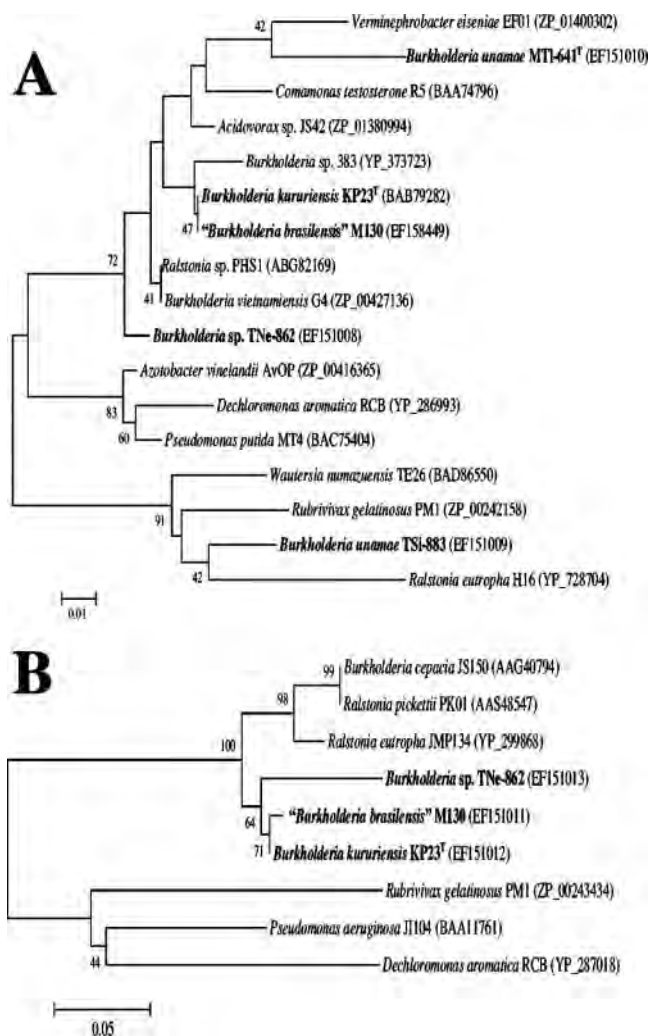


FIG. 3. Phylogenetic tree based on aromatic oxygenases showing the relatedness among the diazotrophic *Burkholderia* species associated with tomato plants (strain designations in bold) and degrader species of volatile aromatic compounds. (A) Phylogenetic analysis of phenol hydroxylase amino acid sequences; the analysis included 67 sites. (B) Phylogenetic analysis of toluene-3-monooxygenase amino acid sequences; the analysis included 153 sites. Bootstrapping analysis was used to test the statistical reliability of tree branch points. One thousand bootstrap samplings were performed. The NCBI GenBank accession number for each strain is indicated in parentheses.

MES buffer, all of the other isolates of this species as well as Bkr and *Burkholderia* sp. isolates were able to dissolve insoluble phosphates only in the absence of MES buffer after incubation for 3 to 5 days. *B. xenovorans* isolates were unable to dissolve tricalcium phosphate, except for strain CAC-124, which showed a small solubilization halo of 2 mm, but only in the absence of MES buffer.

Siderophore production. All of the diazotrophic *Burkholderia* isolates associated with tomato plants were able to produce siderophores on CAS medium agar plates (Table 3). In this medium, *B. unamae* isolates formed orange haloes (indicative of siderophore production) with diameters ranging from 5 to 8 mm, except for strain TATI-371, which produced the largest diameter halo (22 mm) among all of the diazotrophic

TABLE 3. Phosphate solubilization and biosynthesis of siderophores by N₂-fixing *Burkholderia* species associated with tomato plants

Species or strain (<i>n</i>)	Halo size (mm) ^a on NBRI medium for Ca ₃ (PO ₄) ₂ solubilization				Value for siderophore production	
	Without MES buffer		With MES buffer		Halo size (mm) ^a on CAS medium	Hydroxamate concn (μM) ^b
	3 days	7 days	3 days	7 days		
<i>B. tropica</i> (6)	7.1	9.5	3.0	4.3	14.2	0.23–1.10
<i>B. tropica</i> (3) ^d	7.3	9.7	3.0	4.0	14.0	0.38–0.42
<i>B. unamae</i> (6)	0.0	2.3 ^c	0.0	0.0	6.5 ^c	3.04–8.31
<i>B. unamae</i> (3) ^d	1.3	5.0	0.0	0.0	5.0	3.11–6.29
<i>B. xenovorans</i> (4)	0.0	0.0	0.0	0.0	16.8	4.70–5.91
<i>B. xenovorans</i> LB400 ^T	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	19.5
Bkr group (5)	0.0	1.5	0.0	0.0	4.6	0.33–1.63
<i>B. kururiensis</i> KP23 ^T	0.0	5.0	0.0	0.0	6.0	0.0
<i>Burkholderia</i> sp. (2)	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.33–0.70

^a Values represent the average halo sizes formed by the strains tested and are means for two replicate cultures.

^b Siderophore production range by the strains tested.

^c Halo sizes produced by *B. unamae* TAtI-371 were not included in the average, as this strain was exceptional in siderophore production and phosphate solubilization with respect to all of the strains of this species.

^d Includes type and reference strains tested.

Burkholderia strains tested. Generally, *B. xenovorans* strains produced the largest halo sizes (13 to 19 mm), followed by *B. tropica* strains (12 to 17 mm), the Bkr group (2 to 14 mm), and *Burkholderia* sp. isolates (3 mm). Except for the *Burkholderia* sp. isolates, all of these diazotrophic *Burkholderia* species produced hydroxamate-type siderophores (Table 3), but none produced catechol-type siderophores under the assay conditions used (data not shown). Generally, halo size was not correlated with amount of hydroxamate determined in liquid culture (Table 3). However, *B. unamae* TAtI-371 produced the largest amount of hydroxamate (8.3 μM) among all of the isolates recovered from the tomato environment, which otherwise produced hydroxamates in concentrations less than 5 μM (Table 3). Interestingly, *B. xenovorans* strains LB400^T, CCUG 28445, and CAC-124, included as controls in different assays, produced hydroxamates in concentrations as high as 19.5, 16, and 7.8 μM, respectively.

DISCUSSION

A total of 54 isolates recovered from the rhizospheres and rhizoplanes of tomato plants showed consistent nitrogenase activity as measured by the ARA method, and the presence of *nifH* genes was detected in all of the isolates (data not shown), confirming their diazotrophic abilities. The taxonomic statuses of all these isolates as members of the genera *Burkholderia* and *Ralstonia* were confirmed with two specific primer sets, BuRa-16-1/BuRa-16-2 (described previously [5]) and GB-F/GB-R (designed in the present study). All 54 of the diazotrophic isolates were confirmed as belonging to the genus *Burkholderia* by amplifying the 16S rRNA genes with the GB-F/GBN2-R-specific primer pair, described previously (49). A total of eight ARDRA profiles were identified from among the 54 diazotrophic *Burkholderia* isolates, and on this basis, only 25 representative N₂-fixing isolates of each ARDRA genotype identified among isolates recovered from tomato plants cultivated on different farms were further analyzed. Based on 16S rRNA sequences and whole-cell protein profiles, which provide strong evidence for the delineation of bacterial species (74), *B. xenovorans*, *B. unamae*, and *B. tropica* species were identified. In addition, two other unknown nitrogen-fixing *Burkholderia*

species were cultured in the present study, one of them closely phylogenetically related to *B. kururiensis* and the other one to legume-nodulating strains and to *B. silvatlantica*.

It is worth noting the substantial ability of the bacterial species to colonize different environments, including taxonomically distinct plants cultivated in distantly separated geographical regions. For example, *B. xenovorans* strains TCo-213 and TCo-382 were recovered from the rhizosphere of tomato in the present work, and strains CAC-124 and LMG 16224 were isolated from the rhizosphere of a coffee plant in Mexico and from a blood culture in Sweden, respectively (32). Similarly, in the present study *B. tropica* was found associated with tomato plants, but it has been isolated from sugarcane and maize varieties in Brazil, South Africa, and Mexico (49, 54). Recently, based on the 16S rRNA sequence, one isolate recovered from within dune grass (*Ammophila arenaria*) showed 99% identity with *B. tropica* strains (20). Although *B. unamae* has been found predominantly associated with sugarcane in Mexico (49), its isolation from sugarcane varieties cultivated in Brazil and South Africa (NCBI GenBank database accession number AY391282) (49) as well as from other crop plants, including maize and coffee (11), has been documented. Although 16S rRNA gene sequences from Bkr isolates associated with tomato plants showed high identity levels (97%) with *B. kururiensis* KP23^T and “*B. brasilensis*” M130, the protein patterns visualized in the Bkr isolates were clearly different from those observed in strains KP23^T and M130, which strengthens the notion that Bkr isolates do not belong to the species *B. kururiensis* or “*B. brasilensis*.” However, it is remarkable that *B. kururiensis* KP23^T and “*B. brasilensis*” M130 show almost identical protein profiles. Previously, it was suggested that strains KP23^T of *B. kururiensis* and “*B. brasilensis*” M130 belong to the same species, since both strains were able to fix N₂ in similar manners, showed the same ARDRA profile, and had identity levels of 99.9% between their 16S rRNA sequences (27). In addition, strains KP23^T and M130 differ at a single gene locus of 12 enzyme gene loci (multilocus genotypes) tested in multilocus enzyme electrophoresis assays (data not shown) and display other very similar features, such as the ability to grow using phenol and toluene as single carbon sources, with the

corresponding gene sequences (phenol hydroxylase and toluene-3-monooxygenase) being almost identical. High identity levels between *glnB* or *nifH* genes in both strains were observed previously (43). On the basis of these data, strain M130 should be considered a member of the species *B. kururiensis*, and we recommend that reference to the species "*Burkholderia brasiliensis*" be omitted in future literature to avoid further confusion. Nonetheless, the wide geographic distribution and substantial ability of *B. kururiensis* to colonize such dissimilar environments is striking; while the trichloroethylene-degrading strain KP23^T was isolated from an aquifer polluted with trichloroethylene in Japan (80), strain M130 was recovered from surface-sterilized roots of rice grown in Brazil (76). Based on these findings, it appears conceivable to find new host plants or other unexpected habitats for *B. unamae* or *B. kururiensis* and other well-known or unknown species, as observed with *B. xenovorans* and *Burkholderia* spp. recovered in the present study.

In this work, N₂-fixing *Burkholderia* isolates associated with tomato plants were assessed for their abilities to grow with some common volatile pollutant compounds as sole carbon sources. Very interestingly, all of the *B. unamae* isolates associated with tomato plants were able to grow with benzene and phenol as sole carbon sources, and the ability to grow on phenol was confirmed with the detection and sequencing of phenol monooxygenase genes by PCR. This feature was confirmed to be characteristic of this species as well as for seven other *B. unamae* strains, including type strain MTI-641, associated with different plants cultivated in widely distant regions (11). However, complete sequences of phenol monooxygenase genes from *B. unamae* strains MTI-641^T and TSi-883 should be obtained to determine the divergence between them, as these sequences differed greatly in the small (203-bp) DNA fragments analyzed. In addition, the complete phenol monooxygenase genes of more *B. unamae* strains should be analyzed to determine their evolutionary origins in populations of this species. These dissimilarities strongly contrast with the 100% identity found between phenol monooxygenase genes from *B. kururiensis* KP23^T and M130 isolated from two widely separated regions of the world. No less remarkable is the finding that *B. tropica* (54), *B. sacchari* (9), and *B. ferrariae* (72), all closely phylogenetically related to *B. unamae*, were unable to grow with the aromatic compounds benzene and phenol (data not shown). Nevertheless, very recently one *B. tropica* strain able to degrade benzene, toluene, and xylene was described (22), but this strain was identified only on the basis of PCR amplification and sequencing of 16S rRNA genes, which may be insufficient evidence to define its exact taxonomic position, considering that *B. tropica* and *B. unamae* show identity levels higher than 98% between their 16S rRNA gene sequences (11). Moreover, this *B. tropica* strain was identified (31) before *B. unamae* was described (11) and their 16S rRNA gene sequences could be compared. If the taxonomic status of the *B. tropica* strain is confirmed by means of polyphasic taxonomy criteria, then considering the inability of several *B. tropica* strains tested in this study to grow on aromatic compounds, this would indicate a case of lateral gene transfer, as has been suggested for the biphenyl pathway for PCB degradation expressed by *B. xenovorans* LB400^T but absent in two other strains of this species (12, 32). In the present study, such a

lateral gene transfer in LB400^T is supported by the finding that the *B. xenovorans* isolates (e.g., TCo-26 and TCo-382) associated with tomato plants were incapable of growing with biphenyl as the sole carbon source, and biphenyl dioxygenase genes were not PCR amplified from these strains, though this occurred, as expected, in strain LB400^T. Undoubtedly, more *B. xenovorans* isolates should be analyzed to confirm that the ability to degrade biphenyl and other aromatic compounds is a typical characteristic in this species and not a unique feature of strain LB400^T. Considering the habitat of *B. xenovorans* (soil and rhizosphere), the ability to degrade aromatic compounds originating from root exudates and root turnover could be important (12). Similarly, since about 25% of the Earth's biomass consists of compounds having a benzene ring as the main structural component (29), and phenolic compounds are widely distributed in the plant kingdom (21), the ability of *B. unamae* to use benzene and phenol as carbon sources could be advantageous for its survival in the rhizospheric and endophyte environments, both common habitats of this species (11). Unfortunately, in this study we did not analyze the endophyte environment of tomato for recovering diazotrophic *Burkholderia* species. However, the ability of *B. unamae* to grow using aromatic hydrocarbons, as well as its widespread association with different plant species (11, 49), suggests that it could be suitable for applications in rhizosphere remediation of common soil pollutants. In addition, taking into consideration the host plant range of *B. unamae* and its endophytic character, it would be of great interest to know the natural ability of this species to improve phytoremediation of volatile organic pollutants, as has been suggested with the application of engineered endophytic bacteria (4, 68).

In the present work, several bacterial plant growth-promoting mechanisms were analyzed and detected in diazotrophic *Burkholderia* isolates associated with tomato plants. In previous studies, ACC deaminase activity was proposed as a bacterial mechanism that may enhance plant growth by lowering plant ethylene levels (30), which is especially true in stressed dicots such as tomato, since monocots are less sensitive to ethylene (36). Based on these data, and supported by the occurrence of *acdS* genes (PCR amplified using a primer pair designed in this study and verified by sequencing) in *B. unamae* and *B. xenovorans* as well as by the corresponding ACC deaminase activities expressed by strains of these species associated with tomato plants, it could be suggested that both *B. unamae* and *B. xenovorans* possess the potential for improving plant growth. In fact, maize inoculation with wild-type strains of *B. unamae* promotes maize plant growth (unpublished results), and experiments using different mutants to determine the mechanism of plant growth promotion are in progress. Conversely, although ACC activity has been detected in *B. tropica* strain BM-273, and the corresponding *acdS* gene was detected in this strain and in strain BM-16 (7), we were unable either to detect ACC activity or to amplify the *acdS* gene in any of the *B. tropica* strains analyzed. This discrepancy could be attributed to the different sets of primers used for amplification in both studies. However, based on *acdS* phylogenetic analysis, an extensive horizontal transfer of *acdS* genes has been suggested, which could explain the occurrence of this gene in strains BM-273 and BM-16 (both isolated from maize plants inoculated with soil from the same field [26]) but not in *B. tropica*

strains associated with tomato plants or in seven other strains of this species recovered from plants cultivated in different locations (54). These discrepancies deserve further analysis, which was beyond the scope of this study.

In the present work, the highest mineral phosphate-dissolving capability was detected in *B. tropica* isolates; this capability was lower in *B. unamae* and *Burkholderia* sp. isolates and null in most *B. xenovorans* strains. Even though mineral phosphate-dissolving capability in most bacteria has been related to organic acid production (55), recent results indicate that this is not the only mechanism of mineral phosphate solubilization by bacteria (56). Mineral phosphate solubilization through organic acid production appears to occur in most diazotrophic *Burkholderia* species associated with tomato plants, but in *B. tropica*, an additional, unknown mechanism presumably exists, since this species solubilized tricalcium phosphate in less than 72 h even in a strongly buffered culture medium. Regardless of the mechanism used by *B. tropica*, its remarkable ability to convert insoluble mineral phosphorus to an available form is an important trait for allowing this diazotrophic species to be defined as a plant growth-promoting rhizobacterium. Seed inoculation with efficient phosphate-solubilizing bacteria is known to increase solubilization of fixed soil phosphorus and immobilized phosphates in the soil after application of mineral fertilizers, resulting in higher crop yields (23, 56).

Production of siderophores by plant growth-promoting rhizobacteria is considered to be important in the suppression of deleterious microorganisms and soilborne plant pathogens (66) and in some cases appears to trigger induced systemic resistance (18, 75). The production of hydroxamate-type siderophores by *B. unamae* and *B. tropica* strains has been described previously (11, 54) and confirmed in the present work as a characteristic feature in these species. *B. xenovorans* strain LB400^T is widely known as an effective PCB degrader, but the synthesis of hydroxamate-type siderophores in large amounts by this species is described for the first time in this work. In accordance with this finding, homologs of biosynthesis genes encoding two hydroxamate-type siderophores, pyoverdine and ornibactin, were found on chromosome 2 of *B. xenovorans* LB400^T (12). While this chromosome also carries a homolog encoding pyochelin (catechol siderophore) synthesis (12), we were unable to detect catechol-type siderophores in LB400^T liquid cultures. The lack of catechol-type siderophores detected in strain LB400^T, as well as in all of the other diazotrophic *Burkholderia* isolates, could be related to the CAA culture medium used in the assay, since pyochelin production and that of its precursor salicylic acid vary according to the minerals and carbon sources available (24). In addition, the lack of correlation between the largest orange haloes exhibited on CAS-CAA medium and the very small amounts of hydroxamate siderophores found in liquid cultures from *B. xenovorans* isolates associated with tomato plants (even smaller amounts are found in cultures from all of the *B. tropica* strains) suggests that other types of siderophores, different from hydroxamates, are produced by strains of these species. Accordingly, all of the diazotrophic *Burkholderia* species siderophore producers associated with tomato could play a major role in the biocontrol of phytopathogens, either in tomato or in other host plants of these diazotrophs.

Certainly, the nitrogen-fixing *Burkholderia* species associ-

ated with tomato plants represent a great potential for agrobiotechnological applications, which could lead toward using consortia of these species as plant growth-promoting rhizobacteria and, concomitantly, in rhizoremediation and/or for improvement of phytoremediation and for biological control of plant pathogens. However, the potential beneficial role of the *Burkholderia* species revealed in this study should be established under natural conditions, since a particular bacterial activity exhibited in the laboratory is not guaranteed to function in association with a host plant.

Undoubtedly, the isolation of *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, and two other unknown N₂-fixing *Burkholderia* species, as well as their very attractive features for agronomic and environmental applications, some detected for the first time in these species, emphasizes the significance of performing studies on taxonomy and the suitability of exploring common environments, such as the rhizosphere, for isolation of bacterial species with biotechnological potential.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Socorro Cruz and Guadalupe Paredes for technical assistance. We are grateful to Michael Dunn (CCG-UNAM) for reading the manuscript and to Rosa M. Pitard (EMBRAPA-Seropédica, Brazil) for supplying strain "*B. brasiliensis*" M130. We also thank Matthew A. Parker (State University of New York at Binghamton) for supplying *Burkholderia* sp. strain mpa2.1a. We acknowledge Martín Arellano, Antonio Trujillo, and José Leyva for plant collection.

REFERENCES

1. Arnow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixture. *J. Biol. Chem.* **118**:531–537.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
3. Baldwin, B. R., C. H. Nakatsu, and L. Nies. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3350–3358.
4. Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeyen, J. V. Colpaert, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.* **22**:583–588.
5. Bauernfeind, A., I. Schneider, R. Jungwirth, and C. Roller. 1999. Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1335–1339.
6. Belova, S. E., T. A. Pankratov, and S. N. Dedysh. 2006. Bacteria of the genus *Burkholderia* as a typical component of the microbial community of *Sphagnum* peat bogs. *Microbiology* **75**:90–96.
7. Blaha, D., C. Prigent-Combaret, M. S. Mirza, and Y. Moëgne-Loccoz. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**:455–470.
8. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–258.
9. Brämer, C. O., P. Vandamme, L. F. da Silva, J. G. C. Gomez, and A. Steinbüchel. 2001. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1709–1713.
10. Burris, R. H. 1972. Nitrogen fixation assay—methods and techniques. *Methods Enzymol.* **24B**:415–431.
11. Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, and P. Estrada-de los Santos. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1165–1172.
12. Chain, P. S. G., V. J. Denef, K. T. Konstantinidis, L. M. Vergez, L. Agulló, V. L. Reyes, L. Hauser, M. Córdova, L. Gómez, M. González, M. Land, V. Lao, F. Larimer, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, S. A. Malfatti, C. J. Marx, J. J. Parnell, A. Ramette, P. Richardson, M. Seeger, D. Smith, T. Spilker, W. J. Sul, T. V. Tsoi, L. E. Ulrich, I. B. Zhulin, and J. M. Tiedje. 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15280–15287.
13. Chen, W. M., S. M. de Faria, R. Straliotto, R. M. Pitard, J. L. Simões-

- Araujo, J.-H. Chou, Y.-J. Chou, E. Barrios, A. R. Prescott, G. N. Elliott, J. I. Sprent, J. P. W. Young, and E. K. James. 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7461–7471.
14. Chen, W.-M., E. K. James, T. Coenye, J.-H. Chou, E. Barrios, S. M. de Faria, G. N. Elliott, S.-Y. Sheu, J. I. Sprent, and P. Vandamme. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1847–1851.
15. Chiarini, L., A. Bevivino, C. Dalmastrì, S. Tabacchioni, and P. Visca. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol.* **14**:277–286.
16. Coenye, T., D. Henry, D. P. Speert, and P. Vandamme. 2004. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**:623–627.
17. Coenye, T., and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **5**:719–729.
18. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4951–4959.
19. Czàky, T. Z. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chem. Scand.* **2**:450–454.
20. Dalton, D. A., S. Dramer, N. Azios, S. Fusaro, E. Cahill, and C. Kennedy. 2004. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**:469–479.
21. Daniel, O., M. S. Meier, J. Schlatter, and P. Frischknecht. 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**:109–114.
22. de los Cobos-Vasconcelos, D., F. Santoyo-Tepole, C. Juárez-Ramírez, N. Ruiz-Ordaz, and C. J. J. Galíndez-Mayer. 2006. Cometabolic degradation of chlorophenols by a strain of *Burkholderia* in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* **40**:57–60.
23. Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, and Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* **22**:107–149.
24. Duffy, B. K., and G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2429–2438.
25. Erickson, B. D., and F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multi-component polychlorinated biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**:2903–2912.
26. Estrada, P., P. Mavingui, B. Cournoyer, F. Fontaine, J. Balandreau, and J. Caballero-Mellado. 2002. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can. J. Microbiol.* **48**:285–294.
27. Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, and J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2790–2798.
28. Fuentes-Ramírez, L. E., and J. Caballero-Mellado. 2005. Bacterial biofertilizers, p. 143–172. In Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
29. Gibson, J., and C. S. Harwood. 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:345–369.
30. Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *J. Theor. Biol.* **190**:63–68.
31. Gómez-de-Jesús, A., A. Lara-Rodríguez, F. Santoyo-Tepole, C. Juárez-Ramírez, E. Cristiani-Urbina, N. Ruiz-Ordaz, and J. Galíndez Mayer. 2003. Biodegradation of the water-soluble gasoline components in a novel hybrid bioreactor. *Eng. Life Sci.* **3**:306–312.
32. Goris, J., P. de Vos, J. Caballero-Mellado, J.-H. Park, E. Falsen, J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and P. Vandamme. 2004. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1677–1681.
33. Govindarajan, M., J. Balandreau, R. Muthukumarasamy, G. Revathi, and C. Lakshminarasimhan. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant Soil* **280**:239–252.
34. Hayatsu, M., M. Hirano, and S. Tokuda. 2000. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1737–1740.
35. Hofer, B., L. D. Eltis, D. N. Dowling, and K. N. Timmis. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene* **130**:47–55.
36. Holguin, G., and B. R. Glick. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tet^r promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microb. Ecol.* **46**:122–133.
37. Honma, M., and T. Shimomura. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* **42**:1825–1831.
38. Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, NY.
39. Kennedy, I. R., A. T. M. A. Choudhury, and M. L. Keckskés. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* **36**:1229–1244.
40. Kikuchi, Y., X.-Y. Meng, and T. Fukatsu. 2005. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4035–4043.
41. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, AZ.
42. Mahenthiralingam, E., T. A. Urban, and J. B. Goldberg. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:144–156.
43. Marin, V. A., K. R. S. Teixeira, and J. I. Baldani. 2003. Characterization of amplified polymerase chain reaction *glnB* and *nifH* gene fragments of nitrogen-fixing *Burkholderia* species. *Letts. Appl. Microbiol.* **36**:77–82.
44. Meyer, J. M., A. Stintzi, D. de Vos, P. Cornelis, R. Tappe, K. Taraz, and H. Budzikiewicz. 1997. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143**:35–43.
45. Miller, S. C. M., J. J. LiPuma, and J. L. Parke. 2002. Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3750–3758.
46. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**:265–270.
47. Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5269–5273.
48. O'Sullivan, L. A., and E. Mahenthiralingam. 2005. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Letts. Appl. Microbiol.* **41**:8–11.
49. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, R. Castro-González, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3103–3110.
50. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, J. I. Baldani, P. Estrada-de los Santos, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1931–1937.
51. Poly, F., L. Jocteur-Monrozier, and R. Bally. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* **152**:95–103.
52. Ramette, A., J. J. LiPuma, and J. M. Tiedje. 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1193–1201.
53. Reeves, M. W., L. Pine, J. B. Neilands, and A. Balows. 1983. Absence of siderophore activity in *Legionella* species grown in iron-deficient media. *J. Bacteriol.* **154**:324–329.
54. Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V. L. D. Baldani, M. Schmid, J. I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann, and J. Caballero-Mellado. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2155–2162.
55. Rodríguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**:319–339.
56. Rodríguez, H., R. Fraga, T. Gonzalez, and Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* **287**:15–21.
57. Roesch, L. F. W., F. L. Olivares, L. M. P. Passaglia, P. A. Selbach, E. L. S. de Sa, and F. A. O. de Camargo. 2006. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**:967–974.
58. Rösch, C., A. Mergel, and H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3818–3829.
59. Roselló-Mora, R., and R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39–67.
60. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
61. Salles, J. F., F. A. de Souza, and J. D. van Elsas. 2002. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1595–1603.
62. Salles, J. F., E. Samyn, P. Vandamme, J. A. van Veen, and J. D. van Elsas. 2006. Changes in agricultural management drive the diversity of *Burkholderia* species isolated from soil on PCAT medium. *Soil Biol. Biochem.* **38**:661–673.
63. Salles, J. F., J. A. van Veen, and J. D. van Elsas. 2004. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4012–4020.

64. Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**:47–56.
65. Shah, S., J. Li., B. A. Moffatt, and B. R. Glick. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**:833–843.
66. Siddiqui, Z. A. 2005. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens, p. 111–142. *In* Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
67. Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA.
68. Taghavi, S., T. Barac, B. Greenberg, B. Borremans, J. Vangronsveld, and D. van der Lelie. 2005. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8500–8505.
69. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
70. Tillmann, S., C. Strömpl, K. N. Timmis, and W.-R. Abraham. 2005. Stable isotope probing reveals the dominant role of *Burkholderia* species in aerobic degradation of PCBs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**:207–217.
71. Valdés, M., N. O. Pérez, P. Estrada-de los Santos, J. Caballero-Mellado, J. J. Peña-Cabriales, P. Normand, and A. M. Hirsch. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:460–466.
72. Valverde, A., P. Delvasto, A. Peix, E. Velásquez, I. Santa-Regina, A. Ballester, C. Rodríguez-Barrueco, C. Garcia-Balboa, and J. M. Igual. 2006. *Burkholderia ferriarvae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2421–2425.
73. Vandamme, P., J. Goris, W.-M. Chen, P. de Vos, and A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:507–512.
74. Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407–438.
75. van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:453–483.
76. Weber, O. B., V. L. D. Baldani, K. R. S. Teixeira, G. Kirchhof, J. I. Baldani, and J. Döbereiner. 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* **210**:103–113.
77. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697–703.
78. Witzig, R., H. Junca, H.-J. Hecht, and D. H. Pieper. 2006. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3504–3514.
79. Yang, H.-C., W.-T. Im, K. K. Kim, D.-S. An, and S.-T. Lee. 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:453–457.
80. Zhang, H., S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:743–749.
81. Zhang, H., H. Luo, and Y. Kamagata. 2003. Characterization of the phenol hydroxylase from *Burkholderia kururiensis* KP23 involved in trichloroethylene degradation by gene cloning and disruption. *Microbes Environ.* **18**:167–173.

ANEXO 3

Ensayos de microscopía

Los análisis de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido fueron realizados con algunas plantas de maíz y tomate inoculadas con diferentes cepas (*B. unamae* MTI-641^T o *s7p-gusA*) y plantas sin inocular. Las plantas fueron cultivadas en tubos de ensaye con arena, bajo las condiciones descritas previamente (Onofre-Lemus *et al.* 2009). Las plantas inoculadas con la cepa *s7p-gusA* fueron procesadas para la detección histoquímica del gene *gusA* y analizadas mediante microscopía óptica (Fig. 1). Algunos fragmentos representativos de las raíces fueron seleccionados para su posterior fijación, deshidratación e inclusión en resinas hidrofílicas. El tejido embebido en las resinas fue procesado en un micrótopo y ultramicrotopo para la obtención de cortes de diferente espesor. En el microscopio electrónico de barrido, las plantas de maíz inoculadas mostraron la presencia de bacterias adheridas de forma polar a la superficie de las células epidérmicas, las cuales se encontraron embebidas en una capa de mucigel densa y fibrosa (Fig. 2A). Las observaciones microscópicas de plantas de tomate inoculadas, mostraron colonización extensa en células epidérmicas y pelos radicales (Fig. 2B). Los cortes de tejido radical ultrafinos revelaron también la presencia de bacterias embebidas en el mucigel, las bacterias encontradas corresponden al tamaño de las bacterias inoculadas (Fig. 2 C-D). La identidad de la cepa inoculada fue confirmada con la recuperación y crecimiento en medio selectivo.

Finalmente, para corroborar la identidad de la cepa MTI-641^T inoculada, fueron realizados ensayos inmunohistoquímicos en tejido radical de maíz y tomate. El tejido ya fijado fue incubado en glucosa estéril 30% por un periodo de 24-40 horas y posteriormente mediante un criostato fueron obtenidos cortes de tejido entre 60 y 60 micras. Para realizar los ensayos de inmunofluorescencias fueron utilizados los anticuerpos α -*Burkholderia* (1:1500) como anticuerpo primario y α -IgG acoplado a rodamina B (1:250) como anticuerpo secundario. Los resultados de estos análisis fueron positivos en las plantas inoculadas y negativos en las no inoculadas (Fig. 3 A1-3), demostrando la identidad de *B. unamae* MTI-641^T colonizando las raíces de maíz y tomate. Mediante estos ensayos también fue observada la presencia de bacterias en tejido vascular (Fig. 3 B), y la superficie de las raíces (Fig 3. C), sin embargo la calidad de los cortes no permitió la identificación del tejido vegetal.

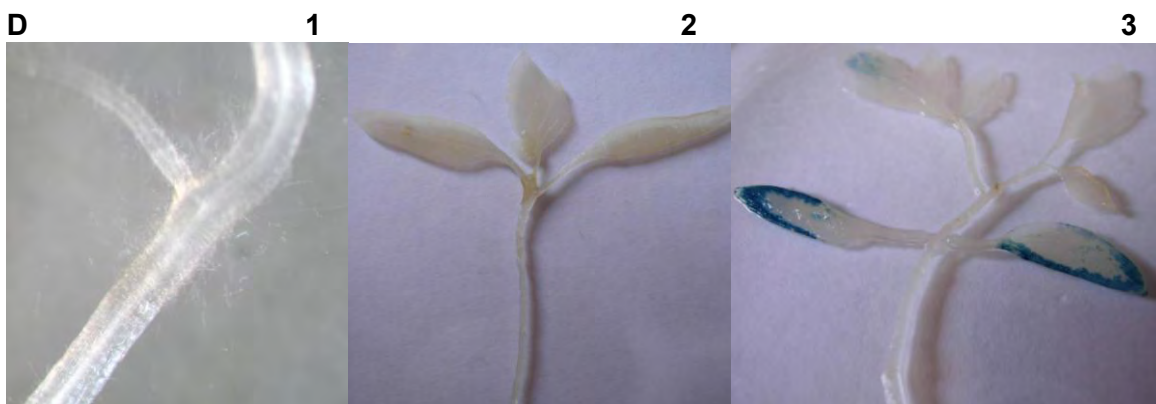
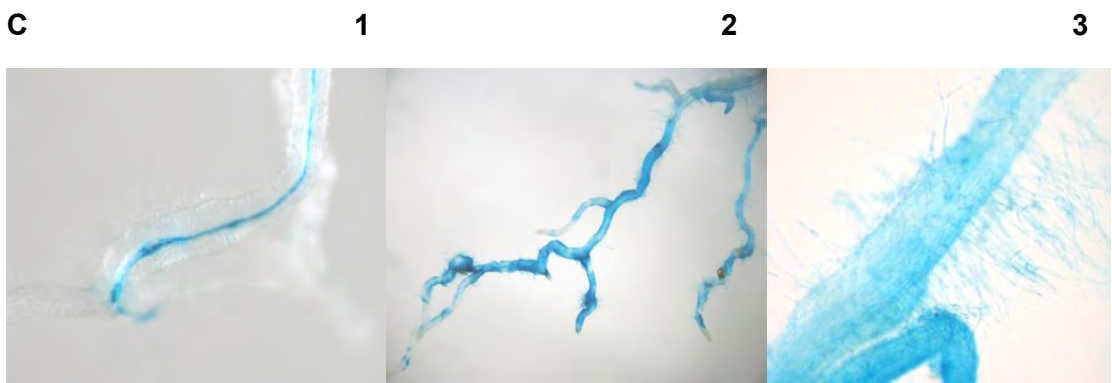
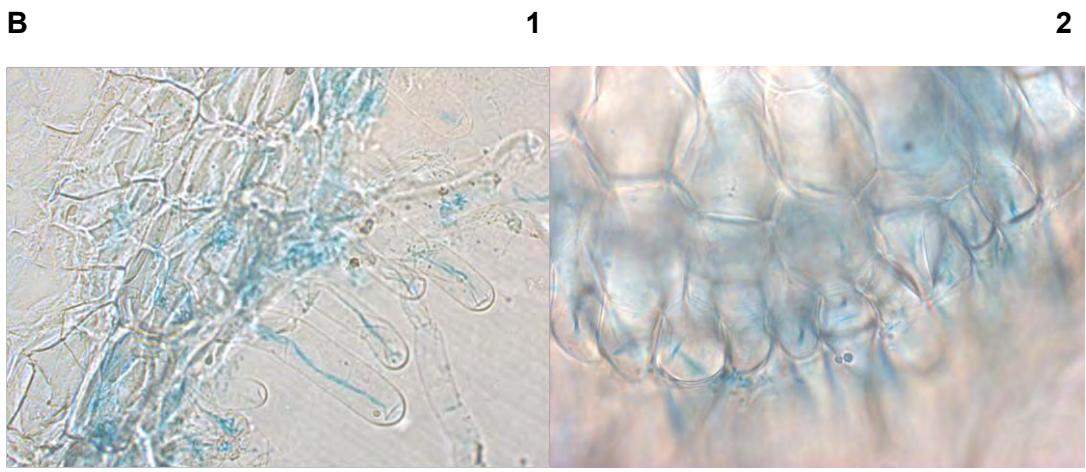
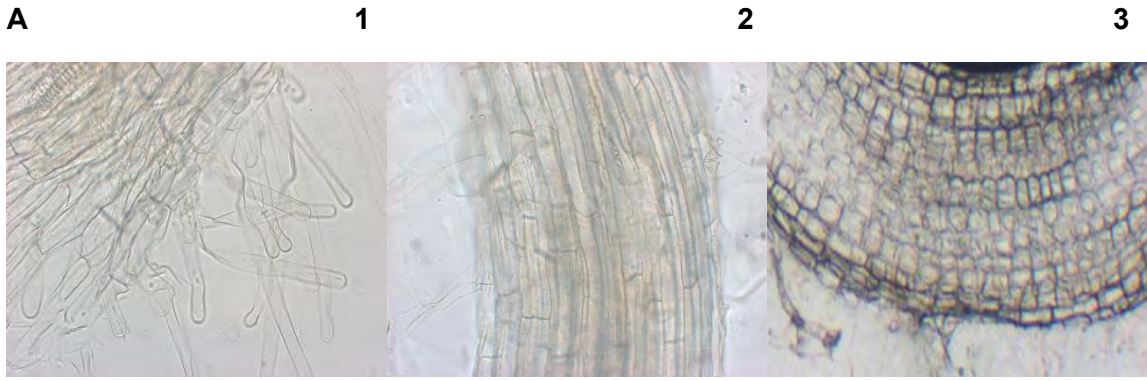
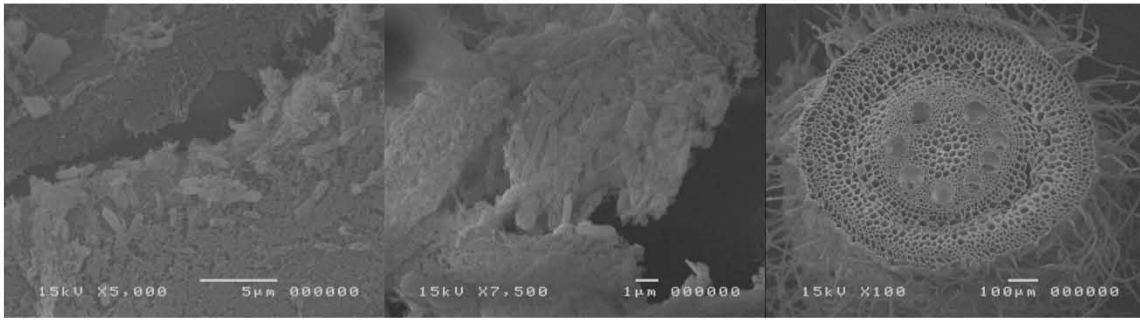
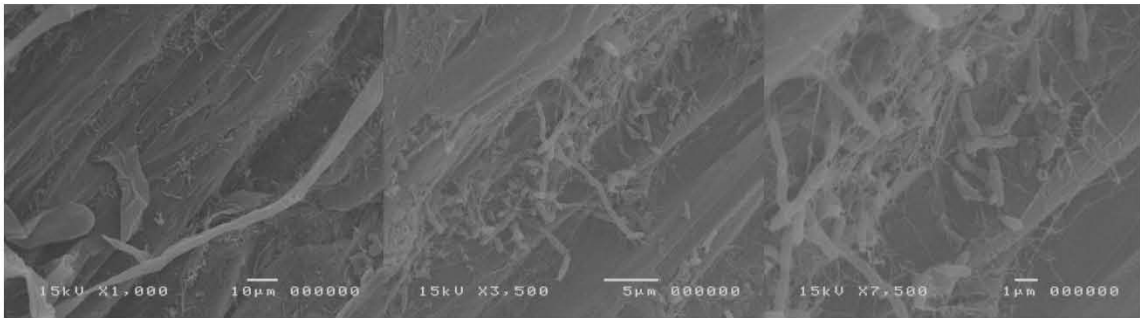


Figura 1. Localización histoquímica de la actividad β -glucuronidasa a través de microscopía óptica en plantas de tomate inoculadas con la cepa *s7p-gusA* o con la cepa *gusA*⁻ y en plantas no inoculadas. **A.** cortes longitudinales (A 1-2) y transversales (A-3) de raíces de plantas de tomate inoculadas con la cepa *gusA*⁻ (contiene el gene *gusA* sin promotor). **B.** Corte longitudinal (B-1) y transversal (B-2) de raíces de plantas inoculadas con la cepa *s7p-gusA*. **C.** Raíces completas de plantas inoculadas con la cepa *s7p-gusA*. **D.** Raíces (D-1), y parte aérea (D-2) de plantas inoculadas con la cepa *gusA*⁻. D-3. Parte aérea de plantas inoculadas con la cepa *s7p-gusA*.

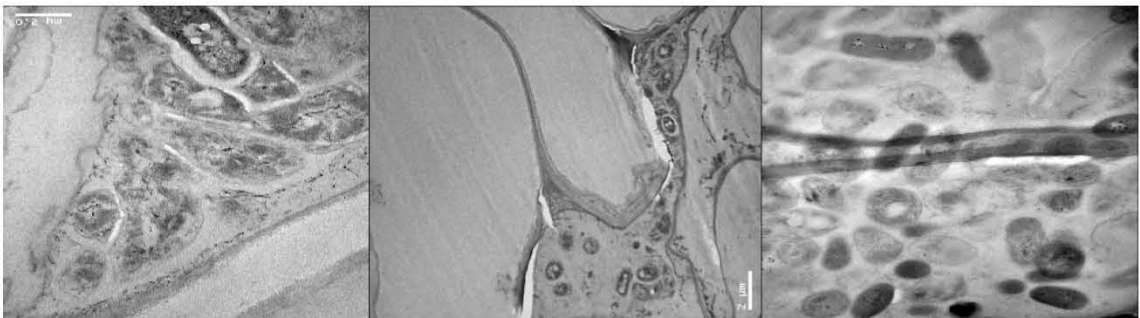
A



B



C



D

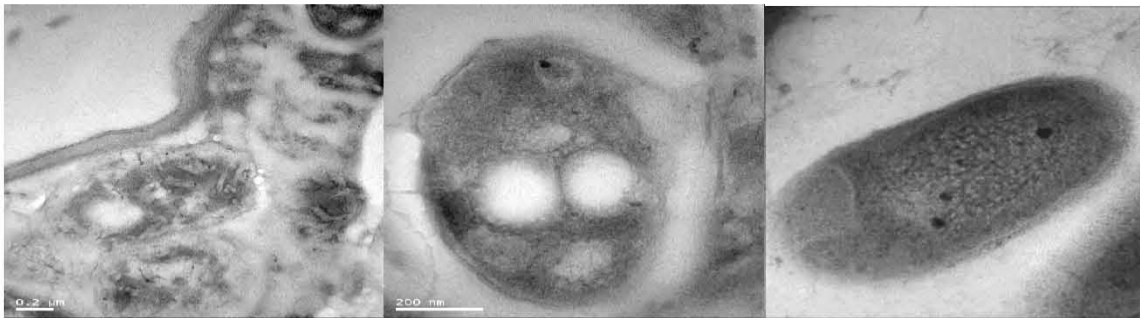


Figura 2. Análisis de microscopía electrónica de barrido en raíces de plantas inoculadas con la cepa *s7p-gusA* en plantas de maíz (A) y tomate (B). Análisis por microscopía electrónica de transmisión en diferentes cortes de tejido radical de plantas de tomate inoculadas con la cepa *s7p-gusA* (C-D).

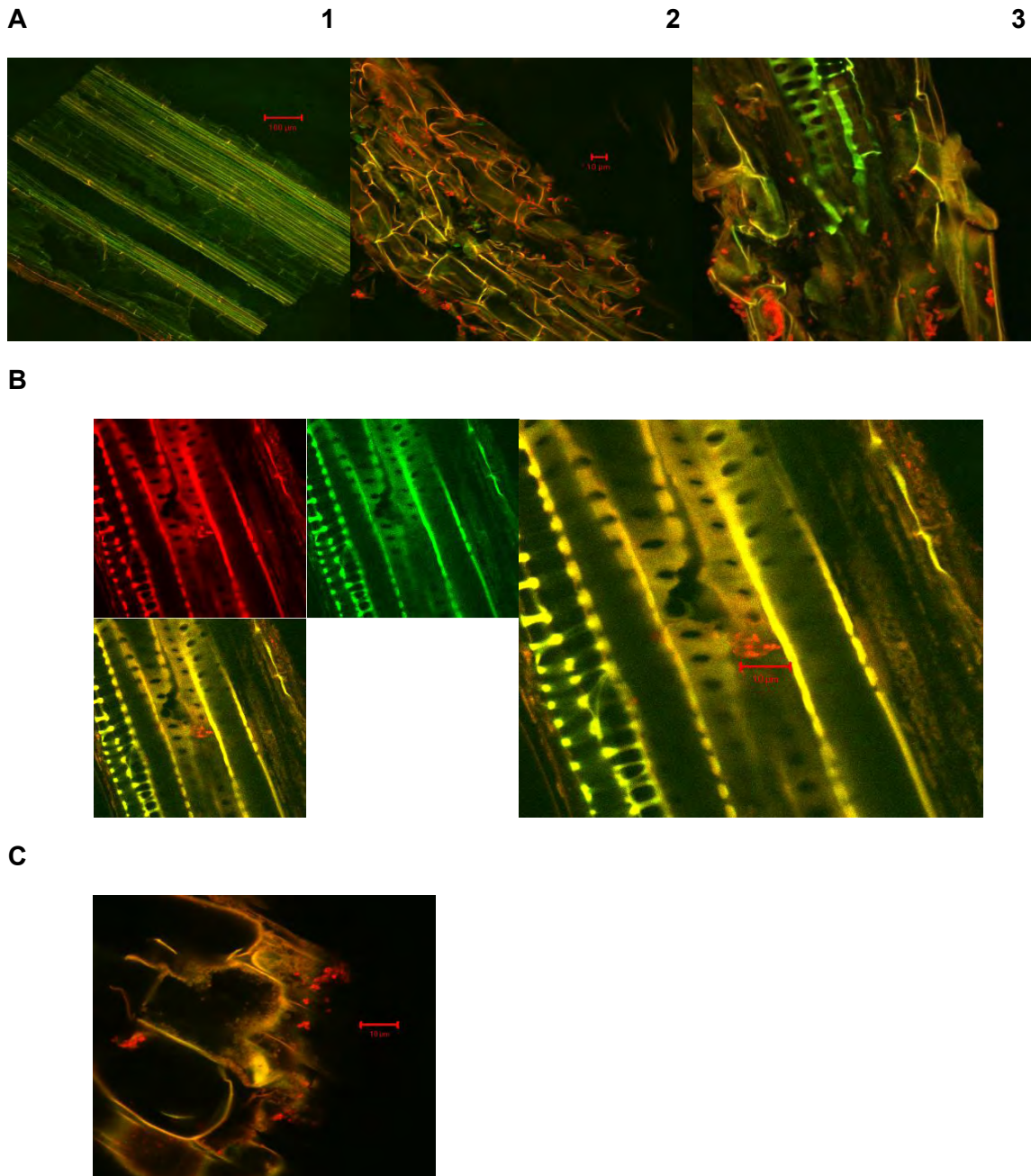


Figura 3. A. Análisis inmunohistoquímicos visualizados a través de microscopía confocal en plantas de tomate inoculadas con la cepa *s7p-gusA* y plantas sin inocular. A1. Corte transversal de planta no inoculada. A2-A3. Corte transversal de planta inoculada. B. Acercamiento en corte transversal de planta inoculada. C. detección inmunohistoquímica en células radicales epidérmicas de plantas inoculadas. Agradecemos a la Dra. Mónica Rosales Pérez por la asesoría brindada en los análisis inmunohistoquímicos y por proporcionarnos los anticuerpos α -*Burkholderia*.

ANEXO 4

Medios de cultivo, y determinación de actividades enzimáticas

Medio BSE

0.5% ácido succínico, 0.04% K_2HPO_4 , 0.04% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, y 0.05% extracto de levadura; pH 6.5. Esterilizar por autoclave.

Medio selectivo BAc

0.2% ácido azelaico, 0.02% L-citrulina, 0.04% K_2HPO_4 , 0.04% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, azul de bromotimol 0.0075%, y agar 1.8%. El medio es ajustado a pH 5.7, y esterilizado por a 121°C por 20 minutos antes de la adición de la citrulina (esterilizada previamente por filtración).

Medio de sales minerales SM

Acido succínico 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, $CaCl_2$ 0.013, $FeSO_4$ 0.0013%. Ajustar a pH 5.7 y esterilizar por autoclave. Al momento de inocular adicionar a temperatura ambiente el ACC filtrado ajustando a una concentración final de 3 mM.

Análisis de los perfiles de restricción del gene ribosomal 16S (ARDRA)

La amplificación del gene 16S fue realizada por PCR de colonias individuales recuperadas del medio selectivo. El gene ribosomal 16S fue amplificado con los oligonucleótidos universales fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1991) utilizando la Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR consistieron de un ciclo de desnaturalización inicial (94°C, 3 min), 35 ciclos de amplificaciones (94°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min) y un ciclo de elongación final (72°C, 5 min). Los productos de PCR amplificados (1.5 kb) fueron digeridos con las enzimas *Hae* III, *Hinf* I y *Rsa* I. Las longitudes de los fragmentos de restricción de los genes 16S fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 3%, y los patrones de restricción de cada colonia analizada fueron comparados con el de la cepa *B. unamae* MTI-641^T.

Determinación de actividad enzimática ACC desaminasa

Las bacterias fueron cultivadas en 6 ml de medio líquido BSE por 18 horas a 29°C con agitación 250 rpm. Después del crecimiento, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas dos veces con buffer de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.5. Antes de realizar el ensayo es necesario inducir la actividad ACC desaminasa por lo cual el paquete celular es transferido a 20 ml de un segundo medio (SM) con ACC 3 mM o NH₄Cl 3 mM como única fuente de nitrógeno. Después de la incubación (inducción de la actividad ACC desaminasa) por 18 horas, las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas 2 veces con buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.5. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 1 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 8.5 y mantenido en hielo. La lisis celular fue realizada con la prensa French utilizando 900 lb/in² de presión. Los extractos crudos son obtenidos por centrifugación y mantenidos en hielo. La actividad ACC desaminasa fue determinada a través de la producción de α -cetobutirato de acuerdo a una modificación del ensayo publicado por Honma & Shimomura (1978) que es descrito a continuación. Una cantidad de extracto crudo es mezclada con ACC 25 mM en un volumen final de 200 μ l en buffer Tris.HCl 0.1 M pH 8.5. La cantidad de extracto crudo puede variar de acuerdo al crecimiento bacteriano en el medio con ACC (entre 10 y 190 μ l), preparar un stock de ACC 0.5 M y adicionar 10 μ l de este al extracto para comenzar la reacción. Esta mezcla debe ser incubada en tubos de ensayo de 10 ml a 30°C por un periodo de 15 minutos y como máximo 2 horas. Después de este tiempo, la reacción es detenida adicionando 1.8 ml de HCl 0.56N. Posteriormente, adicionar 0.3 ml de una solución 0.1% de 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNP) disuelta en HCl 2N. Esta mezcla es mantenida por 15 minutos a 30°C, después son adicionados 2 ml de hidróxido de sodio 2N y finalmente se determina la absorbancia de las muestras a 540 nm. El número de μ moles de α -cetobutirato producido por la enzima es determinado a través de la comparación de las mediciones de OD 540 nm con aquellas obtenidas en una curva estándar de α -cetobutirato en un rango de 0.1 a 1 μ mol. Cada una de las series de las concentraciones conocidas de α -cetobutirato son preparadas en un volumen final de 200 μ l en buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 8.5, dando el mismo tratamiento que a los extractos de proteínas totales, excepto la adición del ACC. Es recomendable que por cada solución preparada de DNP sea realizada una curva estándar de α -cetobutirato. Como blanco pueden ser utilizados los valores de absorbancia del extracto sin ACC, o el ACC sin extracto. El ACC preferentemente debe ser preparado al momento de realizar el

ensayo, o puede ser congelado en alícuotas a -20, descongelando una alícuota por ensayo. En este ensayo el contenido de proteínas totales fue determinado por el método de Bradford (1976). La obtención de la actividad enzimática ACC desaminasa es reportada en μ moles de α -cetobutirato/h/mg de proteína.

Ensayos *in vitro* de la actividad β -glucuronidasa

Solución de sales MM

0.01% $MgSO_4$, 0.022% K_2HPO_4

Buffer de ensayo GUS

50 mM $NaPO_4$, pH 7.0, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, al momento de realizar el ensayo adicionar PNPG a una concentración final de 1.25 mM.

Después de inducir la expresión del gene *acdS* y la obtención de crecimiento bacteriano en las diferentes cepas marcadas con *gusA*, 1 ml de cada cultivo celular fue centrifugado, lavado dos veces y resuspendido en 1 ml de una solución de sales minerales (MM) suplementada con Cm 100 μ g/ml. En seguida, las células fueron permeabilizadas mediante la adición de 30 μ l de una solución de SDS 0.1% y 60 μ l de cloroformo, vortexando por 10 s. Después de la separación de las dos fases, en un tubo nuevo fueron colocados 100 μ l de células permeabilizadas (tomar la muestra de la parte de arriba) y fueron mezcladas con 400 μ l de buffer de ensayo de GUS calentado previamente a 37°C. Las reacciones fueron mantenidas a 37°C, y después de 20, 40 y 60 minutos de incubación se tomaron muestras de 100 μ l que fueron colocadas en 800 μ l de 0.4 M de Na_2CO_3 para detener la reacción. La absorbancia de cada muestra fue determinada a 405 nm. La actividad enzimática β -glucuronidasa es reportada en nmoles/min/mg de proteína. Bajo estas condiciones, el coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol es 18,000. Entonces en un volumen final de 900 μ l una absorbancia de 0.02 representa 1 nmol de producto producido, por lo tanto, el coeficiente de extinción molar es una constante (0.02). Por otro lado, es necesario calcular la pendiente (S) de la velocidad de la reacción graficando OD_{405} nm (eje Y) contra el tiempo (eje X). La velocidad de reacción (R) es calculada con la siguiente fórmula: $R = S / (0.02 \times V \times \text{mg de proteína. ml})$; en donde V = volumen analizado de células permeabilizadas. En este ensayo V= 0.02 ml.

El contenido de proteínas totales fue determinado en el paquete celular obtenido a partir de 1 ml de cultivo. Las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 1ml de ácido tricloroacético 5% para su lisis. Después de centrifugar y eliminar el sobrenadante, el pelet fue resuspendido en 0.4 N de NaOH. En seguida, una muestra del extracto celular fue analizada por el método de Bradford (1976).

REFERENCIAS

1. **Abeles, F. B, P. W. Morgan, and M. E. Saltveit.** 1992. Ethylene in plant biology, 2nd ed. Academic Press, New York.
2. **Arshad, M. and W. T. Frankenberger.** 2002. Ethylene: Agricultural Sources and applications. Klumer Academic/Plenum Publishers, New York.
3. **Blaha, D., C. Pringet-Combaret, M. S. Mirza, and Y. Moëgne-Loccoz.** 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography .FEMS. Microbiol. Ecol. 56:455-470.
4. **Belimov A. A., N. Hontzeas, V. I. Safranova, S. V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, and B. R. Glick.** 2005. Cadmium tolerant plant-growth promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) Soil. Biol. Biochem. 37:241-250.
5. **Belimov, A. A., I. C. Dodd, N. Hontzeas, J. C. Theobald, V. I. Safranova, and W. J. Davies.** 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signaling. New Phytol. 181:413-423.
6. **Belimov, A. A., I. C. Dodd, V. I. Safranova, N. Hontzeas, and W. J. Davies.** 2008. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. J. Exp. Bot. 58:1485-1495.
7. **Brämer C. O, P. Vandamme, F. L da Silva, J. G. Gomez, A. Steinbüchel.** 2001. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1709-13
8. **Brinkman A. B., T. J. G. Ettema, W. M. de Vos, and J. van der Oost.** 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. Mol. Microbiol. 48:287-294.
9. **Burd G. I., D. G. Dixon and B. R. Glick.** 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46:237-245.
10. **Caballero-Mellado J, J. Onofre-Lemus, P. Estrada-de los Santos & L. Martínez-Aguilar.** 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl. Environ. Microbiol 73: 5308–5319.
11. **Caballero-Mellado J.** 2006. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48:154-161.
12. **Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdéz, and P. Estrada-de los Santos.** 2004. *Burkholderia unamae* sp nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1165–1172.
13. **Cain C. C, A. T. Henry, R. H. Waldo, L. J. Casida and J. O. Falkinham.** 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. Appl. Environ. Microbiol 66: 4139–4141.
14. **Chain P.S, V. J. Deneff, K.T Konstantinidis, L. M. Vergez, L. Agulló, V. L. Reyes, L. Hauser, M. Córdova, L. Gómez, M. González, M. Land, V. Lao, F. Larimer, J. J. LiPuma, E. Mahenthalingam, S. A. Malfatti, C. J. Marx, J. J. Parnell, A. Ramette, P. Richardson, M. Seeger, D. Smith, T. Spilker, W. J. Sul, T. V. Tsoi, L. E. Ulrich, I. B. Zhulin, and J. M. Tiedje.**

2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:15280-15287.
15. **Chen W. M., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna, and C. Boivin-Masson.** 2003. Legume symbiotic fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. J. Bacteriol. 185:7266-7272.
 16. **Chen W.M, S. M. de Faria, R. Straliootto, R. M. Pitard, J. L. Simões-Araújo, J. H. Chou, Y. J. Chou, E. Barrios, A. R. Prescott, G. N. Elliott, J. I. Sprent, J. P. Young, and E. K. James.** 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. Appl. Environ. Microbiol. 71:7461-71.
 17. **Cheng Z., B. P. Duncker, B. J. McConkey, and B. R. Glick.** 2008. Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. Can.J. Microbiol. 54:128-136.
 18. **Chet I., and J. Inbar.** 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48:37-43.
 19. **Chiarini L., A. Bevivino, C. Dalmastrri, S. Tabacchioni and P. Visca.** 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. Trends. Microbiol. 14: 277-286.
 20. **Coenye, T., S. Laevens, A. Willems, M. Ohlen, W. Hannant, J. R. Govan, M. Gillis, E. Falsen, and P. Vandamme.** 2001. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1099-1107.
 21. **Compant S, J. Nowak, T. Coenye, C. Clément, and E. Ait Barka.** 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. FEMS. Microbiol. Rev.32:607-626.
 22. **Czarny J., V. P. Grinchko, and B. R. Glick.** 2006. Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. Biotechnol. Advances. 24:410-419.
 23. **De Paepe A., and D. Van Der Straeten.** 2005. Ethylene biosynthesis and signaling: An overview. Vitamins and Hormones. 72:399-430.
 24. **De Paepe A., M. Vuylsteke, P. Van Hummelen, M. Zabeau, and D. Van Der Straeten.** 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. Plant J. 39:537-559.
 25. **Dell'Amico, E., L. Cavalca, and V. Andreoni.** 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Soil Biol. Biochem. 40:74-84.
 26. **Döbereiner J.** 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis. 13:1-13.
 27. **Dowling D., N., R. Sexton, A. Fenton, I. Delany, S. Fedi, B. McHugh, M. Callanan, Y. Moëne-Loccoz and F. O'Gara.** 1996. Iron regulation in plant associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control. In: Molecular Biology of *Pseudomonads*, pp. 502-511. Nakazawa T., K. Furukawa, D. Haas, and S. Silver. Eds. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
 28. **Duan J., K. M. Müller, T. C. Charles, S. Vessely and B. R. Glick.** 2009. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia from southern Saskatchewan. Microb. Ecol. 57:423-436.
 29. **Eilmus S & M. Heil.** 2009. Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. Appl. Environ. Microbiol. 75:4324-4332.

30. **Elliott G.N., J.H Chou, W. M Chen, G.V Bloemberg, C. Bontemps, E. Martínez-Romero, E. Velazquez, J. P. Young, J. I. Sprent, and E. K. James.** 2009. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ. Microbiol.* 11:762-78.
31. **Elliott G.N., W. M. Chen, J. H. Chou, H. C. Wang, S. Y. Sheu, L. Perin, V. M. Reis, L. Moulin, M. F. Simon, C. Bontemps, J. M. Sutherland, R. Bessi, S. M. de Faria, M. J. Trinick, A. R. Prescott, J. I. Sprent, and E. K. James.** 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol.* 173:168-80.
32. **Estrada-de Los Santos P., R. Bustillos-Cristales and J. Caballero-Mellado.** 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790–2798.
33. **Finlayson S. A., K. R. Foster, and D. M. Reid.** 1991. Transport and metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 96:1360-1367.
34. **Fujino A., T. Ose, M. Yao, T. Tokiwano, M. Honma, N. Watanabe, I. Tanaka.** 2004. Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Mol. Biol.* 341:999–1013
35. **Gamalero, E., G. Berta, N. Massa, B. R. Glick, and G. Lingua.** 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:459-467.
36. **Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin & P. Fernandez.** 1995. Polyfasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J. Syst. Bacteriol.* 45: 274-289.
37. **Glick B.** 2004. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 56:291-312.
38. **Glick B. R. Z, Cheng, J. Czarny, and J. Duan.** 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329-339.
39. **Glick B. R., D. M. Penrose, and J. Li.** 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63-68.
40. **Goris, J., P. de Vos, J. Caballero-Mellado, J.-H. Park, E. Falsen, J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and P. Vandamme.** 2004. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677–1681.
41. **Grinchko V. P and B. R. Glick.** 2001a. Amelioration of flooding stress in plants by ACC deaminase-containing plant growth promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39:11-17.
42. **Grinchko V. P. and B. R. Glick.** 2001b. Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39:1-9.
43. **Grinchko V. P. and B. R. Glick.** 2001c. Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, rolD or PBR-1b promoter. *Plant Physiol. Biochem.* 39:19-25.

44. **Grincko, V. P., V. I. Grishko, and K. P. Pauls.** 2005. Evaluation of tomato plants with constitutive, root-specific, and stress-induced ACC deaminase gene expression. *Russian J. Plant Physiol.* 52:359-364.
45. **Hall J. A., D. Peirson, S. Ghosh, and B. R. Glick.** 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Isr. J. Plant Sci.* 44:37-42.
46. **Holden M. T, H. M. Seth-Smith, L. C. Crossman, M. Sebahia, S. D. Bentley, A. M. Cerdeño-Tárraga, N. R. Thomson, N. Bason, M. A. Quail, S. Sharp, I. Cherevach, C. Churcher, I. Goodhead, H. Hauser, N. Holroyd, K. Mungall, P. Scott, D. Walker, B. White, H. Rose, P. Iversen, D. Mil-Homens, E. P. Rocha, A. M. Fialho, A. Baldwin, C. Dowson, B. G. Barrell, J. R. Govan, P. Vandamme, C. A. Hart, E. Mahenthiralingam, and J. Parkhill.** 2009. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* 191:261-77.
47. **Holden MT, R.W. Titball, S. J. Peacock, A. M. Cerdeño-Tárraga, T. Atkins, L.C. Crossman, T. Pitt, C. Churcher, K. Mungall, S. D. Bentley, M. Sebahia, N. R. Thomson, N. Bason, I. R. Beacham, K. Brooks, K. A. Brown, N. F. Brown, G. L. Challis, I. Cherevach, T. Chillingworth, A. Cronin, B. Crossett, P. Davis, D. DeShazer, T. Feltwell, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. E. Keith, M. Maddison, S. Moule, C. Price, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, M. Simmonds, S. Songsivilai, K. Stevens, S. Tumapa, M. Vesaratchavest, S. Whitehead, C. Yeats, B. G. Barrell, P. C Oyston, and J. Parkhill.** 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 14240-14245.
48. **Holguin G., and B. R. Glick.** 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* 41:281-288.
49. **Honma M., and T. Shimomura.** 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 42:1825-1831.
50. **Hontzeas, N., A. O. Richardson, A. Belimov, V. Safranova, M. M. Abu-Omar, and B. R. Glick.** 2005. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7556-7558.
51. **Hontzeas, N., J. Zoidakis, B. R. Glick, and M. M. Abu-Omar.** 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1703:11-79.
52. **Huang X. D., Y. El-Alawai, D. M. Penrose, and B. R. Glick.** 2004. Multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environ. Pollut.* 130:465-476.
53. **Huang X. D., Y. El-Alawai, J. Gurska, and B. R. Glick.** 2005. A multi-process phytoremediation system decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* 81:139-147.
54. **Izumi H, E. R. B. Moore, K. Killham, I. J. Alexander and I. C. Anderson.** 2007. Characterisation of endobacterial communities in ectomycorrhizas by DNA- and RNA-based molecular methods. *Soil Biol. Biochem* 39: 891–899.

55. **Jackson MB.** 1991. Ethylene in root growth and development. In: Matoo AK, Suttle JC, (eds) The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 65-80.
56. **Jacobson, C. B., J. J. Pasternak, and B. R. Glick.** 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* 40:1019-1025.
57. **Jalili F., K Khavazi, E. Pazira, A. Nejati, H. A. Rahmani, H. R. Sadaghiani, and M. Miransari.** 2009. Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J. Plant. Physiol.* 166:667-674.
58. **Jia Y. J., Y. Kakuta, M. Sugawara, T. Igarashi, N. Oki, M. Kisaki, T. Shoji, Y. Kanetuna, H. Matsui, and M. Honma.** 1999. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:542-549.
59. **Johnson P. R., and J. R. Ecker.** 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a Molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32:227-254.
60. **Kikuchi Y., T. Hosokawa and T. Fukatsu.** 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol* 73: 4308–4316.
61. **Kikuchi Y., X. Y. Meng and T. Fukatsu.** 2005. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera:Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4035–4043.
62. **Koch, K. A., G. Capitani, M. G. Gruetter, and J. F. Kirsch.** 2001. The human cDNA for a homologue of the plant enzyme 1-aminocyclopropan-1-carboxylate synthase encodes a protein lacking that activity. *Gene* 272:75-84.
63. **Kuhn S., M. Stiens, A. Pühler, and A. Schlüter.** 2008. Prevalence of pSmeSM11a-like plasmids in indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains isolated in the course of a field release experiment with genetically modified *S. meliloti* strains. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 63:118-131.
64. **Li J. and Glick B.** 2001. Transcriptional regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene (*acdS*). *Can. J. Microbiol.* 47:359-367.
65. **Li J., D. H. Ovakim, T. C. Charles, and B. R. Glick.** 2000. An ACC deaminase mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Curr. Microbiol.* 41:101-105.
66. **Lim J, T. H. Lee, B. H. Nahm, Y. D. Choi, M. Kim, and I. Hwang.** 2009. Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *J. Bacteriol.* 191:3758-9.
67. **Lim, Y. W., K. S. Baik, S. K. Han, S. B. Kim, and K. S. Bae.** 2003. *Burkholderia sordidicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1631-1636.
68. **López-Bahena, F.J., J. A. Monreal, F. Pérez-Montaño, B. Guasch-Vidal, R. A. Belloguín, J. M. Vinardell, and F. J. Ollero.** 2009. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases *GmPR1* expression in Williams soybean. *MPMI.* 22:1445-1454.
69. **Ma, W., F. C. Guinel, and B. R. Glick.** 2003a. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4396-4402.
70. **Ma W., S. B. Sebastianova, J. Sebastian, G. I. Burd, F. C. Guinel, and B. R. Glick.** 2003b. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek.* 83:285-291.

71. **Ma W., T. C. Charles, and B. R. Glick.** 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5891-5897.
72. **MacDonell L., J. M. Plett, S. Andersson-Gunneras, C. Kozela, J. Dugardeyn, D. Van Der Straeten, B. R. Glick, B. Sundberg & S. Regan.** 2009. Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiol. Plantarum.* 136: 94-109.
73. **Mahenthalingam, E., A. Baldwin, and P. Vandamme.** 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 51: 533-538.
74. **Martínez-Aguilar L., R. Díaz, J. J. Peña-Cabrales, P. Estrada-de los Santos, M. F. Dunn & J. Caballero-Mellado.** 2008. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4574-4579.
75. **Matoo A. K., and C. S. Suttle.** 1991. The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton, FL.
76. **Mattos K.A, V. L. Pádua, A. Romeiro, L. F. Hallack, B. C. Neves, T. M. Ulisses, C. F. Barros, A. R. Todeschini, J. O. Previato, L. Mendonça-Previato.** 2008. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80:477-93.
77. **Mazurier, S., M. Lemunier, S. Siblot, C. Mougél & P. Lemanceau.** 2004. Distribution and diversity of type III secretion system like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 49: 455-467.
78. **Meyer S. L. F., S. I. Massoud, D.J. Chitwood and D. P. Robets.** 2000. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology.* 2: 871–879.
79. **Minami, R., K. Uchiyama, T. Murakami, J. Kawai, K. Minkami, T. Llamada, D. Yokoi, H. Ito, H. Matsui, and M. Honma.** 1998. Properties, sequence, and synthesis in *E. coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J. Biochem.* 123:1112-1118.
80. **Nelson L. M.** 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New TESIS Jin Duan. Inoculants. Plant Management Network.
81. **Nierman W. C, D. DeShazer, H. S. Kim, H. Tettelin, K. E. Nelson, T. Feldblyum, R. L. Ulrich, C. M. Ronning, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, T. D. Davidsen, R. T. Deboy, G. Dimitrov, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, H. Khouri, J. F. Kolonay, R. Madupu, Y. Mohammoud, W. C. Nelson, D. Radune, C. M. Romero, S. Sarria, J. Selengut, C. Shamblin, S. A. Sullivan, O. White, Y. Yu, N. Zafar, L. Zhou, and C. M. Fraser.** 2004. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:14246-14251.
82. **Nukui N., K. Minamisawa, S. Ayabe, and T. Aoki.** 2006. Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen fixing regulator gene *nifA2* in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4964-4969.
83. **Ochman, H. & N.A. Moran.** 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science.* 292:1096-1098.
84. **Okon J. & R. Itzigsohn.** 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculants for improving crop yields. *Biotechnol. Adv.* 13: 415-424.

85. **Olson, J. M., J. N. Agar, M. K. Johnson, and R. J. Maier.** 2000. Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochem.* 39:16213-16219.
86. **Onofre-Lemus, J., I. Hernández-Lucas, L. Girard-Cuesy and J. Caballero-Mellado.** 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth promoting effect on tomato plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6581-6590.
87. **O'Sullivan L. and E. Mahenthalingam.** 2005. Under the microscope Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:8–11.
88. **Parke J.L and D. Gurian-Sherman.** 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 225–258.
89. **Perin, L., L. Martínez-Aguilar, R. Castro-González, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado.** 2006. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3103–3110.
90. **Pringet-Combaret, C., D. Blaha, J. F. Pothier, L. Vial, M. A. Poirier, F. Wisniewski-Dyé, and Y. Moëgne-Loccoz.** 2008. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other *Proteobacteria*. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 65:202-219
91. **Reis, V. M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V. L. D. Baldani, M. Schmid, J. I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann, and J. Caballero-Mellado.** 2004. *Burkholderia tropica* sp nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2155–2162.
92. **Rezzonico, F., G. Défago & Y. Moëgne-Loccoz.** 2004. Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcN* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and in phytopathogenic proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5119-5131.
93. **Riemenschneider A., R. Wegele, A. Schmidt, J. Papenbrock.** 2005. Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 272:1291–1304.
94. **Rodríguez H., S. Vessely, S. Shah, and B. R. Glick.** 2008. Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* strain on growth of non-transformed and transgenic canola plants. *Curr. Microbiol.* 57:170-174.
95. **Rotz L. D., A. S. Khan, S. R. Lillibridge, S.M. Ostroff, and J. M. Hughes.** 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis.* 8:225-230.
96. **Somtrakoon K, S. Suanjit, P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue, H. Lee, S. Upatham.** 2008. Enhanced biodegradation of anthracene in acidic soil by inoculated *Burkholderia* sp. VUN10013. *Curr. Microbiol.* 57:102-6.
97. **Saleem M., M. Arshad, & A. S. Bhatti.** 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635-648.
98. **Sun Y., Z. Cheng & B. R. Glick.** 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth- promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 296: 131-136.

99. **Tilman D., R. M. May, C. L. Lehman and M. A. Nowak.** 2002. Habitat destruction and the extinction debt. *Nature*. 418:671-677.
100. **Todorovic, B., and B. R. Glick.** 2008. The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulphhydrase by directed mutagenesis. *Planta*. 229:193-205
101. **Uchiumi, T., T. Ohwada, M. Itakura, H. Mitsui, N. Nukui, P. Dawadi, T. Kaneko, S. Tabata, T. Yokoyama, K. Tejima, K. Saeki, H. Omori, M. Hayashi, T. Maekawa, R. Sriprang, Y. Murooka, S. Tajima, K. Simomura, M. Nomura, A. Suzuki, Y. Shimoda, K. Sioya, M. Abe, and K. Minamisawa.** 2004. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186:2439-2448.
102. **Valverde, A., P. Delvasto, A. Peix, E. Velazquez, I. Santa-Regina, A. Ballester, C. Rodriguez-Barrueco, C. Garcia-Balboa, and J. M. Igual.** 2006. *Burkholderia ferrariae* sp.nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2421-2425.
103. **Van Borm S, A. Buschinger, J.J. Boomsma, and J. Billen.** 2002. *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269:2023-2027.
104. **Van Loon L., P. Bakker, and C. Pieterse.** 1997. Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: *Plant Growth-promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects.* pp. 50-57. Ogoshi A., K. Kobayashi, Y. Honma, F. Kodama, N. Kondo, & S. Akino. Eds. OECD, Paris.
105. **Van Loon, L. C. and B. R. Glick.** 2004. Increased plant fitness by rhizobacteria. In: *Molecular ecotoxicology of plants.* pp. 177-205. Sandermann, H., Ed., Springer-Verlag, Berlin.
106. **Van Oevelen S, E. De Wachter, P. Vandamme, E. Robbrecht, and E. Prinsen.** 2002. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (*Rubiaceae*, angiosperms) and proposal of 'Candidatus *Burkholderia kirkii*' sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:2023-2027.
107. **Van Oevelen S, R. de Wachter, P. Vandamme, E. Robbrecht and E. Prinsen.** 2004. 'Candidatus *Burkholderia calva*' and 'Candidatus *Burkholderia nigropunctata*' as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2237–2239.
108. **Vandamme P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, and A. Willems.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:507-12.
109. **Wang C., E. Knill, B. R. Glick, and G. Défago.** 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* 46:898-907.
110. **Weisburg W. G, S. M. Barns, D. A. Pelleiter, and. J. D. Jane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
111. **Whipps J. M.** 1990. Carbon utilization. In: *The rhizosphere,* pp. 59-97. Lynch, J. M. Ed., Wiley Interscience, Chinchester, UK.
112. **Whipps J. M.** 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Botan. Res.* 26:1-134.
113. **Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa.** 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36: 1251-1275.

114. **Yang J, J. W. Kloepper, and C. M. Ryu.** 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1-4.
115. **Zahir, Z.A., A. Munir, H. N. Asghar, B. shaharona, and M. Arshad.** 2008. Effectiveness of Rhizobia containing ACCD for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:958-963.
116. **Zang Y., L. Zhao, Y. Wang, B. Yang, and S. Chen.** 2008. Enhancement of heavy metal accumulation by tissue specific co-expression of *iaaM* and ACC deaminase genes in plants. *Chemosphere.* 72:564-571.
117. **Zhang, H., S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane.** 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 743-749.
118. **Zhong G. V. and J. K. Burns.** 2003. Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant. Mol. Biol.* 53:117-31.