



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EL PAPEL DE LOS LIPOPOLISACARIDOS EN LA RESISTENCIA A DISTINTOS FACTORES DE ESTRES EN Rhizobium tropici CIAT899”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

DEYANIRA PEREZ MORALES



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DR. MARIA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO  
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN





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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AGRICOLA DE MERIDA

Deyanira Pérez Morales  
7 de julio de 2004  
Dey P. M.

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "El papel de los lipopolisacáridos en la resistencia a distintos factores de estrés en *Rhizobium tropici* CIAT899".

realizado por **Deyanira Pérez Morales**

con número de cuenta **9425281-9**, quien cubrió los créditos de la carrera de:  
**Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**A t e n t a m e n t e**

Director de Tesis  
Propietario **Dra. María Esperanza Martínez Romero**  
Co-director de Tesis  
Propietario **Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann**  
  
Propietario **Biól. Rodolfo Salas Lizana**  
  
Suplente **M. en C. Martha Graciela Rocha Munive**  
  
Suplente **Biól. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo**

*Esperanza Martínez R*  
*Pablo Vinuesa*

*Rodolfo Salas Lizana*  
*Martha Graciela Rocha Munive*

Consejo Departamental de **Biología** FACULTAD DE CIENCIAS

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*

**M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez**



*A mis padres,  
porque más que haberme dado la vida, me han enseñado a disfrutarla y  
a aprender de ella. Porque han llenado de amor todos y cada uno de  
mis días. Porque sin su ejemplo no sería quien soy.*

*A mi hermano Moisés,  
mi amigo, mi cómplice, mi ejemplo a seguir. Por estar siempre conmigo  
y apoyarme. Por ser quien es.*

*A Paulo Tristán,  
por haber venido a darle una luz especial a nuestras vidas.*

*A Armando,  
por todo lo vivido, aprendido, compartido y soñado, por todos los  
instantes. Por la felicidad de saberme parte de su vida.*

*.....Con amor.*

## **Agradecimientos Académicos**

A mi tutora, la Dra. Esperanza Martínez Romero por todo el apoyo y la confianza que siempre depositó en mí.

A mi co-tutor, el Dr. Pablo Vinuesa Fleishmann por su guía durante el desarrollo del proyecto.

A mis sinodales, el Biól. Rodolfo Salas Lizana, por sus valiosas críticas y comentarios al trabajo. A la M. en C. Martha Rocha Munive, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis. Al Biól. Ernesto Ormeño Orrillo, por los comentarios aportados y porque fue un gran compañero de laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio del CIFN, por hacer de éste un lugar agradable para trabajar y aprender. En especial a Toño, por la ayuda técnica. A Lulú, porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme, por sus consejos.

A todos mis maestros que durante la carrera me transmitieron su amor por la Biología.

A la UNAM, nuestra maravillosa casa de estudios, por todo lo que me ha dado y por el orgullo y la responsabilidad que implica ser universitaria.

Al SNI y Probetel por las becas proporcionadas durante la elaboración de este trabajo.

## **Agradecimientos Personales**

A mis padres, por haberme guiado y apoyado a concluir esta etapa. Por la maravillosa familia que somos y por su ejemplo de vida.

A mi hermano, por motivarme de muchas maneras, a ser mejor.

A mis abuelitos Isabel y Lino, por ser ejemplo de fuerza y trabajo. Por las caminatas rodeados de la naturaleza.

A Armandín, por todo lo que me ayudó y apoyó (que fue muchísimo, en todos los aspectos) durante la realización de este trabajo. Por haber recorrido juntos esta parte de nuestras vidas.

A mis amigos de toda la vida, Martha y Oscar, porque sé que a pesar de la distancia, siempre están apoyándome y compartiendo mis alegrías. A mi gran amigo Edgar, por estar tan pendiente de mí.

A Noé y a Tecilli, por su preciada amistad.

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>2</b>
1.1 Rizobios y su interacción con plantas leguminosas .....	2
1.2 Lipopolisacáridos, principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.....	4
1.2.1 Química de los LPS.....	5
1.2.2. Genética y biosíntesis de los LPS.....	8
1.2.2.1 Biosíntesis del lípido A .....	9
1.2.2.2. Biosíntesis del oligosacárido núcleo .....	9
1.2.2.3. Biosíntesis del polisacárido O .....	10
1.2.3. Función de los LPS.....	11
1.3 Factores de estrés ambiental.....	12
1.3.1 Estrés oxidativo .....	13
1.3.2 Estrés osmótico.....	14
1.3.3 Estrés por acidez.....	16
1.3.4 Estrés por el fungicida "Captan" .....	17
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>19</b>
2.1 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899: el modelo de estudio.....	19
2.1.1 La importancia de la fucosa para la formación del polisacárido O en <i>R. tropici</i> CIAT899.....	19
2.1.2 Los genes <i>gmd</i> y <i>fcl</i> en el genoma de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	20
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	<b>24</b>
6.1 Cepas y plásmidos utilizados.....	24
6.2 Medios y condiciones de cultivo .....	24
6.2.1 <i>Rhizobium tropici</i> .....	24
6.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	24
6.3 Obtención de la cepa mutante de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	25
6.3 Obtención de la cepa mutante de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	26
6.4 Complementación de la cepa mutante <i>R. tropici</i> FR1 .....	27
6.5 Ensayos de estrés .....	27
6.5.1 Crecimiento en distintos factores de estrés.....	27
6.5.1.1 Estrés oxidativo .....	28
6.5.1.2 Estrés osmótico.....	28
6.5.1.3 Estrés por acidez.....	28
6.5.1.4 Estrés por el fungicida "Captan" .....	29
6.6 Ensayos de nodulación .....	29
<b>7. Resultados</b> .....	<b>30</b>
7.1 Obtención de una cepa de <i>R. tropici</i> CIAT899 portadora de una mutación en los genes <i>gmd</i> y <i>fcl</i> .....	30
7.1.1 La cepa mutante de <i>R. tropici</i> CIAT899 ( <i>R. tropici</i> FR1) posee un fenotipo LPS-R .....	30

7.1.2 Un cósmido de <i>R. tropici</i> CIAT899 produjo el restablecimiento del fenotipo de la cepa silvestre en FR1 .....	31
7.2 Crecimiento bajo distintas condiciones de estrés de las cepas <i>R. tropici</i> CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1 .....	32
7.2.1 Estrés oxidativo por ROS .....	32
7.2.2 Estrés por acidez .....	33
7.2.3 Estrés osmótico por Cloruro de Sodio .....	34
7.2.4 Estrés por el fungicida "Captan" .....	37
7.3 FR1 no indujo el desarrollo de nódulos en plantas de frijol .....	40
<b>8. Discusión .....</b>	<b>42</b>
8.1 Comportamiento de FR1 ante las distintas condiciones de estrés .....	42
8.1.1 Estrés por Peróxido de hidrógeno .....	43
8.1.2 Estrés por acidez .....	44
8.1.3 Estrés por Cloruro de Sodio .....	45
8.1.4 Estrés por "Captan" .....	46
8.2 Antígeno O, elemento determinante en la sobrevivencia ante distintas condiciones de estrés .....	48
8.3 Limitantes de las descripciones <i>in vitro</i> .....	48
8.4 La cepa complementada fue tan tolerante a los distintos tipos de estrés como la cepa silvestre .....	49
8.5 Impedimento de FR1 para formar nódulos en plantas de frijol .....	49
8.6 Ausencia de análisis genéticos .....	49
8.7 La tolerancia de <i>R. tropici</i> CIAT899 a ciertos tipos de estrés involucra elementos constitutivos .....	50
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>52</b>
<b>10. Apéndice .....</b>	<b>53</b>
I. Medios de cultivo y antibióticos .....	53
II. Protocolos .....	55
<b>11. Glosario .....</b>	<b>57</b>
<b>12. Bibliografía .....</b>	<b>58</b>

# Resumen

El proceso de fijación biológica de nitrógeno es llevado a cabo por el grupo de bacterias conocidas como rizobios, al interactuar con plantas leguminosas. Es de suma importancia para la agricultura y los ecosistemas naturales en general, debido a que representa la fuente más importante de abastecimiento de nitrógeno.

El éxito de esta interacción está estrechamente relacionada al estado fisiológico en el que se encuentran los dos simbios. De esta forma, una cepa de rizobio eficiente no expresará al máximo su capacidad de fijar nitrógeno si existen factores que limiten su vigor o el de la leguminosa hospedera, y viceversa. Muchas condiciones ambientales son factores limitantes para el crecimiento y actividad de los organismos. Típicos factores de estrés ambiental enfrentados por las leguminosas y los microsimbios pueden incluir estrés por agua, salinidad, pH del suelo, temperatura, metales pesados, entre otros.

Debido a la importancia de esta asociación simbiótica, es necesario entender cómo es que esta interacción ocurre a nivel de todos sus componentes y esto será mejor entendido sólo cuando la fisiología de dichos organismos sea estudiada en detalle bajo condiciones subóptimas, pues son las que generalmente encuentran en su medio natural. Un aspecto importante de caracterizar es la influencia que la arquitectura molecular de la superficie bacteriana tiene en su crecimiento, sobrevivencia y persistencia en el suelo, en condiciones adversas, así como en la interacción con el hospedero. Debido a que los lipopolisacáridos son componentes de la superficie celular, se encuentran constantemente expuestos a las presiones del medio externo, por lo que importantes roles en la resistencia a las condiciones hostiles son esperados de encontrar aquí.

Con el fin de contribuir a dicho conocimiento, se generó una mutante en la cepa *R. tropici* CIAT899 por recombinación heteróloga, en los genes *gmd* y *fcl*, involucrados en la biosíntesis de fucosa. La fucosa es un monosacárido que forma parte del antígeno O de los lipopolisacáridos de CIAT899. Al no tener la fuente de obtención de fucosa, el antígeno O no puede ser formado. Se determinó el comportamiento de esta cepa mutante ante distintas condiciones que implicaban un estrés abiótico. Asimismo se estableció si fue capaz de establecer una interacción exitosa con su macrosimbios.

# 1. Introducción

Los microorganismos y específicamente las bacterias, representan la forma de vida más versátil y conspicua que existe sobre la tierra debido en parte, a que han tenido millones de años para colonizar y adaptarse a prácticamente todos los tipos de hábitats (Brock, 2003).

## 1.1 Rizobios y su interacción con plantas leguminosas

Un grupo de procariontes que ha sido objeto de gran interés desde hace varias décadas por su papel dentro del ciclo del nitrógeno es el grupo de los colectivamente llamados rizobios, conjunto de bacterias que taxonómicamente pertenecen al orden Rhizobiales, dividido en cuatro familias y perteneciente a la subdivisión alfa de las Proteobacterias (Spaink, 2000).

Los rizobios son bacterias de suelo aerobias, Gram negativas, con forma de bacilo y una distribución casi cosmopolita. Su característica más distintiva es su capacidad para convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a formas de nitrógeno combinado (amonio, alanina), las cuales pueden ser asimiladas por las plantas leguminosas con las que forman asociaciones endosimbióticas (intracelulares). En esta simbiosis se distingue la formación por parte de la planta de estructuras especializadas denominadas nódulos. Los nódulos son el lugar de albergue de las bacterias y donde mediante un proceso de diferenciación celular, se convierten en bacteroides, los cuales son la forma celular capaz de fijar el dinitrógeno gaseoso (mediante su reducción a amonio) a través de la enzima nitrogenasa, proceso al que se le conoce como fijación biológica de nitrógeno (Wang *et. al.*, 2001; Brock, 2003). A su vez, las bacterias reciben compuestos derivados principalmente de la fotosíntesis. Este proceso no es exclusivo de la simbiosis rizobio-leguminosa, pues existen otras interacciones planta-bacteria (terrestres y acuáticas) en las que se presenta (Martínez-Romero, 2000). Sin embargo, históricamente su estudio se ha enfocado al sistema simbiótico desarrollado entre las leguminosas y los rizobios debido a que ésta asociación representa en términos cuantitativos, un componente principal en el ciclo del nitrógeno (Zahran, 1999).

Debido a que las plantas pueden utilizar el nitrógeno sólo en su forma combinada, el proceso de la fijación biológica por la simbiosis rizobio-leguminosa es de gran importancia para la agricultura y los ecosistemas naturales en general. Al favorecer el aumento en la cantidad de nitrógeno utilizable en el suelo, sobre todo en aquellos muy erosionados, constituye una buena alternativa para asegurar un desarrollo sustentable (Wang *et. al.*, 2001). Otra ventaja adicional es el incremento en los niveles de proteína de las plantas (Zahran, 1999). La fijación biológica de nitrógeno representa la fuente más importante de abastecimiento de nitrógeno (Martínez-Romero, 2000). Se estima que la cantidad anual de nitrógeno que entra a los ecosistemas terrestres por este proceso es de 139 a 175 millones de toneladas, donde las asociaciones rizobios-leguminosas contribuyen con más de la mitad de esta cantidad de nitrógeno fijado (Zahran, 1999), del 60 al 80%.

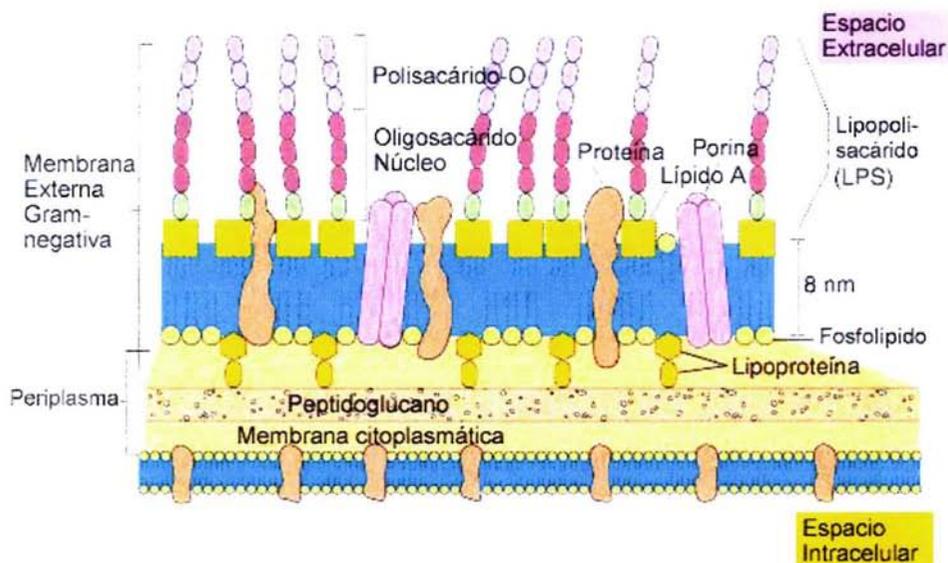
Actualmente se reconocen seis géneros dentro del grupo de los rizobios: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, con un número variable de especies descritas (Wang *et. al.*, 2001). A pesar de que el grupo constituye un grupo heterogéneo y polifilético (Debellé *et. al.*, 2001), las especies que lo componen comparten ciertas características bioquímicas y genéticas que les permiten establecer una asociación simbiótica exitosa con sus hospederos. Estos factores comunes incluyen la capacidad de reconocer moléculas específicas producidas por las plantas (flavonoides) y producir moléculas de señalización que actúan como morfógenos sobre las plantas hospederas (factores Nod). Otros elementos necesarios implican la presencia de ciertas adaptaciones por parte de los dos componentes de la interacción (Broughton y Pret, 1999). Entre estas últimas sobresale la eficiencia con la que es regulado el ambiente físico-químico que se requiere para la expresión óptima de la actividad de la nitrogenasa del microsimbionte (Brock, 2003).

La familia de angiospermas *Leguminosae* comprende alrededor de 700 géneros, con un número aproximado de 19 000 especies distribuidas mundialmente. Presentan una amplia diversidad tanto morfológica como ecológica (van Berkum y Eardly, 1998). Algunas especies del grupo de las leguminosas son cultivos agrícolas fundamentales en la economía y que forman parte de la dieta principal de muchos países, incluido el nuestro. Entre los cultivos económicamente importantes destacan el frijol, la alfalfa, la soya, el chícharo y el trébol (Martínez-Romero, 2001).

## 1.2 Lipopolisacáridos, principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas

A diferencia de las bacterias Gram positivas, las cuales además de la membrana citoplásmica poseen solamente una capa adicional constituida principalmente de mureina, las Gram negativas tienen prácticamente una segunda membrana celular, denominada membrana externa. La presencia de esta capa extra permite la creación de un nuevo compartimiento celular, el periplasma, que es el espacio existente entre las dos membranas. Está conformado por una red de peptidoglucanos y distintas proteínas como enzimas hidrolíticas, quimiorreceptores y proteínas de unión, entre otras (Brock, 2003).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas (Fig. 1.1) es una estructura asimétrica constituida en su monocapa interna por fosfolípidos típicos de las membranas citoplasmáticas y en su monocapa externa igualmente por fosfolípidos, pero además y esencialmente por lipopolisacáridos, conocidos como LPS, siendo el componente principal. Proteínas integrales (principalmente porinas que funcionan como canales permitiendo la entrada de moléculas hidrofílicas pequeñas) y proteínas periféricas se encuentran atravesando las dos monocapas de la membrana externa (Gronow y Brade, 2000).



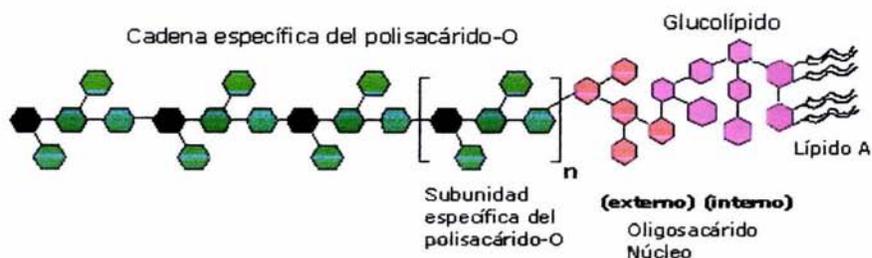
**Figura 1.1.-** Membrana externa de las bacterias Gram negativas. A diferencia de las Gram positivas, en las Gram negativas se presenta una segunda membrana cuyo componente principal son los lipopolisacáridos. Modificado de Brock, 2003.

Los lipopolisacáridos son moléculas glucolipídicas, ocupan aproximadamente el 75% del área de la superficie celular y tienen una masa molecular promedio de 10 kDa (Lerouge y Vanderleyden, 2001). Otras moléculas que también son parte de la membrana externa son los exopolisacáridos (EPSs), los polisacáridos capsulares (CPSs) y los glucanos cíclicos (Kannenberg *et. al.*, 1998).

### 1.2.1 Química de los LPS

En general, los LPS de las bacterias entéricas, que también son proteobacterias, son los mejor caracterizados debido a que numerosas especies del grupo son causales de enfermedades en varias especies animales, incluido el hombre (Raetz y Whitfield, 2002). Su estudio comenzó en los años 50, cuando se determinó que sus LPS contenían los componentes bioactivos responsables de las patofisiologías encontradas (Schnaitman y Klena, 1993), llevando a la generación de un modelo de diseño molecular de los LPS (Preston y Maskell, 2002). Con el tiempo, el estudio se fue enfocando también a organismos con otros estilos de vida, entre ellos los rizobios (Raetz y Whitfield, 2002). En la actualidad, los LPS mejor estudiados en el grupo de los rizobios son los de las especies *R. etli* y *R. leguminosarum* (Kannenberg *et. al.*, 1998). Aunque en composición química los LPS son muy distintos y presentan marcadas variaciones entre los dos grupos de bacterias (entéricas y rizobios) y aún entre sus especies, en arquitectura molecular son similares (Preston y Maskell, 2002).

Los LPS son moléculas anfipáticas complejas (Gronow y Brade, 2001) que se componen de tres regiones estructurales y funcionales: el lípido A, el oligosacárido núcleo y el polisacárido O (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.-** Estructura de los lipopolisacáridos. Se encuentran conformados por tres distintas regiones: el lípido A, el oligosacárido núcleo y el polisacárido O. Modificado de Brock, 2003.

El lípido A es un carbohidrato acilado (Carlson *et. al.*, 1999) que constituye el componente lipídico e hidrofóbico mediante el cual se ancla la molécula de LPS a la monocapa de fosfolípidos más superficial de la membrana externa, gracias al gran contenido de ácidos grasos que tiene (Frayse *et. al.*, 2003). La composición del lípido A en el grupo de las enterobacterias es prácticamente constante (Lerouge y Vanderleyden, 2001), mientras que en los rizobios varía entre las distintas especies formando grupos determinados, estos grupos resueltos son similares a los encontrados con otras filogenias, por ejemplo utilizando 16S rRNA (Kannenberg *et. al.*, 1998). A pesar de las variaciones encontradas, el lípido A típico es un disacárido de glucosamina o un 2,3-diamino glucosa (Frayse *et. al.*, 2003), al que se le unen de cuatro a seis ácidos grasos (Lerouge y Vanderleyden, 2001) saturados o monoinsaturados (Carlson *et. al.*, 1999), los cuales pueden estar distribuidos simétrica o asimétricamente entre ambos azúcares y están siempre hidroxilados (Gronow y Brade, 2001). Algunas veces el azúcar reductor puede estar oxidado (amino gluconato) o fosforilado, asimismo el segundo azúcar puede estar fosforilado o substituido por un residuo galacturonato. Excepto para *Azorhizobium caulinodans*, todos los rizobios analizados contienen la cadena larga de ácidos grasos 27-OH:C28 (ácido hidroxioctacosanoico-27), que atraviesa las dos bicapas de la membrana externa y la cual representa un marcador quimiotaxonómico para el grupo (Frayse *et. al.*, 2003). No es exclusiva de este grupo, pues también está presente en otras bacterias endosimbiontes y patógenas (Kannenberg *et. al.*, 1998).

El oligosacárido núcleo es una cadena corta de azúcares hidrofílicas que se encuentra unida al lípido A. Éste puede ser dividido conceptualmente en dos regiones: núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno es la parte proximal al lípido A y dentro de los géneros de las enterobacterias su estructura suele estar bien conservada (Lerouge y Vanderleyden, 2001; Raetz y Whitfield, 2002). En cuanto a los rizobios, sucede lo mismo que con el lípido A, es decir que forman grupos en los que el oligosacárido núcleo es muy parecido, pudiendo establecer relaciones filogenéticas que concuerdan con filogenias basadas en otros marcadores (Kannenberg *et. al.*, 1998). El núcleo interno contiene un elemento único e invariablemente encontrado en todos los oligosacáridos núcleos caracterizados, el monosacárido Kdo (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico), que es lábil al ácido y mediante el cual se une al lípido A (Lerouge y Vanderleyden, 2001). Así, se compone de al menos una

molécula de Kdo, en la mayoría de los casos son dos, aunque en ciertas especies se puede presentar en lugar del segundo Kdo, un derivado de éste, el Ko (ácido D-glicero-D-talo-octulosónico) y una o más unidades de los residuos típicos L-glicero-D-manoheptosa, D-glicero-D-manoheptosa, o los dos. En el caso de *Rhizobium*, la heptosa no está presente (Gronow y Brade, 2000). Adicionalmente y en muchas ocasiones, la estructura básica está substituida con derivados no estequiométricos de otros azúcares, con fosfato (Raetz y Whitfield, 2002) o etanolamina (Lerouge y Vanderleyden, 2001).

El núcleo externo es mucho más variable que el interno (Raetz y Whitfield, 2002). Consiste de un oligosacárido corto, no repetitivo y variable, siendo en algunos casos específico de cepa (Vinuesa, 1998). Lo componen en su mayoría hexosas (Gronow y Brade, 2000) básicas y neutras (Lerouge y Vanderleyden, 2001).

La unidad mínima que necesitan las bacterias para su supervivencia es el lípido A y el núcleo interno con dos moléculas de Kdo. Sin embargo, pueden presentar una estructura adicional que generalmente no es necesaria para sobrevivir, el polisacárido O, lo cual se ha demostrado por la subsistencia de distintas mutantes que sólo tienen el lípido A y el oligosacárido núcleo, además de la existencia de bacterias que sin ninguna mutación genética no expresan polisacáridos O. (Raetz y Whitfield, 2002). No obstante, por lo general, esta estructura está presente en la gran mayoría de las bacterias y se encuentra covalentemente unida al núcleo externo y se extiende a partir de ahí hacia el medio exterior.

El polisacárido O consiste de unidades repetitivas de oligosacáridos que se polimerizan formando una cadena, la cual es mucho más larga que la del oligosacárido núcleo y altamente variable en estructura, siendo específicos de cepa en los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, no así en las especies del género *Sinorhizobium*, las cuales tienen polisacáridos O muy conservados entre ellas. En los dos primeros géneros, el polisacárido O, además, confiere una actividad antigénica característica, pues al ser estructuras de superficie son altamente inmunogénicos y reaccionan fuertemente con anticuerpos anti-O. Por tal motivo, son también comúnmente llamados antígenos O. En *Sinorhizobium*, el oligosacárido núcleo y los antígenos K son las regiones antigénicas dominantes. Las unidades repetitivas forman mono u oligosacáridos, es decir que cada una puede estar constituida por 1 a 8 monómeros de azúcar (Gronow y Brade, 2000), generalmente de 3 a 5 (Lerouge y Vanderleyden, 2001), que difieren en estructura,

posición, la estereoquímica de los enlaces glucosídicos y la presencia o ausencia de sustituyentes no carbohidratados (grupos acetilos, metilos, etc.). Pueden también ser lineales o ramificadas y formar homopolímeros o, más frecuentemente, heteropolímeros. Se han descrito más de 60 monosacáridos y 30 diferentes componentes no carbohidratados que pueden conformar al polisacárido O, lo cual habla de su gran variabilidad (Raetz y Whitfield, 2002), muchos de estos carbohidratos son incluso únicos o muy raros de encontrar en otro lado en la naturaleza. La longitud de la cadena formada puede variar, llegando a polimerizar hasta más de 40 unidades repetitivas (Lerouge y Vanderleyden, 2001).

La presencia del antígeno O en las bacterias lleva a la formación de colonias sobre placas de agar de apariencia lisa, conocidas como colonias de tipo S o LPS-S, (por smooth, en inglés) o LPS-I, en cambio, las colonias de bacterias que no tienen el polisacárido O en sus LPS exhiben una morfología rugosa, conformando al fenotipo LPS-R (por rough, en inglés) o LPS-II (Kannenberg *et. al.*, 1998; Gronow y Brade, 2000).

### 1.2.2. Genética y biosíntesis de los LPS

La separación de los LPS en lípido A, oligosacárido núcleo y antígeno O está también reflejado en su organización genética y biosíntesis (Gronow y Brade, 2000). La información disponible acerca de los genes que están involucrados en la biosíntesis de los LPS aún es escasa y los avances en su estudio son lentos, en parte por la gran heterogeneidad estructural y complejidad que caracterizan a las moléculas de LPS de los rizobios (Kannenberg *et. al.*, 1998; Spaink, 2000).

Dentro de los rizobios, relativamente bien estudiados están sólo los genes que intervienen en la biosíntesis de los LPS en *R. etli* CFN42 (Spaink, 2000), donde distintas regiones *lps* han sido identificadas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ). La región  $\beta$  está localizada en el plásmido simbiótico, mientras que las otras dos regiones están localizadas en el cromosoma. La región  $\alpha$  codifica proteínas involucradas en la biosíntesis tanto del oligosacárido núcleo como del antígeno O. Las regiones  $\beta$  y  $\gamma$  son requeridas para la síntesis del oligosacárido núcleo (Kannenberg *et. al.*, 1998). En *R. leguminosarum* se describió una nueva región que

no era complementada por ninguna de las regiones antes descritas y se le denominó lps- $\delta$ , está involucrada también en la síntesis del oligosacárido núcleo (Allaway *et. al.*, 1999).

Un aspecto importante que se ha podido concluir hasta el momento a partir de la poca información genética generada del estudio de los rizobios, al compararla con la más amplia que se tiene de las enterobacterias es que en éstas, los genes involucrados en la biosíntesis de los LPS están predominantemente agrupados, mientras que en los rizobios están más bien distribuidos y separados a lo largo del cromosoma y/o plásmidos (Spaink, 2000).

Los LPS mejor estudiados en el aspecto biosintético y genético son aquellos de las bacterias entéricas, en especial los de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. De las rutas biosintéticas determinadas a partir de estos modelos es de las cuales se hará referencia en adelante, pues son las más completas disponibles hasta el momento. Estudios basados en secuencias demuestran que, a pesar de las variaciones en los detalles, el grueso de las vías en diferentes bacterias está conservado (Raetz y Whitfield, 2002).

#### **1.2.2.1 Biosíntesis del lípido A**

En cuanto a los genes requeridos para la biosíntesis del lípido A, existen avances considerables en el sistema de *R. etli* gracias a la comparación con el modelo bastante bien estudiado y establecido de *E. coli* (Spaink, 2000). Utilizando los distintos precursores de su lípido A, se comprobó que *R. etli* contiene las mismas actividades enzimáticas que aquéllas que llevan a formar el lípido IV<sub>A</sub>-Kdo<sub>2</sub> de *E. coli* a partir de UDP-GlcNAc. Una vez sintetizado el lípido IV<sub>A</sub>-Kdo<sub>2</sub>, el cual es un intermediario, se produce un procesamiento, como la adición de los ácidos grasos aciloxiacilados para formar el lípido A maduro. Por lo tanto, se ha determinado que la ruta biosintética que da lugar a la formación del lípido IV<sub>A</sub>-Kdo<sub>2</sub> es vital para la sobrevivencia de un muy amplio rango de bacterias Gram negativas (Carlson *et. al.*, 1999).

#### **1.2.2.2. Biosíntesis del oligosacárido núcleo**

Una vez formado el lípido A-Kdo<sub>2</sub>, éste sirve como aceptor y es sobre el cual se ensamblará el oligosacárido núcleo mediante la transferencia secuencial de azúcares a partir de precursores de nucleótidos de azúcar por glucosiltransferasas, cuya acción coordinada

---

---

resulta en un proceso de síntesis de gran rapidez y eficiencia. En *E. coli* y *S. enterica*, la región cromosomal *waa* (Gronow y Brade, 2000; Raetz y Whitfield, 2002) (antes *rfa*) contiene los principales operones involucrados en la biosíntesis del oligosacárido núcleo (Schnaitman y Klena, 1993).

### 1.2.2.3. Biosíntesis del polisacárido O

En bacterias entéricas, la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis del polisacárido O están codificadas en el locus *wba* (Raetz y Whitfield, 2002) (antes *rfb*) (Schnaitman y Klena, 1993). Este locus codifica enzimas requeridas para la síntesis de precursores de nucleótidos de azúcar, glucosiltransferasas y enzimas necesarias para el proceso de exportación (Raetz y Whitfield, 2002). La mayoría de los operones *waa* son expresados constitutivamente, teniendo una secuencia JUMPStart/ops precediéndolos, lo cual indica un estado activo del proceso de antiterminación (Hobbs y Reeves, 1994).

Los polisacáridos O son sintetizados a partir de azúcares activados, éstos son ensamblados por glucosiltransferasas que generalmente son proteínas de membrana periféricas o solubles, lo cual indica que la polimerización de las subunidades ocurre en la cara interna de la membrana citoplasmática (Schnaitman y Klena, 1993). Sin embargo, los polisacáridos O son transferidos y ligados al lípido A-oligosacárido núcleo en el espacio periplasmático, por lo que debe de existir un mecanismo mediante el cual las unidades repetitivas sean transferidas al periplasma. Se han descrito tres rutas distintas por las que se sintetizan los polisacáridos O, difiriendo entre ellas sólo en los mecanismos de exportación al periplasma, pues las tres vías tienen reacciones de iniciación similares y son terminadas por el mismo proceso de ligación. Las vías son: 1) dependiente de Wzy; 2) dependiente del transportador ABC y 3) dependiente de sintasa. En entéricas, las primeras dos rutas están ampliamente distribuidas, mientras que la dependiente de sintasa tiene una distribución muy limitada.

Una vez ensamblados en el periplasma, los LPS deben pasar a través de la membrana externa. El proceso de traslocación no discrimina entre LPS con diferentes estructuras de polisacárido O, y las moléculas LPS-S y LPS-R parecen ser traslocadas con la misma eficiencia. Los sistemas de secreción de proteínas Tipo II y III en bacterias ofrecen

ejemplos similares de maquinarias de translocación de multiproteínas. La proteína To1A ha sido implicada en el procesamiento de translocación de LPS-S en *E. coli* (Raetz y Whitfield, 2002).

El mecanismo biosintético del polisacárido O es mucho menos entendido que el de la síntesis del lípido A debido en gran parte a la variación estructural del polisacárido O y a la diversidad correspondiente de las enzimas subsecuentes (Spaink, 2000).

### 1.2.3. Función de los LPS

Por ser los LPS componentes de superficie celular se localizan en la zona primaria de contacto entre la bacteria y su medio ambiente, teniendo entonces un papel principalmente protectorio (Raetz y Whitfield, 2002), funcionando como una barrera de permeabilidad altamente efectiva que evita tanto el paso de moléculas grandes, cargadas negativamente y/o hidrofóbicas (Lerouge y Vanderleyden, 2001), como detergentes y antibióticos. Esta función de los LPS está directamente relacionada a sus propiedades químicas y biofísicas, lo cual se ve reflejado en el alto grado de conservación de su arquitectura. Mientras que una monocapa de fosfolípidos es fluida a la temperatura normal de crecimiento, una monocapa de LPS es una estructura altamente ordenada con muy baja fluidez (Gronow y Brade, 2000).

Los LPS también contribuyen a mantener las propiedades estructurales de la envoltura celular, pues ayudan a estabilizar la membrana externa de la bacteria (Lerouge y Vanderleyden, 2001), además de estar involucrados en el plegamiento correcto de algunas proteínas de la capa externa como la porina PhoE de *E. coli* (Gronow y Brade, 2000).

Asimismo, tienen un papel muy importante durante el proceso de infección (Spaink, 2000), para el establecimiento de una enfermedad en el caso de las bacterias patógenas, o para producir una simbiosis exitosa o eficiente en las interacciones hospedero-bacteria (Lerouge y Vanderleyden, 2001). Así, se ha determinado que además de otros factores, en los rizobios, los polisacáridos de superficie como CPSs, EPSs y LPSs son necesarios para que una interacción completa con el hospedero se lleve a cabo (García-de los Santos y Brom, 1997; Campbell *et. al.*, 1998; Carlson *et. al.*, 1999; Summers *et. al.*, 2000; Fraysse *et. al.*, 2003). Estos compuestos representan la superficie molecular que es reconocida por

las plantas en el momento en el que los dos simbiosntes entran en contacto físico, comunicación que acontece durante el proceso de infección (Vinuesa, 1998; Lerouge y Vanderleyden, 2001).

Existen numerosos ejemplos en especies de *Rhizobium* donde se ha determinado la importancia de los LPS en el establecimiento de la simbiosis, teniendo un papel fundamental el antígeno O, pues se ha demostrado que cambios en su composición o en su abundancia llevan a una simbiosis inefectiva (Vinuesa *et. al.*, 1999; Noel *et. al.*, 2000). En otros estudios se ha establecido que también el lípido A y el oligosacárido núcleo son importantes en el proceso de infección (Kannenberg y Carlson, 2001; Lagares *et. al.*, 2001; Ferguson *et. al.*, 2002). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos donde mutantes en LPS son incapaces de nodular a las plantas, esta incapacidad es debida a mutaciones en el antígeno O (Raetz y Whitfield, 2002). Se ha propuesto, utilizando mutantes, los distintos estados del desarrollo del nódulo donde los LPS pueden tener efectos significativos, éstos son: iniciación de la infección a través de la adhesión de los rizobios a los pelos radiculares, invasión del tejido de la raíz, liberación de la bacteria en el hilo de infección y desarrollo y senescencia del bacteroide (Raetz y Whitfield, 2002). Otros roles de los LPS en la simbiosis sugerido es la supresión de las respuestas de defensa del hospedero (Frayse *et. al.*, 2003) o la resistencia a los compuestos excretados por las plantas como las fitoalexinas (Rosenblueth *et. al.*, 2001).

### **1.3 Factores de estrés ambiental**

Un medio natural como el suelo constituye un espacio cambiante en el que los organismos encuentran una exposición constante a fluctuaciones ambientales que en ciertos casos crean una gama de distintos tipos de estrés, los cuales pueden afectar sus actividades y crecimiento. Como consecuencia, los microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten monitorear el entorno y expresar aquellas actividades o estructuras que les ayuden a protegerse de las nuevas condiciones ambientales. Uno de los mecanismos mejor estudiados es el de la diferenciación a formas de resistencia (endosporas), que presentan las bacterias Gram positivas. Sin embargo, la mayoría de las bacterias que habitan el suelo no se diferencian en tales formas pues son Gram negativas (Ricillo *et. al.*, 2000b).

La interacción *Rhizobium*-leguminosa está altamente relacionada con el estado fisiológico de los dos simbioses, por lo que las condiciones desfavorables del suelo frecuentemente son factores limitantes que determinan en gran medida el éxito de la simbiosis y, por lo tanto, la productividad de las leguminosas (Kingsley y Bohlool, 1992; Kulkarni, 2000). Además, las bacterias no sólo encuentran factores de estrés en el suelo, sino también una vez que están dentro del nódulo (Crockford *et. al.*, 1996). Algunos de los factores de estrés a los que más comúnmente tienen que enfrentarse las bacterias son pH ácido o alcalino, deficiencia de nutrientes, temperaturas no óptimas, estrés por agua, salinidad, estrés oxidativo, metales pesados y biocidas (Milcamps *et. al.*, 1998; Zahran, 1999; Kulkarni, 2000; Ricillo *et. al.*, 2000b). Las poblaciones de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* varían en su tolerancia a las diferentes clases de estrés (Raza *et. al.*, 2001).

### 1.3.1 Estrés oxidativo

El estilo de vida aerobio trae como consecuencia inevitable la exposición a distintas especies reactivas de oxígeno (ROS, por Reactive Oxygen Species, en inglés), las cuales son generadas como productos del metabolismo dependiente de oxígeno (Eiamphungporn *et. al.*, 2003). Entre las ROS más comunes se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilos ( $OH^+$ ,  $OH^-$ ), entre otros (Crockford *et. al.*, 1996).

El superóxido es el primer radical derivado de la cascada de producción de ROS y a pesar de que éste no es extremadamente reactivo por sí mismo, puede inactivar enzimas cuya función es eliminar el hierro de la célula. Dicha inactivación promueve un incremento en la concentración intracelular de hierro libre, favoreciendo la reacción de Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^+ + OH^-$ ), trayendo como resultado la producción de radicales hidroxilos altamente reactivos, capaces de atacar prácticamente a cualquier macromolécula biológica. Así, estos oxidantes pueden causar una amplia variedad de deterioros sobre las células por dañar macromoléculas clave, incluido el DNA (Crockford *et. al.*, 1996; Santos *et. al.*, 2000). Como consecuencia, las bacterias han desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que les permiten protegerse de estas moléculas altamente tóxicas (Crockford *et. al.*, 1996; Eiamphungporn *et. al.*, 2003). Dentro de los mecanismos de defensa

enzimáticos se encuentra la producción de distintas proteínas antioxidantes que participan en las transformaciones de dichas especies, manteniendo el balance oxidante/antioxidante. Algunas de estas enzimas son la catalasa (CAT), que es una metaloproteína tetramérica involucrada en la destrucción del  $H_2O_2$  (Santos *et. al.*, 2000); la superóxido dismutasa (SOD), que detoxifica superóxido; y la glutatión sintetasa (GSH), que sintetiza glutatión, éste se une, transforma y detoxifica una variedad de compuestos (Ricillo *et. al.*, 2000b). Algunos de los mecanismos de defensa no enzimáticos lo constituyen alteraciones en algunos componentes de la superficie celular bacteriana (Sabra *et. al.*, 2003).

Un sitio específico donde las bacterias rizosféricas encuentran altas concentraciones de ROS es en la zona de interacción con la planta, pues la rápida producción y acumulación de ROS constituye parte importante de la respuesta de defensa inicial contra microorganismos que la planta emplea (Eiamphungporn *et. al.*, 2003). Una vez dentro del nódulo, las bacterias también están expuestas a moléculas oxidantes, ya que a pesar de la baja concentración de oxígeno libre que es necesaria para el funcionamiento de la nitrogenasa, las altas tasas de respiración requeridas para proveer de la energía para la fijación de nitrógeno y la autooxidación de la leghemoglobina, generan altos niveles de ROS. Otra razón es el hecho de que peroxidasas y peróxidos de hidrógeno frecuentemente se encuentran asociados a la pared celular vegetal, y el hilo de infección por donde las bacterias se liberan al nódulo es un derivado de la pared celular de la planta, por lo que una eficiente protección contra el estrés oxidativo es requerida aquí también (Oke y Long, 1999; Santos *et. al.*, 2000).

### 1.3.2 Estrés osmótico

La salinidad del suelo es una condición que limita la productividad agrícola, sobre todo en zonas áridas y semiáridas (Raza *et. al.*, 2001), pues la alta concentración de sales ahí existente trae como consecuencia problemas de infertilidad y degradación de la tierra. Este tipo de suelos representan aproximadamente el 7% de la superficie mundial, abarcando cerca de 952 millones de hectáreas (Kulkarni, 2000; Unni y Rao, 2001).

La mayoría de los cultivos agrícolas son sensibles a niveles relativamente bajos de salinidad, y en el caso de las leguminosas existe un problema adicional debido a que no

sólo la planta, sino también su bacteria simbiote es sensible a la salinidad, tanto en vida libre como durante la simbiosis (Lloret *et. al.*, 1995). Los rizobios han mostrado ser más tolerantes al estrés salino que sus hospederos vegetales (Kulkarni, 2000; Nogales *et. al.*, 2002) y las diferentes especies y cepas de bacterias varían a su vez entre ellas, en su sensibilidad a la sal (Unni y Rao, 2001).

No sólo en las áreas áridas y semiáridas se presenta el problema de la salinidad. En general, en la rizósfera, que es la zona de influencia química de la raíz, se encuentra una mayor concentración de sales que en el resto del suelo, esto es debido a la gran secreción de solutos no esenciales o tóxicos como el NaCl y las sales de aluminio que la planta hace a través de la raíz (Miller y Wood, 1996). Adicionalmente, en estudios con mutantes se ha determinado que cuando la bacteria entra al nódulo a través del hilo de infección, o cuando entra al citoplasma de la célula vegetal, necesita activar respuestas osmo-adaptativas para poder completar la simbiosis (Oke y Long, 1999).

Los efectos detrimentales que tiene la sal sobre los organismos son consecuencia de un déficit de agua, la cual es importante, entre otras cosas, en procesos de difusión y concentración de nutrientes (Sadovsky y Graham, 1998). Al estar ésta en cantidad reducida, las sales se concentran en el medio, estimulando la creación tanto de un estrés osmótico, como de un estrés iónico (Zahran, 1999), generando éste último un efecto tóxico debido al exceso de iones, los cuales pueden afectar procesos bioquímicos vitales (Kulkarni, 2000).

Para aclimatarse a cambios en la osmolaridad del ambiente, las bacterias acumulan intracelularmente solutos orgánicos de bajo peso molecular denominados osmolitos u osmoprotectores, los cuales incrementan la presión osmótica interna (Boncompagni *et. al.*, 1999). Su acumulación evita la deshidratación provocada por la baja actividad de agua en el medio, manteniendo el volumen celular apropiado y protegiendo a las macromoléculas intracelulares (Zahran, 1999). Estos solutos compatibles incluyen iones (por ejemplo  $K^+$  o  $Mg^{2+}$ ), glutamato, trealosa, betaína glicina, betaína prolina, poliaminas, entre otros. Las bacterias pueden tomarlos del medio o sintetizarlos ellas mismas (Boncompagni *et. al.*, 1999; Nogales *et. al.*, 2002).

En los rizobios, los cambios en la morfología y tamaño celular o modificaciones en el perfil de los EPS (Nogales *et. al.*, 2002) y LPS constituyen otro tipo de respuesta a la osmoadaptación (Graham *et. al.*, 1994) y al estrés iónico (Lloret *et. al.*, 1995).

### 1.3.3 Estrés por acidez

El pH ácido en el suelo constituye otro factor importante que merma la productividad agrícola (Zahran, 1999), afectando aproximadamente al 25% de la superficie mundial cultivada (Sadovsky y Graham, 1998), especialmente en suelos tropicales y templados.

La mayoría de las leguminosas requieren de un suelo neutro o ligeramente ácido para su crecimiento, especialmente cuando dependen de la interacción con los rizobios para la obtención del nitrógeno (Zahran, 1999). La forma en la que la acidez afecta desfavorablemente a la formación de asociaciones simbióticas entre especies de rizobios y sus plantas hospederas es debido a la incapacidad que algunos rizobios tienen para persistir bajo estas condiciones, pues su sobrevivencia o crecimiento es adversamente afectado (Reeve *et. al.*, 1998).

Se sabe que las raíces de las leguminosas secretan iones  $H^+$  y ácidos orgánicos, lo que trae como consecuencia una considerable disminución en el pH de la rizósfera, siendo en ocasiones tanto como 2 unidades menor que el del resto del suelo. Por lo tanto, la acidez representa un estrés al que se enfrentan las bacterias no sólo en suelos con este problema, sino también en su ambiente rizosférico (Vinuesa *et. al.*, 2002). Además, también se cree que el nódulo es un compartimiento acidificado (LeVier *et. al.*, 2000; Raetz y Whitfield, 2002). Una alta concentración de protones en el medio puede resultar en una subsecuente acumulación de este anión en el citoplasma celular, el pH intracelular ácido afecta negativamente el flujo metabólico y daña macromoléculas como el DNA (Foster, 1999).

Las cepas de una especie particular varían ampliamente en su tolerancia al pH (Zahran, 1999). En general, muchas cepas de rizobios son incapaces de crecer en medios de cultivo con valores de pH menor o igual a 5, sólo muy pocas son capaces de tolerar pH de 4.5, las bases genéticas para las diferencias encontradas aún no son claras. (Sadovsky y Graham, 1998). Las leguminosas también exhiben tolerancias distintas a la acidez (Zahran, 1999).

Existen distintos mecanismos involucrados en la capacidad de los microbios de subsistir y crecer en niveles de pH bajos, siendo uno de ellos la regulación del pH citoplasmático mediante la generación de un gradiente que le permite mantener un pH interno constante (O'Hara *et. al.*, 1989; Chen *et. al.*, 1993; Ricillo *et. al.*, 2000b), este proceso requiere tanto de elementos activos como pasivos (Reeve *et. al.*, 1998) e implica el control sobre el movimiento de los protones que cruzan la membrana citoplasmática de la célula (Chen *et. al.*, 1993). Otra respuesta es la acumulación de solutos compatibles (Ricillo *et. al.*, 2000b). Se ha reportado la acumulación citoplasmática de glutamato y potasio en células estresadas por acidez, la cual es una respuesta similar a la encontrada en células con estrés osmótico (Zahran, 1999). La producción de exopolisacáridos (Crockford *et. al.*, 1996), diferencias en la composición y estructura de la membrana externa (LPS), la acumulación de poliaminas celulares, la permeabilidad de la membrana, el metabolismo del calcio, la exclusión y extrusión de protones y la síntesis de proteínas de choque ácido, también son mecanismos que han sido asociados con el crecimiento de las células a pH ácido (Sadowsky y Graham, 1998; Zahran, 1999).

#### **1.3.4 Estrés por el fungicida “Captan”**

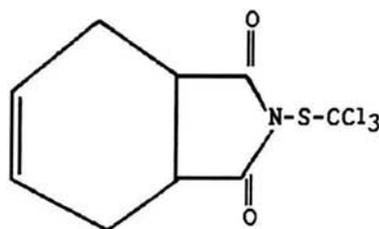
Los plaguicidas son cualquier sustancia o mezcla de sustancias que están destinadas al combate de organismos a los que se considera plagas. Son el resultado de un proceso industrial de síntesis química y se han convertido en la forma principal de control de plagas que dañan a los cultivos agrícolas. Todos los plaguicidas son sustancias tóxicas diseñadas para interferir o modificar los mecanismos fisiológicos fundamentales de los organismos patógenos o plagas, pero muchas veces no sólo afectan los de aquellos a los que pretenden controlar, sino que también afectan la fisiología de otros seres vivos denominados no blanco (Bejarano, 1998), incluidas las bacterias (Chalam *et. al.*, 1997; Kyei-Boahen *et. al.*, 2001). También constituyen una de las principales fuentes de contaminación ambiental, por lo que su uso continuo agudiza el llamado desequilibrio ecológico (Instituto Nacional de Ecología, 2002).

Entre los plaguicidas, un tipo ampliamente utilizado en la agricultura de nuestro país es el de los fungicidas. Se clasifican en dos tipos: sistémicos y de contacto. Los primeros

son específicos para ciertas enfermedades, penetran en la semilla y proporcionan una protección temprana a la plántula. Los fungicidas de contacto protegen la parte externa de la semilla contra una amplia variedad de enfermedades causadas por hongos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc., que atacan a la semilla en el almacén o en la emergencia en la siembra y generalmente se aplican cuando las semillas están almacenadas (Hasan, 1999). Algunos ejemplos de fungicidas de contacto que se encuentran actualmente en el mercado son Captan, Thiram, Clorotalonil, entre otros (Pardo-Castro, 1990).

El Captan es un fungicida ftalimida de contacto cuya fórmula química es  $C_9H_8Cl_3NO_2S$  (Fig. 1.3). En su forma pura es una sustancia cristalina de color blanco, en su forma comercial es amarillo (Environmental Protection Agency, 2003). Es prácticamente insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos comunes como acetona, cloroformo, dimetilsulfoxido, etc. (Extension Toxicology Network, 1996).

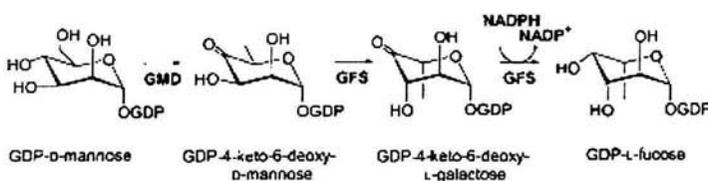
**Figura 1.3.**-Estructura química del Captan. A pesar de tener tres átomos de Cloro, no es considerado un organoclorado. Por su conformación de anillos se asemeja a los flavonoides. Tomado de Extension Toxicology Network, 1996.



Su uso está prohibido en otros países pero autorizado en México (Bejarano, 1998), empleándose en estados del sureste como Tabasco y Campeche. Según la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, el Captan se encuentra entre los diez primeros fungicidas más utilizados, ocupando el séptimo lugar (AMIPFAC, 1995). Algunos de sus efectos son los siguientes: baja toxicidad aguda en humanos, puede causar dermatitis al contacto (Fenske *et. al.*, 1998); extrema toxicidad crónica, altera funciones del hígado y riñones, oficialmente considerado como cancerígeno por el gobierno de USA, mutagénico, provoca aberraciones cromosómicas, teratogénico. Contamina el suelo y las aguas subterráneas, es altamente tóxico para los peces, también afecta a anfibios y aves (Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales, 1996) y a diversos organismos fijadores de nitrógeno, en su crecimiento y en la actividad de la nitrogenasa (Chalam *et. al.*, 1997).



La fucosa es un monosacárido que se encuentra conformando muchos glucanos biológicamente importantes como los lipopolisacáridos bacterianos y las glucoproteínas y glucolípidos eucariontes. La fucosilación de estas moléculas requiere del azúcar nucleotídica GDP-L-fucosa como donadora de fucosa y la correspondiente fucosiltransferasa. Puede ser sintetizada a través de dos vías metabólicas distintas denominadas de salvamento y *de novo* de las cuales la primera no ha sido determinada en bacterias, a diferencia del sistema *de novo*, que es el más conspicuo pues se ha encontrado tanto en células procariontes como en eucariontes. En ésta vía, la GDP-L-fucosa es sintetizada a partir de GDP-D-manosa en un camino biosintético de tres pasos, catalizado por dos enzimas comunes a los dos grupos de organismos (Järvinen *et. al.*, 2001). La vía de síntesis inicia con la deshidratación de GDP-D-manosa por la proteína GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa (GMD), codificada por el gen *gmd*, produciendo GDP-4-keto-6-deoxy-D-manosa. Este intermediario sufre una subsecuente epimerización en las posiciones C-3 y C-5, lo que provoca que el anillo de la hexosa pase de una configuración D- a una configuración L-. Finalmente, experimenta una reducción dependiente de NADPH en la posición C-4. Los últimos dos pasos, es decir, la epimerización y la reducción, son catalizados por una sola enzima bifuncional, la GDP-4-keto-6-D-deoximanosa epimerasa/reductasa (FCL) (Vinuesa, 1998), conocida también como GMER (Andrianopoulos *et. al.*, 1998; Järvinen *et. al.*, 2001) o GDP-L-fucosa sintetasa (GFS) (Wu *et. al.*, 2001), codificada por el gen *fcl*.



**Figura 2.2.-** Biosíntesis de GDP-L-fucosa a partir de GDP-D-manosa. Ruta de tres pasos en la que intervienen dos distintas enzimas. Tomado de Wu *et. al.*, 2001.

### 2.1.2 Los genes *gmd* y *fcl* en el genoma de *R. tropici* CIAT899

El conocimiento de que el antígeno O de *R. tropici* CIAT899 posee residuos de fucosa en su unidad repetitiva, llevó al planteamiento del presente trabajo de generar una mutante de LPS mediante la inactivación de los genes que se encargan de sintetizar dicho

residuo, pues al eliminar la fuente de obtención de la fucosa, ésta no podrá ser incorporada para la conformación de las unidades repetitivas del lipopolisacárido O, evitando su maduración.

Se han descrito ya mutantes en bacterias en las cuales la fucosa forma parte de su antígeno O, incapaces de sintetizar ésta estructura, debido a la inactivación de genes que codifican proteínas homólogas a GMD y FCL. McGowan *et. al.* (1998) caracterizaron una mutante nula de *wbcJ* (gen que codifica una proteína homóloga a GMD) en *Helicobacter pylori*. Esta mutante mostró un fenotipo LPS-R y fue incapaz de infectar el tracto digestivo humano, lugar donde se encuentra en condiciones normales.

Por otro lado, Vinuesa (datos no publicados) obtuvo una mutante LPS-R de la cepa *R. etli* KIM5s, siendo ésta también incapaz de nodular a su macrosimbionte habitual, el frijol. Dicha mutante, nombrada KIM $\Delta$ 1 se obtuvo mediante una delección en el gen *gmd*, que tiene 1062 nucleótidos y en el *fcl*, con 952 nucleótidos, organizados en una sola unidad transcripcional. La mutante se produjo utilizando un plásmido (pPVKIM $\Delta$ 1) que tiene clonadas regiones internas de estos genes, separados por un cassette de Kanamicina. Mediante un experimento de recombinación, estos genes interrumpidos reemplazaron a los de la cepa silvestre, generando la delección. Adicionalmente, esta cepa fue complementada con una librería de cósmidos de *R. tropici* CIAT899. Al conjugarse con la librería, se recuperaron colonias de la mutante KIM $\Delta$ 1 que restauraron el fenotipo de nodulación de la cepa silvestre, lo cual sugiere que entre los ortólogos *gmd* y *fcl* de *R. etli* KIM5s y *R. tropici* CIAT899 existe una identidad en secuencia, pues uno fue capaz de restaurar el fenotipo silvestre del otro. Mediante la utilización de oligonucleótidos degenerados diseñados a través del alineamiento múltiple de secuencias de los genes *gmd* y *fcl* de distintos organismos, Vinuesa (datos no publicados) logró obtener un producto amplificado por PCR del genoma de *R. tropici* CIAT899. Así, la presencia de los genes *gmd* y *fcl* en el genoma de *R. tropici* CIAT899 y la identidad de éstos entre las dos cepas de bacterias ya había sido demostrada por Vinuesa (datos no publicados), lo cual sentó las bases para el desarrollo del presente trabajo.

## 3. Objetivos

### Objetivo general

- ❖ Determinar el papel de los lipopolisacáridos de *Rhizobium tropici* CIAT899 en la resistencia a distintos factores de estrés, en especial del antígeno O

### Objetivos particulares

- ❖ Obtener una mutante de *R. tropici* CIAT899 en la biosíntesis del antígeno O de los lipopolisacáridos.
- ❖ Determinar la respuesta de la mutante en el crecimiento a distintos factores de estrés (acidez, estrés osmótico, estrés oxidativo y estrés por plaguicida) al compararla con la silvestre.
- ❖ Evaluar la capacidad simbiótica de la cepa mutante
- ❖ Realizar experimentos de complementación de la mutante.

## **4. Hipótesis**

Alteraciones en la estructura de los LPS, como sería la eliminación del antígeno O, producirán una variación en el comportamiento que las bacterias generen frente a distintas condiciones hostiles. La mutante con moléculas de LPS incompletas presentará una menor resistencia ante las distintas condiciones de estrés, en comparación con la silvestre.

## **5. Justificación**

La interacción rizobio-leguminosa es de suma importancia para la agricultura y el medio ambiente en general, por tal motivo es necesario entender cómo es que esta interacción ocurre a nivel de todos sus componentes. Uno de estos componentes, el microsimbionte, juega un papel determinante en el establecimiento de la simbiosis y la mayoría de las veces el éxito de la interacción depende del estado fisiológico en el que éste se encuentra creciendo alrededor. Éste crecimiento será mejor entendido sólo cuando la fisiología de dichos organismos sea estudiada en detalle bajo condiciones subóptimas, pues son las que generalmente encuentran en su medio natural.

Por lo tanto, es importante caracterizar la influencia que la arquitectura molecular de la superficie bacteriana tiene en su crecimiento, sobrevivencia y persistencia en el suelo en condiciones adversas, así como en la interacción con el hospedero con el fin de contribuir al conocimiento de todos los aspectos implicados en el establecimiento de una simbiosis exitosa.

El entendimiento de la adaptación de las bacterias a condiciones adversas puede sentar las bases para la generación de cepas mejoradas que sean resistentes a muchos tipos de estrés ambiental y al ser utilizadas como inóculos se mejoren sus expectativas de sobrevivencia en el suelo.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas de bacterias y plásmidos utilizados se enlistan en la tabla 6.1.

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
<b>Cepa</b>		
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Silvestre, LPS-S, Ndv <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> (Km <sup>r</sup> )	Martínez-Romero <i>et. al.</i> , 1991
<i>R. tropici</i> FR1	LPS-R, Ndv <sup>+</sup> , Fix <sup>-</sup> (Km <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>R. tropici</i> FR1/pPV1psCOS1	LPS-S, Ndv <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> (Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> S17-1	RPA integrado en el cromosoma, <i>recA</i> , 2-Tc::Mu-Km::Tn7 (Nal <sup>r</sup> )	Simon <i>et. al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17-1/Km	pPVKIMΔ1 transformado (Km <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17-1/Tc	pPV1psCOS1 transformado (Tc <sup>r</sup> )	Este trabajo
<b>Plásmido</b>		
pPVKIMΔ1	Vector pk19mobsac con regiones internas de los genes <i>gmd</i> y <i>fcl</i> de <i>R. etli</i> KIM5s clonadas	Vinuesa, no publicado
pPV1psCOS1	Cósmido de <i>R. tropici</i> CIAT899 complementante de una mutante LPS-R de <i>R. etli</i> KIM5s recuperado a partir de una librería de cósmidos, (Tc <sup>r</sup> )	Vinuesa, no publicado

**Tabla 6.1.-** Lista de cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo.

Nal: Ácido nalidíxico; Km: Kanamicina; Tc: Tetraciclina. (r resistente, - no resistente); Ndv<sup>+</sup>, Fix<sup>-</sup>: Sin capacidad de nodulación ni fijación de N<sub>2</sub>; Ndv<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>: Con capacidad de nodulación y fijación de N<sub>2</sub>.

### 6.2 Medios y condiciones de cultivo

#### 6.2.1 *Rhizobium. tropici*

El medio PY (Noel *et. al.*, 1984) (ver Apéndice I) fue utilizado como medio complejo para el crecimiento de rutina de *R. tropici* CIAT899, FR1 y FR1/pPV1psCOS1 a 30° C. También fue utilizado para el análisis del estrés oxidativo y del fungicida. El medio 20E (Werner *et. al.*, 1975) (ver Apéndice I) fue utilizado para evaluar el crecimiento de las cepas en la presencia de pH ácido a 30° C. El medio mínimo (Kingsley y Bohlool, 1992) (ver Apéndice I) se utilizó para analizar la osmotolerancia, así como para el “screening” de las mutantes a 30° C. Cuando fue necesario, los diferentes medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos (ver Apéndice I).

#### 6.2.2 *Escherichia coli*

*E. coli* S17-1 fue incubada rutinariamente en medio LB (Sambrook *et. al.*, 1989) a 37° C. Cuando fue necesario, el medio de cultivo fue suplementado con distintos antibióticos, dependiendo de los plásmidos que se usaron para transformar las cepas (ver Apéndice).

El diseño experimental seguido se ilustra en un diagrama de flujo en la Fig. 6.1.

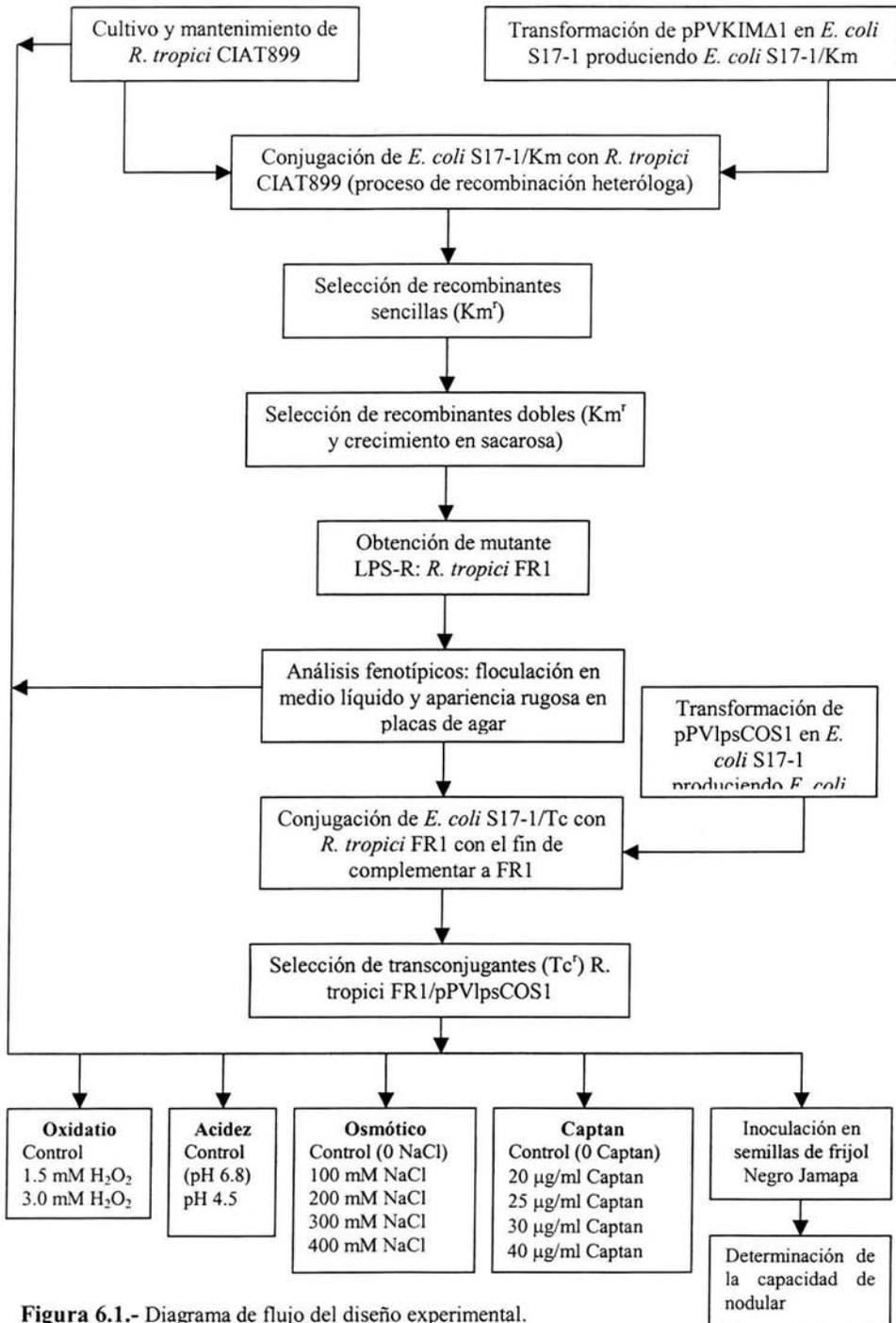
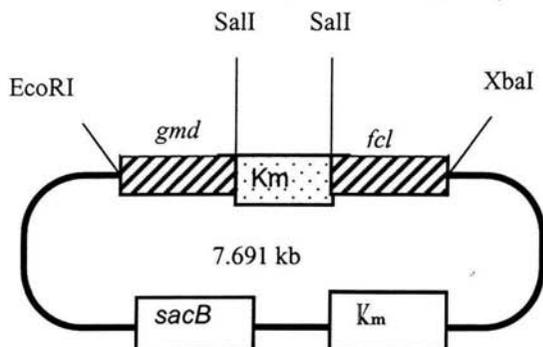


Figura 6.1.- Diagrama de flujo del diseño experimental.

### 6.3 Obtención de la cepa mutante de *R. tropici* CIAT899

Para generar la mutante de *R. tropici* CIAT899 con una delección en los genes *gmd* y *fcl* se utilizó el plásmido pPVKIMΔ1 (Vinuesa, no publicado), el cual es un derivado del vector pk19mobsac (Schäfer *et. al.*, 1994) en el que se clonó una región interna del gen *gmd* y otra del gen *fcl* de *R. etli* KIM5s, separadas por un cassette de kanamicina (Vinuesa, no publicado).

El plásmido pk19mobsac tiene un limitado rango de hospederos, se replica solamente en las enterobacterias siendo por lo tanto un vector integrativo en los rizobios. Posee el marcador para la resistencia a Kanamicina (Km) y el gen *sacB*, el cual confiere sensibilidad a la sacarosa en bacterias Gram negativas. Sólo aquellas células en donde se produzca un segundo evento de recombinación (intercambio de marcadores) pierden el vector y los marcadores que éste llevaba, pudiendo crecer en sacarosa, permitiendo por lo tanto, la selección positiva de recombinantes dobles (Schäfer *et. al.*, 1994).

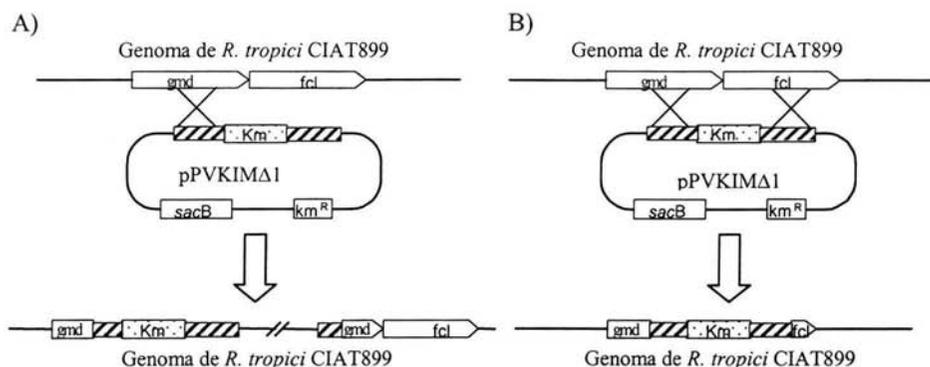


**Fig. 6.2.-** Plásmido pPVKIMΔ1 (Vinuesa, no publicado), derivado del vector pk19mobsac (Schäfer *et. al.*, 1994) en el que se clonó una región interna del gen *gmd* y otra del gen *fcl* de *R. etli* KIM5s, separadas por un cassette de kanamicina (Vinuesa, no publicado). Mostrados están los sitios de restricción, los marcadores del plásmido (*sacB* y Km) y el tamaño del plásmido.

El vector pPVKIMΔ1 se transformó (ver Apéndice II: Transformación) en la cepa *E. coli* S17-1, cuyo uso es conveniente en experimentos de movilización ya que no necesita de un plásmido “helper” para la transferencia del plásmido, permitiendo entonces una conjugación biparental (Simon *et. al.*, 1983). Una vez transformado el plásmido en *E. coli* S17-1, ahora nombrada *E. coli* S17-1/Km éste se transfirió a *R. tropici* CIAT899 mediante un experimento de conjugación (ver Apéndice II: Conjugación).

Al integrarse pPVKIMΔ1 en *R. tropici* CIAT899, las regiones de los genes de *R. etli* KIM5s que lleva clonadas, recombinaron con regiones del genoma de *R. tropici* CIAT899 (donde están los genes heterólogos para *gmd* y *fcl*). Esta recombinación es posible debido a que estas dos especies poseen una identidad en secuencia en dichos genes (Vinuesa, no publicado). Después de la movilización, el plásmido sólo puede ser mantenido por integración en el cromosoma vía recombinación, en este caso, heteróloga pues se trata de dos especies distintas, *R. etli* KIM5s y *R. tropici* CIAT899. Primero hubo un sólo evento de recombinación en alguno de los dos genes, con lo cual el plásmido se integró completamente en el genoma de *R. tropici* CIAT899, expresando la resistencia a Km, sin

embargo, al promover un segundo evento de recombinación, el plásmido sufrió un proceso de escisión pues se produjo un intercambio de los fragmentos clonados de *R. etli* KIM5s en pPVKIMΔ1 con los fragmentos heterólogos de los genes *gmd* y *fcl* de *R. tropici* CIAT899, provocando una interrupción en dichos genes:



**Fig. 6.3.-** Modelo de recombinación heteróloga, el uso del plásmido pk19mob/sac permitió la selección positiva de recombinantes dobles. A) Recombinantes sencillas en las cuales se integra todo el vector. B) En la recombinación doble se pierde el gen *sacB*, pudiendo crecer las células en la presencia de sacarosa.

Regiones internas de los genes *gmd* o *fcl* de *R. etli* KIM5s

Genes *gmd* o *fcl* de *R. tropici* CIAT899

## 6.4 Complementación de la cepa mutante *R. tropici* FR1

Para llevar a cabo la complementación de la mutante FR1, se transformó (ver Apéndice II: Transformación) *E. coli* S17-1 con el plásmido pPVlpsCOS1 (nombrándose *Escherichia coli* S17-1/Tc). pPVlpsCOS1 es un cósmido obtenido a partir de una librería de cósmidos de *R. tropici* CIAT899 conjugada con mutantes LPS-R de *R. etli* KIM5s que recobraron el fenotipo silvestre a LPS-S, Ndv<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>. El cósmido es el plásmido aislado a partir de estas mutantes complementadas de *R. etli* KIM5s (Vinueza, datos no publicados).

Este plásmido transformado fue movilizado a la cepa *R. tropici* FR1 por conjugación biparental (ver Apéndice II: Conjugación). Las transconjugantes se plaquearon en MM Nal Tc. La cepa complementada se nombró *R. tropici* FR1/pPVlpsCOS1.

## 6.5 Ensayos de estrés

Para cada uno de los experimentos se adicionaron distintos componentes a los medios de cultivo. Todos los experimentos fueron repetidos tres veces en dos experimentos independientes.

### 6.5.1 Crecimiento en distintos factores de estrés

Un método útil y rápido de obtener un estimado del crecimiento celular es a través del uso de la medida de turbidez del cultivo mediante un espectrofotómetro. Una suspensión celular parecerá más turbia a la vista cuando mayor número de células, traducido en

crecimiento, haya en un cultivo (Brock, 2003) y ha sido una estrategia utilizada por muchos grupos de trabajo para determinar los efectos de ciertas condiciones sobre el crecimiento celular (Lloret *et al.*, 1995; Chalam *et al.*, 1997; Ricillo *et al.*, 2000b; Nogales *et al.*, 2002). También el conteo de unidades formadoras de colonias constituye un método útil para evaluar el crecimiento celular (Brock, 2003).

#### 6.5.1.1 Estrés oxidativo

Para evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de las bacterias se hizo lo siguiente: las tres cepas (*R. tropici* CIAT899, FR1 y FR1/pPVIpsCOS1) se crecieron por separado en 3 ml de medio PY líquido hasta alcanzar la fase exponencial ( $OD_{600}$  de 0.5), se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos (100  $\mu$ l) y se plaquearon diluciones seriales ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) sobre placas de PY, otras alícuotas fueron tomadas para incubarlas por 20 minutos adicionales con 1.5 y 3 mM de  $H_2O_2$ . Transcurrido el tiempo se plaquearon de igual forma que las anteriores. Después de 48 horas de incubación de las placas a 30° C, se contó el número de colonias formadas. La fracción de sobrevivencia fue definida como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas después del tratamiento, dividido por el valor de UFC antes del tratamiento (Eiamphungporn *et al.*, 2003). Este valor fue traducido a porcentajes.

#### 6.5.1.2 Estrés osmótico

La tolerancia a sal fue evaluada por el crecimiento de las bacterias en medio líquido. Se crecieron por separado cultivos de las tres cepas en medio líquido con los antibióticos adecuados, durante aproximadamente 10 horas en agitación continua, estos cultivos se inocularon en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio para alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de  $\sim 0.05$ . Los matraces contenían MM suplementado con 0 (control), 100, 200, 300 ó 400 mM de NaCl. Se incubaron a 30° C en un agitador por 4 días y el crecimiento fue monitoreado turbidométricamente registrando la densidad óptica a 600 nm cada 12 horas en un espectrofotómetro Beckman DU650. Con estos datos se graficó la  $OD_{600}$  contra el tiempo.

#### 6.5.1.3 Estrés por acidez

Para la determinación de la tolerancia a pH ácido, las distintas cepas fueron inoculadas en medio 20E teniendo un pH de 6.8 (control) y en medio tamponado a pH 4.5 con 25 mM de ácido etanosulfónico Homopiperazine-N,N'-bis-2 (Homopipes). Matraces con 50 ml de medio fueron inoculados de la misma forma en la que ya se describió para el experimento con NaCl (hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de  $\sim 0.05$ ). Los matraces conteniendo a las bacterias fueron incubados únicamente por 2 días, pues transcurrido este tiempo el pH no mantenía su acidez y se volvía más básico. La densidad óptica ( $OD_{600}$ ) fue registrada cada 3 horas y se graficó contra el tiempo.

#### **6.5.1.4 Estrés por el fungicida “Captan”**

El crecimiento en la presencia de Captan fue monitoreado tanto en cultivos líquidos como en medio sólido. La estimación del crecimiento en medio líquido se llevó a cabo de la misma manera en que se realizó para el estrés osmótico sólo que en lugar de NaCl, se adicionaron 0, 20, 25, 30 ó 40 µg/ml de Captan al medio PY. Para el experimento en cajas se crecieron cultivos líquidos de cada cepa hasta alcanzar la fase exponencial media ( $OD_{600}$  de 0.5) y 20 µl de cada dilución ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) de éstos cultivos se aplicaron en forma de gota (sin plaquear) sobre las cajas conteniendo las distintas concentraciones ya mencionadas de Captan. El crecimiento se registró después de 48 horas. El fungicida Captan usado fue el de empleo comercial obtenido a partir de Hoechst.

#### **6.6 Ensayos de nodulación**

Con el fin de determinar el comportamiento de la cepa mutante en simbiosis y compararla con la silvestre, se inocularon la cepa silvestre, la cepa mutante y la cepa complementada por separado en semillas de frijol negro Jamapa (ver Apéndice II), variedad comúnmente utilizada en experimentos de nodulación.

## 7. Resultados

Modificaciones en los LPS, y especialmente en el antígeno O, constituyen parte de los mecanismos de resistencia que muchas bacterias emplean en respuesta a condiciones adversas, incluyendo pH ácido, estrés oxidativo y estrés osmótico (Lloret *et. al.*, 1995; Zahran, 1999; Lerouge y Vanderleyden, 2001; Sabra *et. al.*, 2003). Si *R. tropici* CIAT899 utiliza estos mismos elementos como parte de su tolerancia intrínseca, entonces su comportamiento ante estas condiciones de estrés teniendo moléculas de LPS incompletas, por ejemplo la falta del antígeno O, se verá afectado.

### 7.1 Obtención de una cepa de *R. tropici* CIAT899 portadora de una mutación en los genes *gmd* y *fcl*

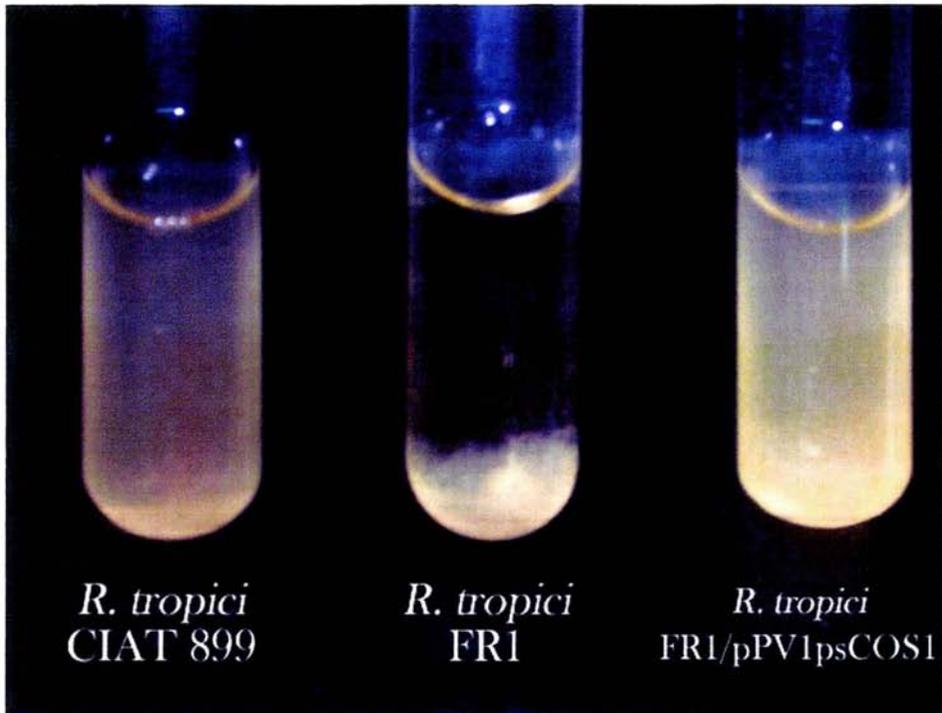
La cepa fue generada a través de mutagénesis por recombinación. Como era de esperarse para una recombinación heteróloga, la tasa de recombinación fue bajísima, encontrándose de 0-1 transconjugantes en la dilución  $10^{-1}$ .

#### 7.1.1 La cepa mutante de *R. tropici* CIAT899 (*R. tropici* FR1) posee un fenotipo LPS-R

La cepa mutante obtenida se confirmó, por la resistencia adquirida producto de la recombinación. Y fenotípicamente por la apariencia rugosa de las colonias al crecerlas sobre placas de 20E (indicio de la falta del antígeno O), produciendo un fenotipo LPS-R, a diferencia de la cepa silvestre, la cual posee un fenotipo liso. También se confirmó por su fenotipo de floculación (autoaglutinación) que aparece cuando, después de ser crecidas hasta saturación en medio líquido, las células tienden a sedimentarse rápidamente y después de 20-30 minutos de estar sin agitación constante, las bacterias se van al fondo; lo cual no ocurre con la cepa tipo silvestre (Fig. 7.1). El fenotipo de floculación lo presentan bacterias de *Rhizobium* con LPS sin el polisacárido O (Vinuesa *et. al.*, 1999). Y debido al fenotipo rugoso de la mutante fue que ésta se nombró *R. tropici* FR1. Así, *R. tropici* FR1 es una cepa LPS-R derivada de CIAT899 tipo silvestre por inactivación de los genes *gmd* y *fcl*, involucrados en la biosíntesis de fucosa.

### 7.1.2 Un cósmido de *R. tropici* CIAT899 produjo el restablecimiento del fenotipo de la cepa silvestre en FR1

A *R. tropici* FR1 se le transfirió por conjugación un cósmido, el pPV1psCOS1. Éste fue aislado a partir de un librería de cósmidos de *R. tropici* CIAT899 que complementó a una mutante de *R. etli* KIM5s con una deleción en los genes *gmd* y *fcl* (Vinuesa, datos no publicados). Así, la cepa mutante obtuvo un cósmido que replica en trans. FR1 recuperó el fenotipo de la cepa silvestre (apariciencia lisa de las colonias sobre placas de agar y sin floculación en medio líquido) (Fig. 7.1), por lo que el plásmido complementa la mutación en FR1. La cepa complementada fue nombrada FR1/pPV1psCOS1.



**Figura 7.1.-** Fenotipo de floculación. Fotografía donde se muestra el comportamiento de las distintas cepas de *R. tropici* al crecerlas en medio líquido tras media hora de estar sin agitación. El primer tubo de izquierda a derecha representa la cepa tipo silvestre (CIAT899), el tubo 2 la cepa mutante (FR1) y el tubo 3 la cepa complementada (FR1/pPV1psCOS1). *R. tropici* FR1 presenta la rápida sedimentación de las células, a diferencia de las cepas silvestre y complementada.

---

## 7.2 Crecimiento bajo distintas condiciones de estrés de las cepas *R. tropici* CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1

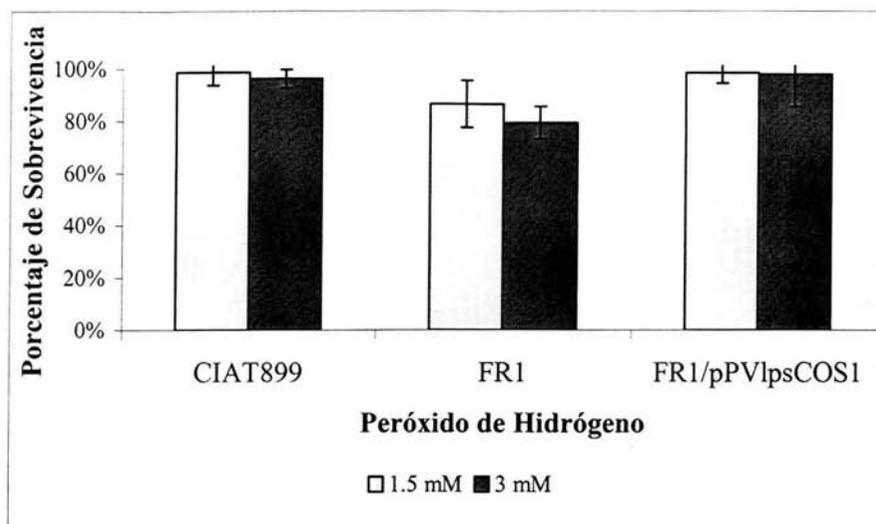
Las tres cepas fueron expuestas a distintas condiciones de estrés y determinado su crecimiento. Las concentraciones utilizadas en cada experimento corresponden a concentraciones previamente establecidas en otros trabajos en las que se comprobó que *R. tropici* CIAT899 crece óptimamente. Lo anterior es importante debido a que lo que se determinó fue el comportamiento de la cepa mutante al compararlo con el de la silvestre y ésta última requería presentar un crecimiento favorable en dichas condiciones de laboratorio.

### 7.2.1 Estrés oxidativo por ROS

En este experimento se utilizó el peróxido de hidrógeno para producir un estrés oxidativo por exposición de las bacterias a ROS en medio líquido. Se utilizaron dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5 mM y 3 mM) (Ricillo *et. al.*, 2000b). La fracción de sobrevivencia corresponde al número de UFCs recuperadas después del tratamiento, dividido entre el número de UFCs antes del tratamiento (Eiamphungporn *et. al.*, 2003), convertido a porcentajes.

Como se observa en la gráfica de la Fig. 7.2, para las dos concentraciones utilizadas, es decir, 1.5 mM y 3 mM, las cepas silvestre y complementada no parecieron verse seriamente afectadas, ya que la fracción de sobrevivencia de las cepas CIAT899 y FR1/pPVlpsCOS1 fue muy cercana al 100%. Aunque si hubo una diferencia en cuanto a la sobrevivencia en 3 mM, con respecto a la exhibida en 1.5 mM, ésta fue mínima. Así, no se observaron cambios importantes en la sobrevivencia entre una concentración y otra para ninguna de estas dos cepas.

Con respecto a la mutante, ésta disminuyó su viabilidad después del tratamiento, ya que la sobrevivencia después del tratamiento fue aproximadamente del 85% para 1.5 mM y del 80% para 3 mM.

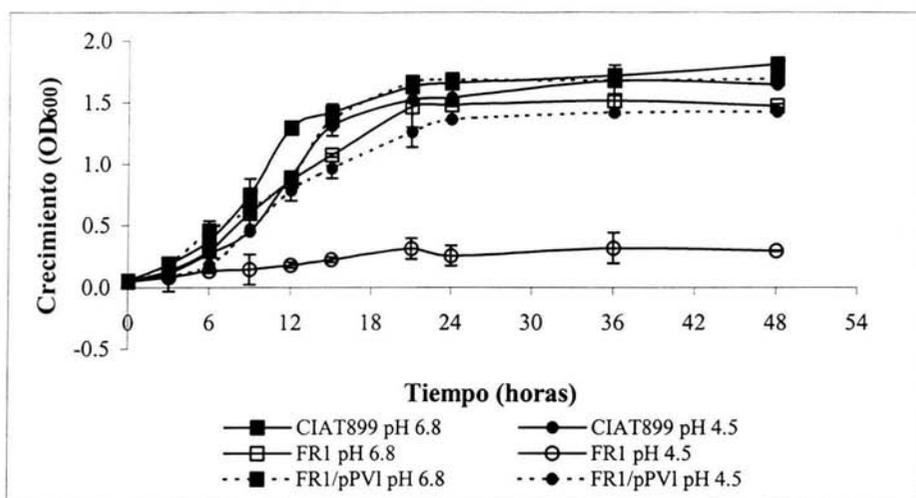


**Figura 7.2.-** Gráfica donde se muestra la fracción de sobrevivencia traducida en porcentajes de las cepas silvestre, mutante y complementada. Las cepas mutante y complementada mostraron un comportamiento muy semejante en las dos concentraciones de  $H_2O_2$  (1.5 mM y 3 mM) y entre sí.

### 7.2.2 Estrés por acidez

Para determinar el crecimiento de las bacterias en condiciones ácidas, se creció a la cepa mutante, así como a la silvestre y a la complementada en medio tamponado con pH 4.5, teniendo como control su crecimiento en pH 6.8. Éste último valor de pH es el óptimo de la cepa silvestre para crecer, sin embargo, también es capaz de hacerlo favorablemente en pH 4.5 (Graham *et. al.*, 1994, Vinuesa *et. al.*, 2002). La sensibilidad a la acidez fue definida experimentalmente como la incapacidad de crecer a pH 4.5.

Como se muestra en la Fig. 7.3, el crecimiento de la cepa *R. tropici* FR1 se vio seriamente afectado con respecto a su control, pues prácticamente no mostró ningún crecimiento a pH 4.5, a diferencia del crecimiento de CIAT899 y FR1/pPVlpsCOS1, cuyo crecimiento no pareció verse afectado a este nivel de acidez ya que crecieron casi a la misma tasa que a la que lo hicieron en pH 6.8 (Fig. 7.3).



**Figura 7.3.-** Curva de crecimiento en pH 6.8 y pH 4.5 de *R. tropici* CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPVlpsCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPVl.

### 7.2.3 Estrés osmótico por Cloruro de Sodio

Para caracterizar la osmotolerancia de las distintas cepas, se determinó su crecimiento en distintas concentraciones de NaCl que fueron de 100 a 400 mM (Ricillo *et. al.*, 2000b, Nogales *et. al.*, 2002).

En la presencia de 100 mM de NaCl, las cepas CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1 parecieron no verse afectadas en lo absoluto en su crecimiento, pues cada una creció prácticamente a la misma tasa en la que lo hicieron en medio no suplementado con NaCl (Fig. 7.4).

Al aumentar las concentraciones de NaCl en el medio, se pudieron observar distintos efectos en las tasas de crecimiento de las cepas.

Se encontró que para la cepa silvestre, la concentración de 200 mM parece no afectar significativamente su crecimiento (Fig. 7.5), es para la concentración 300 mM (Fig. 7.6) donde se ve una disminución significativa en el crecimiento y para la concentración de 400 mM (Fig. 7.7) el crecimiento descendió a casi la mitad comparado con el control.

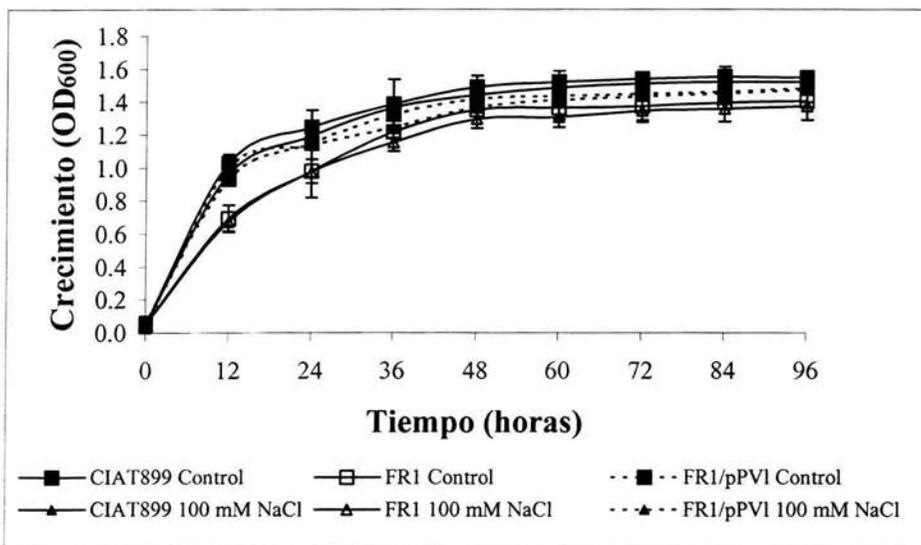
Para FR1 en la Figura 7.5, se observa que en la concentración 200 mM, el crecimiento disminuyó a una mayor tasa en comparación con lo que disminuyó el de la

silvestre en la misma concentración, comparado con su control. Sin embargo, este decremento no fue tan acentuado, a diferencia de lo que ocurre en las concentraciones 300 (Fig. 7.6) y 400 mM (Fig. 7.7), donde se observa un decremento dramático y prácticamente no hay crecimiento celular.

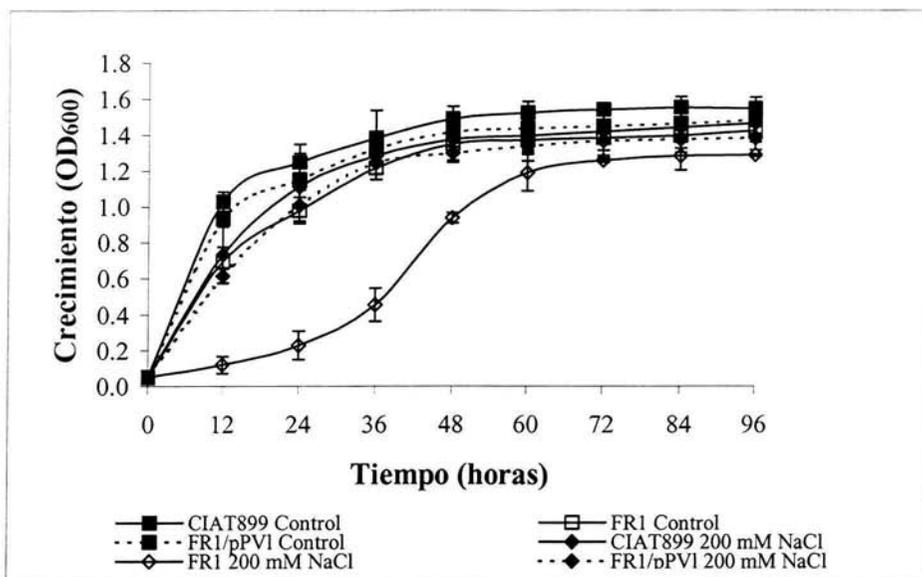
Un aspecto que llama la atención es la fase lag alargada que presentan la cepa mutante en la concentración 200 mM (Fig. 7.5) y la silvestre en la 300 (Fig. 7.6) y 400 mM (Fig. 7.7), que aunque sí crecen, se demoran más en alcanzar la fase exponencial.

Para FR1/pPVIpsCOS1 (Figs. 7.5, 7.6 y 7.7), el comportamiento es muy parecido al de la cepa silvestre en todas las concentraciones probadas. También presenta la fase lag alargada en 300 y 400 mM de NaCl (Figs. 7.6 y 7.7).

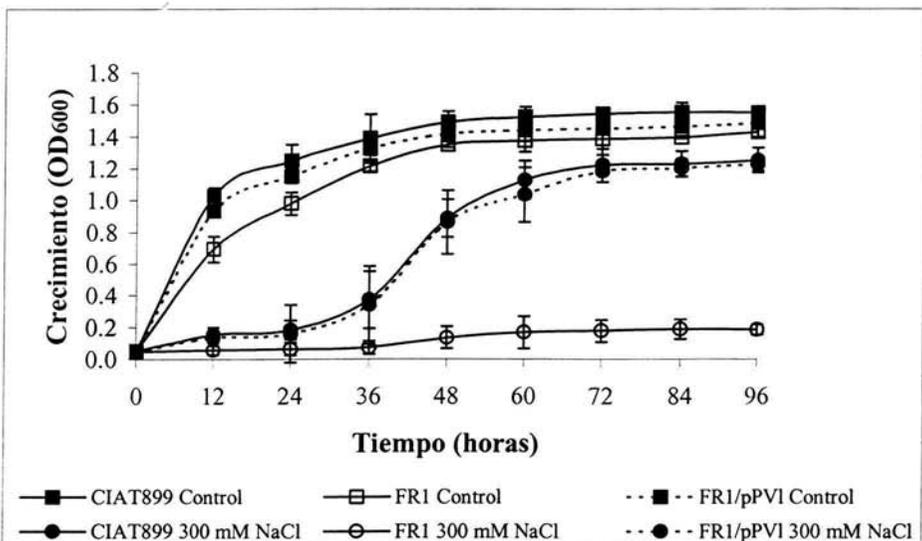
Así, la cepa FR1 manifestó ser más sensible a la sal, pues su crecimiento se inhibió a las concentraciones 300 y 400 mM y a mayor concentración de NaCl, éste decreció. Lo anterior contrasta con lo observado para las cepas silvestre y la complementada, las cuales fueron capaces de crecer, aunque a una tasa menor, en dichas cantidades de NaCl y su desarrollo no fue en ningún caso totalmente inhibido, mostrando tasas de crecimiento razonable a todas las concentraciones de NaCl probadas.



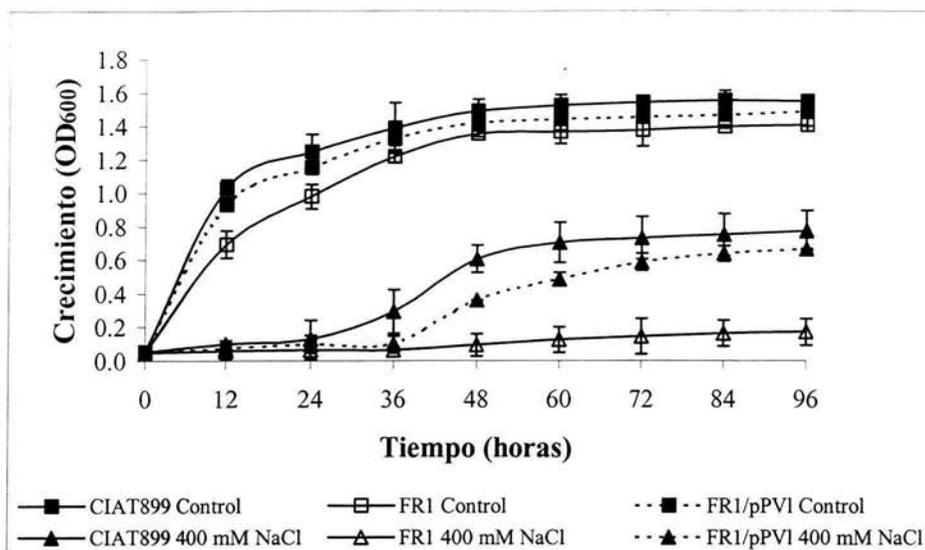
**Figura 7.4.-** Crecimiento de las cepas silvestre, mutante y complementada en 100 mM de NaCl y en medio sin NaCl. No se observaron cambios en las tasas de crecimiento de ninguna de las cepas con respecto de una condición a otra. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPVIpsCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPVI.



**Figura 7.5.-** Crecimiento de las cepas silvestre, mutante y complementada en 200 mM de NaCl y en medio sin NaCl. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPV1psCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPV1.



**Figura 7.6.-** Curvas de crecimiento de las cepas silvestre, mutante y complementada en 300 mM de NaCl y en medio sin NaCl. Se encontraron distintos efectos de dicha concentración sobre el crecimiento de las cepas silvestre y complementada con respecto a la mutante. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPV1psCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPV1.

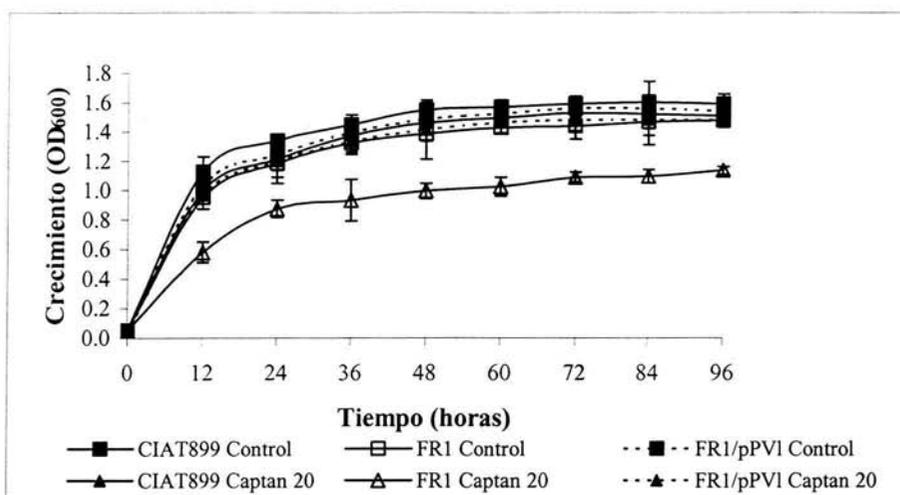


**Figura 7.7.-** Curvas de crecimiento de las cepas silvestre, mutante y complementada en 400 mM de NaCl y en medio sin NaCl. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPV1psCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPV1.

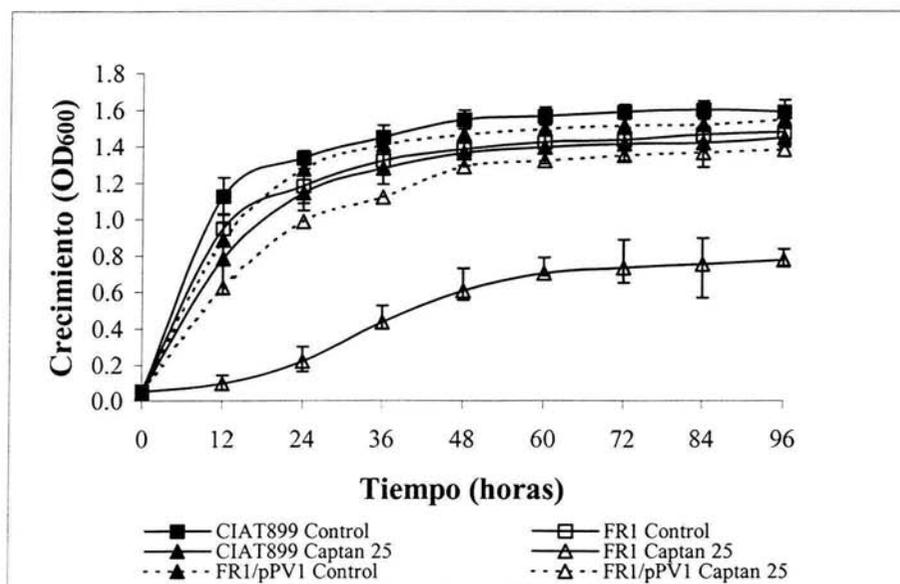
#### 7.2.4 Estrés por el fungicida “Captan”

En cuanto al tratamiento con el fungicida “Captan”, lo que se pudo advertir es que para FR1 existe una relación inversa entre el crecimiento y la concentración del Captan; cuanto mayor es la concentración del Captan utilizada, menor crecimiento existe de las bacterias. En las cepas CIAT899 y FR1/pPV1psCOS1 no se observa tal efecto y parece no afectarles significativamente. Aún en la mayor concentración de Captan utilizada, el crecimiento de estas dos cepas no se ve disminuído ni siquiera a la mitad. Las concentraciones utilizadas representan concentraciones donde *R. tropici* CIAT899 puede crecer (Ormeño E, comunicación personal).

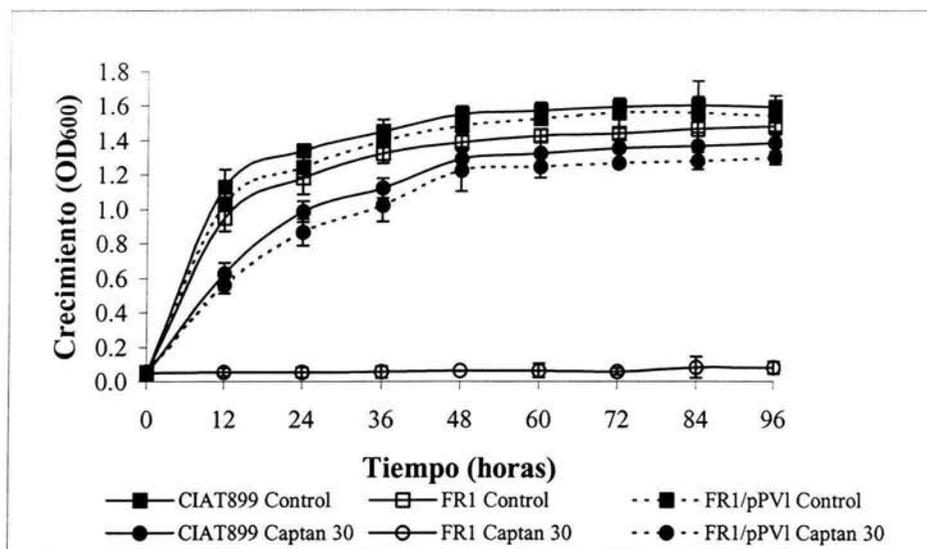
La cepa FR1 resultó ser más sensible al Captan, ya que en las concentraciones 20 y 25  $\mu\text{g/ml}$  (Figs. 7.8 y 7.9), su crecimiento disminuyó significativamente en comparación con el control. En las concentraciones 30 y 40  $\mu\text{g/ml}$  (Figs. 7.10 y 7.11) no se observó ningún crecimiento celular. CIAT899 y FR1/pPV1psCOS1 crecieron favorablemente bien en casi todas las concentraciones de Captan utilizadas (Figs. 7.8, 7.9 y 7.10), a excepción de 40  $\mu\text{g/ml}$ , donde su crecimiento disminuyó significativamente (Fig. 7.11).



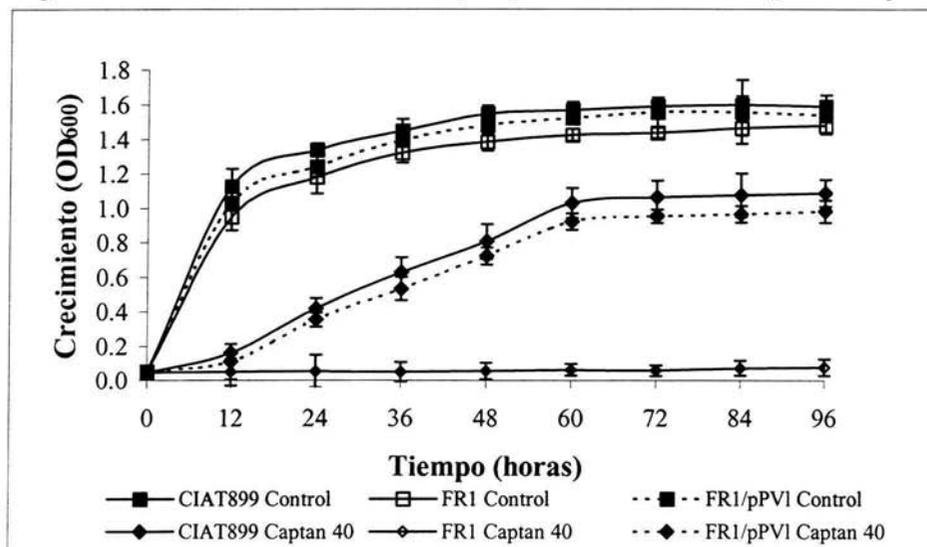
**Figura 7.8.-** Curvas de crecimiento de CIAT899, FR1 y FR1/pPV1psCOS1 en 20 µg/ml de Captan. El crecimiento de FR1 en comparación con su control se vió disminuido. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPV1psCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPV1.



**Figura 7.9.-** Curvas de crecimiento de CIAT899, FR1 y FR1/pPV1psCOS1 en 25 µg/ml de Captan. La cepa FR1 fue la única que se vió afectada en su crecimiento en esta concentración. Por razones de espacio, la cepa complementada FR1/pPV1psCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPV1.



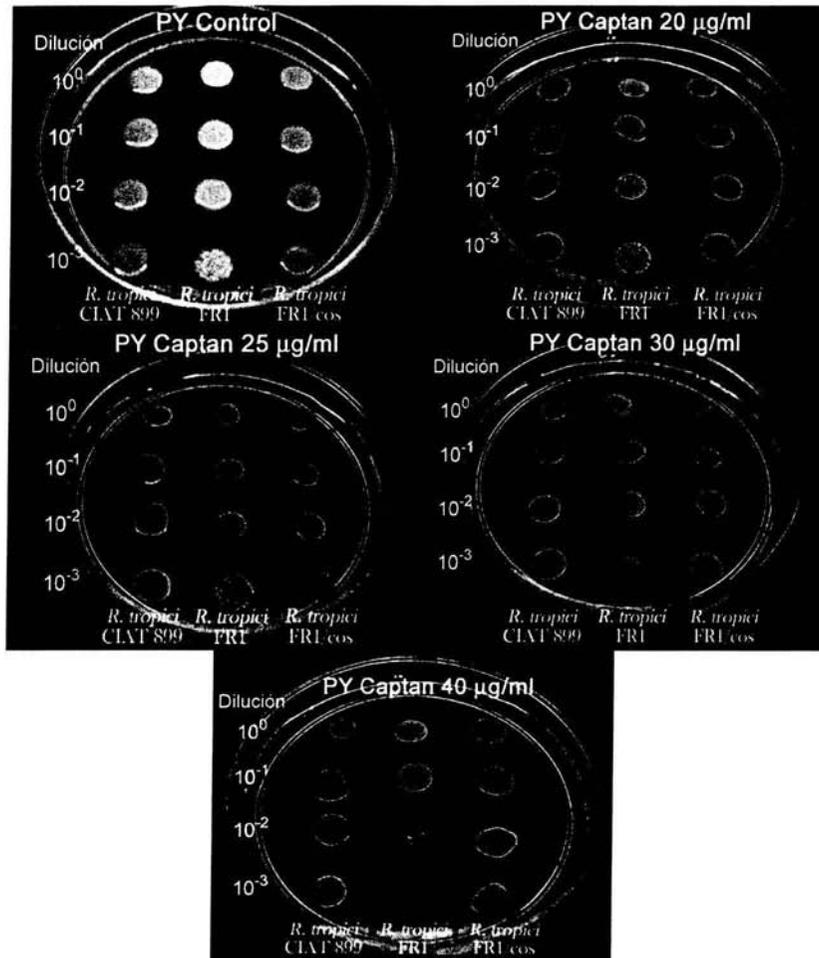
**Figura 7.10.-** Crecimiento de CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1 en 30 µg/ml de Captan. Ningún crecimiento fue observado en FR1. FR1/pPVlpsCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPVl.



**Figura 7.11.-** Curvas de crecimiento de CIAT899, FR1 y FR1/pPVlpsCOS1 en 40 µg/ml de Captan. Las cepas silvestre y complementada disminuyeron su crecimiento significativamente. La mutante no mostró crecimiento alguno. FR1/pPVlpsCOS1 es nombrada en la gráfica FR1/pPVl.

En cuanto al crecimiento en placas, para la cepa FR1 (Fig. 7.12), se observó un efecto similar al encontrado en medio líquido, es decir, que conforme aumenta la concentración de

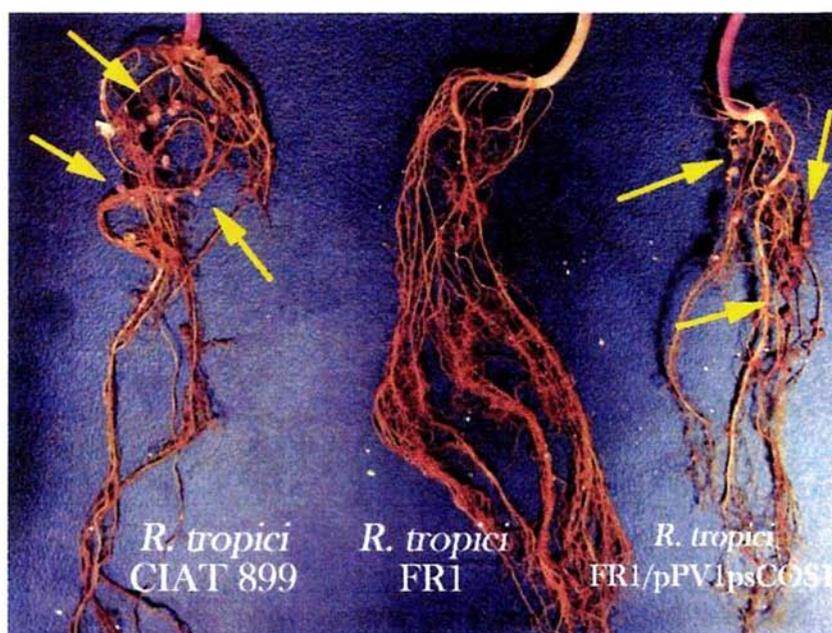
Captan, aparentemente su crecimiento va disminuyendo. En el caso de CIAT899 y FR1/pPV\psCOS1, prácticamente no se observa ninguna disminución en su crecimiento



**Figura 7.12.-** Crecimiento en placas de diferentes diluciones de las cepas silvestre, mutante y complementada en distintas concentraciones de Captan. Una aparente disminución en el número de colonias formadas es observada en el caso de FR1 al aumentar la concentración de Captan.

### 7.3 FR1 no indujo el desarrollo de nódulos en plantas de frijol

Como se observa en las figuras 7.13 y 7.14, las raíces de las plantas donde se inoculó FR1 no desarrollaron nódulos, mientras que las raíces donde se habían inoculado la cepa silvestre y la cepa complementada si presentaron el desarrollo de nódulos, siendo estos además de una apariencia rojiza, presentando las lenticelas típicas de los nódulos maduros.



**Figura 7.13.-** Fotografía donde se observa el sistema radicular de plantas de frijol de 21 días de crecimiento donde se inocularon por separado las tres cepas de bacterias. Aquéllas que desarrollaron nódulos fueron en las que se inoculó CIAT899 y FR1/pPV1psCOS1. Los nódulos están señalados con flechas. FR1 no indujo la formación de nódulos.



**Figura 7.14.-** Acercamiento de una de las raíces inoculadas con CIAT899 y de un nódulo desarrollado en dicha raíz. Como puede observarse posee lenticelas bien definidas y un color rojizo, características encontradas únicamente en los nódulos maduros y capaces de fijar nitrógeno.

---

## 8. Discusión

Las bacterias del suelo como *Rhizobium tropici*, encuentran en su medio natural una serie de fluctuaciones ambientales que pueden llegar a ser hostiles, los cuales pueden mermar su sobrevivencia. Además, durante el proceso de simbiosis también se tienen que enfrentar a distintas condiciones adversas que necesitan vencer para lograr una interacción exitosa.

El trabajo realizado aquí demuestra que en *R. tropici* CIAT899, los LPS, y en particular el antígeno O, están involucrados en conferir la resistencia intrínseca mostrada por esta cepa a distintos tipos de estrés abiótico. Prueba de lo anterior es que la mutante LPS-R de esta bacteria fue seriamente afectada en su crecimiento en la presencia de las condiciones probadas, a diferencia de la cepa tipo silvestre, la cual creció favorablemente en tales condiciones. Asimismo, el antígeno O está involucrado en el desarrollo de una interacción exitosa con su macrosimbionte, pues la mutante FR1 no fue capaz de inducir la formación de nódulos en las raíces de frijol.

En el presente estudio se generó y analizó a la mutante FR1, derivada de *R. tropici* tipo silvestre. Fue reconocida como una mutante que produce moléculas de LPS incompletas debido a la apariencia rugosa de las colonias al crecerlas sobre placas de medio 20E y a su tendencia a flocular en medio líquido. Además, tampoco estimuló la formación de nódulos en plantas de frijol tras 21 días post-inoculación. Estas características fenotípicas son comúnmente encontradas en mutantes de *Rhizobium* cuya producción de LPS es anómala (Vinuesa, 1999).

### 8.1 Comportamiento de FR1 ante las distintas condiciones de estrés

A excepción del estrés causado por la exposición a peróxido de hidrógeno, la cepa FR1 se vió seriamente afectada en su crecimiento cuando se expuso a las más altas concentraciones utilizadas de las demás condiciones de estrés analizadas, mostrando ser muy sensible a concentraciones en las que CIAT899 no lo fue.

### 8.1.1 Estrés por Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno fue un componente que no pareció influir prácticamente de ningún modo en el crecimiento de las cepas CIAT899 y FR1/pPVlpsCOS1. Sin embargo, esto pudo ser el resultado de que la concentración utilizada fuera muy baja y la cepa tipo silvestre sea capaz de tolerar concentraciones aún más altas. Con lo anterior, también se pudo haber encontrado un efecto mayor en FR1 del que se observó. Ricillo *et. al.* (2000b) reportaron un efecto importante del  $H_2O_2$  sobre las unidades formadoras de colonias en una cepa de *R. tropici* CIAT899 con una mutación en un gen involucrado en la resistencia a la acidez. Al crecerla en la concentración 1.5 mM determinaron que las UFCs disminuyeron tras la exposición con  $H_2O_2$  un orden de magnitud, siendo la mutante por lo tanto, muy sensible a dicha condición. Sin embargo, FR1 no disminuyó su crecimiento un orden de magnitud sino que, su viabilidad tras el tratamiento, se redujo aproximadamente un 20%.

También se ha observado que el peróxido de hidrógeno se volatiliza muy rápido (Levine *et. al.*, 1994), lo cual representa una variable que posiblemente afecte en los resultados, ya que la concentración inicial pudiera cambiar rápidamente. Quizá en nuestro experimento, la cantidad de  $H_2O_2$  aplicada si era la suficiente para producir un estrés, pero al volatilizarse rápidamente, no pudo seguir actuando sobre toda o la mayor parte de la población. De esta forma, sólo fue capaz de afectar a un número reducido de la población de bacterias de la cepa mutante, lo cual se tradujo en una reducción de la sobrevivencia después del tratamiento de un 20%. Por consiguiente, no podemos asegurar que el peróxido de hidrógeno afectó o no afectó al crecimiento de FR1, pues tal vez lo que ocurrió fue que no tuvo el tiempo suficiente para dañar a la mayoría de las células. Para salvar este problema se podría adicionar cada determinado tiempo, la misma concentración de  $H_2O_2$  con la que se inició; en el caso de que se pierda toda en ese intervalo de tiempo. Se pueden hacer seguimientos para determinar cuánto peróxido de hidrógeno se va perdiendo por unidad de tiempo y así, ir ajustando la concentración al medio donde se crezcan las bacterias, con el fin de asegurar que la cantidad de  $H_2O_2$  a la que están siendo expuestos los organismos sea verdaderamente la que se pretende.

A pesar de lo anterior, si se observó un efecto del peróxido de hidrógeno sobre la sobrevivencia de FR1, pues ésta disminuyó después del tratamiento. Se ha propuesto que

---

---

cambios en los LPS para disminuir la permeabilidad, forman parte de las respuestas que contrarrestan el estrés oxidativo (Sabra *et. al.*, 2003). Si *R. tropici* FR1 no posee moléculas de LPS completas, las modificaciones no podrán ser llevadas a cabo, pues una gran parte de éstas se producen en el antígeno O. Con tal carencia, las ROS como el peróxido de hidrógeno, encuentran una barrera más fácil de cruzar, por lo que muy probablemente se acumulan dentro de la célula y son capaces de dañar macromoléculas importantes.

### 8.1.2 Estrés por acidez

Los rizobios tiene que enfrentarse a valores de pH bajos tanto en condiciones de vida libre como una vez dentro del nódulo, por lo que deben de tener mecanismos que les permitan sobrevivir en tales condiciones adversas, pues siendo neutrófilas el valor de pH al cual crecen mejor es cercano a la neutralidad.

En el efecto del pH ácido sobre el crecimiento de las bacterias, se observó una gran diferencia entre la cepa mutante y la cepa tipo silvestre, siendo la mutante incapaz de crecer en pH 4.5.

Anteriormente ya se había sugerido para *R.tropici* CIAT899 la posibilidad de que la composición y la estructura de la membrana externa podrían representar un factor importante en la tolerancia a la acidez, pues Graham *et. al.* (1994) determinaron que al crecer a las células en pH ácido, la membrana celular de las bacterias se volvía muy hidrofóbica y resistente a los efectos del cristal violeta (compuesto cuya entrada es afectada por la permeabilidad de la membrana externa). En el presente reporte dicha aseveración es apoyada, ya que la cepa mutante FR1, carente del antígeno O, fue incapaz de crecer en pH 4.5, a diferencia de la cepa silvestre, la cual creció razonablemente bien en dicho valor de pH, con una tasa de crecimiento muy similar a la exhibida cuando se inoculó en pH 6.8. Así, queda de manifiesto que en *R. tropici* CIAT899, componentes de su membrana externa, como serían los LPS, son esenciales para su tolerancia a la acidez, en especial el antígeno O. Lo anterior tiene sentido debido a que existe una correlación entre la superficie celular bacteriana, incluyendo la cantidad de exopolisacáridos y la composición de los LPS y la tolerancia a la acidez en distintas especies bacterianas (Correa y Barneix, 1997; Zahran, 1999; Ricillo *et. al.*, 2000b).

La forma en la que la falta del antígeno O afecta la tolerancia de la célula a pH ácido puede ser debida al hecho de que los LPS actúan como una barrera celular que reduce la entrada de protones, con lo cual se fomenta el mantenimiento de un pH intracelular en valores no letales. Este mantenimiento del pH a un nivel menos ácido que el del exterior es un mecanismo mostrado por otras bacterias en respuesta a la acidez (O'Hara *et. al.*, 1989; Chen *et. al.*, 1993; Foster, 1999). Al carecer del antígeno O se puede afectar la permeabilidad de la membrana, posiblemente mediante un aumento de dicha permeabilidad, lo que permite un mayor paso de moléculas como serían los protones. Lo anterior puede producirse ya sea por el gran espacio en sí que deja la falta del antígeno O, o por la incapacidad de la célula para producir modificaciones en esta parte de los LPS, como serían los cambios en la longitud de la cadena, mecanismo mostrado en respuesta a condiciones de estrés (Preston, 2002), volviéndose una barrera menos eficiente contra los agentes externos. Por otro lado, la composición del antígeno O también puede afectar la carga de la superficie bacteriana, lo cual es otra forma de alterar la permeabilidad de la membrana. Asimismo, la pérdida de la cadena O puede afectar la conformación y función de proteínas de superficie (Larouge y Vanderleyden, 2001) y en el caso de la respuesta a pH ácido puede haber enzimas involucradas en la tolerancia a esta condición que se vean afectadas en su correcta conformación o actividad.

### 8.1.3 Estrés por Cloruro de Sodio

Dentro de su hábitat natural, los rizobios están frecuentemente expuestos a efectos desfavorables por la salinidad, la cual afecta el crecimiento bacteriano y la colonización de la planta. Éste es un estrés compuesto que tiene tanto un componente iónico como un componente osmótico.

El crecimiento mostrado por las cepas mutante, silvestre y complementada en 100 mM y en medio sin NaCl fue prácticamente idéntico. Lo anterior era de esperarse debido a que para alcanzar esta concentración (100 mM) se debe de adicionar al medio una cantidad en gramos de NaCl equivalente a casi la mitad de la que es utilizada cuando se prepara medio LB, medio en el que *R. tropici* CIAT899 crece perfectamente bien, con lo cual realmente no se generó un estrés. Sin embargo, algunos autores (Nogales *et. al.*, 2002) han

reportado una disminución en el crecimiento de CIAT899 a esta concentración. La variación encontrada en el crecimiento a distintas concentraciones de NaCl entre distintos laboratorios puede estar dada debido al tipo de medio utilizado pues este puede tener en sí mismo una mayor o menor concentración de sales.

Por otra parte, se determinó que la cepa silvestre de *R. tropici* fue capaz de crecer hasta una concentración de 400 mM de NaCl, a diferencia de la cepa mutante. En las concentraciones de 300 y 400 mM en el caso de la cepa silvestre y la complementada y de 200 mM para la mutante, se observó una fase lag inusualmente alargada. Este comportamiento muy probablemente está relacionado al proceso de aclimatación que experimentan las bacterias ante la exposición a condiciones que les producen un estrés importante. En esta fase lag alargada quizá las bacterias sintetizan enzimas o compuestos que les ayuden a sobrevivir en tales condiciones hostiles. Una vez aclimatadas a las nuevas condiciones, son capaces de exhibir crecimiento.

El hecho de que la cepa FR1 no haya mostrado ningún crecimiento en presencia de 300 ó 400 mM de NaCl supone un efecto inhibitorio debido quizá a la acumulación de los iones, lo cual produjo un estrés osmótico y también un estrés iónico. Los cambios estructurales de los LPS por la falta del antígeno O, muy probablemente estén afectando el paso de los iones, de tal manera que no se puede evitar la entrada de tales moléculas a la célula. Muchas cepas que son tolerantes a la sal, sintetizan LPS con una cadena más larga en longitud en respuesta al estrés y al no tener una cadena O que modificar, las bacterias se vuelven más sensibles a la sal, como sería el caso de FR1.

#### 8.1.4 Estrés por “Captan”

En la actualidad, el uso de los plaguicidas para mejorar la productividad se ha vuelto una práctica rutinaria en las actividades agrícolas, una de las consecuencias que esto ha generado es un efecto inhibitorio sobre la microflora del suelo, incluyendo los organismos fijadores de nitrógeno (Chalam *et. al.*, 1997).

Una vez introducidos al ambiente, los plaguicidas y otros contaminantes antropogénicos son sujetos a procesos de transformación biológica y no biológica. Dentro de los procesos biológicos, el metabolismo microbiano es la fuerza primaria en la

---

transformación o degradación de plaguicidas. De hecho, se ha establecido que en muchos casos, en la degradación de un plaguicida son más importantes los microbios que los mecanismos físicos o químicos. La importancia de los microorganismos no es de sorprenderse, dada la diversidad de sus actividades metabólicas, las cuales les permiten interactuar en nichos ecológicos que de otra manera serían inaccesibles.

El crecimiento de la cepa mutante se vió afectado de manera inversa en relación a la concentración de Captan añadida al medio, cuanto mayor fue ésta, menor fue el crecimiento de las bacterias. Lo anterior no ocurrió en la cepa silvestre, la cual fue capaz de crecer aún en la concentración máxima utilizada, aunque a una tasa menor. Existen pocos reportes referidos al efecto del Captan sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899. Y el descubrimiento de que ésta fue capaz de crecer en la presencia del fungicida, a diferencia por ejemplo de *R. etli* KIM5s (datos no mostrados) y otras bacterias (Ormeño E, comunicación personal), cuyo crecimiento es seriamente afectado aún a concentraciones mucho menores en las que crece *R. tropici* CIAT899, la hace deseable para su aplicación como biofertilizante en condiciones de campo, donde cantidades considerables de estos compuestos pueden ser encontradas. Si al estar en vida libre CIAT899 entra en contacto con este compuesto, su sobrevivencia, dependiendo de las concentraciones presentes, puede no verse seriamente afectada, o al menos en comparación con la de otras bacterias, que han mostrado ser más sensibles. No obstante, todavía tiene que ser comprobado si *R. tropici* CIAT899 es capaz de utilizar al Captan como fuente de energía. Para esto debe crecerse a la bacteria en medio mínimo, es decir, en un medio sin ninguna fuente de carbono y adicionarle Captan.

El que la cepa mutante no haya sido capaz de crecer en concentraciones a las que la silvestre si lo hizo puede estar relacionado al hecho de que el Captan al hidrolizarse, libere sus iones cloro, los cuales se acumulan dentro de la célula produciendo un efecto tóxico, similar al encontrado en el estrés por NaCl. La acumulación puede ser debida a una alteración en la permeabilidad que produce la falta del antígeno O. Por lo tanto, esta parte de los LPS también es de suma importancia para que la bacteria pueda tolerar el Captan.

## 8.2 Antígeno O, elemento determinante en la sobrevivencia ante distintas condiciones de estrés

La carencia del antígeno O indiscutiblemente implica un cambio importante en la estructura de los LPS, pues es la parte más grande y la que está en mayor contacto con el medio externo. No es claro cómo este cambio en la estructura y en la composición química de los LPS afecta a FR1, haciéndola más sensible a las condiciones de estrés probadas, en comparación con la cepa silvestre. Lo que es un hecho, es que el antígeno O es determinante para la resistencia de la bacteria a dichas condiciones. La explicación más acogida es que la permeabilidad de la membrana se ve afectada. En el caso de FR1, esto puede ser comprobado mediante un experimento empleando cristal violeta, compuesto que entra a la célula dependiendo de la permeabilidad de la membrana. También se sugiere que los cambios sufridos en la composición de la membrana externa por la falta del antígeno O, pueden llevar a una inestabilidad en la membrana, con lo cual también se puede favorecer una menor regulación de las moléculas que entran.

## 8.3 Limitantes de las descripciones *in vitro*

Los resultados presentados aquí, están basados en experimentos llevados a cabo sobre medios de cultivo definidos. Es necesario conocer la concentración de los distintos compuestos empleados, en especial del NaCl, del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del Captan, en condiciones de campo, con el fin de poder predecir el efecto que estos compuestos puedan tener sobre *R. tropici* CIAT899 en condiciones de vida libre.

Asimismo, se trataron de realizar todos los experimentos tanto en medio sólido como en líquido, para poder hacer comparaciones entre un estado y otro y relacionarlo con el que encuentran las bacterias en su medio natural. Sin embargo, esto no fue del todo posible debido a implicaciones técnicas. Para el caso del pH, las placas de medio no pueden ser solidificadas a valores de pH 4.5 con agar normal, se necesita un compuesto especial para gelificar, el cual no estaba disponible. En el caso del peróxido de hidrógeno, el crecimiento bacteriano se evaluó sólo en medio sólido tras una exposición rápida a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pues como ya se mencionó, debido a la rápida volatilización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es difícil de seguir una curva de

crecimiento por varios días. Para el Captan se evaluó el crecimiento tanto en placas de agar como en medio líquido.

En el caso del Captan, debido a que se utilizó tanto el crecimiento en placas como en medio líquido para evaluar su efecto sobre las bacterias, se pudo observar que el comportamiento de las células entre uno y otro estado fue muy parecido.

#### **8.4 La cepa complementada fue tan tolerante a los distintos tipos de estrés como la cepa silvestre**

La cepa FR1 pudo ser complementada con el cósmido pPVlpsCOS1, pues al replicarlo en trans, restauró el aspecto de la cepa silvestre y no flocluló cuando se creció en cultivo líquido. Adicionalmente, su crecimiento fue muy parecido al de CIAT899 en todas las distintas condiciones examinadas, lo cual fue señal de que en el cósmido está presente el elemento genético que le permitió complementar su defecto genético.

#### **8.5 Impedimento de FR1 para formar nódulos en plantas de frijol**

Cuando CIAT-FR1 fue examinada en sus propiedades simbióticas, se encontró que no indujo la formación de nódulos en las plantas de frijol. Sin embargo, el estado exacto en el que es afectado el proceso de nodulación es desconocido. Puede ser que la falta del antígeno O en la estructura de los LPS exponga componentes moleculares (como el oligosacárido núcleo) que no sean reconocidos por la planta, provocando un despliegue en sus respuestas de defensa pues no existió la comunicación molecular por parte de los simbioses. Otra posibilidad es que su pared se vuelva permeable a las moléculas tóxicas secretadas por las plantas o que sea incapaz de adherirse a los pelos radiculares debido a la falta de la cadena O, entre otras posibilidades.

#### **8.6 Ausencia de análisis genéticos**

Aún falta comprobar mediante análisis de Southern Blot, que la mutante generada es producto de la inactivación de los genes *gmd* y *fcl*. Sin embargo, dadas todas las evidencias presentadas, nuestra hipótesis actual es que CIAT-FR1 es una mutante LPS-II debido a la

incapacidad para sintetizar el residuo fucosa, por lo que la cadena del antígeno O no puede ser formada y que la función de estos genes no es redundante en el genoma, pues su inactivación no fue compensada, no existiendo un proveedor de fucosa alternativo. La baja tasa de recombinación encontrada en las transconjugantes fue razonable, ya que se trataba de una recombinación heteróloga.

En general, se han descrito pocos organismos que posean genes homólogos a *gmd* y *fcl* y la capacidad de fucosilar glucanos parece que no es una característica muy comúnmente encontrada en bacterias (Järvinen *et. al.*, 2001). En otras especies del grupo de los rizobios se han localizado estos genes y su expresión es inducida por flavonoides, pues la fucosa constituye parte de sus factores Nod (Freiberg *et. al.*, 1997; Lamrabet *et. al.*, 1999; Broughton *et. al.*, 2000). En *R. tropici* CIAT899 estos genes no afectaron la composición de los factores Nod pues en esta bacteria éstos están sulfatados y no fucosilados (Laeremans *et. al.*, 1996).

### **8.7 La tolerancia de *R. tropici* CIAT899 a ciertos tipos de estrés involucra elementos constitutivos**

Por ser el antígeno O una región muy expuesta a las presiones selectivas del medio como el estrés ambiental, respuestas del hospedero, bacteriófagos, etc., es de esperarse también que esta parte de los LPS muestre las modificaciones principales para responder a estas presiones del medio. Los LPS constituyen un mecanismo de defensa constitutivo, pues en condiciones normales, siempre están presentes en la membrana de *R. tropici* CIAT899. Sin embargo, al estar ausente o incompleto, no podrá ser modificado en respuesta a estas señales ambientales, por lo que se podría pensar que existen otros mecanismos que son activados cuando el primero no funciona, con el fin de asegurar la sobrevivencia de la bacteria. Así, a pesar de que se demostró que los LPS son importantes para tolerar condiciones adversas como la acidez, el estrés osmótico y el crecimiento en un compuesto antropogénico, lo que no es muy claro es qué ocurrió con los mecanismos que son inducidos en respuesta a tales condiciones de estrés. En la tolerancia a la acidez, se han identificado dos genes en *R. tropici* CIAT899 que son transcripcionalmente regulados por choque ácido, *atvA* (Vinuesa *et. al.*, 2000) y *gshB* (Ricillo *et. al.*, 2000b).

Si en *R. tropici* un mecanismo de respuesta falla, se deberían poder activar los otros, sobre todo si el mecanismo que falló es constitutivo, sin embargo quizá este mecanismo tiene una importancia tal que no pueda ser nivelado, en la mayoría de los casos, por otras respuestas, como se observó en el presente trabajo.

Un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia de las bacterias a distintos factores ambientales permitirá construir cepas mejoradas en las que los factores de estrés no limiten la nodulación y fijación de nitrógeno sobre las leguminosas.

## 9. Conclusiones

- ❖ Se generó la mutante *Rhizobium tropici* FR1, derivada de *R. tropici* CIAT899. Esta mutante no posee antígeno O en sus lipopolisacáridos.
- ❖ En *Rhizobium tropici* CIAT899, los genes *gmd* y *fcl* muy probablemente están involucrados en la biosíntesis del antígeno O de los lipopolisacáridos.
- ❖ La cepa FR1 fue afectada en su crecimiento ante las condiciones de estrés evaluadas. De tal forma que en *R. tropici* CIAT899, los LPS y en especial, el antígeno O, tienen un papel importante en conferir la resistencia intrínseca mostrada ante distintas condiciones de estrés como la acidez, el estrés osmótico por NaCl, el estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno y el fungicida Captan.
- ❖ FR1 fue incapaz de inducir el desarrollo de nódulos en plantas de frijol, por lo que el antígeno O en *R. tropici* CIAT899, también es requerido para llevar a cabo un proceso de interacción exitoso con la planta.
- ❖ La cepa mutante pudo ser complementada por un cósmido de *R. tropici* CIAT899, el cual fue capaz de revertir el defecto genético y restaurar los fenotipos mostrados por la cepa silvestre.

## 10. Apéndice

### I. Medios de cultivo y antibióticos

#### MEDIO PY (Noel *et. al.*, 1984)

Peptona de caseína	5g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub>	1g
Agar (si es sólido)	15 g
H <sub>2</sub> O	Para 1 l
Calcio 1M	(1ml/100 ml de medio estéril)

#### MEDIO 20E (Werner *et. al.*, 1975)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	86 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	87 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	73.5 mg
KNO <sub>3</sub>	506 mg
FeSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6.95 mg
EDTA	9.3 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4.84 mg
Glicerol	4.6 ml
Manitol	1.82 g
Extracto de levadura	2 g
Agar (si es sólido)	15 g
H <sub>2</sub> O	Para 1 l

#### MEDIO MÍNIMO (MM) (Kingsley y Bohlool, 1992)

Glicerol	5.17 ml
Glutamato de sodio	2.085 g
<u>Solución Stock I (x10)</u>	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	246 mg
CaCl <sub>2</sub>	68 mg
KCl	112 mg
<u>Solución Stock II (x100)</u>	
FeEDTA	11mg
<u>Solución Stock III (x1000)</u>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	685 µg

MnSO <sub>4</sub>	152 µg
ZnSO <sub>4</sub>	115 µg
CuCl <sub>2</sub>	170 µg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4.84 µg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	65 µg
<u>Vitaminas (Stock x 1000)</u>	
Pantotenato de sodio	0.8 mg/l
Tiamina HCl	0.8 mg/l
Nicotinamida	0.8 mg/l
Agar (si es sólido)	15 g
H <sub>2</sub> O	Para 1 l

**MEDIO LB** (Sambrook *et. al.*, 1989)

Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g
NaCl	10 g
Agar (si es sólido)	15 g
H <sub>2</sub> O	Para 1 l

**Antibióticos utilizados en *R. tropici*:**

Antibiótico	Solvente	Concentración (µg/ml)
Ácido nalidíxico (Nal)	NaOH 0.1 M	20
Kanamicina (Km)	H <sub>2</sub> O	100
Tetraciclina (Tc)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH 70%	7.5

**Antibióticos utilizados en *E. coli*:**

Antibiótico	Solvente	Concentración (µg/ml)
Kanamicina (Km)	H <sub>2</sub> O	35
Tetraciclina (Tc)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH 70%	10

## II. Protocolos

### Transformación (Vinuesa, 1998)

- 1.- Descongelar las células competentes (*E. coli* S17-1 en tubos de 100-200  $\mu$ l) en hielo.
- 2.- Añadir 0.5-1  $\mu$ l de plásmido a las células competentes y dejar incubando en hielo por 30 minutos.
- 3.- Incubar las células a 42° C por 2 minutos exactos, pasarlas inmediatamente a hielo (choque térmico), y dejar enfriar por 2 minutos adicionales.
- 4.- Transferir las células competentes a un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de medio LB y dejar incubando a 37° C en agitación durante 1 hora.
- 5.- Centrifugar las células y tirar la mayor parte del sobrenadante dejando solamente 50  $\mu$ l, volumen en el que se resuspende la pastilla de células.
- 6.- Plaquear las células en cajas de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido utilizado, en este caso Km.

### Conjugación (Vinuesa, 1998)

- 1.- Crecer la cepa *E. coli* S17-1/Km y la cepa *R. tropici* CIAT899 en medio líquido con el antibiótico adecuado por aproximadamente 12 horas.
- 2.- Obtener un cultivo fresco de *E. coli* haciendo una dilución 1:20 (ahora sin antibiótico) y dejar crecer hasta una densidad óptica de 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0.6 – 0.8. El cultivo de *Rhizobium* deberá de estar a una  $OD_{600}$  de ~1.
- 3.- Mezclar los cultivos de *E. coli* y *Rhizobium* en relaciones 1:1, 1:2, y 2:1 en un eppendorf, centrifugar.
- 4.- Resuspender en 1 ml de PY y centrifugar a 7000 rpm durante 1 minuto, tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100  $\mu$ l de PY a 30°C, aplicar en forma de gota este volumen en una placa de PY a 30°C. Dejar secar e incubar toda la noche.
- 5.- Al día siguiente recuperar la masa bacteriana y resuspender en una solución estéril de NaCl al 0.8 %, vortexear. Repetir 2 ó 3 veces este lavado.
- 6.- Plaquear 100  $\mu$ l de las células sobre medio selectivo (diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) e incubar de 3 a 4 días, las colonias que aparezcan serán las recombinantes.

### “Screening” de mutantes

- 1.- Las colonias bien crecidas se subcultivan en el mismo medio selectivo dos veces para purificarlas (asegurándose de que no sean contaminaciones de *E. coli*). Estas células son las recombinantes sencillas (1x).
- 2.- De las recombinantes sencillas se seleccionan hasta 10 clonas, se crecen en 3 ml de PY con los antibióticos adecuados hasta saturación y se plaquean 100  $\mu$ l (diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) en el mismo medio selectivo pero ahora adicionado además sacarosa, con el objeto de obtener las recombinantes dobles (2x). Sólo si existe una doble recombinación se produce el intercambio de marcadores.

- 3.- Dejar crecer entre 3 y 4 días y observar si aparecen colonias bien crecidas.
- 4.- Purificar estas colonias por resiembra (dos veces).
- 5.- Una vez purificadas, se estrían en PY y 20E y se compara la morfología con la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899 silvestre, observar si las mutantes son rugosas. Adicionalmente se crecen en medio líquido hasta saturación y después de 20 minutos de dejarlas en reposo, se observa si flocculan o no.

### **Esterilización, germinación, inoculación con rizobios y crecimiento de las semillas**

- 1.- Enjuagar las semillas de frijol con etanol al 70% por 1 minuto.
- 2.- Enjuagar con cloro al 25% durante 15 minutos.
- 3.- Lavar con agua destilada estéril en abundancia hasta dejar de percibir el olor a cloro.
- 4.- Elegir sólo aquéllas semillas que no tengan la testa arrugada o maltratada.
- 5.- En cajas de petri con agar-agua al 0.75%, incubar las semillas a 30° C por dos días o hasta que germinen.
- 6.- Esterilizar simultáneamente matraces de 250 ml conteniendo vermiculita, la cantidad usada no debe de llenar hasta el tope el matraz, cubrirlos con una tapa de papel aluminio doblado tres veces.
- 7.- En esterilidad, cultivar en los matraces las semillas germinadas, agregar 150 ml de solución nutritiva libre de nitratos y 400  $\mu$ l del inóculo bacteriano crecidos hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0.4, distribuirlo uniformemente sobre la raíz, taparlos nuevamente con la tapa de aluminio.
- 8.- Colocar los matraces en la cámara de etiolación (oscuridad a 26°C), por dos días o hasta que la plántula alcanza la tapa del matraz. Al cabo de esto, se reemplaza la tapa de aluminio por tapones estériles, permitiendo que la plántula emerja por un costado.
- 9.- Finalmente los matraces se trasladan al cuarto de crecimiento, que tiene un fotoperiodo de 12 horas y una temperatura de 28° C. Esperar 21 días para observar las plantas y determinar en las raíces si existe o no nodulación.

## 11. Glosario

27-OH:C28	Ácido hidroxioctacosanoico-27
CAT	Catalasa
CFU	Unidades formadoras de colonias
CPSs	Polisacáridos capsulares
DNA	Ácido desoxiribunucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPSs	Exopolisacáridos
FCL	GDP-4-keto-6-D-deoximanosa epimerasa/reductasa
GFS	GDP-L-fucosa sintetasa. Ver FCL
GMD	GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa
GMER	Ver FCL
GSH	Glutati3n sintetasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per3xido de hidr3geno
Kdo	Ácido 2-keto-3-deoxioctunoico
Km	Kanamicina
LPSs	Lipopolisacáridos
LPS-I	LPS con lípido A, oligosacárido núcleo y polisacárido O
LPS-II	LPS sin polisacárido O
LPS-R	Ver LPS-II
LPS-S	Ver LPS-I
Nal	Ácido nalidíxico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anión super3xido
OH <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	Radicales hidroxilo
ORF	Marco de lectura abierto
<i>R. etli</i>	<i>Rhizobium etli</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Rhizobium tropici</i>
rRNA 16S	Ácido Ribonucleico ribosomal, subunidad 16S
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)
SOD	Super3xido dismutasa
Tc	Tetraciclina
UDP-GlcNAc	UDP N-acteilglucosamina

---

## 12. Bibliografía

1. **Allaway D, Jeyretman B, Carlson RW, Poole P.S.** 1996. Genetic and chemical characterization of a mutant that disrupts synthesis of the lipopolysaccharide core tetrasaccharide in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology* 178: 6403-6406.
2. **Andrianopoulos K, Wang L, Reeves PR.** 1998. Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 180 (4): 998-1001.
3. **Bejarano, F.** 1998. Plaguicidas. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (<http://www.laneta.apc.org/emis/sustanci/plagui/plagui.htm>).
4. **Boncompagni E, Osteras M, Poggi M-C, Le Rudulier D.** 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (5): 2072-2077.
5. **Brock TD.** 2003. *Biology of microorganisms*. 10<sup>th</sup> Ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.
6. **Broughton W, Perret X.** 1999. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 305-311.
7. **Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182 (20): 5641-5652.
8. **Campbell GRO, Reuhs BL, Walker GC.** 1998. Different phenotypic classes of *Sinorhizobium meliloti* mutants defective in synthesis of K antigen. *Journal of Bacteriology* 180 (20): 5432-5436.
9. **Carlson RW, Rehus BL, Forsberg LS, Kannenberg EL.** 1999. Rhizobial cell surface carbohydrates: their structures, biosynthesis, and functions. Pp. 53-90 *en* JB Goldberg (editor). *Genetics of Bacterial Polysaccharides*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
10. **Chalam AV, Sasikala C, Ramana CV, Uma NR, Rao PR.** 1997. Effect of pesticides on the diazotrophic growth and nitrogenase activity of purple nonsulfur bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 463-468.
11. **Chen H, Richardson AE, Rolfe BG.** 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6): 1798-1804.
12. **Correa OS, Barneix AJ.** 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 153-157.
13. **Crockford AJ, Behnke C, Williams HD.** 1996. The adaptation of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to oxidative stress and its overlap with other environmental stress responses. *Microbiology* 142: 331-336.
14. **Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénaré J, Boivin C.** 2001. Nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* 48 (2): 359-365.
15. **Eiamphungporn W, Nakjarung K, Prapagdee B, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S.** 2003. Oxidant-inducible resistance to hydrogen peroxide killing in

- Agrobacterium tumefaciens* requires the global peroxide sensor-regulator OxyR and KatA. FEMS Microbiology Letters 225: 167-172.
16. **Fenske RA, Schuller C, Lu C, Allen EH.** 1998. Incomplete removal of the pesticide captan from skin by standard handwash exposure assessment procedures. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61: 194-201.
  17. **Ferguson GP, Roop II RM, Walker GC.** 2002. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* *bacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. Journal of Bacteriology 184 (20): 5625-5632.
  18. **Foster JW.** 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. Current Opinion in Microbiology 2: 170-174.
  19. **Frayse N, Couderc F, Poinso V.** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. European Journal of Biochemistry 270: 1365-1380.
  20. **Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387: 394-401.
  21. **García-de los Santos A, Brom S.** 1997. Characterization of two plasmid-borne *lps* $\beta$  loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 10 (7): 891-902.
  22. **Gil-Serrano AM, González Jiménez I, Mateo PT, Bernabé M, Jiménez Barbero J, Megías M, Romero Vázquez MJ.** 1995. Structural analysis of the O-Antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. Carbohydrate Research 275: 285-294.
  23. **Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML.** 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. Canadian Journal of Microbiology 40: 198-207.
  24. **Gronow S, Brade H.** 2001. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? Journal of Endotoxin Research 7 (1): 3-23.
  25. **Hasan HHA.** 1999. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. Mycopathologia 148: 149-155.
  26. **Hobbs M, Reeves PR.** 1994. The JUMPstart sequence: a 39 element common to several polysaccharide gene clusters. Molecular Microbiology 12 (5): 855-856.
  27. **Järvinen N, Mäki M, Rabian J, Roos C, Mattila P, Renkonen R.** 2001. Cloning and expression of *Helicobacter pylori* GDP-L-fucose synthesizing enzymes (GDM and GMER) in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry 268: 6458-6464.
  28. **Kannenberg EL, Rehus BL, Forsberg LS, Carlson RW.** 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis and functions. Pp. 119-154 en HP Spanik, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (editores). The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
  29. **Kannenberg EL, Carlson RW.** 2001. Lipid A and O-Chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. Molecular Microbiology 39 (2): 379-391.
  30. **Kingsley MT, Bohlool BB.** 1992. Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminum tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli CIAT899. Applied and Environmental Microbiology 4: 1095-1101.

31. **Kulkarni S, Surange S, Nautiyal CS.** 2000. Crossing the limits of *Rhizobium* existence en extreme conditions. *Current Microbiology* 41: 402-409.
32. **Kyei-Boahen S, Slinkard AE, Walley FL.** 2001. Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian Journal of Microbiology* 47 (6): 585-589.
33. **Laeremans T, Caluwaerts I, Verreth C, Rogel MA, Vanderleyden J, Martínez Romero E.** 1996. Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9 (6): 492-500.
34. **Lagares A, Hozbor DF, Niehaus K, Pich Otero AJL, Lorenzen J, Arnold W, Pühler A.** 2001. Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 183 (4): 1248-1258.
35. **Lamrabet Y, Bellog'pin RA, Cubo T, Espuny R, Gil A, Krishnan HB, Megias M, Ollero FJ, Pueppke SG, Ruiz-Sainz JE, Spanik HP, Tejero-Mateo P, Thomas-Oates J, Vinardell JM.** 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (3): 207-217.
36. **Lerouge I, Vanderleyden J.** 2001. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 17-47.
37. **LeVier K, Phillips RW, Grippe VK, Roop II RM, Walker GC.** 2000. Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science* 287: 2492-2493.
38. **Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
39. **Lloret J, Bolaños L, Lucas MM, Peart JM, Brewin NJ, Bonilla I, Rivilla R.** 1995. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10): 3701-3704.
40. **Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41 (3): 417-426.
41. **Martínez-Romero E.** 2000. The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. (<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>).
42. **McGowan CC, NechevaA, Thompson SA, Cover TL, Blaser MJ.** 1998. Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* 30: 19-31.
43. **Milcamps A, Ragatz DM, Lim P, Berger KA, de Bruijn FJ.** 1998. Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation-induced loci of *Sinorhizobium meliloti* 1021 by Tn5-*luxAB* mutagenesis. *Microbiology* 144: 3205-3218.
44. **Miller KJ, Wood JM.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Review in Microbiology.* 50: 101-136.
45. **Noel KD, Forsberg LS, Carlson RW.** 2000. Varying the abundance of O antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* 182 (19): 5317-5324.

46. **Nogales J, Campos R, BenAbdelkhalek H, Olivares J, Lluch C, Sanjuan J.** 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (3): 225-232.
47. **O'Hara GW, Goss TJ, Dilworth MJ, Glenn AR.** 1989. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (8): 1870-1876.
48. **Oke V, Long SR.** 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology* 32 (4): 837-849.
49. **Pardo-Castro A.** 1990. El tratamiento de semillas: Una Herramienta para la Agricultura Sostenible. (<http://www.amsac.org.mx/>).
50. **Preston A, Maskell DJ.** 2002. Molecular genetics and role in infection of environmentally regulated lipopolysaccharide expression. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 7-15.
51. **Raetz CHR, Whitfield C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review in Biochemistry* 71: 635-700.
52. **Raza S, Jornsgard B, Abou-Taleb H, Christiansen JL.** 2001. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32: 379-383.
53. **Reeve WG, Tiwari RP, Wong CM, Dilworth MJ, Glenn AR.** 1998. The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* 144: 3335-3342.
54. **Ricillo PM, Collavino MM, Grasso DH, England R, deBrujin FJ, Aguilar OM.** 2000a. A *guaB* mutant of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1228-1236.
55. **Ricillo PM, Muglia CI, De Bruijn FJ, Roe AJ, Booth IR, Aguilar OM.** 2000b. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* 182 (6): 1748-1753.
56. **Rosenblueth M, Martínez Romero J, Martínez Romero E.** 2001. Ecología química en la rizósfera y en las simbiosis de plantas. Pp: 99-136 en AL Anaya, FJ Espinosa-García y R Cruz-Ortega (editores). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Plaza y Valdés Editores. México.
57. **Sabra W, Lünsdorf H, Zeng AP.** 2003. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology* 149: 2789-2795.
58. **Sadowsky MJ, Graham PM.** 1998. Soil biology of the *Rhizobiaceae*. Pp. 155-172 en HP Spanik, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (editores). *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
59. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA.** 1983. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
60. **Santos R, Hérouart D, Puppo A, Touati D.** 2000. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology* 38 (4): 750-759.

61. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145 (1): 69-73.
62. Schnaitman CA, Klena JD. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological Reviews* 57 (3): 655-682.
63. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.
64. Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by Rhizobial bacteria. *Annual Review in Microbiology* 54: 257-288.
65. Summers ML, Botero LM, Busse SC, McDermott TR. 2000. The *Sinorhizobium meliloti* Lon protease is involved in regulating exopolysaccharide synthesis and is required for nodulation of alfalfa. *Journal of Bacteriology* 182 (9): 2551-2558.
66. Unni S, Rao KK. 2001. Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium sp.* and its exopolysaccharide-deficient mutant. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 111-115.
67. van Berkum P, Eardly BD. 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. Pp. 1-24 en HP Spanik, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (editores). *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
68. Vinuesa, P. 1998. Genetic and phenotypic analysis of *Rhizobium etli* and *R. tropici* mutants defective in lipopolysaccharide synthesis and acid tolerance, and applications of genomic typing methods. PhD Tesis. Philipps of Marburg University, Marburg, Alemania.
69. Vinuesa P, Reuhs BL, Breton C, Werner D. 1999. Identification of a plasmid-borne locus in *Rhizobium etli* KIM5s involved in lipopolysaccharide O-chain biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology* 181 (18): 5606-5614.
70. Vinuesa P, Neumann Silkow F, Pacios Bras C, Spanik HP, Martínez Romero E, Werner D. 2002. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (1): 1-8.
71. Wang E., Martínez-Romero J y López-Lara I. 2001. Microbios en línea. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas (<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>).
72. Werner D, Wilcoxon J, Zimmermann E. 1975. Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. *Archives of Microbiology* 105: 27-32
73. Wu B, Zhang Y, Wang PG. 2001. Identification and characterization of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase and GDP-L-fucose synthase in a GDP-L-fucose biosynthetic gene cluster from *Helicobacter pylori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285: 346-371.
74. Zahran HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (4): 968-989.

## SITOS DE INTERNET

1. Instituto Nacional de Ecología. 2002. Comportamiento ambiental de los plaguicidas (<http://www.ine.gob.mx/>).
2. Environmental Protection Agency (EPA). 2003. Technology Transfer Network Air Toxics Website (<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/captan.html>).
3. Extension Toxicology Network (EXTOXNET). 1996. Pesticide Information Profiles (<http://extoxnet.orst.edu/pips/captan.htm>).
4. Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC). 1995. ([http://148.233.168.204/estadisticas\\_2000/naturaleza/estadistica.am/informe/acrobat/capitulo3-3-5.pdf](http://148.233.168.204/estadisticas_2000/naturaleza/estadistica.am/informe/acrobat/capitulo3-3-5.pdf)).
5. Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales (OLCA). 1996. Lista provisoria de plaguicidas registrados en Chile que están prohibidos o severamente restringidos por gobiernos y sus efectos sanitarios y ambientales (<http://www.olca.cl/oca/plaguicidas/plag03.htm>).