



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala*

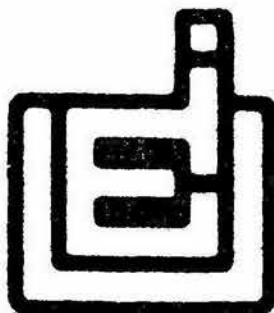
*“ALGUNOS ASPECTOS FITOPATOLÓGICOS DE
Xanthomonas campestris CON RELACION A
LAS PROPIEDADES DEL POLÍMERO
EXTRACELULAR QUE PRODUCE”*

Tesis Profesional

*Que para obtener el Título de
B I O L O G O*

p r e s e n t a

Maria Eugenia Ramírez Guapo



México, D. F., 1987



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.

Per que sembla
cuesta més
que cosechar

Intentar una cosa,
es signe de inquietud,
realitzar-la
es prova de caràcter

A ell

Por su sacrificio y su fe

A mis padres:

*Cristina Guapo Muñoz y
Sr Juan Romero Seis*

Por la constancia, la dedicación y la superación

A cada uno de mis hermanos.

Por que le guardo "pensamientos y no me olvides"

A Paulina.

*A todas las personas que me apoyaron y ayudaron a la realización
de la presente.*

RECONOCIMIENTOS

Al M. en C. Enrique Galindo Fentanes.

Por que la preparaci3n y formaci3n de profesionales requiere de dedicaci3n, esfuero y comprensi3n, mis m3s grandes agradecimientos.

Quiero agradecer los consejos y la cr3tica al presente trabajo al Dr. Leopoldo Fucickovsky y al Dr. Federico Garcia Jimenez.

Índice general

	Página
Índice general	i
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas	vi
Presentación	1
Resumen	2
Capítulo	
1 Introducción	5
2 Antecedentes	8
2.1.1 Generalidades	8
2.1.2 Características generales y principales enfermedades de la familia de las crucíferas	9
2.1.3 Agente causal: <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	11
2.1.3.1 Características morfológicas	11
2.1.3.2 Características bioquímicas	11
2.1.4 Naturaleza de la enfermedad	13
2.1.5 Medios de infección	16
2.1.6 Caracterización de los síntomas	17
2.1.7 Desarrollo de la enfermedad	18

2.1.8	Medios de dispersión	10
2.1.9	Resistencia a la pudrición negra	20
2.1.10	Métodos de detección	21
2.1.11	Formas de control	22
2.2.1	Características estructurales del polímero.	23
2.2.2	Función biológica	24
2.2.3	Producción de la goma xantana por fermentación	29
2.2.4	Usos Industriales	30
3	Objetivos	32
4	Materiales y Métodos	33
4.1.1	Estrategia experimental desarrollada.....	34
4.1.2	Cepas	36
4.2	Métodos	37
4.2.1	Técnicas analíticas	37
4.2.1.2	Mutagénesis con Nitrosoguanidina	37
4.2.1.3	Determinación de radicales acetilos	42
4.2.1.4	Determinación de radicales pirúvicos	46
4.2.1.5	Espectroscopia de infrarrojo	50
4.2.2	Metodologías generales	51

4.2.2.1	Conservación de las cepas en agar suave	51
4.2.2.2	Liofilización	52
4.2.2.3	Determinación de la concentración celular para la suspensión bacteriana	53
4.2.2.4	Determinación de crecimiento celular (D.O.)	55
4.2.2.5	Infección de plantas de <u>Brassica oleraceae</u> con una suspensión bacteriana	55
4.2.2.6	Evaluación de las lesiones producidas por cada mutante	56
4.2.3	Procedimientos experimentales.....	58
4.2.3.1	Fermentación en matraz Fernbach	58
4.2.3.2	Obtención del polímero en polvo	59
4.2.3.3	Determinación de viscosidad con el viscosímetro Brookfield	60
5	Resultados y Discusión	61
5.1	Obtención de cepas	61
5.2	Caracterización de las colonias y mutantes de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u> con relación a las propiedades del polímero extracelular que producen ...	72
5.2.1	Evaluación fitopatológica de las colonias y mutantes	72
5.2.2	Características del polímero extracelular obtenido de las fermentaciones en matraces Fernbach y su correlación con la virulencia	74

Índice de figuras

1	Principales bacterias fitopatógenas y síntomas que producen	10
2	Vista microscópica de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	12
3	Corte longitudinal de vainas y semillas de plantas de <u>Brassica oleraceae</u>	15
4	Cortes transversales de la vena central de las hojas de col	19
5	Unidad estructural de la goma xantana	25
6	Interacción sinérgica de la goma xantana-galactomanana	28
7	Estrategia experimental desarrollada	35
8	Curva de muerte de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u> tratada con Nitrosoguanidina	40
9	Curva patrón para la determinación de grupos acetilo en el polímero	44
10	Curva patrón para la determinación de radicales pirúvicos	48
11	Curva patrón para la determinación de concentración celular de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	54
12	Estimación de la virulencia	57
13	Relación entre el diámetro de la colonia y el rendimiento de cada una de las cepas	65
14	Relación del diámetro de las colonias con respecto al índice de las levanas.....	69
15	Relación entre el índice de levanas y la viscosidad aparente de las mutantes.....	70
16	Relación entre el índice de levanas y el rendimiento producido en la fermentación de cada una de las cepas.....	71
17	Viscosidad aparente producido en matraz Fernbach de cada una de las mutantes con respecto a su virulencia	84

18	Producción específica de cada cepa y su relación con la virulencia	86
19	Rendimiento de los polímeros producidos por cada cepa respecto al área de la lesión.....	88
20	Capacidad viscosificante con respecto al área de la lesión de las mutantes	91
21	Porcentajes de ácido pirúvico presentes en el polímero de cada cepa y su relación con el área de la lesión	93
22	Porcentajes de radicales acetilos de los polímeros de cada mutante y de las cepas no mutadas con respecto al área de lesión que producen	94
23	Correlación entre el producto acetilo, pirúvico y rendimiento en relación con el área de la lesión producida por cada una de las cepas	97
24	Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa <u>X. campestris</u> <u>NKRLB-1459</u>	100
25	Relación entre la banda de la asociación intramolecular (1063 cm^{-1}) y el área de la lesión de cada una de las cepas	102
26	Relación de intensidades relativas de bandas que implican las asociaciones inter e intra moleculares en cepa no virulenta (<u>X. campestris</u> <u>27NT12</u>) medianamente virulenta (<u>X. campestris</u> <u>1459</u>) y virulenta (<u>X. campestris</u> <u>18 N</u>).....	103

Índice de tablas

1	Características morfológicas de mutantes de <u>X. campestris</u> y colonias de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	63
2	Características de las cepas mutadas en medio YM con cloruro de tetrazolium	64
3	Prueba de producción de levanas de las colonias de <u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u> y las mutantes	68
4	Tamaño de las lesiones obtenidas de la infección en plantas de coliflor	73
5	Resultados de las fermentaciones en matraz Fernbach de las mutantes y colonias silvestres de <u>X. campestris</u>	83
6	Capacidad viscosificante producida por las cepas	90
7	Datos obtenidos de la relación (acetilo)(pirúvico)(rendimiento) de cada una de las cepas y su respectiva área de lesión	96
8	Descripción del espectro de infrarrojo del polímero de <u>X. campestris</u> 1459.....	99
9	Áreas de las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas.....	101
10	Bandas distintivas de los espectros de infrarrojo comparativamente con el espectro de <u>X. campestris</u> 1459.....	105

Presentación

El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas *, de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Fitopatología del Colegio de Posgraduados de Chapingo.

Los asesores que participaron en el desarrollo del presente trabajo fueron: El Dr. Leopoldo Fucickovsky Zak (Colegio de Post-graduados), el M. en C. Enrique Galindo Fentanes (Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM) y el Dr. Federico García Jiménez (Instituto de Química, UNAM).

* Aunque el trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, el personal participante actualmente pertenece al Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.

RESUMEN

L. campestris es una bacteria fitopatógena que produce un polímero denominado goma xantana. Este polímero es de gran importancia industrial porque se emplea en la industria petrolera, alimenticia y farmacéutica, entre otras.

En el presente trabajo se realizaron estudios fitopatológicos tendientes a establecer la relación que existe entre la capacidad fitopatógena de la bacteria y las propiedades (químicas y fisicoquímicas) del polímero que produce. Ello permitió establecer criterios de selección y aislamiento de cepas de L. campestris, con alta capacidad productiva del polímero y cuyas características sean adecuadas para su uso final.

La primera etapa del trabajo consistió en la alteración de las propiedades del polímero producido por L. campestris 1459 como consecuencia de una mutagénesis química provocada por el tratamiento de esta cepa con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina. Como resultado de este tratamiento se seleccionaron y aislaron ocho mutantes, de acuerdo con las diferencias que presentaron en medios VM, VM + cloruro de tetrazolium y en un medio rico en sacarosa. Para determinar el grado de virulencia en función del área de las lesiones, cada mutante fue inoculada en plantas del género Brassica oleraceae (coliflor). Como control se utilizó además una cepa silvestre de L. campestris pv campestris, obtenida de un campo de cultivo en donde se presentaba la enfermedad "Podrición negra" producida por la bacteria. Una vez definidas las características fitopatógenas, se procedió a establecer su relación con el polímero. Para este objetivo cada cepa fue inoculada en matraces Fernbach con

un medio definido para la producción del polímero. Después de 48 hrs de cultivo se procedió a la recuperación del polímero para la realización de los análisis químicos.

Los resultados obtenidos con las mutantes indicaron que los parámetros más significativos en los cuales se observó relación con la virulencia fueron: la viscosidad aparente, la capacidad viscosificante, la producción específica y los porcentajes de sustituyentes acetilo presentes en el polímero. Todos los anteriores parámetros se incrementan a medida que la patogenicidad de la cepa aumenta.

Por otra parte los estudios de los espectros de infrarrojo de cada polímero señalaron que otro factor que está involucrado fuertemente en la virulencia es la interacción intramolecular que se presenta en el polímero. Esta observación permite establecer que este arreglo intramolecular junto con los porcentajes de acetilo sean responsables de la interacción del polímero con las moléculas constituyentes de la pared de la planta infectada.

Los datos obtenidos sugieren que en la virulencia, no solo los parámetros cuantificados en este trabajo son responsables de dicha virulencia, sino que existen factores intrínsecos involucrados tanto del microorganismo como de la planta y las condiciones ecológicas en donde se desarrolle esta interacción. Sin embargo, la estrategia desarrollada en el presente trabajo permitirá la selección y aislamiento de cepas directamente de su hábitat natural, así como la posibilidad de usarse para el proceso de producción del biopolímero. Es decir, tomando como principal criterio el área de la lesión que produce la cepa, se pueden aislar cepas con un alto grado de

potencialidad para ser empleados en la producción de este importante biopolímero.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Existen en la biósfera una gran cantidad de microorganismos que son esenciales en cualquier ecosistema. Sin embargo, algunos microorganismos provocan alteraciones funcionales a plantas, animales e inclusive al hombre.

Xanthomonas campestris es una bacteria fitopatógena descubierta por Pammel en 1895 en nabos enfermos y es en la actualidad un microorganismo que ha sido objeto de investigaciones en varias ramas de las ciencias, entre las que se encuentran la fitopatología y la biotecnología, que en este caso se interrelacionan con objetivos diferentes.

La fitopatología es una rama de la ciencia que estudia la naturaleza, el desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Considera los factores físicos, químicos y biológicos en un medio ambiente determinado. (National Academy of Sciences, 1981).

Aún cuando se conoce sobre la enfermedad que produce X. campestris en las crucíferas, poco se comprenden los principios de la fitopatogenicidad del microorganismo, de la interacción hospedante-patógeno así como de su control. Siendo un área en donde se amplían las interrogantes y se requiere de la intensificación de estudios para comprender las interacciones importantes y complejas en la enfermedad.

Con respecto a la biotecnología, es una rama interdisciplinaria que se enfoca a la utilización de las actividades biológicas,

microbiológicas así como bioquímicas en el marco de los procesos técnicos y de la producción industrial para la generación de bienes y servicios. Es en esta área donde se emplea al microorganismo fitopatógeno como fuente para la producción del heteropolisacárido extracelular, también conocido en el sector industrial como goma xantana.

Por sus propiedades viscosificantes la goma xantana se le ha empleado en una gran variedad de productos. En el país una de las industrias que presenta mayor demanda de la goma es la industria petrolera, en donde se emplea en la perforación y reparación de pozos petroleros.

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) en colaboración con el Instituto Mexicano del Petróleo se realizó un proyecto de investigación titulado: "Escalamiento del proceso de producción de un biopolímero" cuyos objetivos fueron el desarrollar una tecnología para la producción de la goma xantana. Poco se conocía del hábitat natural del microorganismo, de los riesgos ecológicos que implicaba su manejo e inclusive de la fuente para su obtención. De esta forma se planteó el presente trabajo el cual representa una alternativa para el aislamiento y/o obtención de nuevas cepas.

Se intentó proporcionar conocimientos de dos áreas comúnmente no afines: la fitopatología y la biotecnología, enfocadas desde el punto de vista del proyecto global. De esta manera se contribuía a la escasa información existente acerca de la función del biopolímero extracelular que produce *X. campestris* y a la obtención de cepas productoras con la metodología y criterios que esto implica.

Los principales objetivos del presente estudio se enfocaron a estudiar la relación virulencia-propiedades del polímero producido por X. campestris así como a generar conocimientos respecto a posibles criterios de selección y aislamiento de cepas que resultaran buenas productoras del polímero, cuyas propiedades en solución sean de interés para los propósitos de su uso final.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1.1 Generalidades

Las plantas cultivadas presentan con frecuencia enfermedades de gran importancia económica, según los factores ambientales que imperan en diferentes áreas ecológicas.

Aunque es difícil circunscribir la definición de enfermedad vegetal, se le ha considerado en términos generales como alteraciones funcionales y estructurales que impiden su desarrollo normal (García, 1979).

Las bacterias constituyen algunos de los principales agentes causales responsables de un número importante de enfermedades en las plantas, sin embargo en comparación con enfermedades causadas por hongos su número es reducido. No se conoce el número exacto de bacterias fitopatógenas aunque se ha propuesto que existen aproximadamente 200 especies; de las cuales entre 150 y 170 provocan un amplio rango de síntomas que son característicos pero que pueden confundirse con infecciones causadas por otros agentes fitopatógenos (Kelman, 1969).

Aunque existen bacterias fitopatógenas que son altamente selectivas en su hospedante, existen un gran número de razas que son distintivos por su habilidad de atacar una amplia variedad de plantas.

Las bacterias fitopatógenas pertenecen principalmente a cinco

géneros : Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas y Xanthomonas (figura 1). Las enfermedades que producen pueden ser agrupadas de manera general de acuerdo con los síntomas que presentan las plantas en tres tipos : pre-necróticos, como el marchitamiento; necróticos como los tizones, pudriciones , manchas foliares e hipertróficos como las hiperplasias (Jauch, 1973; Kelman, 1969; Agrios, 1979).

La pudrición negra de las crucíferas es una enfermedad producida por la bacteria fitopatógena X. campestris pv campestris, de amplia distribución mundial y económicamente importante (Griffin y Baker, 1976). Esta enfermedad se presenta en cultivos de varios miembros de las crucíferas.

2.1.2 Características generales y enfermedades de la familia de las crucíferas .

La familia de las crucíferas está integrada por las tribus de la col, coliflor, brócoli, colinabo, nabo, nabo de suecia, col China, el mastuerzo de agua y la mostaza. Esta familia se ve afectada por seis enfermedades entre las que se cuentan : la enfermedad amarilla producida por Fusarium oxysporium f.conglutinans ; la pierna negra producida por Phoma lingam; el círculo de la raíz causado por Plasmodiophora brassicae y la pudrición negra causada por X. campestris pv campestris. La mayoría de las enfermedades se caracterizan por los síntomas que presentan (Walker, 1953).

De acuerdo con el manual Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974) el género Xanthomonas incluye alrededor de 70 especies ciertas , 158 nominales y 44 dudosas. Las 70 especies han sido agrupadas en cinco:

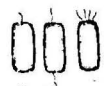



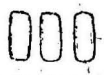


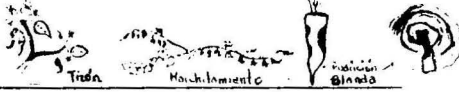

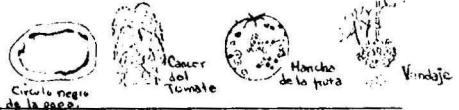
Familia	Genero	Reacción de Gram	Formas celulares	Tipos de síntomas
Pseudomonadaceae	<u>Pseudomonas</u>	-		 <p>Manchas foliares Agujero (olor) Marchitamiento del plátano Lesión</p>
	<u>Xanthomonas</u>	-		 <p>Manchas foliares Lesión Lesión Lesión</p>
Rizobiaceae	<u>Agrobacterium</u>	-		 <p>Lesión Lesión Lesión Lesión</p>
Enterobacteriaceae	<u>Erwinia</u>	-		 <p>Lesión Lesión Lesión Lesión</p>
Corineformes	<u>Corynebacterium</u>	+		 <p>Lesión Lesión Lesión Lesión</p>

Figura 1 Principales bacterias fitopatógenas y los principales síntomas que producen (Agris, 1979).

Xanthomonas campestris con 102 especies nominales, Xanthomonas fragariae, Xanthomonas ampelina, Xanthomonas albilineans y Xanthomonas axonopodis. El grupo de especies nominales de X. campestris ha sido formalmente designado como pathovar. La diferenciación de este grupo se ha basado principalmente en la especificidad vegetal y en sus efectos sobre la planta, debido a su poca diferenciación morfológica.

2.1.3 Agente causal : Xanthomonas campestris pv campestris

Características morfológicas.

X. campestris pv campestris (Pammel) Dowson (1939) es un microorganismo bacilar de 0.2-0.8 por 0.6-2.0 μ m, presenta un flagelo polar y una capa mucosa constituida por polisacáridos extracelulares. Visto al microscopio electrónico se observa como en la figura 2.

En cajas con medio de cultivo con extracto de levadura, las colonias se tipifican por sus características morfológicas manifestándose como colonias amarillo brillantes, viscosas con bordes lisos que medidos a las 48 hs. de incubación (29^o C) y son de un diámetro aproximado de 4 mm.

2.1.3.2 Características bioquímicas.

Xanthomonas campestris pv campestris es un microorganismo Gram-negativo, quimiorganótrofo. Presenta un metabolismo respiratorio en donde el oxígeno molecular es el último aceptor electrónico. Fermenta la glucosa, lactosa, galactosa y sacarosa; en un medio con amortiguadores produce ácidos a partir de los carbohidratos excepto

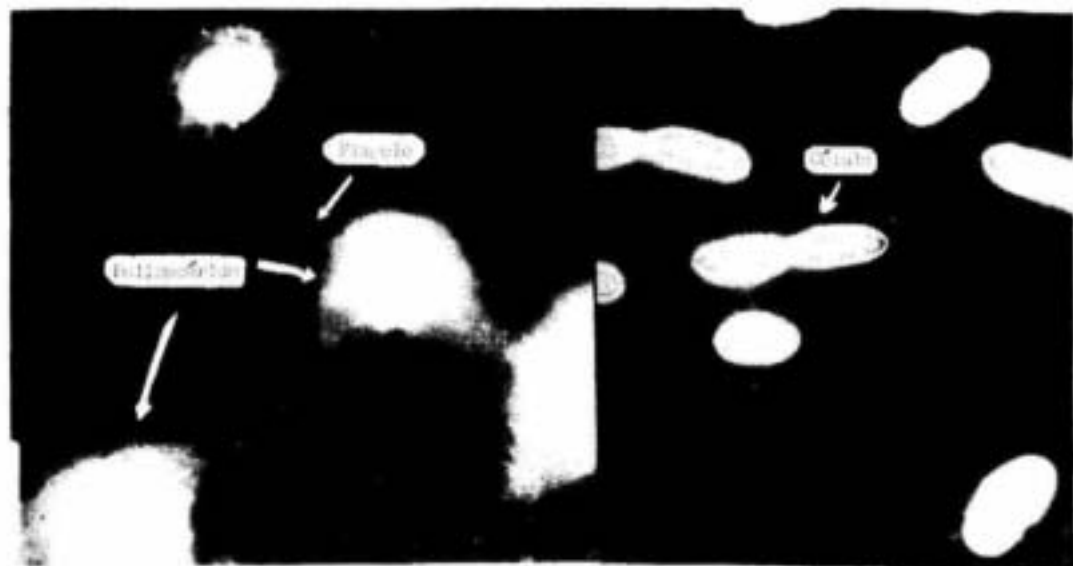


Figura 2.

Vista microscópica de Xanthomonas campestris.

de ramosa, inulina, adonitol, dulcitol, inositol o salicina y raramente de sorbitol. Utiliza el acetato, citrato, malato, propionato y succinato. Hidroliza el almidón, coagula moderadamente la leche, no reduce los nitratos, produce ácido sulfúrico a partir de la cisteína. La reacción de la ureasa es negativa, catalasa positiva y tolera el cloruro de sodio hasta 5 %.

Tiene un contenido de G + C en el DNA de 63-72 mol % , sus requerimientos nutricionales son complejos y usualmente incluyen : metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico en varias proporciones. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 30° C (Gordienko, 1940; Quintero et al., 1984; Buchanan y Gibbons 1974).

2.1.4 Naturaleza de la enfermedad.

Las epidemias de la pudrición negra han resultado del uso directo de semillas infectadas. X. campestris pv. campestris fue una de las primeras bacterias fitopatógenas que se demostró que eran transmitida a través de las semillas (Hunter 1975; Harding et al. 1904).

El microorganismo puede desarrollarse en las semillas cuando las plantas infectadas pasan a través de un estado vegetativo de latencia sin síntomas externos de la enfermedad. En el periodo reproductivo las plantas infectadas están expuestas a temperaturas frías lo que favorece el florecimiento y consecuentemente la producción de semillas. Este factor ayuda a la no expresión de los síntomas de la enfermedad y al mismo tiempo a presentarse una invasión sistémica en el sistema vascular de ramas, pedicelos y vainas (Cook et al., 1952).

La invasión sistémica del microorganismo en las vainas de las plantas se realiza a través del tallo y penetra hasta ubicarse en la membrana falsa de la semilla y posteriormente hasta el sistema vascular a través del funículo (figura 3). La bacteria causa cavidades lisogénicas en el xilema del tejido vascular de las paredes de la semilla en la vaina (figura 3 a), posteriormente la bacteria avanza dentro del tejido vascular hacia la unión del funículo y la vena rafe así como a muchas regiones del tejido parenquimatoso asociado (figura 3 b) e invade completamente todo el xilema funicular (figura 3 d). Frecuentemente se ha observado que la unión del xilema y el funículo pueden ser destruidos totalmente (figura 3 e).

El fitopatógeno puede quedar en el xilema del funículo que posteriormente llega a convertirse en la cubierta de la semilla en su madurez (figura 3 e).

Como consecuencia de la invasión bacteriana en las vainas inmaduras se puede producir la expulsión de las semillas, produciéndose semillas infestadas y germinables en aquellas vainas que llegan a su maduración (Cook *et al.*, 1952).

Las semillas infectadas son capaces de germinar en la siguiente estación o bien la bacteria puede conservar su viabilidad por cerca de tres años. Se ha reportado que la viabilidad del microorganismo puede decrecer con el grado de madurez de la semilla (Kliciewicz y Found, 1961).

Recientemente se ha destacado la importancia de aerosoles naturales como fuentes primarios de inóculos en campos con crucíferas infectadas (Linderman *et al.*, 1982). La dispersión aérea de la

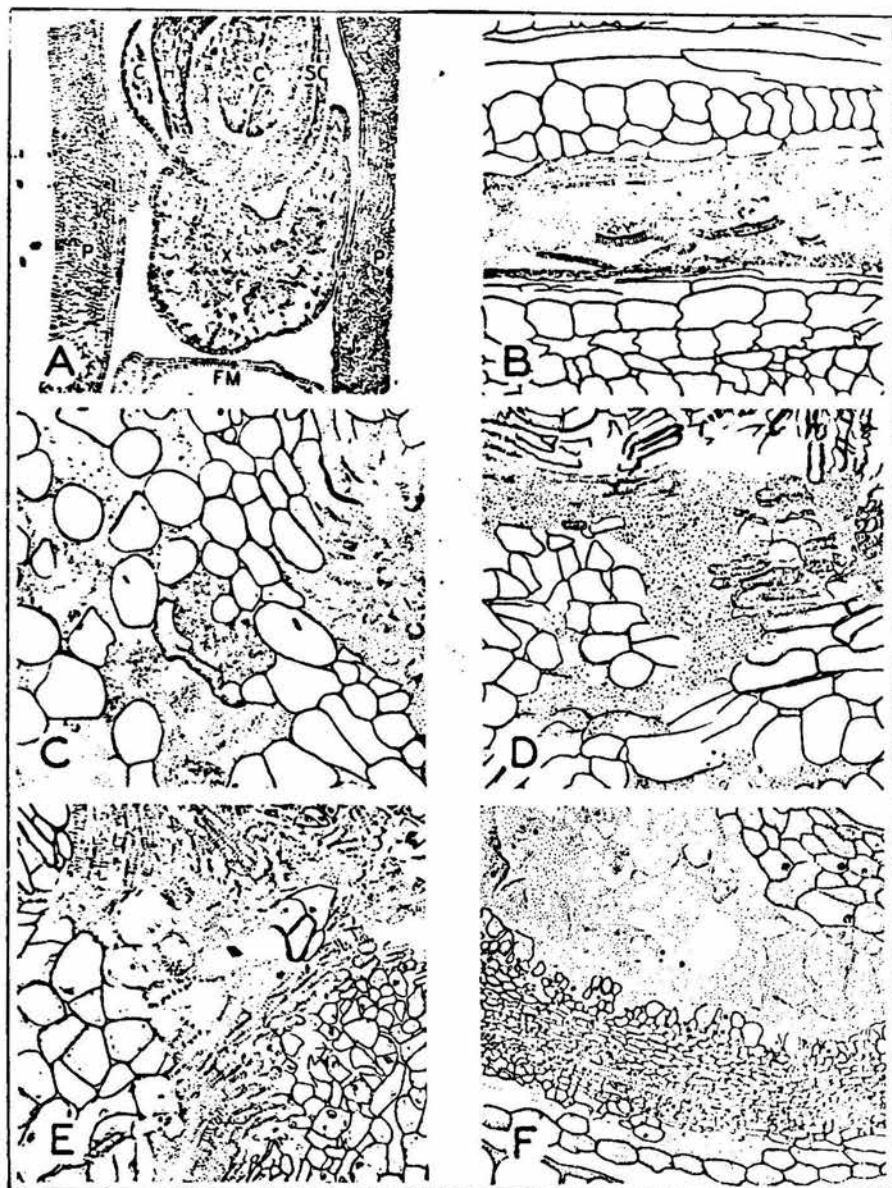


Figura 3.

Corte longitudinal de vainas de semillas de col. A: C-cotiledon, F-funiculo, FM-membrana basal, H-hipocotilo, P-vaina, SC-cubierta de la semilla, X-xilema del funiculo. Apr. 94x. B: paquete vascular de la pared de la vaina en donde la bacteria ha dañado el xilema, las zonas oscuras son acumulaciones de bacteria muerta, 185x. C: mesófilo invadido por la bacteria 400x. D: curvatura del funiculo con xilema destruido por la bacteria. E: funiculo con tejido destruido 400x. F: porción de semilla irmadura, con extensión del xilema en la cubierta de la semilla 185x. (Cook *et al.*, 1952).

bacteria se realiza principalmente por las gotas de lluvias, partículas de aire y viento . Las partículas aerosoles son epidemiológicamente significativas por que pueden recorrer distancias más amplias que las salpicaduras (Xuan et al., 1986).

2.1.5 Medios de infección.

La infección en las plantas de las crucíferas se realiza principalmente en las hojas por medio de los hidátodos (Smith, 1987). Clayton (1925) reportó que la penetración de la bacteria podía presentarse a través de los estomas .

Ambas estructuras, estomas e hidátodos estan involucrados en la evapotranspiración del agua en la planta, aunque su funcionalidad y ubicación son distintas (Cook et al., 1952a).

Para que la infección se realice por los estomas se necesita que se presente una congestión de agua en las cámaras subestomales para que la penetración del fitopatógeno se llegue a realizar y se confine a los espacios intercelulares del mesófilo esponjoso . Sin embargo, este fenómeno pocas veces ocurre en la naturaleza, por lo que se ha establecido que las principales entradas son los hidátodos (Cook et al., 1952 a).

El mecanismo de entrada se realiza debido a que en los espacios intercelulares del epitelio se presenta una exudación de agua (también conocida como agua de glutación) hacia los hidátodos . El agua exudada se contamina con el fitopatógeno y es absorbida por acción capilar hacia el interior de la planta . El microorganismo suspendido en el interior de la planta se ubica en la vecindad del tejido vascular y se multiplica hasta inducir la formación de la

lesión (Cook et al, 1952a).

2.1.6. Caracterización de los síntomas.

Debido a que la infección bacteriana acontece frecuentemente a través de los hidátodos, los primeros signos de la enfermedad suelen presentarse en los márgenes de las hojas.

Usualmente el tejido se vuelve amarillo y presenta clorosis que progresa hacia la nervadura central de la hoja. Las lesiones cloróticas llegan a ser característicamente en forma de V (ver foto 5, capítulo 5).

Las venas y venillas cloróticas, así como los vasos de las grandes venas se vuelven de un color negro con el avance de la lesión. La nervadura central llega a ser afectada y se vuelve café, deshidratándose y consecuentemente se hace quebradiza (Cook et al, 1952 a; Walker, 1967; Sutton y Williams, 1970).

Los síntomas de la enfermedad progresan hacia todas las hojas, el tallo y la raíz debido a la invasión sistémica del patógeno. Cuando se presenta la infección en los primeros estadios de maduración de la planta se produce defoliación prematura.

Subsecuentemente a la infección producida por *X. campestris* pv *campestris* se presenta en las áreas infectadas una invasión con la bacteria responsable de la pudrición blanda, la cual destruye el tejido y ocasiona un mal olor (Agrios, 1978; Walker, 1967).

2.1.6. Desarrollo de la enfermedad

De acuerdo con los síntomas característicos que presentan las

hojas de col, Smith (1911) y Roth (1961) establecieron que los daños en el tejido vascular son producidos por el bloqueo del transporte de agua.

Sutton y Williams (1970) afirman que el déficit del agua es producido por el crecimiento bacteriano. Ambos examinaron la extensión de la lesión en el tejido vascular de la col. Empezaron en su estudio dos aislamientos de *X. campestris* pv *campestris*: B-87 S1 y B87- S2, B87- S1 mostró una reducida multiplicación dentro del tejido vascular y poca producción de mucilago (figura 4e). En B87- S2 observaron que el microorganismo avanzó hacia el tejido conductor del xilema en donde se acumuló y bloqueó los vasos conductores de agua (figura 4b). A medida que el material de obstrucción se acumulaba, el parenquima del xilema se iba separando (figura 4c), posteriormente el fitopatógeno causó cavidades lisogénicas en el mesófilo (figura 4f). Cuando el xilema se llena con la masa bacteriana, en la pared vascular se rompen las microfibrillas de celulosa. Con el avance de la lesión se van incorporando sustancias pécticas en el material de obstrucción de los vasos xilemáticos.

Estos hechos indicaron que el rompimiento de los vasos del xilema, el crecimiento poblacional y la acumulación del mucilago o polisacárido extracelular que produce la bacteria son factores que conducen al atrofiamiento vascular y por lo tanto al déficit del agua en el tejido intercelular de las hojas.

2.1.8. Medios de dispersión.

Debido a que *X. campestris* pv *campestris* es una bacteria no formadora de esporas requiere de condiciones especiales como medio de

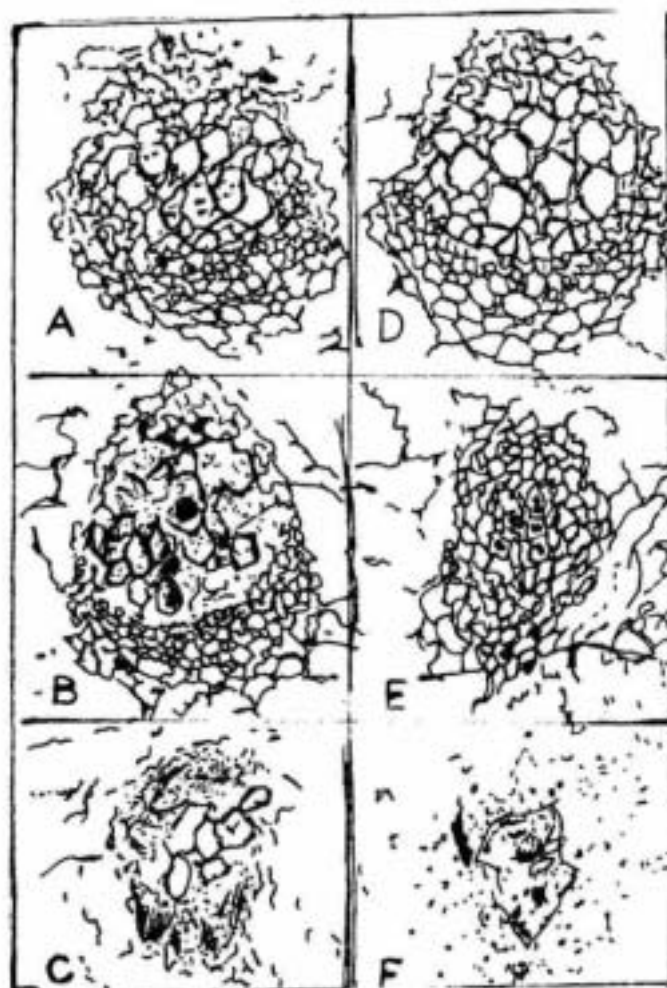


Figura 4. Cortes transversales de la vena central de hojas de oca infectadas con *X. campestris* aislamientos B87-S1 y B87-S2. A-C infección con B87-S2 mostrando: A- xilema invadido; B- xilema bloqueado; C- vena ennegrecida; D- tejido xilemático normal. E- infección con B87-S1. F- melaninas teñidas en la vena ennegrecida, infectada con B87-S2 (Sutton y Williams, 1970).

dispersión local. Las lluvias impulsadas por el viento favorecen la dispersión. En regiones donde la precipitación pluvial es baja o escasa las plántulas en crecimiento no presentan ningún síntoma de la enfermedad (Walker, 1967; Kuan et al., 1986). Los insectos masticadores juegan un importante papel en la transmisión de la bacteria, debido a que dispersan al patógeno y ocasionan heridas a través de las cuales pueden ocurrir las infecciones.

La dispersión local de una planta a otra se puede realizar por los implementos de trabajo que utiliza el labrador durante el manejo del cultivo. Se ha considerado a las hojas defoliadas y enfermas como un medio de dispersión local ya que contienen al fitopatógeno y se encuentran en el suelo (Walker, 1967). En el suelo el microorganismo puede sobrevivir 14 días en primavera y hasta 42 en invierno. Cuando el tejido de la hoja protege al microorganismo este puede sobrevivir hasta 244 días e inclusive un año después de la defoliación. En los países sin ninguna rotación se incrementan los niveles del inóculo y se considera que puede ser la causa principal de la enfermedad (Schaad y White, 1974).

La dispersión aérea con aerosoles naturales es un factor que contribuye a la diseminación del inóculo.

Debido a que las epidemias han resultado del uso directo de semillas infestadas, esta distribución se le ha considerado como un medio de dispersión mundial (Walker, 1967).

2.1.9 Resistencia a la pudrición negra

Poco se conoce acerca de la resistencia de las crucíferas a la enfermedad. Sin embargo, se ha atribuido la resistencia hereditaria

de las plantas a principios genéticos. Bain (1955) atribuye la resistencia selectiva a la pudrición negra en las plantas a una herencia mendeliana, la cual es regulada por factores genéticos dominantes.

Sharwa *et al.*, en 1977 sugieren que la resistencia se confiere a través de mutaciones sufridas durante la larga historia de cultivos en crucíferas

Las plantas de col resistentes se han caracterizado por la ausencia de los síntomas y por una restringida multiplicación bacteriana. En estos genotipos se han involucrado a los hidátodos, venas y al parénquima intercostal como posibles sitios de resistencia (Staub y Williams, 1972).

De acuerdo con resultados experimentales se ha concluido que la resistencia de la col a la pudrición negra está incluida en el gen *f*. Dicho gen restringe la multiplicación bacteriana en el xilema y en los vasos terminales de los hidátodos, debido a que induce cambios en el metabolismo aromático de la planta (Staub y Williams, 1972). Namasivayam *et al.* (1971), mostraron que en cultivos de plantas resistentes se incrementan los fenoles, en forma de orthodihidroxifenol.

2.1.10 Métodos de detección.

En vista de la fitopatogenicidad de la bacteria y los daños severos que causan en los cultivos se han desarrollado métodos para su detección temprana, los principales métodos para la detección del microorganismo se han desarrollado para el suelo y semillas.

En suelos cultivados, se incluyen cultivos de suspensiones de suelo en medios selectivos de almidón (Shaad y White, 1974). Este método presenta varias limitaciones debido a que otras bacterias Gram-negativas pueden crecer en el medio.

Domen y Álvarez (1978) proponen el método de inmunofluorescencia como un método cuantitativo que puede detectar niveles hasta de 10 células por gramo de suelo.

En las semillas, los métodos de detección que se han desarrollado implican la germinación de la semilla y la observación de los primeros síntomas de la enfermedad (Shackleton, 1962; Srinivasan *et al.*, 1971). Este método presenta la principal desventaja de que el patógeno no puede ser detectado en semillas no germinadas y se requiere del factor tiempo para observar si las semillas se encuentran infectadas.

Shaad y Donalson (1980) desarrollaron técnicas combinadas tales como el uso de placas de muestras líquidas sobre un medio de agar y tinción por inmunofluorescencia del microorganismo.

Se ha propuesto además el uso de la inmunofluorescencia indirecta como una técnica de detección rápida del fitopatógeno (Shaad, 1978).

2.1.11. Formas de control

El control de X. campestris *pv* campestris ha representado un problema de difícil solución. Se han desarrollado varias técnicas

para su temprana detección, pero no métodos para su completa erradicación en las semillas.

Entre los métodos que pretenden la erradicación en semillas se encuentran: la desinfección con tratamientos de agua caliente (Clayton, 1925), la inmersión de las semillas en soluciones acuosas de antibióticos (Kliciewicz y Pound, 1961), el uso de acetato de cobre acidificado y calentado (Shaad y Mulanav, 1980), el uso de hipoclorito de sodio combinado con presiones reducidas (Humaydan *et al*, 1980). De los métodos antes mencionados el uso del hipoclorito de sodio es el que ha representado la mayor eficacia para erradicar al microorganismo sin dañar a la semilla, ni reducir el vigor de ésta e inclusive no es fitotóxico. (Humaydan, 1980).

2.2.1. Características estructurales del polímero extracelular que produce *X. campestris* pv *campestris*.

El mucilago que produce *X. campestris* pv *campestris* se ha reconocido como un heteropolisacárido extracelular, polianiónico y de alto peso molecular (Cottrell y Kang, 1978; Kelco, 1981).

La estructura del polisacárido que ha sido propuesta recientemente es la de Jansson *et al* (1975), la cual consta de un polímero ramificado con cinco unidades monoméricas repetidas, dos unidades de β -D glucosa, dos de D-manosa y una unidad de β -D-ácido glucorónico, cuya relación molar es 2.8:3:2, con ácido piruvico y residuos O-acetálicos en diferentes proporciones.

La cadena principal está formada por monómeros de β -D-glucosa unidos con enlaces glicosídicos $\beta(1,4)$. La cadena lateral ramificada está integrada por el monosacárido D-manosa unido a la glucosa con enlace glicosídico (1,3), la cual está unida con el β -D ácido glucurónico por el enlace $\beta(1,2)$. El ácido glucurónico a su vez está unido con la β -D manosa terminal por el enlace $\beta(1,4)$. La cadena lateral está unida al tercer carbón de la glucosa en forma alternada en la cadena principal.

En la D-manosa inicial de la cadena ramificada se encuentra unida en la posición del sexto carbono un grupo acetilo. La mitad de los residuos terminales de la β -D-manosa se encuentra unido catáliticamente a un residuo de ácido pirúvico en el cuarto y sexto carbono de la manosa, (figura 5).

La manera en que está conformado el polímero ha sido el motivo más importante de su resistencia enzimática y de sus propiedades físicas, químicas y reológicas (Kelco,1981).

2.2.2. Función biológica del polímero extracelular.

Los polisacáridos extracelulares desempeñan funciones importantes para las células microbianas, así como en la interacción de los microorganismos con su alrededor (Powell, 1979). Como funciones naturales para las células se ha reportado que sirven como barreras de protección contra condiciones ambientales desfavorables.

Permiten a los microorganismos mantener un mínimo de humedad en su microambiente. Funcionan como una barrera física contra

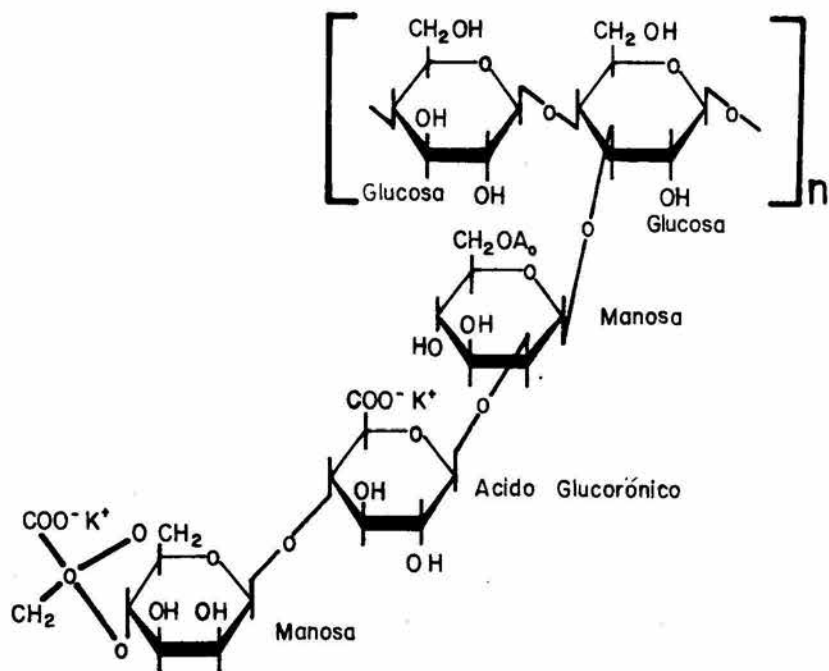


Figura 5.

Unidad estructural de la goma xantana

bacteriofagos y proporcionan protección parcial contra fagocitosis y ataques amebianos (Wilkinson, 1958).

Existen numerosos microorganismos que producen polisacáridos extracelulares (Kang y Cottrel, 1979); incluyendo un gran número de bacterias fitopatógenas (Husain y Kelman, 1958; Gorin y Spencer, 1961).

La especificidad del fitopatógeno en sistemas interactuantes sugiere que el polímero está relacionado con el sistema de reconocimiento en la relación hospedante-patógeno (Strobel, 1977; Albersheim y Anderson Prouti, 1975).

Sutton y Williams (1970a) demostraron que el polisacárido extracelular que produce *X. campestris* pv *campestris* en un medio de cultivo es el mismo que produce en el tejido vascular de la planta infectada.

Morris *et al.*, en 1977 establecieron que el polisacárido extracelular de *X. campestris* pv *campestris* puede tener un poder de reconocimiento molecular, que puede acoplarse al sitio en el que la bacteria se pueda establecer dentro del hospedante. Este reconocimiento puede estar determinado por la composición del exopolisacárido de la pared bacteriana y de un área particular de las células de la planta.

En sistemas biológicos, los polisacáridos frecuentemente existen en uniones heterogéneas, en formas ordenadas o semiordenadas, como en las plantas y paredes bacterianas (Bea *et al.* 1972).

Demostraciones recientes sugieren que el polisacárido

extracelular puede interactuar específicamente con otras cadenas biológicas importantes de polisacáridos (Morris et al., 1977b; Dea et al., 1977). Bajo condiciones fisiológicas, el polímero extracelular o goma xantana muestra evidencias de interacción intermolecular con la galactomanana. Estas interacciones sugieren que pueden ocurrir en diferentes grados con otras galactomananas de las plantas, las cuales presentan uniones β 1-4 (Dea y Morrison, 1975; Morris, et al., 1977b; Rees, 1977; Dea et al., 1977).

Estudios de rotación óptica y difracción de rayos X del proceso de interacción galactomanana-xantana, muestran que los geles que se forman de la interacción, presentan una conformación nativa ordenada. Además, la adición de la galactomanana a soluciones de goma xantana provocan un incremento en la viscosidad inicial del gel.

La interacción galactomanana-xantana involucra la asociación de las regiones no substituidas de las mananas en la galactomanana con la forma ordenada de la xantana (figura 6) (Dea et al., 1977; Dea y Morris, 1977; Morris et al., 1977).

Se ha sugerido que el significado biológico de estas interacciones está relacionado por los daños provocados por X. campestris pv campestris en el tejido de las hojas de las crucíferas, las cuales presentan una pared celular constituida de celulosa y galactoglucomananas, además de contener elementos fibrilares embebidos en una matriz amorfa o de hemicelulosa que puede incluir ciertos elementos de forma ordenada así como sustancias pécticas (Bacon, 1979). De esta forma la xantana puede presentar interacción con éstos polímeros (Dea et al., 1977).

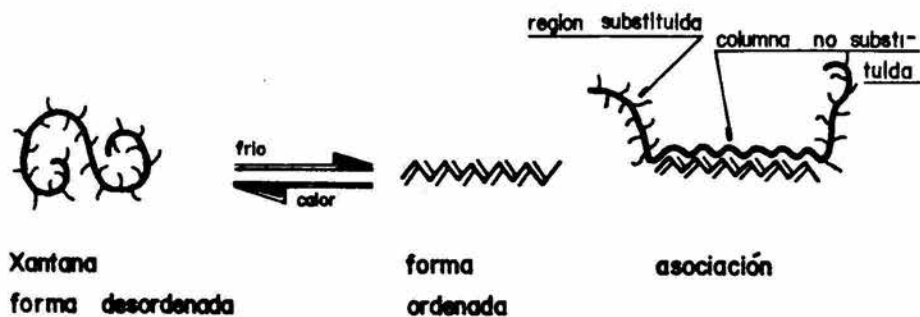


Figura 6.

Representación esquemática de la interacción xantana con la galactomanana. La estequiometría de la interacción no ha sido aún caracterizada (Morris *et al*, 1977).

La interacción sinérgica de xantana-galactomanana es un representación de la interacción natural que puede presentarse en la relación huésped-patógeno.

2.2.3. Producción de la goma xantana por fermentación.

La goma xantana es un polisacárido que se produce durante la fermentación de un carbohidrato. La fermentación para la producción del polisacárido microbiano se lleva a cabo generalmente por cultivo en lotes, en tanques equipados con suministro de aire estéril, agitación mecánica, control de temperatura, control y/o al menos medición de pH (Galindo, 1985).

Los requerimientos nutricionales mínimos para el crecimiento de X. campestris y producción de la goma xantana son: fuentes apropiadas de carbono como glucosa, sacarosa, almidón ó inclusive suero ácido de leche; fuente de nitrógeno como el sulfato de amonio, nitrato de amonio, vinazas (solubles de destilería), urea ó harina de semillas de algodón; amortiguador de fosfatos y cantidades trazas de ciertos minerales (Starr, 1946).

Durante el crecimiento de la bacteria en el fermentador se producen cambios en la reología del caldo de fermentación, resultado de la producción y excreción del polímero. Este cambio en la reología del sistema es de gran importancia ya que afecta a parámetros críticos de la fermentación: la transferencia de masa, la de calor, las características de mezclado y los requerimientos de potencia de agitación, los cuales a su vez se pueden volver críticos al tratar de

escalar el sistema (Galindo, 1985).

2.2.4. Usos industriales.

El heteropolisacárido o goma xantana es uno de los polímeros de origen microbiano que ha sido comercializado a escala industrial.

Su importancia técnica reside principalmente debido a las siguientes propiedades: presenta una gran capacidad viscosificante aun a bajas concentraciones, produce soluciones con propiedades de flujo altamente pseudoplástico, es decir disminuye la viscosidad con un incremento en la rapidez de deformación; las soluciones viscosas de goma xantana presentan elevada estabilidad a la temperatura, pH y concentración de sales ; es compatible con una gran cantidad de sales ; presenta efectos sinérgicos en la viscosidad y fuerza de gel cuando se combina con otros polímeros (Kelco, 1981).

La goma xantana se ha empleado en un gran número de aplicaciones industriales. En la industria textil para prevenir el corrimiento de los colorantes en las telas, en la cerámica para suspender los componentes de barnices; en limpiadores como aditivo para prolongar el tiempo de contacto , en explosivos en forma de lodo como una base, como aditivo en adhesivos, en productos agroindustriales se emplea como agente suspendedor de alimentos líquidos balanceados. En el área farmacéutica se utiliza como agente suspendedor de medicamentos y agente texturizante de cosméticos (Galindo, 1985).

En el país los sectores industriales que mayor demandan el producto son la industria petrolera y la industria alimenticia. Las principales aplicaciones de la goma xantana en el sector alimenticio

son: como aditivo en pastelerías, alimentos enlatados, bebidas, alimentos congelados, jugos de frutas, aderezos, sazónadores, salsas y gravies, mayonesas y jarabes. En este sector la goma xantana tiene especial aplicación porque imparte a los productos elaborados mejor calidad en su sabor, consistencia, olor, gusto al paladar así como mejoras en su proceso de elaboración (Cotrell y Kang, 1978).

En la industria del petróleo se emplea como componente de los lodos de perforación y reparación de pozos petroleros así como en la recuperación secundaria del petróleo (Sandvick y Maerker, 1977). El fluido de perforación se usa durante las operaciones de perforación y tiene como principales objetivos extraer los recortes, lubricar la barrena, prevenir derrumbes y filtraciones durante la perforación y mantener la columna hidrostática. El fluido de reparación es el fluido que se emplea para reparar un pozo, cuando la producción de este ha disminuido. Tiene como principal fin la extracción de recortes o herramientas de un pozo obstruido.

La recuperación secundaria de petróleo consiste en extraer el hidrocarburo de yacimientos que no tienen la presión suficiente como para emerger a la superficie. Esto se obtiene mediante la inyección de fluidos que empujen al aceite a fluir (Galindo, 1985). Este es otro uso que posiblemente tenga gran potencial en el futuro.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron:

- Establecer la posible relación entre el grado de fitopatogenicidad de mutantes de Z. campestris vs campestris, con las propiedades del polímero que produce.

- Establecer posibles criterios para aislar, seleccionar y/o obtener cepas, cuya capacidad para producir polímero sea apropiada en términos de su uso final.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS

Los reactivos, el material así como los medios de cultivos empleados en el desarrollo del presente trabajo se presentan en el Anexo I.

4.1.1 Estrategia experimental. Para cumplir los objetivos se desarrolló la estrategia experimental expuesta en la figura 7. Inicialmente se realizó una revisión bibliográfica retrospectiva que comprendió los años de 1950 a 1984 a través del Centro de Información Científica y Humanística (CICH) así como del Biological Abstract. En esta revisión se manifestó lo poco estudiado del área fitopatológica tanto experimentalmente como en conocimientos básicos.

Con respecto a la parte experimental se inició trabajando con dos cepas, una de la colección de la Northern Regional Research Laboratories USA, X. campestris pv. campestris NRRLB-1459 (liofilizada) y una cepa silvestre X. campestris pv campestris (aislamiento de una planta de col (obtenida por el Dr. Fucickovsky). La cepa de colección se mutagenizó químicamente con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Las mutantes sobrevivientes se cultivaron en: medio de extracto de levadura y malta (YM), en cajas con medio YM +cloruro de tetrazolium y en un medio rico con sacarosa (medio de levadura) como medios de diferenciación de las mutantes. Se seleccionaron ocho mutantes con diferencias morfológicas relevantes y se conservaron. A cada mutante se le realizaron pruebas de virulencia, determinándoles el área de la lesión que ocasionaron.

Paralelamente se efectuaron fermentaciones en matraces Fernbach de cada mutante para determinar las propiedades de los polímeros. La goma se recupero del caldo de fermentación por precipitación con alcohol etílico, las fibras obtenidas se secaron y molieron. Al producto en polvo se le determinó la concentración final (g/l), los radicales acetilo y piruvico y se le realizó espectroscopia en el infrarrojo.

Los resultados permitieron el análisis de la relación entre la virulencia de las mutantes y las características del polímero producido por cada una de ellas. Así mismo se desarrollaron criterios potenciales para la selección de cepas de X. campestris.

--- Revisión Bibliográfica

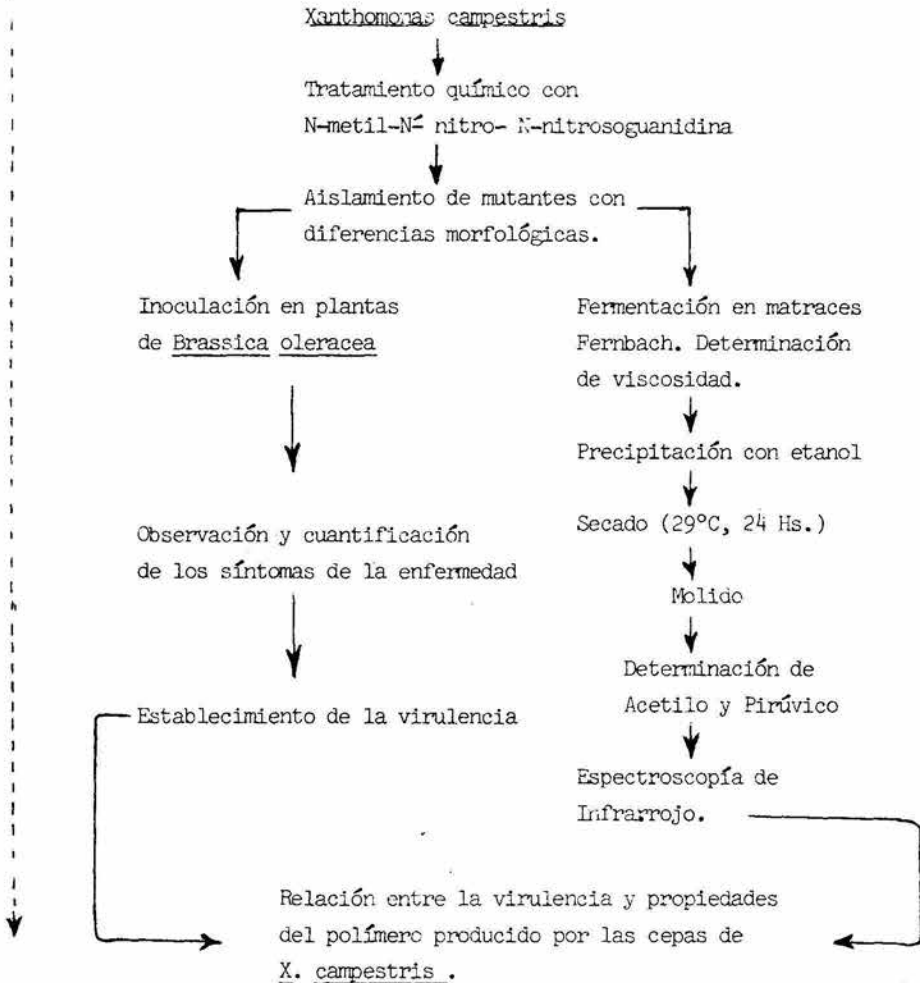


Figura 7.

Estrategia experimental desarrollada.

4.1.2. Cepas

Los microorganismos que se emplearon durante el desarrollo experimental y con las cuales se inició el estudio, fueron: Xanthomonas campestris pv campestris NRRL-B1459 (Cepa de colección de la Northern Regional Research laboratories U.S.A, en lo sucesivo se le denominara X.campestris 1459).

Xanthomonas campestris pv campestris (cepa aislada de una planta de col, se denotará X. campestris pv campestris).

A partir de las anteriores se obtuvieron en el laboratorio las siguientes mutantes cuya denotación fué arbitraria y con las cuales se complementó el estudio:

Xanthomonas campestris 17 NS3

Xanthomonas campestris NY 12

Xanthomonas campestris 18 NT5

Xanthomonas campestris 17 NT4

Xanthomonas campestris 17 NS1

Xanthomonas campestris N6

Xanthomonas campestris 17 N

Xanthomonas campestris 18 N

Las cepas fueron conservadas en tubos inclinados con medio YM en agar suave (8 g/l) y en liofilizados.

4.2 Métodos

4.2.1. Técnicas analíticas.

4.2.1.1. Mutación con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

(Miller, 1972; modificado para el presente trabajo)

Fundamento:

El N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) es un mutágeno químico muy potente. Aunque su mecanismo exacto no es aún claro, se sabe que produce sustituciones primarias y metilaciones en las bases púricas y pirimídicas, principalmente en los puntos de replicación. Produce pequeñas deleciones y puede provocar 50 cambios en las bases a una distancia de 2 min. en el cromosoma.

Curva de muerte.

Del medio en donde se conserva la cepa de X. campestris que no tenga más de tres o cuatro días de haber sido transferida, se toma una azada de la zona más densa y amarilla, se transfiere a un cultivo líquido estéril de medio YM (7 ml) y en un tubo de ensaye se incuba por 24 hs a 29°C con aproximadamente 200 rpm de agitación rotatoria y 45° sobre la horizontal.

Se requiere preparar el siguiente material :

Amortiguador de Citrato estéril (0.1 M de Citrato de sodio, pH 5.5).

Amortiguador de fosfato estéril (0.1 M de fosfato de potasio,

pH 7.0.

NG .

Tubos de vidrio pequeños estériles.

Cajas de Petri con medio YM.

Pipetas de 1 y 10 ml y puntas estériles para micropipetas.

Medio líquido de YM estéril.

Para conocer las condiciones bajo las cuales se manipula la mutación es necesario realizar la curva de muerte. Para realizarla existen dos opciones : a) emplear concentraciones constantes de NG a diferentes tiempos de exposición y b) mantener tiempos de exposición constantes con diferentes concentraciones de NG.

Con la alternativa (a) se ahorran cantidades apreciables de NG, siendo ésta la opción con la cual se trabajó.

Procedimiento:

1. En primera instancia se prepara una solución de 1 mg/ml de NG en amortiguador de citrato, se toman todas las precauciones al pesar y manejar el mutágeno (usar guante y nunca pipetear directamente la solución de NG), se procura que al trabajar con el mutágeno sea de una solución fresca no mayor de 24 hr de preparada.

2. El cultivo de *X. campestris* crecido en los tubos con medio YM líquido , se centrifuga para decantar el medio (3 000 rpm durante 30 min)

Las células se lavan posteriormente con el buffer de citrato por dos veces consecutivas; es decir: resuspensión en 5 ml de amortiguador, agitación en vortex, centrifugación a 3 000 rpm por 30 min decantar y volver a resuspender en 5 ml repitiendo el ciclo de centrifugación.

4. Se resuspende el paquete celular en 5 ml de amortiguador de citrato.

5. Se prepara el baño de incubación a 29°C .

6. En un tubo con suspensión celular se le agrega 250 µl de la solución de NG; este es el tiempo cero; se incuba .

7. A diferentes tiempos: 10, 20, 30, 45, 60, y 90 min. se agregan 250 µl de la solución de NG en cada tubo con la suspensión celular y se incuba.

8. Al término de la incubación se centrifuga la suspensión celular y se lava el paquete celular en 5 ml de amortiguador de fosfato.

9. Se repite la centrifugación y finalmente se resuspende el paquete celular en 5 ml de buffer de fosfato.

10. Se realizan las siguientes diluciones para sembrar en cajas con medio YM: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para los 5, 10, 20, 30 min. y de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para los 45, 60 y 90 min.

11. Se incuban las cajas a 29°C por 48 hs.

12. Posteriormente se construye una gráfica del porcentaje de muerte vs. tiempo de exposición con el mutágeno (figura 8).

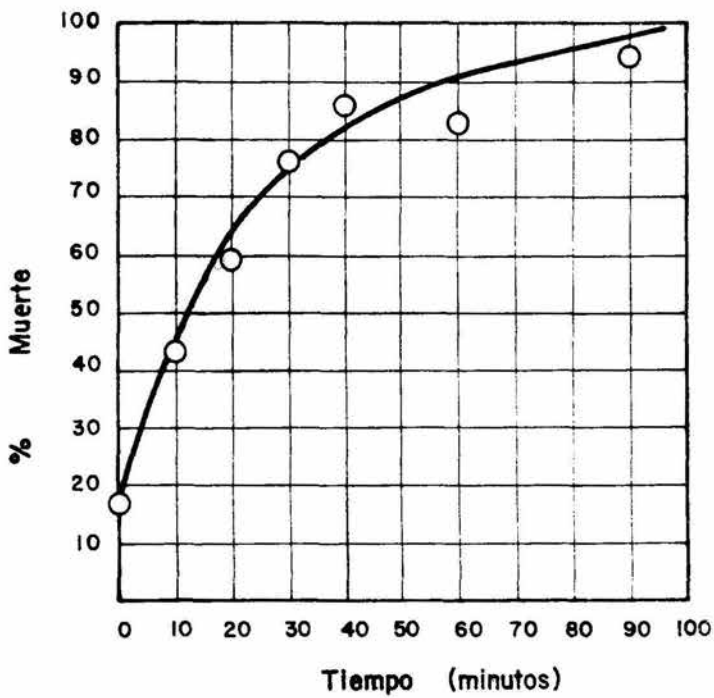


Figura 8 .

Curva de muerte de *Xanthomonas campestris* tratada con N- metil- N'- nitro- N- nitrosoguanidina.

Aislamiento de mutantes , procedimiento.

Para la obtención de colonias mutadas, se repiten los pasos 1 al 6 descritos en la página 79 para la determinación de la curva de muerte.

7. De acuerdo con el tiempo de exposición que se obtuvo para la mutación, cada tubo se incubó con 250 μ l de NG, durante 30 min.

8. Se centrifugan y se resuspenden las células en 5 ml de amortiguador de fosfato (se repite dos veces consecutivas).

9. De la suspensión celular se inoculan tubos con medio YM líquido (7 ml), se incuban por 24 hs a 29°C y a 200 rpm.

10. Posteriormente se realizan diluciones, se siembran en cajas con medio YM y en cajas con medio YM + cloruro de tetrazolium; se incuban a 29°C por 48 hrs.

11. Cuando las colonias hayan crecido se observan, se aíslan y se procede a su mantenimiento.

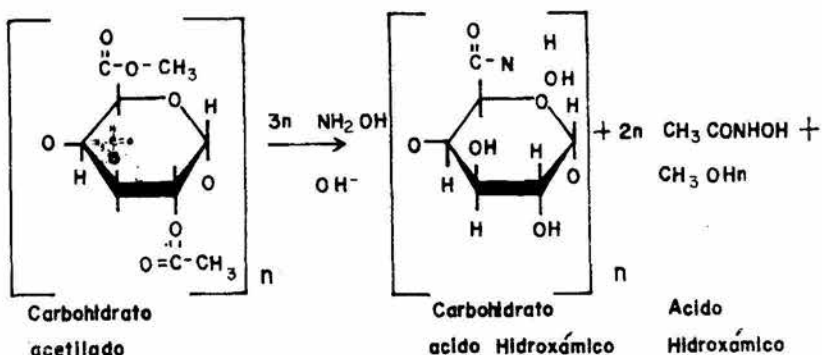
4.2.1.2 Determinación de radicales acetilos.

Reacción ácida hidroxámica.

(Mc Comb y Mc Cready, 1957).

Fundamento:

Esta técnica se basa fundamentalmente en la determinación colorimétrica del ácido acetohidroxámico que se forma por las siguientes reacciones:



El grupo ester del carbohidrato con la hidroxilamina alcalina a temperaturas bajas produce ácido hidroxámico. El carbohidrato ácido hidroxámico forma con los iones férricos un complejo insoluble. Cuando el ácido acetohidroxámico se produce por los grupos acetilos secundarios se forma un complejo rosa soluble que se detecta colorimétricamente. Esta técnica es aplicable en general a polímeros acetilados.

Reactivos

1. Solución de NaOH (9.4 g en 100 ml)
2. Solución de clorhidrato de hidroxilamina (3.75g en 100 ml. de agua)
3. Solución stock de perclorato férrico : 1.93 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de HCl concentrado, agregar 5 ml de ácido perclórico (70%). Calentar y evaporar la solución casi a sequedad . Llevar a un volumen de 100 ml. con agua para utilizarla como solución stock (la solución es estable en refrigeración por un mes).
4. Solución de perclorato férrico. Agregar 8.3 ml de ácido perclórico (70%) a 60 ml de la solución stock . Enfriar con hielo y llevar a 500 ml con metanol absoluto (solución estable por una semana a temperatura ambiente).
5. Solución ácida de metanol. Enfriar 35.2 ml de ácido perclórico y llevar a 500 ml con metanol absoluto frío.
6. Solución patrón de pentacetato de glucosa . Pesár 108.9 g de pentacetato de glucosa, disolverla calentando suavemente en 5 ml de alcohol etílico y llevar a 100 ml con agua. Tomar 2, 4, 5 y 7 ml de esta solución, aforando a 50 ml con agua. Alícuotas de 5 ml de estas soluciones representan 120, 240, 300 y 420 μg de acetilo. Preparar un blanco utilizando agua (5 ml) en lugar de la solución patrón. Se elabora una curva patrón de calibración para la determinación de grupos acetilos en el polímero (figura 9).

Determinación.

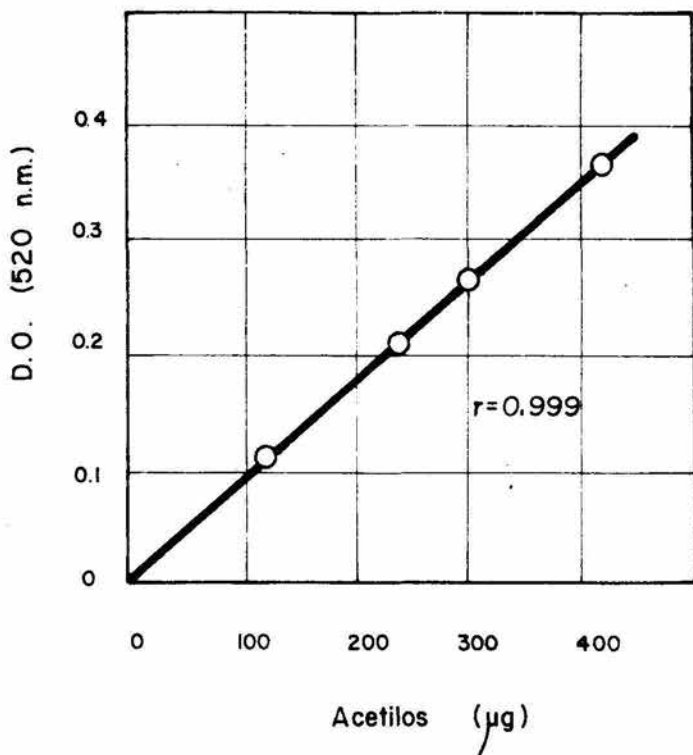


Figura 9 .

Curva patrón para la determinación de grupos acetilos en el polímero.

a) Se pesan 130 mg de cada muestra y se disuelven en 25 ml de solución de hidroxilamina.

b) Se agregan a la solución 25 ml de hidróxido de sodio hasta la completa disolución del polímero.

c) De esta solución se toman 2 ml y se le adicionan 5 ml de agua y 5 ml de solución ácida de metanol. Se lleva a un volumen de 25 ml con solución de perclorato férrico (13 ml aproximadamente). El perclorato férrico se adiciona lentamente y con agitación por lo que se requiere de una bureta que regule las gotas.

d) Se lee en el espectrofotómetro a 520 nm.

Los resultados de acetilos obtenidos en ug se expresan en porcentaje:

$$\text{Acetilo (\%)} = (X \mu\text{g}/2 \text{ ml})(50 \text{ ml})(10 \text{ mg}/\mu\text{g})(100/130\text{mg})$$

2 ml - solución para la determinación.

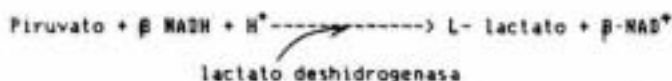
50 ml = 25 hidroxilamina + 25 ml de hidroxido de sodio

130 mg = cantidad de muestra

4.2.1.3. Contenido de ácido pirúvico

(Nadivassiliou et al, 1968).

La determinación de ácido pirúvico se realiza enzimáticamente con la enzima lactato deshidrogenasa, que produce la siguiente reacción:



En donde la cuantificación de L-lactato se realiza por el decremento en la absorbancia a 340 nm por el βNAD^+ formado.

Preparación de reactivos.

- a) Solución 1 M de carbonato de sodio
- b) Solución 1 M de ácido clorhídrico.
- c) Solución 1 M de trietanolamina
- d) NADH: preparar una solución cuya concentración sea de 10 mg/ml en bicarbonato de sodio al 0.1%.
- e) Solución patrón de ácido pirúvico con una concentración de 40 mg/lit.
- f) Enzima lactato deshidrogenasa (de músculo de conejo, con 25 000 U, suspensión cristalina en 2.1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Preparación de muestras para la curva estándar:

a. A partir de la solución patrón de ácido pirúvico con una concentración de 40 mg/l, se toman alícuotas de 1, 2 y 3 ml en tubos de ensayo y se llevan a un volumen de 4 ml con agua destilada; las soluciones tienen concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mg/l.

b. De las soluciones preparadas se toman 2 ml, se ponen en tubos de ensayo, se les agregan 8 ml de agua destilada y se mezclan perfectamente .

Determinación

i) Pipetear 2 ml de la mezcla en un tubo de ensayo y adicionar 1 ml de la solución de trietanolamina, mezclar perfectamente.

ii) Adicionar 50 μ l de solución del NADH, agitar y medir la absorbancia a 340 nm en contra de un blanco .

iii) El blanco se prepara de la misma forma pero sin adicionar la solución del NADH .

iv) Adicionar 4 μ l de la suspensión de la enzima, agitar la mezcla en un vortex .

v). Medir la absorbancia de 5 a 50 min hasta comprobar que no hay decremento en la absorbancia. Con los datos obtenidos se realiza una curva patrón como la que se muestra en la figura 10.

Preparación de muestras problema.

1. Se pesan en una balanza analítica 5 mg de xantana, se colocan en un tubo de ensayo y se le agregan 2 ml de la solución de HCl .

2. Tapar el tubo herméticamente y calentar a baño María en

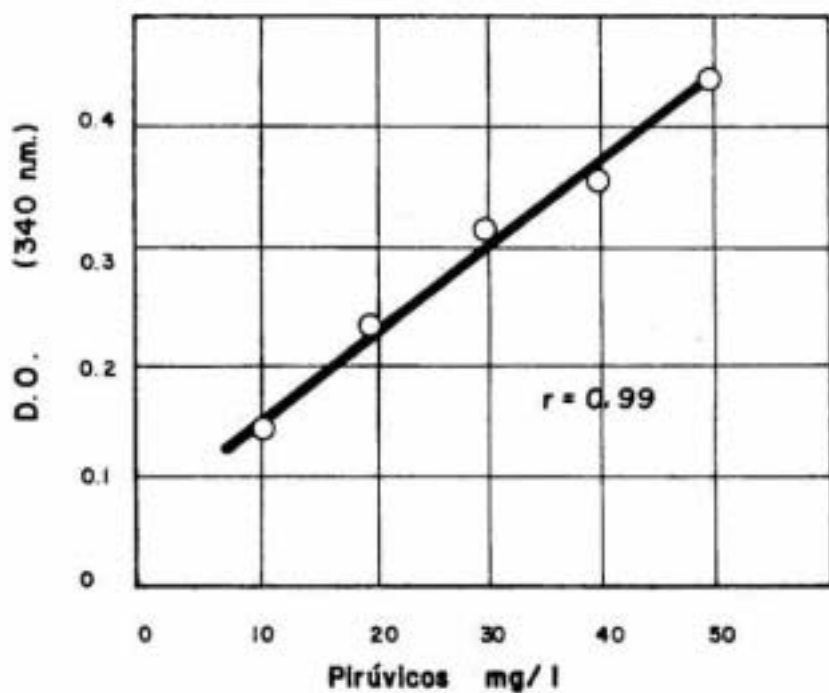


Figura 10.

Curva patrón para la determinación de ácido pirúvico.

ebullición durante 3 hs.

3. Neutralizar el ácido con 1.5 ml de NaCO_3 y llevar la mezcla a un volumen de 10 ml con agua destilada (asegurándose que el pH sea neutro, con una tira de papel pH).

4. Continuar con el procedimiento de la determinación

Cálculos

$$\text{Ácido pirúvico (\%)} = \frac{(\text{D.O. inicial} - \text{D.O. final}) \cdot (100) \cdot (88) \cdot (5) \cdot (3.05)}{(\text{Peso de la muestra}) \cdot (100) \cdot (6.22)}$$

88 = peso molecular del ácido pirúvico

5 = factor de dilución

6.22 = Coeficiente de extinción del NADH

3.05 = volumen de la muestra

4.2.1.4. Espectroscopia de infrarrojo.

Método de la pastilla de bromuro de potasio.

(Silverstein et al, 1974)

Fundamento:

Las transiciones dentro de las moléculas son usualmente estudiadas por la absorción de la radiación que pasa através de ellas. Las transiciones de los niveles vibracionales y rotacionales se encuentran en el infrarrojo. La absorción de la radiación del infrarrojo por las moléculas depende del incremento de la energía vibratoria, de la rotación de las moléculas (asociadas con los enlaces covalentes), producido por el cambio en el momento dipolar de la molécula.

Los espectros de infrarrojo pueden obtenerse de gases, líquidos y sólidos. En muestras sólidas usualmente se examinan como discos comprimidos. En la técnica de disco comprimido el material se puede moler junto a un haluro orgánico, el bromuro de potasio u otro (Silverstein et al, 1974).

Procedimiento.

1. Se mezclan de 1 a 2 mg de polímero con 100 mg de bromuro de potasio.
2. Se muele la muestra en un mortero.
3. Se mezclan perfectamente en un molino de dentista por algunos minutos.

4. Se coloca la muestra en una matriz y se compacta en una prensa hidráulica (1 200 lb/pul²). Las tabletas formadas son completamente claras.

5. Se coloca la matriz con la pastilla en el espectrofotómetro de infrarrojo y se corre el espectro.

4.2.3. Metodologías generales

4.2.3.1. Conservación de las cepas en agar suave.

- a) Se resuspende el microorganismo en 5 ml de medio YH.
- b) Se incuba a 29° C por 24 hrs a 200 rpm en una incubadora giratoria
- c) Se centrifuga para obtener el paquete celular (30 min a 5 000 rpm).
- d) El paquete celular se resuspende en 5 ml de agar suave (0.8 gr de agar en 100 ml de medio YH).
- e) Las células resuspendidas se vacían en un tubo inclinado con medio YH sólido (el tubo contiene 20 ml de medio YH). Se incuba a 29° C por 24 hs.
- f) Se guarda en refrigeración a 4°C

Los tubos inclinados se resiembran cada 15 días y se desechan a los 3 meses.

4.2.3.2. Liofilización

(Kusay, 1972).

Fundamento

Este método ha sido ampliamente usado y tiene como fundamento disminuir al máximo la actividad metabólica así como mantener la viabilidad de los microorganismos, por medio del congelamiento y el secado a vacío. El congelamiento frecuentemente daña la membrana citoplásmica e inclusive puede formar cristales intracelulares siendo nocivos al microorganismo, por lo que se requiere de sustancias protectoras que incrementan la supervivencia de los microorganismos. Entre ellos se encuentran el glicerol, el dimetilsulfatóxido, el suero, la leche, los iones magnesio y el amortiguador de fosfatos.

Procedimiento:

1. Se siembra masivamente la bacteria en tres cajas Petri con medio YN y se crece a 29°C por 48 hrs.
2. Se prepara una solución de leche al 10 % , se coloca en un tubo de ensaye 8 ml.
3. Se transfiere la masa celular de las cajas al tubo que contiene la solución de leche (en una campana de flujo laminar)
4. Se agita en un vortex hasta obtener una solución homogénea
5. Con una jeringa estéril se transfieren aproximadamente 0.5 ml de la muestra a ampollitas estériles (1 lote de 12 ampollitas).
6. Las ampollitas se ponen unos minutos en acetona y hielo seco.

con el fin de que pierdan humedad.

7. Se colocan en una liofilizadora durante 15 hrs aproximadamente a una presión de 100 microtorrs y a -50°C .

8. Se sacan las ampollitas de la liofilizadora, se sellan al vacío con un soplete.

9. Se guardan las ampollitas a temperatura ambiente.

4.2.3.3 Determinación de la concentración celular para la suspensión bacteriana.

1. Se siembra la bacteria en cajas con medio YM, se incuba por 24 hrs a 29°C .

2. En tubos con agua destilada estéril (10 ml), se resuspenden varias azadas de las colonias, de tal manera que se observen diferentes grados de turbidez.

3. Se toman 7 ml de la suspensión (asépticamente) y se lee a 565 nm en el espectrofotómetro. Se registran las lecturas de cada uno de los tubos.

4. De la suspensión bacteriana restante (3 ml) se realizan diluciones y se siembran para contar el número de colonias que se tienen por ml.

5. Se realiza una curva patrón con los datos obtenidos (figura 11).

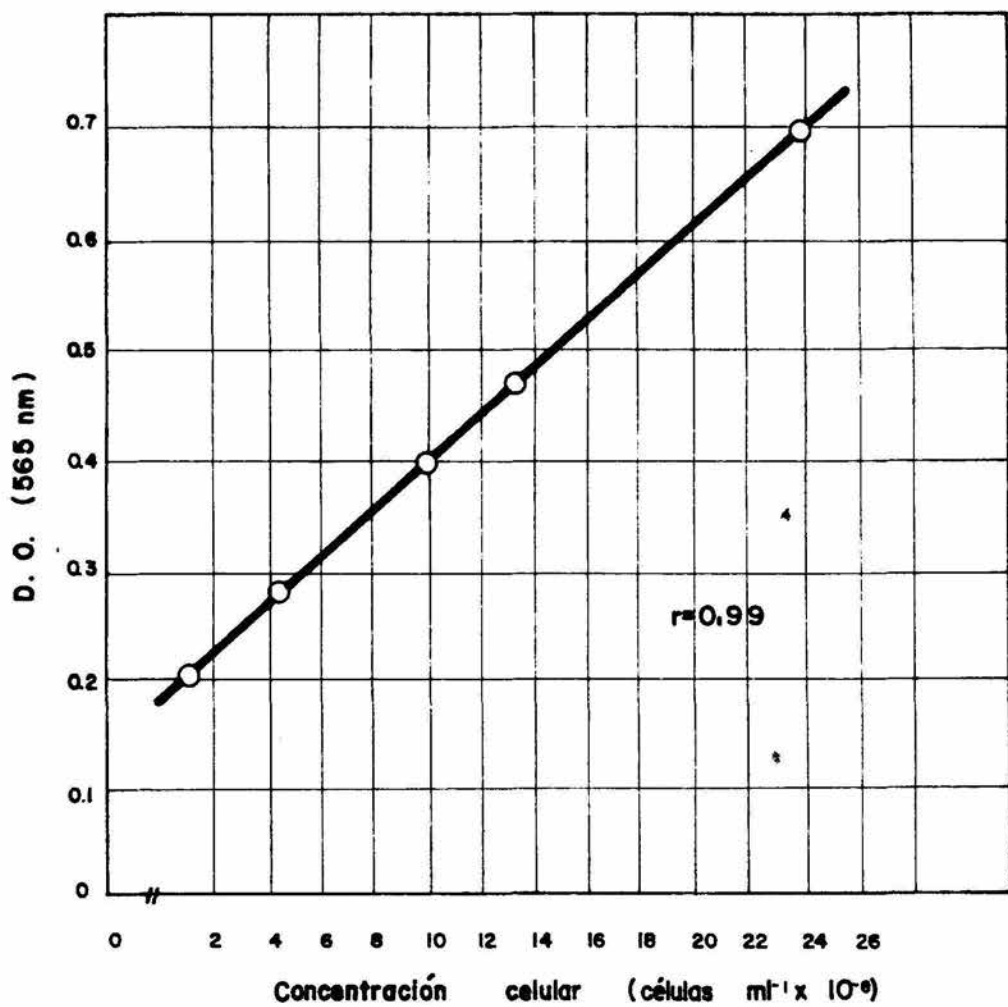


Figura 11.

Curva patron para la determinación de la concentración celular de *X. campestris pv campestris*.

6. Para obtener la suspensión bacteriana con una concentración de 3×10^7 células / ml se repiten los pasos 1,2,3 y se extrapola en la curva obtenida

4.2.2.4. Determinación de crecimiento celular (Densidad óptica).

1. Tomar una alícuota de caldo de fermentación de 5 ml.
2. Agregar 10 ml de agua destilada
3. Centrifugar a 13 000 rpm durante 20 min para precipitar células.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de agua
5. De esta suspensión se toman 0.5 ml y se agregan 4.5 ml de agua.
6. Se lee a 565 nm contra un blanco de agua destilada.

4.2.2.5 Infección de plantas de Brassica oleraceae con una suspensión bacteriana

1. Se colocan las plantas de Brassica oleraceae dentro de una cámara de humedad por 24 hrs a 48 hrs.

2. Tiempo en el cual se prepara la suspensión bacteriana, de acuerdo con la preparación de inóculo de infección por B.O. (sección 4.2.2.3).

3. Se colocan en un matraz estéril 50 ml del inóculo de infección .

4. Se sumergen por 1 min las hojas de las plantas exudadas, de tal manera que quede cubierta toda la hoja.

Se debe de tener la precaución que en lo posible las hojas sean del mismo tanno en plantas de 2 meses de sembradas.

5. Una vez realizada la infección se procede a colocar las plantas en la cámara de humedad por 24 hrs.

6. Después de 16 a 20 días se toman los datos cuando los síntomas aparecen.

4.2.2.6. Evaluación de las lesiones producidas por cada mutante.

Debido a que los síntomas de la pudrición negra son típicamente en forma de V (figura 12, foto 6) la estimación de la virulencia de las mutantes se realizó determinando el área de la lesión, considerando que se forma un triángulo equilátero. El área de la lesión se estimó como :

$$\text{Área} = \frac{(\text{Largo de la lesión})(\text{ancho de la lesión})}{2}$$

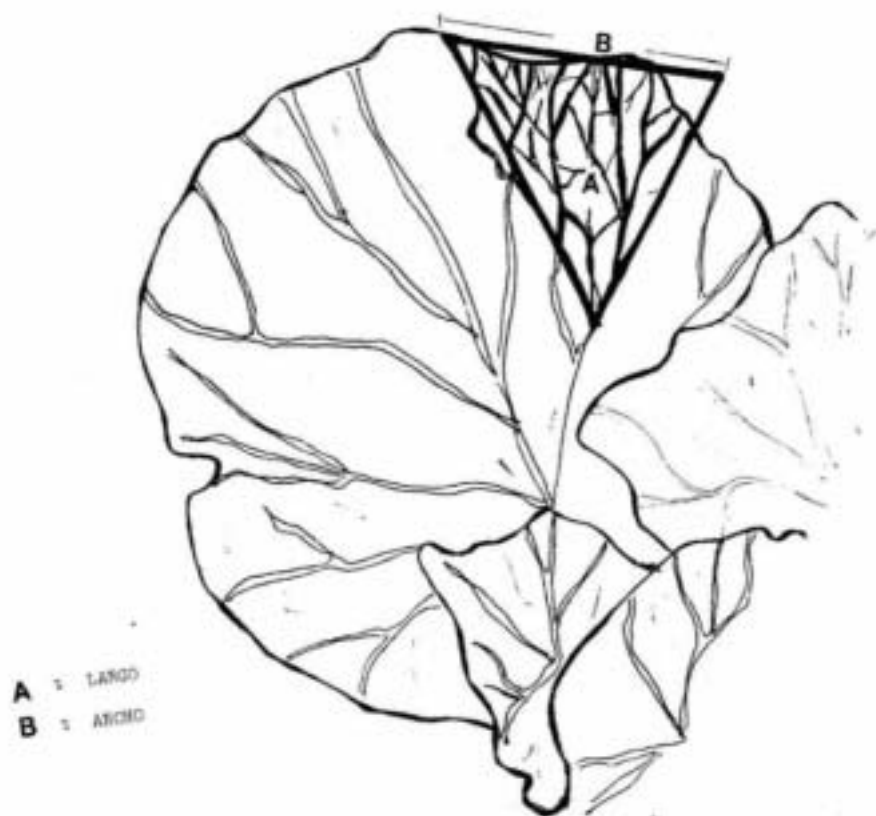


Figura 12. Estimación de la virulencia.

4.2.3 Procedimientos experimentales.

4.2.3.1. Fermentación en matraz Fernbach.

a) Se siembra la bacteria en un tubo que contenga 7 ml de medio YM líquido estéril, se incuba por 24 hr a 29°C y 200 rpm.

b) Se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con medio YM líquido estéril.

c) Se deja crecer durante 24 hrs a 29°C y 200 rpm.

d) Se toma una azada del inóculo y se estria en cajas con medio YM sólido para corroborar que el inóculo no se encuentre contaminado.

e) El inóculo del matraz Erlenmeyer se transfiere a un matraz Fernbach de de 2 800 ml que contiene 450 ml de medio de producción.

f) Se incuba a 29°C por 48 hrs a 200 rpm, y se repite el paso id), para corroborar que el cultivo se encuentra puro.

g) Se mide la viscosidad al caldo de fermentación con el viscosímetro Brookfield

h) Se procesa el caldo de fermentación para la obtención y cuantificación del polímero.

4.2.3.2. Obtención del polímero en polvo.

a) Al caldo de fermentación se le adiciona 10 % de una solución de cloruro de potasio saturada. se mezcla.

b) Se le agrega el doble del volumen de alcohol etílico industrial y se agita.

c) El polímero precipitado se extrae con una malla. escurriendo todo el alcohol posible .

d) Al polímero precipitado se le adiciona 50 ml de acetona , se agita y se escurre.

e) Se pone a secar en una estufa a 29°C

f) El polímero seco se pesa y posteriormente se muele en un mortero.

4.2.3.3. Determinación de la viscosidad en el viscosímetro Brookfield.

a. Se coloca en el viscosímetro la aguja 4 (aguja para determinaciones de soluciones con viscosidades altas).

b. Se coloca en un vaso de precipitado de 250 ml, 200 ml de caldo de fermentación.

c. Se sumerge la aguja dentro de la muestra cuidando que el nivel de esta coincida con el nivel que tiene marcada la aguja .

d. Se prende el viscosímetro con el clutch sostenido, y después de encendido se suelta.

e. Se deja que el señalador del disco se estabilice en la lectura.

f. Se sostiene el clutch nuevamente para mantener el señalador en la lectura se apaga el viscosímetro y se toma la lectura que indica el señalador y se suelta el clutch.

g. Con el clutch sostenido se sube la aguja para sacarla de la muestra y se lava con agua destilada.

La lectura obtenida se multiplica por un factor (200 a 30 rpm), que fué calculado por el fabricante en función de la geometría de la aguja para obtener la viscosidad en centipoises.

CAPITULO 5
RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Obtención de cepas.

La primera etapa desarrollada en este trabajo fué la obtención de cepas mutantes que presentaran características de deficiencia en su potencial como agentes fitopatógenos. El análisis y aislamiento de patógenos bacterianos alterados en su comportamiento respecto al huésped ayuda a definir los procesos de la interacción de factores específicos involucrados en la especificidad del huésped y la patogenicidad (Daniels et al., 1984).

Las mutantes se obtuvieron por mutación química con la nitrosoguanidina. El tratamiento se realizó con una concentración de 50 µg/ml y 30 minutos de exposición ; con estas condiciones se obtuvo el 25 % de células sobrevivientes. La concentración del mutágeno se encuentra en el rango óptimo establecido por Adelberg et al. (1965).

Posteriormente a la inducción de la mutación de X. campestris pv campestris se prosiguió a la selección de las mutantes .

Evidencias experimentales indicaron que en mutaciones espontáneas en X. campestris pv campestris , se presentan colonias variantes que muestran diferencias morfológicas y que se expresan en la producción del exopolímero, tales como el diámetro de la colonia y la apariencia morfológica típica de las colonias (Cadmus et al., 1976).

Debido a que no existen técnicas selectivas para el aislamiento

de mutantes alteradas en la producción o estructura de exopolisacáridos, usualmente se han elegido para este fin las características morfológicas (Whitfield *et al.*, 1961; Corey y Starr, 1957).

Particularmente la selección de las colonias mutadas se realizó en cajas con medio YM. Las principales mutantes que se diferenciaron en sus características morfológicas se presentan en la tabla 1. Las mutantes fueron seleccionadas y conservadas en tubos inclinados de agar suave.

Recientemente se han reportado mutantes de *X. campestris* cuya morfología se encuentra alterada posiblemente por una variación en la biosíntesis del polímero (Daniels *et al.*, 1984; Whitfield *et al.*, 1981). Las principales diferencias morfológicas tales como el diámetro de la colonia y la apariencia morfológica visual han mostrado evidencias de alteración en la susceptibilidad a fagos, a un gran número de antibióticos, en la composición de lipopolisacáridos de la membrana externa, condiciones de temperatura en la cual se produce el polímero e inclusive en su composición química básica. En la familia de las *Xanthomonas*, *X. phaseoli* y *X. oryzae* se han observado las anteriores evidencias y se ha correlacionado con el grado de virulencia en las cepas (Goto, 1972; Leach *et al.*, 1957).

Los datos de la tabla 2 hacen evidentes que los fenotipos obtenidos están en gran medida determinados por la apariencia física de la superficie de la colonia, en el color visual de las colonias así como en el diámetro de ellas.

En la figura 13 de manera general se ilustra que conforme se

Tabla 1.

Características morfológicas de mutantes de X. campestris y colonias de X. campestris pv campestris*.

Colonias y mutantes de <u>X. campestris</u>	Diámetro de las colonias*	Características morfológicas.
<u>X. campestris</u> 1459	0.3-0.4	Amarillo brillante con bordes lisos, convexos, viscosos.
<u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	0.3-0.4	Amarillo brillantes con bordes lisos, convexos, viscosos.
<u>X. campestris</u> 18NT5	0.5	Amarillo brillante con bordes lisos, convexos, viscosos.
<u>X. campestris</u> 18 N	0.45	Amarillo brillante bordes lisos, viscosa.
<u>X. campestris</u> N6	0.3	Cremosa, con bordes regulares, viscosa
<u>X. campestris</u> 17NS3	0.4	Amarillo gruesa, convexa, con bordes irregulares, sin viscosidad
<u>X. campestris</u> 26NX14	0.45	Amarillo opaco, convexa, sin viscosidad
<u>X. campestris</u> 17N	0.3	Amarillo brillante convexa, bordes lisos viscosa.
<u>X. campestris</u> 17NT4	0.25	Amarillo brillante convexa, bordes lisos viscosa
<u>X. campestris</u> 17NS1	0.25	Amarillo brillante convexa, con bordes lisos, viscosa
<u>X. campestris</u> 27NY12	0.05	Amarillo cristalina poco convexa, bordes lisos, acuosa.
<u>X. campestris</u> 27NW8	0.25	Amarillo opaca, poco convexa, bordes lisos acuosa.

*Observadas a las 48 hrs de cultivo en cajas con medio YM.

Tabla 2.

Características de las cepas mutadas en medio YM con cloruro de tetrazolium

Colonias	Observación de las colonias (cms).
<u>X. campestris</u> 1459	Colonias rojo carmin, centro color mostaza (0.4)
<u>X. campestris</u> pv - <u>campestris</u>	Colonias rojo carmin, halo transparente alrededor (0.3).
<u>X. campestris</u> 18NT5	Colonias rojo carmin, halo transparente alrededor (0.5)
<u>X. campestris</u> 18N	Colonias rojo carmin con una media luna en el centro color mostaza (0.5).
<u>X. campestris</u> N6	Colonias rojo carmin con centro color mostaza (0.5).
<u>X. campestris</u> 17NS3	Colonias rojo carmin con halo transparente alrededor (0.3).
<u>X. campestris</u> 28NX14	Colonias rojo carmin con una media luna en el centro (0.4) .
<u>X. campestris</u> 17N	Colonias rojo carmin, centro color mostaza con halo transparente alrededor (0.5).
<u>X. campestris</u> 27NY12	Colonias rojo carmin con crecimiento limitado (0.3) .
<u>X. campestris</u> 27NW8	Colonias rojo carmin con centro color mostaza (0.4).
<u>X. campestris</u> 17NT4	Colonias rojo carmin con halo transparente alrededor (0.4).
<u>X. campestris</u> 27NS1	Colonias rojo carmin con halo transparente alrededor (0.3).

Observada a las 48 hrs de incubación .

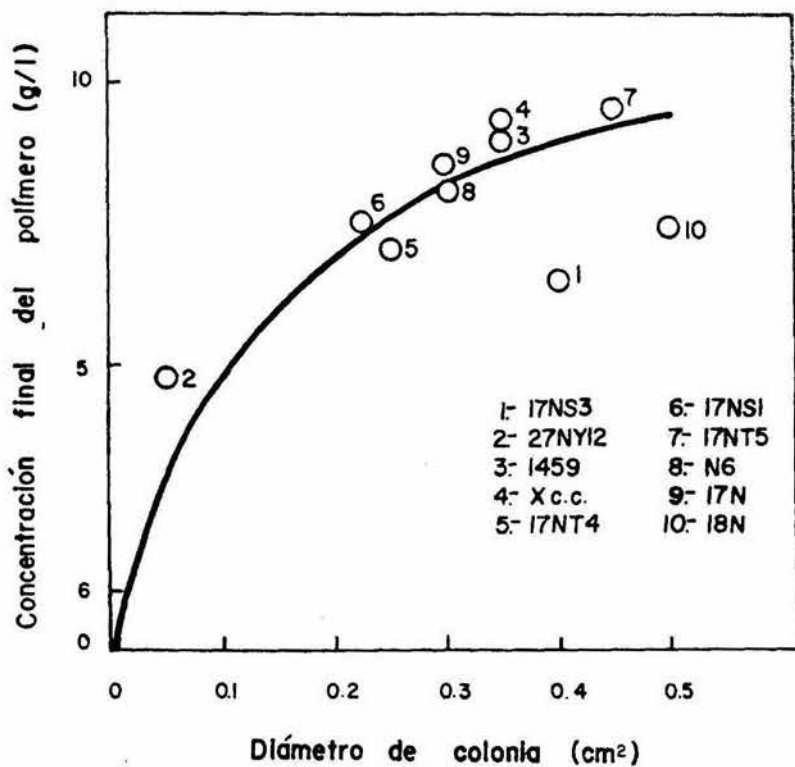


Figura 13.

Relación entre el diámetro de la colonia y el rendimiento de la fermentación de cada una de las cepas.

incrementa el diámetro de las mutantes se aumenta la producción de polímero, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Corey et al (1951).

Una de las pruebas para la selección y conservación de cepas productoras de X. campestris pv campestris en el proyecto UNAH-INP era precisamente el diámetro de la colonia (Quintero et al, 1984), principalmente porque la bacteria presenta gran inestabilidad genética. En cultivos viejos se presentan colonias cuyo diámetro oscila entre 1 y 2 mm y se disminuye su capacidad de producción del polímero así como de la calidad del producto (Cadmus et al, 1976).

Posteriormente las mutantes se sembraron en cajas con medio YM y cloruro de tetrazolium. El cloruro de tetrazolium es una sal reducida que se utiliza como un indicador de pH que vira a rojo cuando el medio se vuelve más ácido. Husain y Kelman (1958) observaron en colonias de Pseudomonas solanacearum diferencias en la pigmentación en un medio con cloruro de tetrazolium, conforme a su capacidad de producción del exopolisacárido: aquellas colonias que no formaron mucilago ó exopolisacárido se tornaron a un color rojo en cambio en aquellas que sí lo producen se presentó una coloración rosa pálida en la parte central, esto indicó que la capa viscosa presenta una baja afinidad por la forma reducida de la sal.

Los resultados obtenidos (tabla 2) indicaron que las colonias cuyo diámetro era mayor presentaban el centro color mostaza, color debido a la cantidad de la capa viscosa así como del pigmento amarillo del polímero. Lo que concuerda con lo observado por Husain y Kelman (1958).

Posteriormente se realizó la "prueba de levana" a cada una de las mutantes. Aunque es una prueba muy cualitativa permite visualizar la producción del polímero. Esta prueba se ha empleado potencialmente para la selección de colonias que producen exopolímeros de origen marino (Comunicación personal Dr. Lizarraga, Instituto de Limnología UNAN.)

Los resultados obtenidos de la prueba de levana en las mutantes seleccionadas, se presentan en la tabla 3. Estos datos se encuentran esquematizados en la figura 14 de manera cualitativa y de forma general las colonias que presentan un diámetro mayor tienen un índice de levana elevado. De acuerdo con estos resultados se tienen dos mutantes X. campestris 17 NS3 y X. campestris 27NY12 que presentan un diámetro pequeño y baja producción de levanas. Estos resultados concuerdan con las diferencias obtenidas en un medio con cloruro de tetrazolium en donde dichas mutantes presentaron un crecimiento limitado.




En las figuras 15 y 16, se muestran los valores de viscosidad aparente obtenidos de la fermentación en matraces Fernbach así como la concentración final del polímero, con respecto a la prueba de levana que presentó cada una de las mutantes. Se observa que aquellas mutantes que no produjeron un índice de levanas o cuyo diámetro en la prueba fue de los más pequeños, mostraron concentraciones reducidas, con viscosidades muy bajas. Por el contrario, aquellas mutantes que presentaron el mayor nivel del índice de levanas produjeron mayores concentraciones finales y las viscosidades aparentes en el caldo de fermentación más altas. Sin embargo, estas mutantes no precisamente correlacionan con la mayor virulencia como

Tabla 3.

Prueba de producción de levanas de colonias de X. campestris pv campestris y mutantes.

Colonias	Diámetro de las colonias (cms.)*	Producción de levanas
<u>X. campestris</u> 1459	1.7	++
<u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	1.5	++
<u>X. campestris</u> 18NT5	1.5	++
<u>X. campestris</u> 18N	1.7	++
<u>X. campestris</u> N6	1.3	+
<u>X. campestris</u> 17NS3	0.46	+
<u>X. campestris</u> 17N	1.5	++
<u>X. campestris</u> 17NT4	1.3	+
<u>X. campestris</u> NS1	1.3	+
<u>X. campestris</u> 27NY12	0.4	+

*Determinado despues de 5 días de incubación

-  = ++ Muy convexa
 = + Convexa
 = + poco convexo

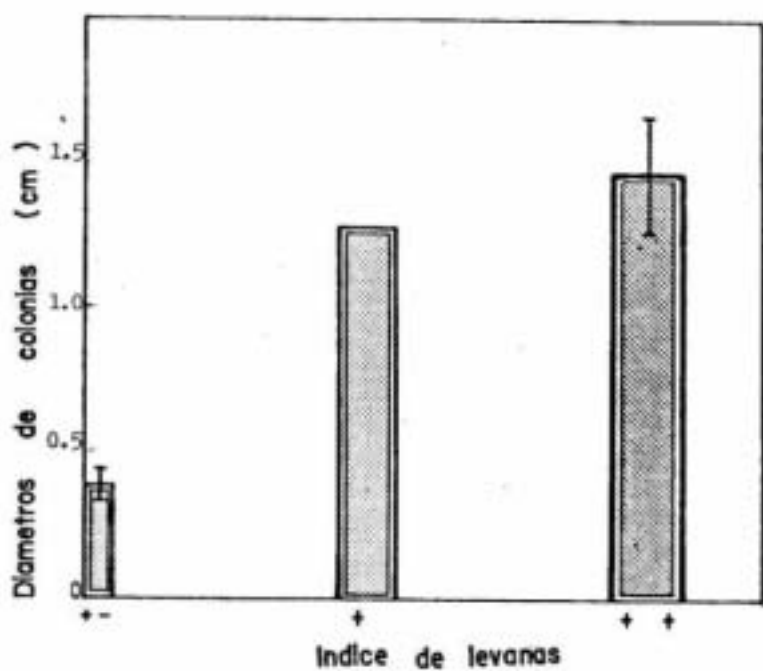


Figura 14 .

Relación del diámetro de las colonias con respecto al índice de levaduras.

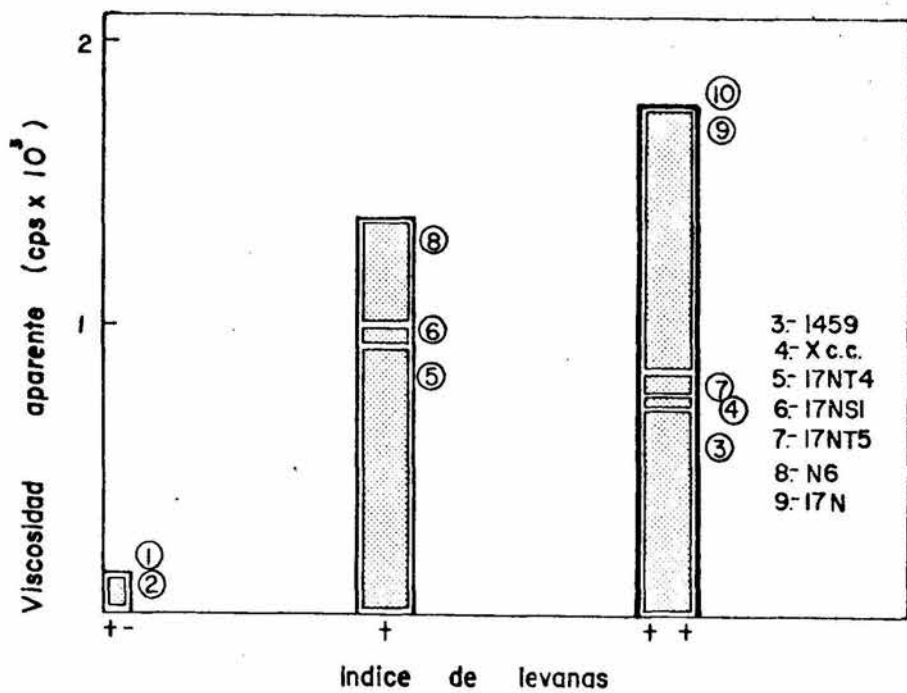


Figura 15.

Relación entre el índice de levanas y la viscosidad aparente de las mutantes.

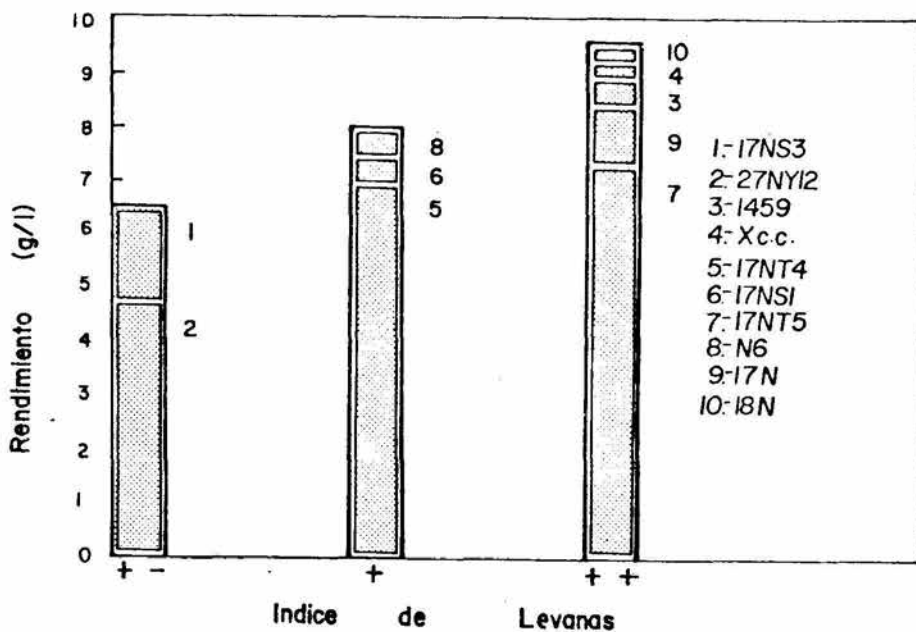


Figura 16.

Relación entre el índice de levanas y el rendimiento producido en la fermentación de cada una de las cepas.

se observará posteriormente.

5.2 Caracterización de las colonias y mutantes de X. campestris y campestris con relación a las propiedades del polímero extracelular que producen.

5.2.1. Evaluación fitopatológica de las colonias y mutantes.

Una vez obtenidas las mutantes, el siguiente paso fue la evaluación de la virulencia de cada una de ellas.

Para la evaluación de la virulencia de las cepas se han establecido procedimientos cualitativos que de alguna forma expresan los grados de patogenicidad o bien la atenuación de ésta, mediante índices que reflejan el grado de patogenicidad (Goto, 1972). Se han expresado como el porcentaje del área total afectada, el tamaño de lesiones determinado por el diámetro en mm., el número de lesiones (Corey y Starr, 1957), o simplemente como la inducción o tipo de respuesta local (Daniels et al., 1984). Todas dependiendo del tipo de sintoma que producen los fitopatógenos en su hospedante.

En el caso del presente trabajo la evaluación se trató de realizar de una forma más cuantitativa y se decidió determinar el área de la lesión (ver figura 12). El promedio del área producida por la inoculación de la cepa silvestre, la de colección y de cada una de las mutantes se presentan en la tabla 4. Como se podrá observar los datos presentan desviaciones estándar muy elevadas, estos resultados sugieren que en el fenómeno de la patogenicidad están involucrados una serie de fenómenos interrelacionados en donde participan factores

Tabla 4.

Tamaño de las lesiones obtenidos de la infección en plantas de coliflor.

Colonias	Area de las lesiones (cm)*	
X. <u>campestris</u> 17NS3	0	
X. <u>campestris</u> NY12	0	
X. <u>campestris</u> 1459	1.22 ±	1.0
X. <u>campestris</u> pv <u>campestris</u>	1.75 ±	1.0
X. <u>campestris</u> 18NT5	2.87 ±	1.8
X. <u>campestris</u> 17NT4	2.80 ±	1.0
X. <u>campestris</u> 17NS1	2.83 ±	1.0
X. <u>campestris</u> N6	2.90 ±	1.0
X. <u>campestris</u> 17N	3.15 ±	0.7
X. <u>campestris</u> 18N	3.7 ±	0.4

* Los resultados son promedio de las áreas infectadas en las hojas de coliflor. Corresponden a 36 lesiones producidas en 16 hojas infectadas de cuatro plantas por cada cepa .

biológicos intrínsecos tanto del huésped como del fitopatógeno.

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 4 se puede apreciar que se lograron obtener mutantes no virulentos (X. campestris 17NS3 y X. campestris 24NY12). Ambas se habían diferenciado por el tamaño de las colonias así como por su baja producción de levadura. El resto de los mutantes produjeron diferentes tamaños de lesiones en las plantas. Las lesiones producidas por los mutantes, la cepa de colección y la cepa silvestre se presentan en las fotos 2 a la 13.

5.2.2. Características del polímero extracelular obtenido de las fermentaciones en matraces Fernbach y su correlación con la virulencia.

Se conoce poco acerca de la superficie bacteriana que hace contacto con el huésped (Panapoulos y Peet, 1985), pero el polisacárido extracelular de X. campestris o campestris ha sido identificado como un factor importante en la patogénesis (Sutton y Williams, 1974; Whitfield *et al.*, 1981; Kidby *et al.* 1977), así como en otras bacterias fitopatógenas (Goto, 1972; Corey y Starr, 1957; Husain y Kelman, 1958).

La estructura molecular del polímero extracelular que sintetiza la bacteria se ha caracterizado por sus radicales acetilo y pirúvico, la viscosidad que produce tanto en el caldo de fermentación como en redisoluciones y por la cantidad excretada en el medio de cultivo. En vista de ello se realizaron fermentaciones en matraces Fernbach para proceder a la caracterización de los polímeros producidos por cada



Foto 1

Foto 2



Foto (1) y (2):
Plantas de coliflor utiliza-
das para el estudio de la
patogenicidad de las cepas



Foto 3



Foto 4

Fotos (3) y (4):
Síntomas típicos producidos por *Xanthomonas campestris* y las mutantes:
clorosis en forma de V, ennegrecimiento de las venas y necrosis del tejido
de la hoja.



Foto (5):
Estimación de la patogenicidad de las cepas:

- a) Largo de la lesión (cm.)
- b) Ancho de la lesión (cm.) (ver esquema de la página siguiente).



Foto (6):
Planta infectada con la mutante avirulenta *X. campestris* NY12, donde se muestra que no produce ningún daño en la planta.



Foto (7):
Hoja infectada con la cepa Xanthomonas
campestris NRRLB-1459



Foto (8):
Lesiones producidas por la cepa viru-
lenta Xanthomonas campestris pv. cam-
pestris (aislada de col).



Foto (9):
Lesiones producidas por la mutante
X.campestris 17 NS1

Foto (10):
Grado de patogenicidad que
presenta la mutante Xantho-
monas campestris 17NT4





Foto (11)

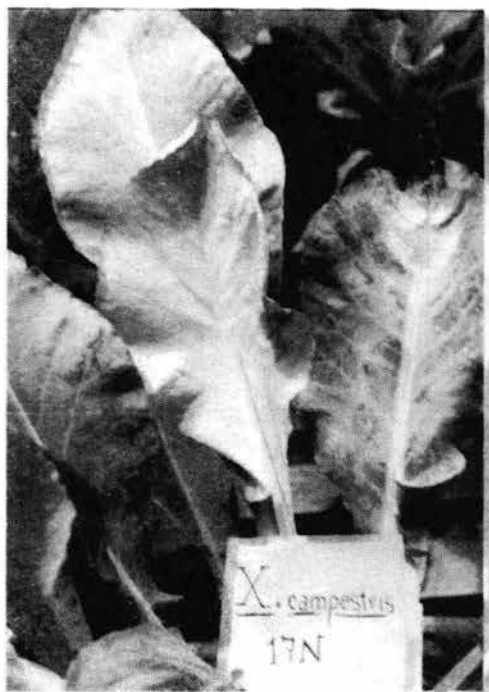


Foto (12)

Foto (11):
Hojas infectadas con la mutante Xanthomonas campestris N6 observándose los síntomas típicos así como necrosis del tejido.

Foto (12):
Lesiones producidas por la mutante Xanthomonas campestris 17N, presentándose la clorsis total de la hoja izquierda.



Foto (13):

Foto (13):
Grado de patogenicidad de la cepa mutante Xanthomonas campestris 18N, mostrándose la necrosis del tejido invadido por la cepa.

cepa.

Con respecto a las fermentaciones, los resultados promedio obtenidos se muestran en la tabla 5, donde se indican además los valores obtenidos de los sustituyentes acetilo y pirúvico. Los valores de D.O. fueron muy similares en casi todas las mutantes, lo que probablemente indique que las mutantes alcanzaron su máximo crecimiento celular.

Debido a que la viscosidad es uno de los principales factores reológicos que influye en la patogenicidad (Leach *et al.*, 1957; Sutton y Williams, 1974), en la tabla 5, se muestran los valores obtenidos de viscosidad en la fermentación. Los datos muestran que las mutantes que no producen síntomas en las plantas de Brassica oleraceae generan una viscosidad reducida, en contraste con las otras mutantes que produjeron viscosidades superiores a las presentadas por la cepa silvestre y la de colección.

En la figura 17 se muestran graficados los valores de virulencia con respecto a la viscosidad obtenida en el matraz Fernbach. Se manifiesta que conforme se incrementa la viscosidad del cultivo, la severidad de la lesión en la planta es mayor, aumentando así el grado de virulencia de las mutantes.

Cuando la cepa es capaz de producir un exopolímero cuya propiedad viscosificante es elevada se observa una rápida defoliación en la planta. Como fué en el caso de las mutantes virulentas X. campestris N6, X. campestris 17N y X. campestris 18N la cual se presentó a los 20 días después de la infección en las plantas. En cambio con la cepa de colección, la cepa silvestre y las otras

Tabla 5.

Resultados de la fermentación en matraz Fernbach de las mutantes y colonias de X. campestris.

Colonias	D ₀ *	Viscosidad** (cps.)	Concentración final (g/l)	Producción específica (cps/D ₀)	Pirúvico (%)	Acetilo (%)
<u>X. campestris</u> 17NS3	0.21	24	6.5	114	2.0	2.6
<u>X. campestris</u> NY12	0.20	133	4.8	665	2.8	3.7
<u>X. campestris</u> 1459	0.20	750	9.0	3 750	2.1	
<u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	0.20	775	9.3	3 875	2.2	2.3
<u>X. campestris</u> 18NT5	0.25	850	7.5	3 400	2.3	2.4
<u>X. campestris</u> 17NT4	0.28	950	7.0	3 393	3.2	3.8
<u>X. campestris</u> 17NS1	0.29	1000	7.5	3 448	3.2	3.4
<u>X. campestris</u> N6	0.21	1380	8.0	6 671		3.7
<u>X. campestris</u> 17N	0.25	1750	8.5	7 000	2.3	3.9
<u>X. campestris</u> 18N	0.22	1780	9.5	8 091	2.3	4.4

* Leído en el espectrofotometro Baush & Lomb (565nm.)

** Medido en el viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4 a 30 rpm.

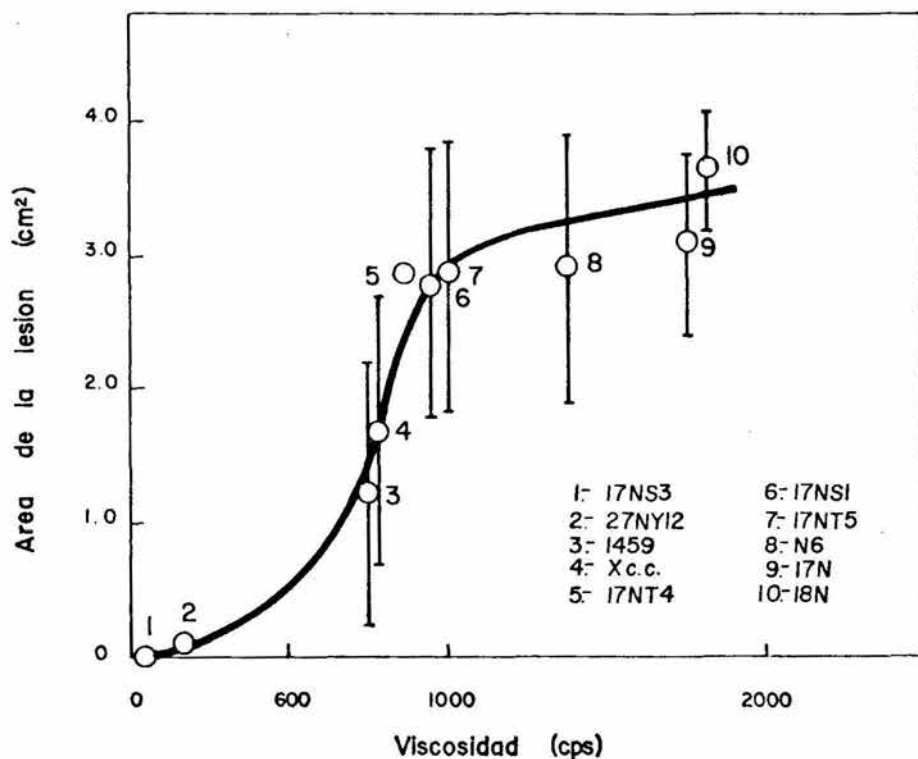


Figura 17.

Viscosidad aparente producida en matraz Fernbach de cada una de las mutantes con respecto a su virulencia.

mutantes que fueron medianamente virulentas, la defoliación de las hojas inoculadas se observó a los 30 días.

Estos resultados sugieren que cuando la cepa es capaz de generar un polímero que produzca elevada viscosidad su efecto en el taponamiento de los vasos vasculares de la planta es superior y consecuentemente se presenta una rápida defoliación de las hojas.

Es interesante notar que la cepa de colección muestra características de virulencia baja con respecto a las mutantes virulentas e inclusive a la cepa silvestre X. campestris pv. campestris.

Para conocer la viscosidad generada por la cantidad total de células se estimó la producción específica. En la gráfica de la figura 18 se muestra la tendencia de la producción específica y el grado de virulencia de las cepas. Se muestra que, en general, la viscosidad producida por célula está relacionada directamente con la virulencia de las colonias.

Aunque se observa que las mutantes medianamente virulentas X. campestris 17NT4, X. campestris 17NS1 y X. campestris 18NT5 presentan una producción específica baja comparada con las cepas X. campestris pv campestris y X. campestris 1549.

Es importante mencionar que en suspensiones celulares con viscosidades altas se presentan errores en la determinación del crecimiento bacteriano, los cuales se deben principalmente a la presencia de burbujas de aire atrapadas y la co-precipitación del polímero en el paquete celular cuando la suspensión celular es centrifugada.

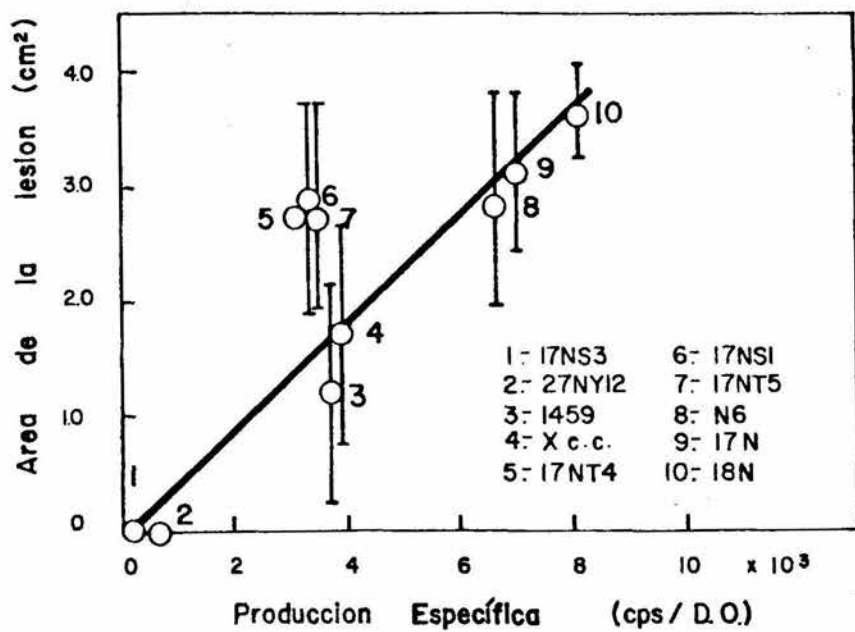


Figura 18.

Producción específica de cada cepa y su relación con la virulencia.

Determinaciones experimentales han indicado que el polímero absorbe luz en el espectro de luz visible, lo que altera los valores de la determinación (Galindo et al., 1987).

Otro factor importante y decisivo en la patogenicidad es la capacidad de producción de polímero. Corey y Starr (1957) establecieron que la patogenicidad de *X. phaseoli* era atribuida a la cantidad de polímero producido. En la figura 19 se presentan los resultados de la concentración final de la goma obtenida de las fermentaciones respecto al área de la lesión producida por las diferentes cepas. Es importante hacer notar que aunque las mutantes no virulentas produjeron cierta cantidad de polímero (ó al menos solidos precipitables con etanol), este perdió la capacidad de producir viscosidad (tabla 5).

Es factible que esta característica sea importante porque las mutantes no virulentas están expuestas a los efectos de fitotoxinas que produce el huésped y que restringe el desarrollo y la multiplicación de las bacterias dentro de él (Husain y Keiman, 1958).

Con respecto al contenido de pirúvico y acetilo las figuras 23 y 24 muestran que el polímero de las mutantes no virulentas presentan porcentajes intermedios e inclusive superiores a los obtenidos en las cepas normales. Esto indicaría que la baja generación de viscosidad de los polímeros no se debe al menos directamente al contenido de sus radicales.

La tendencia con respecto a la concentración final de la goma indica que únicamente está relacionada con la virulencia de las cepas

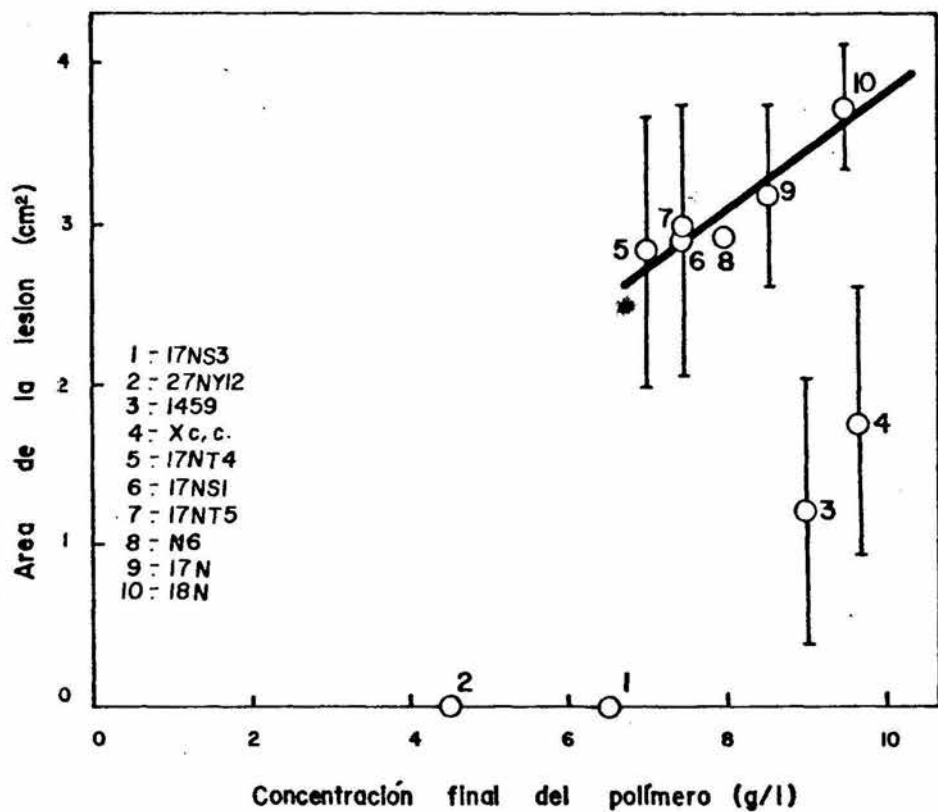


Figura 19.

Concentración final del polímero producido por cada cepa con el área de la lesión.

en los casos en donde el polímero producido genere elevada viscosidad. Lo que explica el bajo grado de virulencia de las cepas normales, porque aunque produjeron mayor cantidad de polímero que las mutantes virulentas, su viscosidad generada en el caldo de fermentación fué menor al producido por los polímeros de las mutantes virulentas.

Sin embargo, debido a que la viscosidad en soluciones de polisacáridos es una función de la concentración así como de las características químicas de los polímeros. Se obtuvo el poder viscosificante del polímero producido por cada cepa (tabla 6). En la figura 20 se observa que dicho parámetro correlaciona con la virulencia de las cepas, de manera muy similar como en la viscosidad aparente, estos resultados sugieren que la capacidad de producción de viscosidad; la cual está influida por la cantidad producida, está relacionada en el fenómeno de la virulencia.

Como corolario de lo anterior era posible que también estuvieran implicados los factores de calidad de la goma: los radicales pirúvico y acetilo, constituyentes del polímero.

Algunas investigaciones han mostrado que la selección de cepas y subcepas en cultivos no puede ser basada solamente en su viscosidad y en el rendimiento del polisacárido, sino en la calidad del producto. Un indicador de la calidad del producto parece ser el contenido de pirúvico presente en la molécula que aparentemente está estequiométricamente relacionado con las unidades repetidas de la macromolécula (Cadmus et al., 1976; Knutson, 1975).

Tabla 6

Capacidad viscosificante producida por las cepas de X. campestris.

Colonias		Capacidad Viscosificante ($\mu\text{a/g/l}$)
<u>X. campestris</u>	17NS3	3.7
<u>X. campestris</u>	NY12	27.7
<u>X. campestris</u>	1459	83.3
<u>X. c.c</u>		83.3
<u>X. campestris</u>	18NT5	113.3
<u>X. campestris</u>	17NT4	135.7
<u>X. campestris</u>	17NS1	133.3
<u>X. campestris</u>	N6	172.5
<u>X. campestris</u>	17N	205.9
<u>X. campestris</u>	18N	187.4

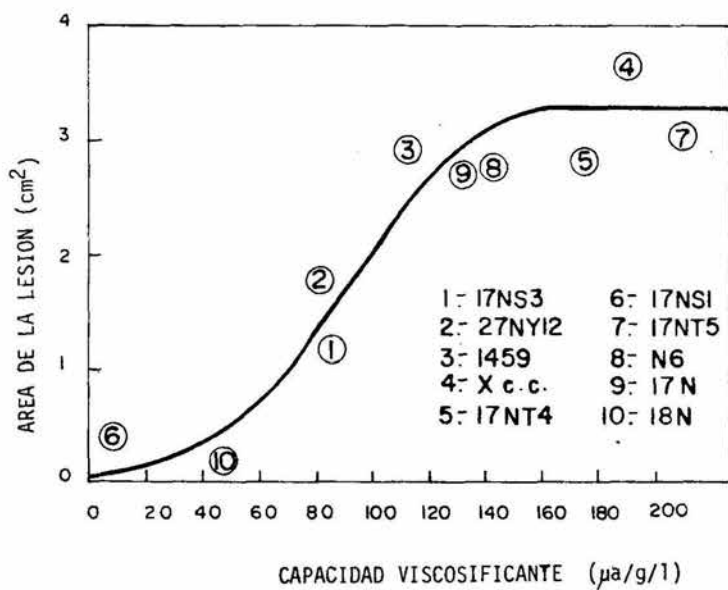


Figura 20.

Capacidad viscosificante con respecto al área de la lesión producida por cada mutante.

En la figura 21 se muestra la relación de los porcentajes de los radicales pirúvico y en la figura 22 los porcentajes de acetilo para cada una de las mutantes. Con respecto al pirúvico no parece existir ninguna relación respecto a la virulencia ya que se observan oscilaciones en un rango muy estrecho. Se ha establecido que los valores de sustituyentes pirúvico influyen importantemente en las propiedades del polímero, principalmente en los índices reológicos de capacidad viscosificante y de pseudoplasticidad y se ha considerado que tales parámetros dependen de la cepa y de las condiciones de su producción (Jeans *et al.*, 1976). Sin embargo, resultados experimentales (Quintero *et al.*, 1984) han confirmado que el contenido de pirúvicos no puede considerarse por sí solo como un criterio de calidad del polímero extracelular ya que existen cepas que producen altos contenidos de sustituyentes pirúvicos y no proporcionan productos con parámetros reológicos deseados.

En la figura 21 se observa que parecen existir dos grupos de mutantes que producen polímeros con porcentajes de pirúvicos en dos rangos. Se ha mostrado que el contenido de ácido pirúvico en el polímero puede estar agrupado en estos rangos (Sandford *et al.*, 1977).

De acuerdo con los valores de los radicales acetilo (figura 22) se observa que, en forma general el porcentaje se va incrementando en los polímeros de las cepas virulentas y que corresponde al incremento del área de la lesión.

Se observa que las cepas normales presentan porcentajes de acetilo y pirúvico muy semejantes pero patogenicidad baja con respecto a las mutantes virulentas.

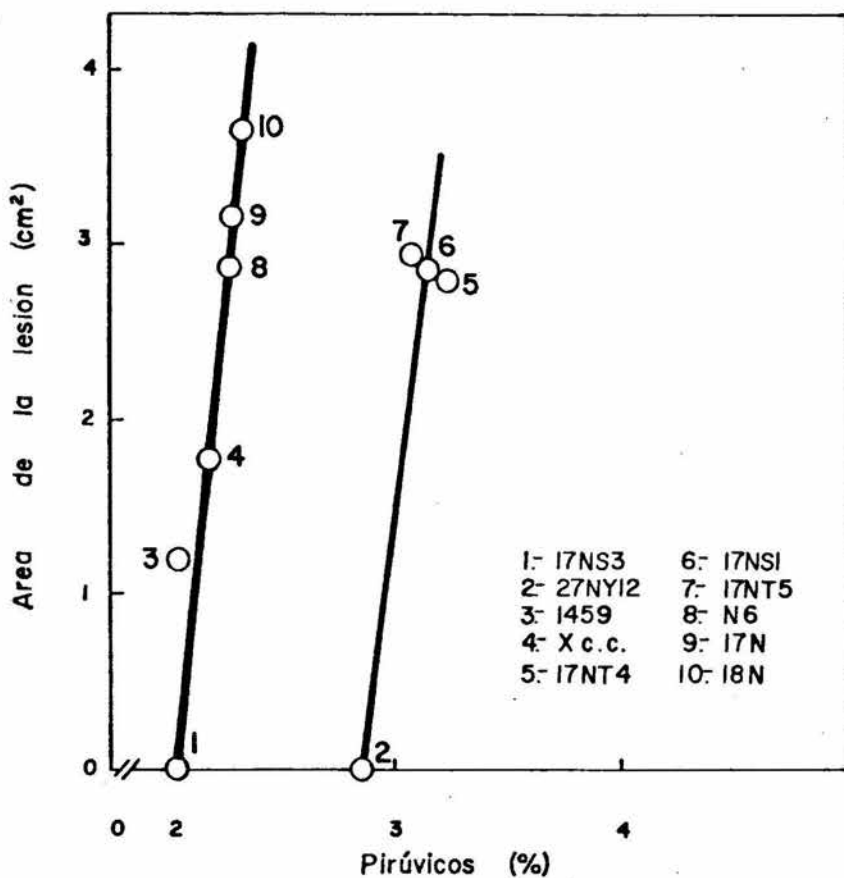


Figura 21.
 Porcentaje de ácido pirúvico presentes en el polímero de cada cepa y su relación con el área de la lesión.

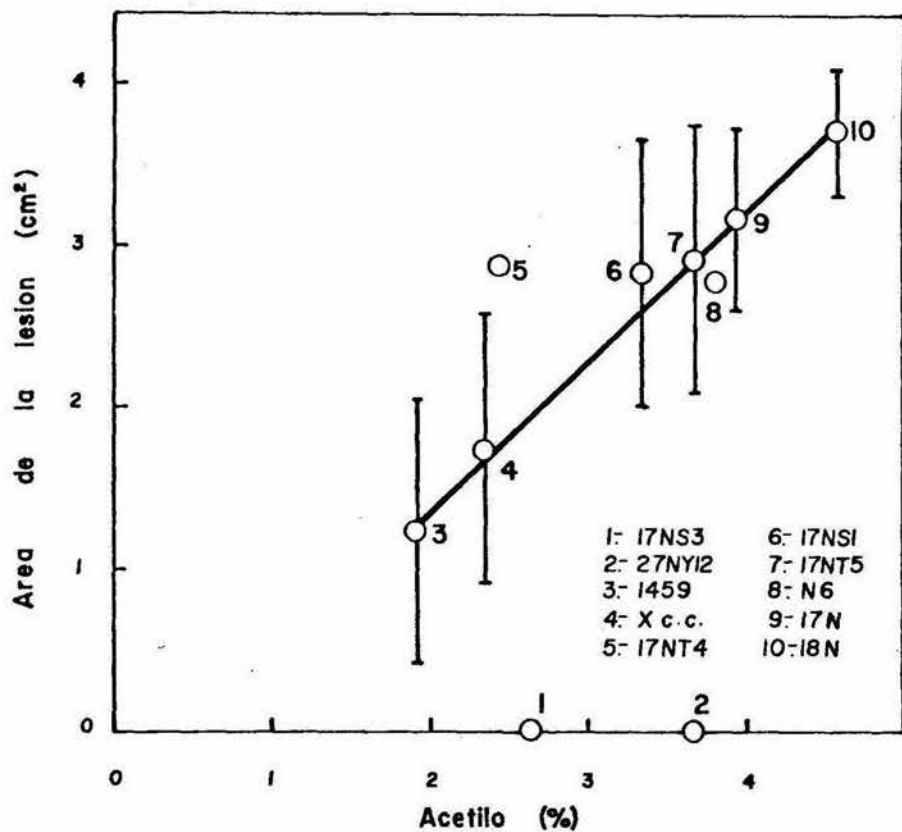


Figura 22.

Porcentaje de radicales acetilo de los polímeros de cada mutante con respecto al área de la lesión.

Estos datos sugieren que probablemente una combinación compleja de estos factores: viscosidad, concentración final de goma, acetilos, pirúvicos, entre otros, sean los responsables del grado de virulencia.

Es necesario remarcar que el análisis considera en forma aislada los contenidos de pirúvico y acetilo. Resulta obvio que si se produce goma en muy bajos niveles se podrían tener valores elevados de sustituyentes y presentar baja o nula virulencia. Con el fin que de alguna manera se corrija el efecto combinado de concentración y niveles de sustituyentes se trataron de correlacionar parámetros combinados como por ejemplo: (acetilo)(pirúvico)(concentración final de la goma). En la figura 23 se observa que hay una tendencia clara en cuanto a que el efecto combinado influye en la patogenicidad de las mutantes.

Sin embargo se observa que la mutante X. campestris NTS está por debajo de la tendencia general. Lo que implica que la patogenicidad del microorganismo no se debe solamente al polímero.

Por los anteriores resultados, era muy probable que la mutación hubiera afectado la biosíntesis del polímero (Whitfield, 1984). Para tratar de averiguarlo se realizó espectroscopia en el infrarrojo en sólido a los polímeros obtenidos de cada una de las mutantes previamente descritas.

La principal finalidad de los espectros fué la de visualizar los posibles cambios estructurales que hubieran podido suceder en la molécula.

Tabla 7.

Datos obtenidos de la relación (Acetilos)(Piruvicos)(Concentración final) de cada una de las cepas y su respectiva área de la lesión.

Cepas	(A)(P)(Cf)* (Unidades arbitrarias)	Area de la lesión (cm ²)
<u>X. campestris</u> 17NS3	21.08	-
<u>X. campestris</u> 27NY12	50.30	-
<u>X. campestris</u> 1459	35.59	1.22 ± 1.0
<u>X. c. c.</u>	47.22	1.75 ± 1.0
<u>X. campestris</u> 18NT5	40.86	2.87 ± 1.8
<u>X. campestris</u> 17NT4	85.38	2.80 ± 0.7
<u>X. campestris</u> 17NS1	79.61	2.83 ± 1.0
<u>X. campestris</u> N6	88.56	2.90 ± 1.0
<u>X. campestris</u> 17N	76.21	3.15 ± 0.7
<u>X. campestris</u> 18N	98.70	3.70 ± 0.4

* (Acetilo)(Pirúvico)(Concentración final)

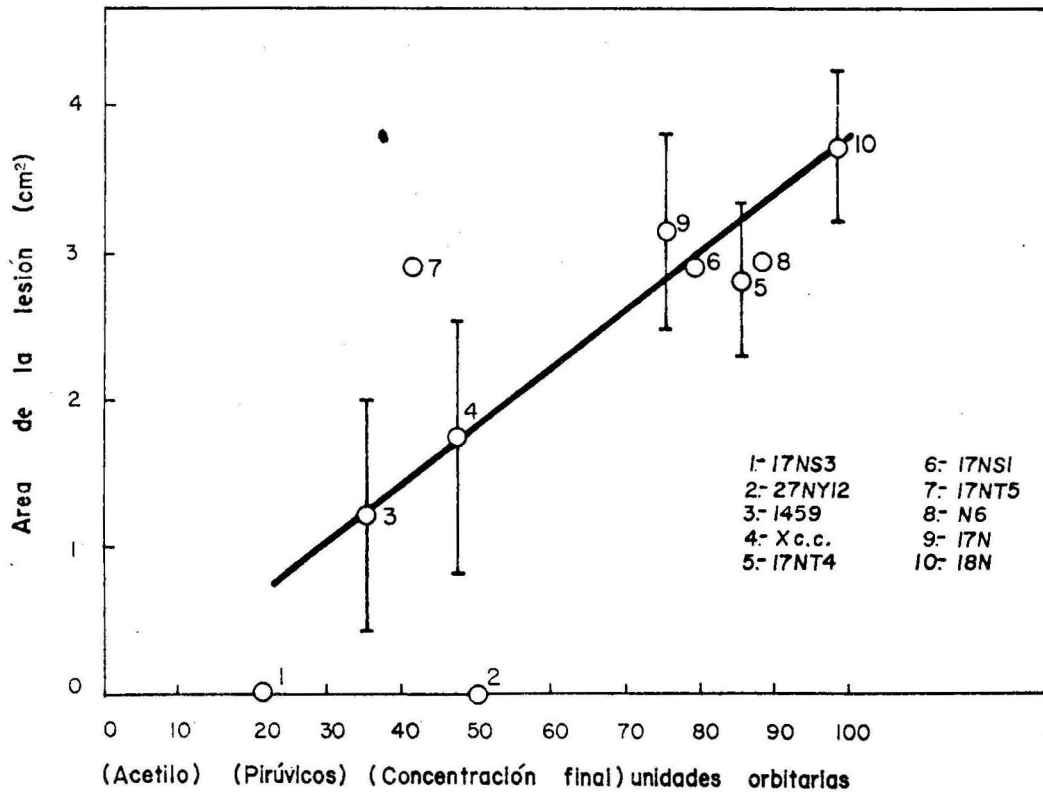


Figura 23.

Correlación entre el índice (Acetilo)(Pirúvico)(Concentración final) en relación con el área de la lesión producido por cada una de las cepas.

Los resultados detallados y comparativos de cada uno de los espectros de los polímeros de las mutantes con respecto al de la cepa normal X. campestris 1459 se presentan en el anexo 2.

En la tabla 8 se presentan los números de onda correspondientes a las principales bandas que describen la vibración de los grupos funcionales del polímero de la cepa de colección y se indican respectivamente en el espectro de la figura 24 los grupos funcionales que corresponden a cada banda.

En la tabla 9 se observan las áreas de las bandas que se diferenciaron significativamente en todos los espectros.

En la figura 25 se muestra que de forma general, la asociación intramolecular presenta cierta tendencia a incrementarse cuando se aumenta la virulencia de las mutantes. De manera comparativa en la figura 26 se presentan los espectros de la mutante no virulenta X. campestris 27NY12, de la cepa normal X. campestris 1459 y de la mutante virulenta X. campestris 188. En la mutante no virulenta se hace más evidente la banda involucrada con la asociación intermolecular (1115 cm^{-1}), conforme la patogenicidad de las cepas se incrementa esta banda tiende a presentarse solo como un hombro, es decir va desapareciendo y predomina la banda de los 1050 cm^{-1} que representa a la asociación intramolecular.

Los resultados sugieren que la asociación intramolecular de las cadenas poliméricas están asociadas con la virulencia. Es muy posible que esta asociación establezca congregaciones moleculares que formen "tapones" que ocluyan los vasos xilemáticos.

TABLA 8

DESCRIPCION DEL E.I DEL POLIMERO DE Xanthomonas campestris
1459

Número de onda (cm^{-1})	Vibración del grupo funcional:
1727.55	Carbonilo de acetilos
1629.42	Carbonilo de acidos carboxilicos libres
1560-1511	Carbonilo de acido pirúvico CH_3 del acetilo
1248.69	Vibración asimétrica del OH del CH_2OH terminal de los azúcares y probablém _e te indique además la ramificación de la cadena principal.
1113.8	Asociación intermolecular(interacción entre grupos funcionales de diferentes cadenas)
1069.072	Interacción intramolecular (asociación entre grupos funcionales de la misma cadena).
885-480	Huellas de los azúcares componentes de las cadenas poliméricas
771	Glucosa
619	Manosa

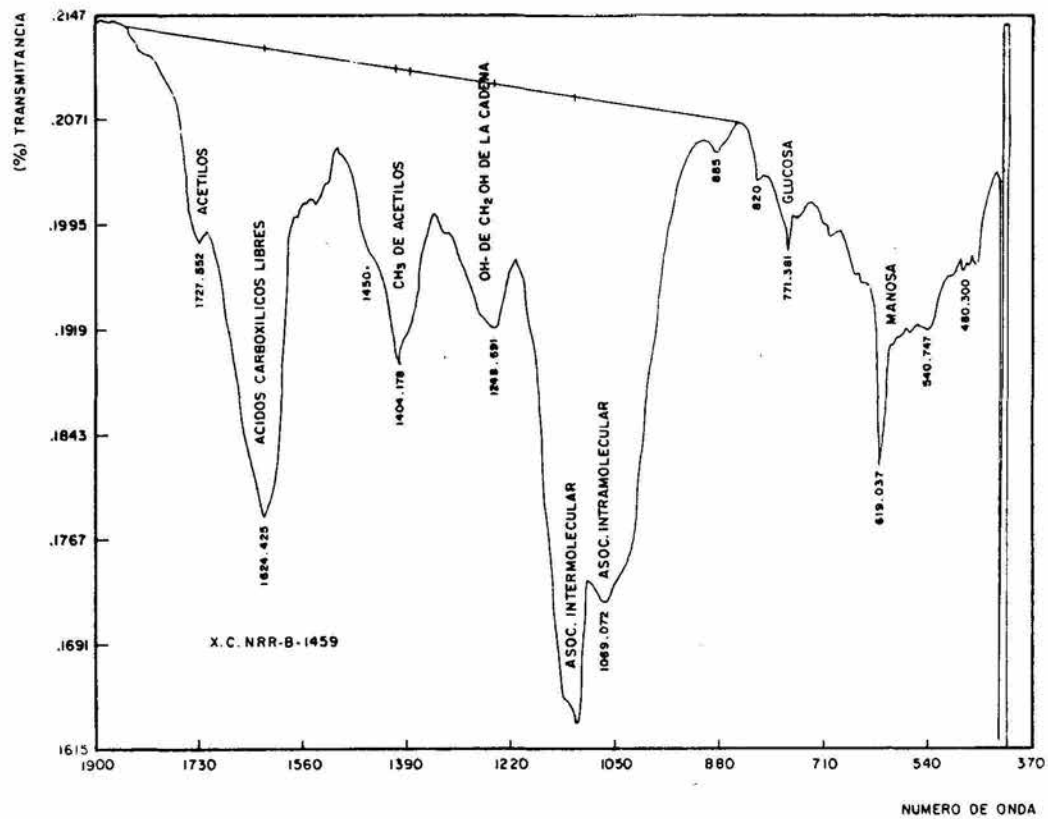


FIGURA 27. Espectro de infrarrojo del polimero de la cepa Xanthomonas campestris NRRLB-1459

Tabla 9.

Areas de las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las colonias.

Colonias	Bandas	
	1 069 cm^{-1}	1 115 cm^{-1}
<u>X. campestris</u> 1459	0.26	1.3
<u>X. campestris</u> pv <u>campestris</u>	0.32	1.8
<u>X. campestris</u> 27NY12	0.035	2.94
<u>X. campestris</u> 17NS3	0.23	0.6
<u>X. campestris</u> 18NT5	0.36	0.07
<u>X. campestris</u> 17NT4	0.93	0.36
<u>X. campestris</u> 17NS1	0.96	0.08
<u>X. campestris</u> N6	0.	
<u>X. campestris</u> 17N	0.70	0.02
<u>X. campestris</u> 18N	1.04	0.01

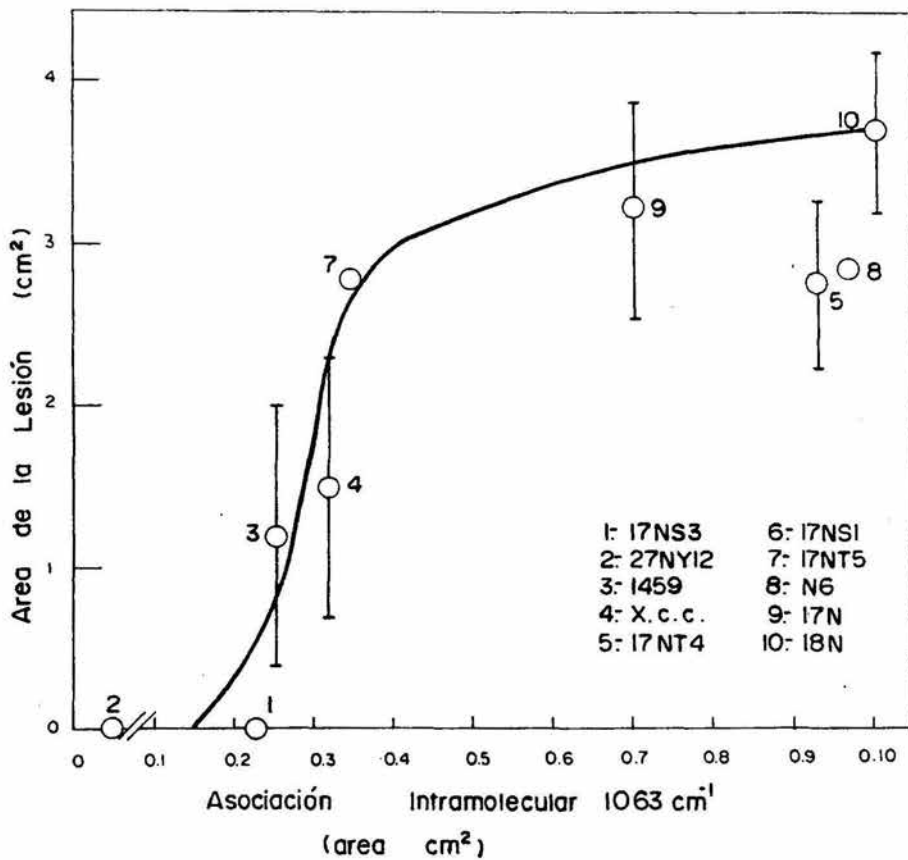


Fig. 25

Relación entre la banda de la asociación intramolecular (1063 cm^{-1}) y el área de la lesión de cada una las cepas.

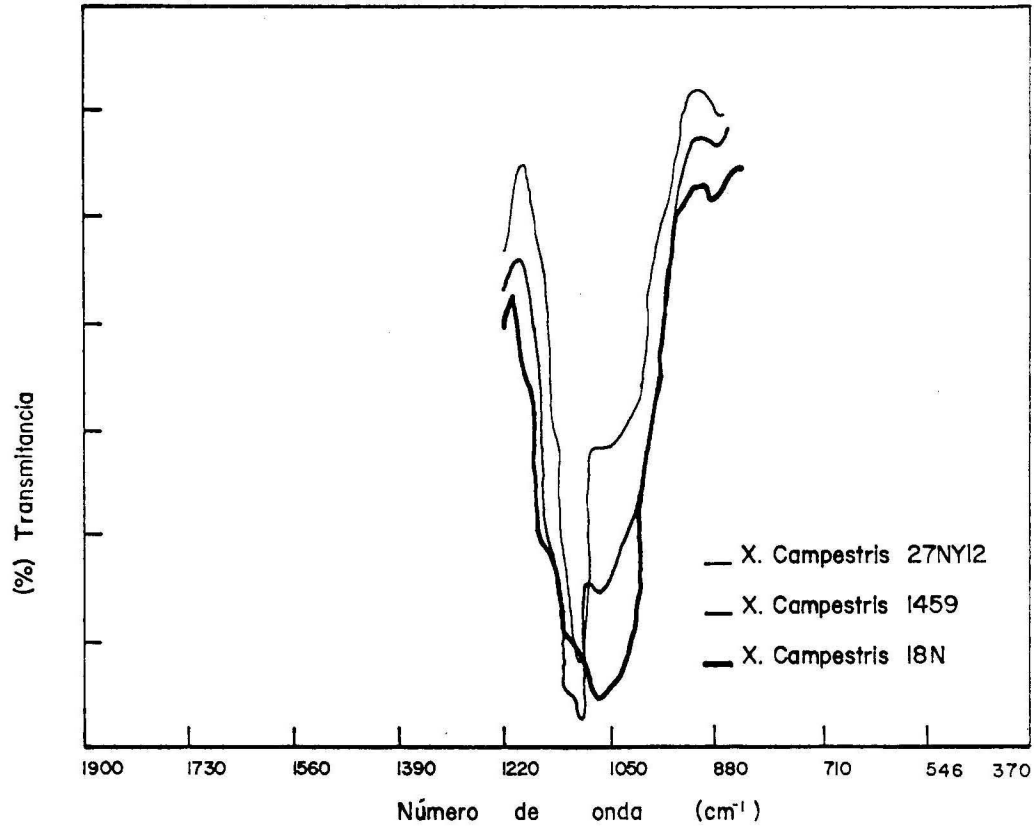


Figura .26.

Relación de intensidades relativas de las bandas que implican la asociación inter e intramolecular en cepa no virulenta (X. campestris 27NY12), medianamente virulenta (X. campestris 1459) y virulenta (X. campestris 18N).

Desafortunadamente la espectroscopia se realizó en sólido, de manera que los resultados no reflejan lo que podría suceder en solución. Se ha sugerido que el exopolímero en solución, se encuentra en forma ordenada como una sola hélice debido a la asociación intermolecular (Dea *et al.*, 1974), estas hélices se ven favorecidas por asociaciones débiles que forman una red tridimensional tenue y que puede ser responsable de la habilidad para suspender² partículas (Rees *et al.*, 1984).

En solución y en condiciones muy cercanas a las fisiológicas, la conformación ordenada de la goma xantana puede mostrar interacciones cooperativas con polisacáridos característicos de la pared celular de la planta y puede representar una "molécula de unión" en reconocimiento al lugar donde se establece la bacteria, identificando el área o superficie particular de la planta por medio de la composición de la pared (Morris *et al.*, 1977).

En la tabla 10 se presenta de manera general un cuadro en donde se presentan el número de bandas que coinciden, el número de bandas diferentes y el número de bandas que faltan en los espectros de infrarrojo de los polímeros de cada mutante. En esta tabla las bandas se comparan con el espectro del polímero de *X. campestris* 1459, cepa de la cual se mutagenizó y se obtuvieron las mutantes. Con respecto al espectro del polímero de la cepa silvestre, se muestra que es sensiblemente diferente al de la cepa de colección, principalmente en las bandas que indican la vibración molecular de los azúcares constituyentes .

De acuerdo con el número de bandas (tabla 10), el polímero que fué totalmente diferente al de la cepa de colección e inclusive al de

Tabla 10.

Bandas distintivas de los espectros de infrarrojo comparativamente con el espectro de X. campestris 1459.

Cepas	Bandas que coinciden (cm^{-1})		Bandas diferentes (cm^{-1})		Bandas que faltan (cm^{-1})
	400-900	900-2000	400-900	900-2000	
<u>X. campestris</u> 1459	7	9	-	-	-
<u>X. c.c.</u>	5	7	6	3	-
<u>X. campestris</u> 21NY12	4	5	18	8	1
<u>X. campestris</u> 17NS3	7	5	5	3	2
<u>X. campestris</u> 18NT5	6	5	5	18	-
<u>X. campestris</u> 17NT4	6	7	3	-	2
<u>X. campestris</u> 17NS1	7	9	1	-	1
<u>X. campestris</u> N6	6	6	3	7	-
<u>X. campestris</u> 17N	6	7	3	-	2
<u>X. campestris</u> 18N	6	8	3	3	1

las otras mutantes fué el de la mutante no virulenta X. campestris 27NY12 , el cual presenta distintas bandas en la región de los azúcares y en la región de los 900 a 2000 cm^{-1} lo que indica que no es una xantana típica.

Con respecto a los espectros de las mutantes virulentas se puede apreciar que las principales diferencias se encuentran en la región que describen las vibraciones moleculares de los azúcares. Lo que sugiere que probablemente otros tipos de azúcares conformen a los polímeros, tales como pentosas o hexosas que no son las que conforman al exopolímero o goma xantana típica.

Estos resultados indican que la estructura molecular del ó de los polímeros probablemente estén definiendo el tipo de asociación que puede estar relacionada con la virulencia.

Un estudio reciente de mutantes de X. campestris mostró evidencias respecto a la alteración de la apariencia morfológica de las colonias, correlacionada con la composición estructural del exopolímero. Se detectó la presencia de galactosa, rhamnosa además de glucosa , manosa y ácido glucorónico en una constitución que es posible hidrolizarla con celulasas (Whitfield, 1984).

Varias cepas de Xanthomonas contienen galactosa en el exopolisacárido (Gorin y Spencer, 1961; Farreed y Percival, 1976). En X. fuscans una subespecie de X. campestris (Buchanan y Gibbons, 1974) el polímero extracelular contiene glucosa, manosa y pequeñas cantidades de ó deoxi-L-manosa y ácido glucorónico (Konisek et al, 1977).

En la tabla 10 se muestra que todos los polimeros de las mutantes presentan las principales diferencias en la región de los $900-2000 \text{ cm}^{-1}$. Dicha evidencia de las diferencias en la región de los 400 a 900 cm^{-1} sugieren que muy probablemente se encuentran alterados los pesos moleculares de los distintos polimeros de las mutantes y que posiblemente esta alteración esté también involucrada con la alta, baja o nula virulencia. Hodgson *et al.*, (1949) han estudiado polimeros de origen vegetal, de diferentes pesos moleculares y concluyeron que ciertos polisacáridos presentaron una relación directa entre el peso molecular y la habilidad para causar marchitamiento y necrosis en las hojas de tomate.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se ha mostrado que la patogenicidad es un fenómeno complejo en donde se encuentran involucrados las interacciones de diversos factores, de los cuales poco se ha aportado para su esclarecimiento.

A pesar de que los experimentos se realizaron en matraces Fernbach, los resultados mostraron evidencias de las distintas propiedades de los polimeros de las mutantes, sin que esto signifique que se trataran de simular las condiciones *in vivo* del huésped. En las fermentaciones en matraces Fernbach se presentan varias limitaciones, entre las que se tienen la baja concentración de oxígeno disuelto cuando la viscosidad se incrementa así como limitaciones en el control del pH ya que se vuelve ácido conforme se excreta el polímero, lo que afecta a la producción del polímero

(Moraine y Rogovin, 1971).

Las propiedades del polímero, tales como la viscosidad, la producción específica y en gran medida la interacción de sus componentes químicos influyen en el fenómeno complejo de la patogenicidad.

Las mutantes X. campestris 17N y X. campestris 18N abren la posibilidad de ser empleadas en la producción de la goma, ya que el polímero de éstas presenta valores de acetilo y pirúvico superiores a la de la cepa de colección así como viscosidades superiores. Sin embargo, la determinación completa de las características reológicas de los polímeros resuspendidos se encontraba fuera del alcance del presente trabajo.

Los resultados obtenidos indican que es posible explorar campos de cultivos con crucíferas enfermas y seleccionar cepas de alta virulencia, cuya área de la lesión sea de 3-3.5 cm². De esta manera las cepas aisladas se espera que produzcan un polímero cuyas propiedades podrían ser idóneas para su uso en la perforación y reparación de pozos petroleros así como para extender su empleo hacia otras aplicaciones.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones generales

De acuerdo con las diferencias morfológicas que presentaron las colonias mutadas fue posible seleccionar y aislar mutantes con alteraciones en su capacidad fitopatogénica y en las características químicas y fisicoquímicas de los polímeros producidos por cada una de ellas.

Alteraciones que seguramente fueron provocadas en la vía biosintética del polímero producidos por el tratamiento con el mutágeno.

Como resultado de esta alteración se presentaron diferencias significativas en su capacidad virulenta en las plantas. En consecuencia se puede establecer que es posible la selección de cepas con diferentes grados de patogenicidad.

El método para cuantificar la virulencia empleado en este trabajo fue determinante para la observación de los distintos grados de la virulencia que presentaron cada una de las cepas. Las desviaciones estándar elevadas indicaron que probablemente en el fenómeno de la virulencia pueden estar implicados una serie de factores conjugados que hasta ahora no se han caracterizado.

De acuerdo con el análisis de las lesiones producidas por las mutantes, X. campestris 1459 y X. campestris pv campestris se observó

de manera congruente que existe una relación directa entre el incremento de la viscosidad generada en matraz y la virulencia cuantificada en las plantas. Se observó la misma tendencia respecto a la producción específica, es decir, a medida que se aumenta la producción específica se incrementa la virulencia de la cepa.

El análisis analítico y mediante espectroscopia de infrarrojo de los diferentes polímeros indicó que los altos porcentajes de acetilo son factores muy importantes para el incremento en el grado de fitopatogenicidad. Las interacciones intramoleculares muy probablemente podrían ser otro de los parámetros estrechamente ligados con la capacidad de virulencia en las cepas. En el taponamiento de los vasos vasculares de la planta los radicales acetilos podrían inducir una interacción entre las moléculas que componen la pared celular de los haces vasculares y el polímero.

De la serie de evaluaciones realizadas, uno de los parámetros que presentó poca correlación con respecto a la patogenicidad fue la concentración de gona producida en matraz, con excepción de los casos en donde se encontró asociado con altas viscosidades.

Este último análisis permite establecer que, aun cuando algunos parámetros están estrechamente asociados con la virulencia de las cepas existen otros factores biológicos intrínsecos en estas como en el huésped. Pueden mencionarse en este sentido las posibles diferencias en la capacidad de producción de enzimas celulolíticas y pécticas así como a la capacidad de aprovechamiento de los micronutrientes en las plantas.

El presente estudio llevó a establecer un método, aún empírico, que permite la selección y aislamiento de cepas de X. campestris. Es posible seleccionar y aislar cepas virulentas que generen alta viscosidad tomando como criterio de selección el área de la lesión en plantas infectadas con la bacteria. Sin embargo, con dicho criterio no se asegura que los valores individuales de acetilo, piruvico y concentración final del polímero sean elevados. Es posible seleccionar cepas productoras del biopolímero cuyo uso sea funcional para la perforación y reparación de pozos petroleros, así como para la aplicación hacia otros usos.

6.2 Recomendaciones

El fenómeno de la patogenicidad en las plantas es una interacción compleja, por lo que es necesario intensificar los estudios en esta área. Aun falta por investigar in vivo el comportamiento de la bacteria en la planta, es decir, ¿cual es el aprovechamiento de los micronutrientes en la planta?, ¿cuales o cuantos son los nutrientes mínimos e importantes para el desarrollo óptimo de la bacteria?. Existen otras interrogantes más que fallan por esclarecer, sin embargo, continuando con este estudio se pueden proponer los siguientes puntos como recomendaciones para estudios futuros:

a) Se recomienda completar el estudio con las mutantes caracterizándolas en lo que se refiere a la producción de enzimas celulolíticas y pécticas, determinando cinéticas y evaluando la actividad en cada una de ellas.

b) Como resultado de la mutación es posible que las mutantes sean protótrofas a micronutrientes de la planta, sería de gran interés comprobar en cuales micronutrientes lo son y si éstos determinan el desarrollo del microorganismo dentro de la planta.

c) Realizar pruebas para determinar si las mutantes que se obtuvieron son genéticamente estables ó inestables.

d) Preparar redisoluciones para comparar los reogramas de los distintos polímeros y observar el comportamiento de las viscosidades aparentes con respecto al esfuerzo de corte o con respecto al grado de deformación. Determinar si los índices reológicos n (índice de pseudoelasticidad), K (índice de consistencia)

de los polimeros de las mutantes obtenidas cumplen la función objetivo para su uso final en los pozos petroleros ó bien en otras aplicaciones.

e) Realizar diversos estudios en el campo. Aunque se puedan encontrar condiciones variables, sería conveniente buscar en campos cultivados, plantas enfermas cuya área de la lesión se encuentre entre los valores establecidos para una alta virulencia y aislar cepas silvestres con la intención de proceder así a obtener cepas para caracterizar su polimero y determinar si esta puede ser empleada en la producción de la goma xantana.

f) Debido a que los espectros se realizaron en sólido es recomendable realizarlos en líquido para comparar los resultados obtenidos.

g) Identificar los componentes moleculares que conforman los polimeros de las mutantes obtenidas y de la cepa silvestre así como del polimero producido por las cepas silvestres que se aislan.

h) Realizar determinaciones de peso molecular de cada unos de los polimeros obtenidos de las mutantes.

i) Las mutantes obtenidas ofrecen perspectivas para su estudio e integración de los aspectos de la biosíntesis del polimero. Por lo que es conveniente continuar este tipo de estudios.

ANEXO 1

LISTA DE MATERIAL Y DESCRIPCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS.

ANEXO I

LISTA DE MATERIAL Y DESCRIPCION DE MEDIOS DE CULTIVOS

Reactivos.

Todos los reactivos empleados fueron grado Q.P.

Acetona	(J.T. Baker)
Acido bórico	(J.T. Baker)
Acido cítrico	(J.T. Baker)
Acido clorhídrico.....	(J.T. Baker)
Acido sulfúrico	(J.T. Baker)
Agar nutritivo	(J.T. Baker)
Antrona	(J.T. Baker)
Bacto agar	(Difco)
Bacto dextrosa	(Difco)
Bacto skim-milk	(Difco)
Bacto peptona	(Difco)
Bicarbonato de sodio	(J.T. Baker)
Bromuro de potasio, grado espectro	(Merck)
Carbonato de calcio	(J.T. Baker)
Carbonato de sodio	(J.T. Baker)
Citrato de sodio	(J.T. Baker)
Clorhidrato de hidroxilamina	(Sigma Chemical)
Cloruro de tetrazolium	(Merck)
Cloruro férrico	(J.T. Baker)
Etanol	(J.T. Baker)
Extracto de levadura	(Difco)
Extracto de malta	(Difco)
Fosfato de potasio monobásico	(J.T. Baker)
Fosfato de potasio dibásico	(J.T. Baker)
Hidroxido de sodio	(J.T. Baker)
Hidroxilamina	(J.T. Baker)
Lactato deshidrogenasa, de músculo de conejo con 25 000 unidades , suspensión cristalina	
Metanol absoluto	(J.T. Baker)
Nicotinamida adenin dinucleótido reducido (NADH), β -dihidroxifosforidina nucleótida de levadura, grado III, contenido de 1.5 moles de agua por mol y 3 % de etanol cuando fué preparado.....	(Sigma Chemical, N-8129).
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	(Aldrich Chemical)
Oxido de zinc	(J.T. Baker)
Pentacetato de glucosa	(Sigma Chemical)
Perclorato férrico	(Sigma Chemical)
Sacarosa	(J.T. Baker)
Solución patrón de ácido pirúvico (40 mg/ml)	(Sigma Chemical, No 726-10)
Sulfato de amonio	(J.T. Baker)
Sulfato de magnesio	(J.T. Baker)
Trietanolamina	(Merck)

Equipo

Olla expres	(Presto, modelo 21 L)
Balanza analítica	(Sartorius 2432)
Balanza digital	(Mettler PC 4 400)
Campana de flujo laminar	(Velco)
Ultracentrífuga	(RC-5 Sorvall Duponts Instruments
Centrífuga clínica	(Solvat)
Espectrofotómetro	(Beckman, modelo 35)
Espectrofotómetro de infrarrojo	(Perkin Elmer 283-B ; Instituto de Química, UNAM).
Incubadora	(New Brunswick Scientific Co., 6 24)
Liofilizador	(Freeze Dryer 5, Labconco)
Molino de dentista	(Crescent Dental MFG Co.; Instituto de Química, UNAM.)
Parrilla agitadora	(Corning PC 353).
Potenciómetro	(Corning pH meter 125)
Prensa hidráulica	(Blackhawk, modelo EA-11 Instituto de Química, UNAM.)
Super Mixer, Vortex	(Lab-Line Instruments INC)
Viscosímetro	(Brookfield modelo LVT)
Cámara de humedad	1 m de ancho por 70 cm de largo .
Invernadero	Colegio de post-graduados, Chapingo
Macetas	Colegio de post-graduados, Chapingo
Semillas de <i>Brassica oleracea</i>	Colegio de post-graduados, Chapingo
Tierra estéril	Colegio de post-graduados, Chapingo

Medios de cultivo.

Medio de extracto de levadura y malta (YM). (Jeans et al, 1976).

Composición:

Extracto de levadura 3 g/l

Extracto de malta 3 g/l

Bacto-peptona 5 g/l

Glucosa 10 g/l

Ágar 20 g/l (solo en el caso que se necesite

Cloruro de tetrazolium * 10 g/l

Medio de levanas .

Bacterias gram- positivas como Bacillus y Streptococcus y bacterias gram-negativas (Pseudomonas, Xanthomonas, Enterobacter y Acetobacter) producen la enzima levansacarosa que convierte la sacarosa a levanas y glucosa. La levana es esencialmente un β -D fructano con uniones 2-6 en donde algunos residuos β -D fructofuranósidos llevan ramificaciones O-1 (Kenne y Linderberg, 1982)

Composición

Ágar nutritivo 20 g/l

Sacarosa 50 g/l

Preparación

Se pesan cada uno de los componentes de los medios, se disuelven con agua y se afora a la cantidad deseada con agua destilada. Posteriormente se esteriliza en el autoclave a 15 lb/pulg² (120°C) de presión durante 15 min. En el caso de medio sólido, una vez estéril el medio y con una temperatura moderada (antes de solidificarse el agar) se vacía en cajas de Petri estériles (aproximadamente 20 ml de medio en cada caja).

* El cloruro de tetrazolium se agrega con los componentes del medio sólido únicamente como un diferenciador de colonias , ya que las colonias se tornan de un color rosa a rojo cuando el pH del medio se vuelve ácido.

Medio para la producción del polímero extracelular de X. campestris (Medio de producción)

(Guintero et al., 1983).

Composición:

Sacarosa	24 g/l
NH_4SO_4	1 g/l
MgSO_4	0.23 g/l
Ácido cítrico	1.3 g/l
KH_2PO_4	3.9 g/l
CaCO_3	0.0024 g/l
H_2BO_3	0.0048 g/l
ZnO	0.0072 g/l
FeCl	0.0014 g/l
pH	7.0

Preparación

Se pesa la sacarosa y se disuelve en el 10 % del volumen total del medio a preparar en agua destilada. Los demás componentes se pesan y se disuelven en el 90 % del volumen restante, se ajusta al pH con lentejuelas de NaOH. Se esteriliza la sacarosa disuelta y los componentes del medio (ambos en su matraz correspondiente) a 120° C por 15 min.

Antes de inocular se mezcla la sacarosa estéril con los componentes del medio.

ANEXO 2

ANALISIS DE ESPECTROS DE INFRARROJO.

ANEXO 2

ANÁLISIS DE ESPECTROS DE INFRAROJO

Los análisis de los espectros se realizaron comparativamente con el espectro del polímero de la cepa normal X. campestris 1459.

Inicialmente se compararon los espectros de la cepa silvestre X. campestris pv campestris (figura A-1). Las principales diferencias en ambos polímeros se presentan en la tabla A-1. En ambos espectros se observa que las bandas que se encuentran a los 1113.13 cm⁻¹ presentan mayor intensidad que la banda de los 1071.98 cm⁻¹. Estas bandas indican que existe mayor asociación intermolecular.

Con respecto a la concentración de acetilos (1720 y 1403 cm⁻¹) las bandas indican que las concentraciones son similares en ambos polímeros y de acuerdo con su determinación analítica, es ligeramente superior en el polímero de X. campestris pv campestris. Sin embargo esta diferencia es mínima y se podría inferir que se encuentra dentro del error experimental.

Las diferencias observadas (tabla A-1) indican que muy probablemente la composición de azúcares del polímero de la cepa silvestre sea diferente a la del polímero de la X. campestris 1459.

Las principales diferencias entre el espectro del polímero de la mutante no virulenta X. campestris 17N53 y del polímero de X. campestris 1459, se reportan en la tabla A-2. Es importante remarcar que en este polímero se hace evidente la intensidad de las bandas que corresponden a la vibración molecular de las interacciones intermoleculares (1071.90 cm⁻¹) siendo ligeramente más intensa.

TABLA A-1

PRINCIPALES DIFERENCIAS DEL E.I DEL POLÍMERO
DE X.c.c.

Número de Onda (cm^{-1})	Bandas diferentes con respecto a E.I del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1525-1482	Dos bandas presentes indicando mayor concentración de pirúvicos y la presencia de éstos grupos en varias partes de la cadena (tales datos concuerdan con datos analíticos, ver tabla).
1297-1248	En esta región se presentan 3 bandas que indican que los grupos CH_2OH se encuentran más dispersas en la cadena quizás debido a que es muy probable que se encuentre más ramificada.
1071.98	La asociación intramolecular tiende a ser más predominante
771 y 785	Bandas que indican la presencia de azúcares con anillos furanósidos.
618.94	La intensidad de la banda es ligeramente mayor indicando mayor presencia de manosas en la cadena.
574, 543, 499, y 480	Pequeñas bandas que indican la presencia de diferentes azúcares constituyentes del polímero.

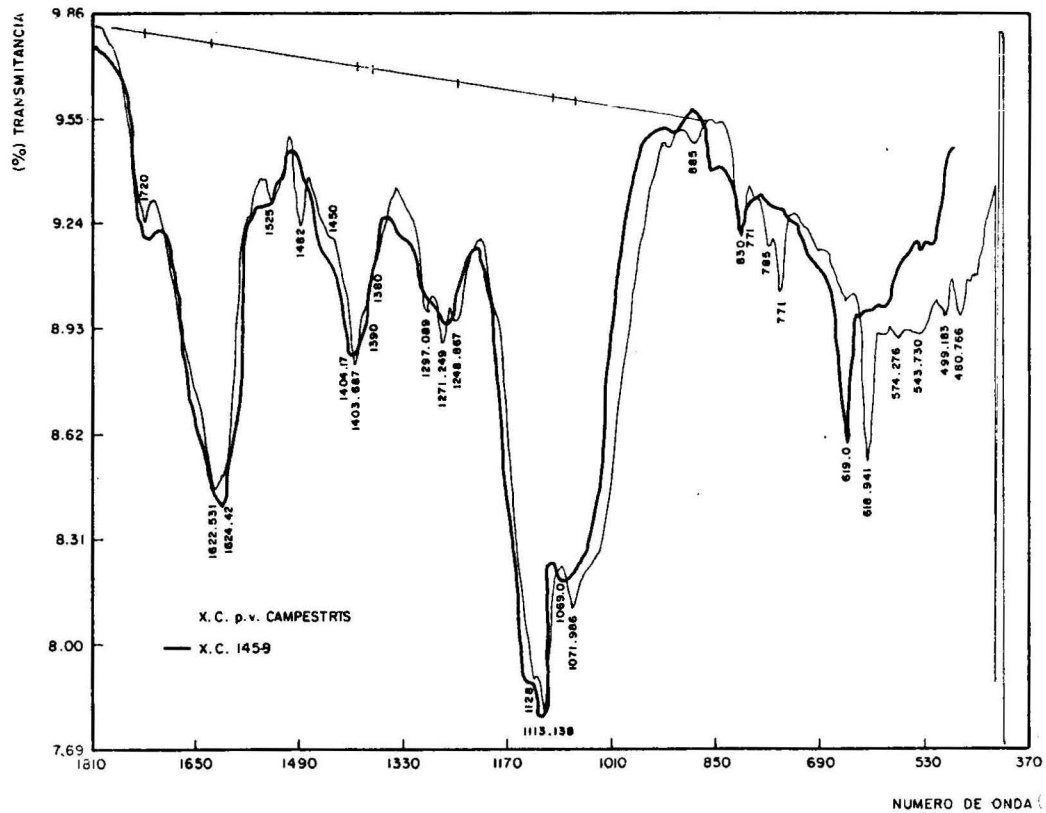


FIGURA A-1 Espectro de infrarojo de la cepa silvestre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en comparación con el espectro del polímero de *X.campestris* 1459.

TABLA A-2

ESPECTRO DEL POLIMERO DE LA MUTANTE X.campestris 17NS3

Número de onda (cm ⁻¹)	Bandas diferentes con respecto al E.I. del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1720	Mayor intensidad, por lo que se sugiere que tenga alto porcentaje de acetilos (concuerta con datos analíticos) mayor intensidad e inclusive se presentan pequeñas bandas, ambos datos indican que existen más ácidos carboxílicos y su presencia en distintos puntos de la cadena.
1624.03	
1567 y 1533	Bandas más intensas indicando que los pirúvicos se encuentran en mayor concentración, las distintas bandas pueden inferir la probable presencia de este grupo en diferentes puntos de la cadena.
1450	-CH ₂ -
1247.67	Mayor intensidad, mayor cantidad de CH ₂ OH libres así como mayor ramificación.
1115.68	Prevalece la interacción intermolecular.
1067.41	Banda más intensa, significando que tiende a presentar, más asociación intramolecular.
771.3	Mayor intensidad, sugiriendo mayor cantidad de glucosa, constituyentes de las cadenas poliméricas.
537.09	Sustitución de algún azúcar diferente con los azúcares componentes de la cadena.

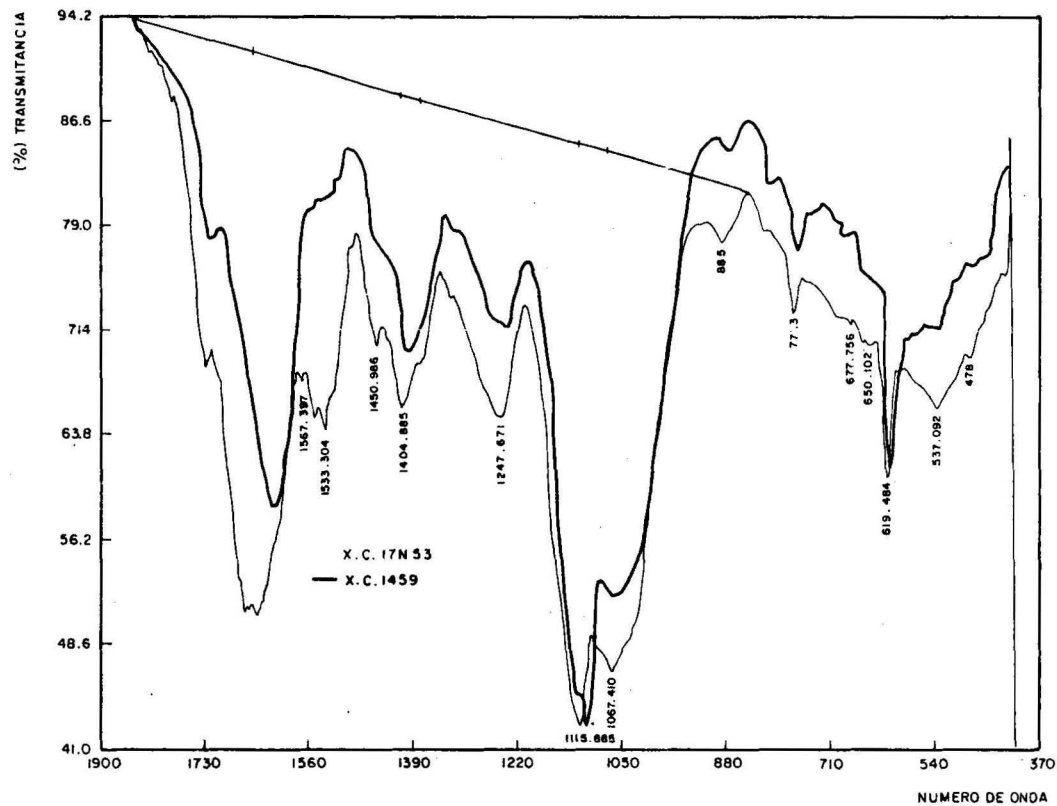


FIGURA A-II Espectro del polímero de la mutante avirulenta *Xanthomonas campestris* 18NS3 en comparación con el espectro del polímero de *X. campestris* 1459

Uno de los polímeros que difieren apreciablemente en su composición estructural en consideración con el espectro del polímero de la cepa madre se muestra en la figura A-3, este espectro corresponde al polímero producido por la cepa no virulenta X. campestris 27NY12.

Las principales diferencias se encuentran en la tabla A-III. Como puede notarse, esta goma es muy diferente en la composición de los grupos funcionales y en su estructura. De tal modo que puede sugerirse que este polímero no sería una xantana típica.

En la figura A-4 se presenta el espectro del polímero producido por la mutante virulenta X. campestris 18RT5, como se observa el espectro presenta un rango de amplitud mayor, debido a que va desde los 4000 cm^{-1} hasta los 400 cm^{-1} . Sin embargo el análisis se realizará únicamente en el rango de 1724 cm^{-1} hasta los 430 cm^{-1} considerando que es el rango en el que se observa la vibración de los grupos funcionales que componen el polímero. Las diferencias remarcadas en el polímero de la mutante se indican en la tabla A-IV.

Se hace énfasis en que la diferencia más marcada en este espectro es la mayor intensidad de la banda de la asociación intramolecular (1066 cm^{-1}). Como se verá en los siguientes espectros, esta banda predomina y la banda de la asociación intermolecular tiende a presentar una intensidad ligera. Es importante señalar que dichos espectros corresponden a cepas altamente virulentas.

El espectro del polímero de la mutante virulenta X. campestris 17NS1 y su comparación con el espectro del polímero de X. campestris

TABLA A-III

CACTERISTICAS DEL E.I DEL POLIMERO PRODUCIDO PARA LA
MUTANTE X.campestris 27NY12

Número de onda (cm^{-1})	Bandas diferentes con respecto al E.I. del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1729 - 1708	Se presentan pequeñas bandas que evidencian que los grupos acetilos se encuentran en diferentes partes de las cadenas.
1534-1572	Las bandas que se observan indican que los pirúvicos se encuentran en mayor proporción y en distintos sitios en las cadenas poliméricas
1663-1612	bandas que indican la presencia de los grupos carboxilicos en distintos lugares de las cadenas del polímero.
1450	-CH ₂ -
113.85	Más intensidad, mayor asociación intermolecular
1066.94	Banda no muy perceptible por lo que sugiere que existe muy poca asociación intramolecular.
885-530	Indican la presencia de distintos grupos cetálicos o hemicetálicos de azúcares constituyentes de las cadenas poliméricas. Asimismo se remarca la diferencia en su composición, la sustitución de distintos carbohidratos.

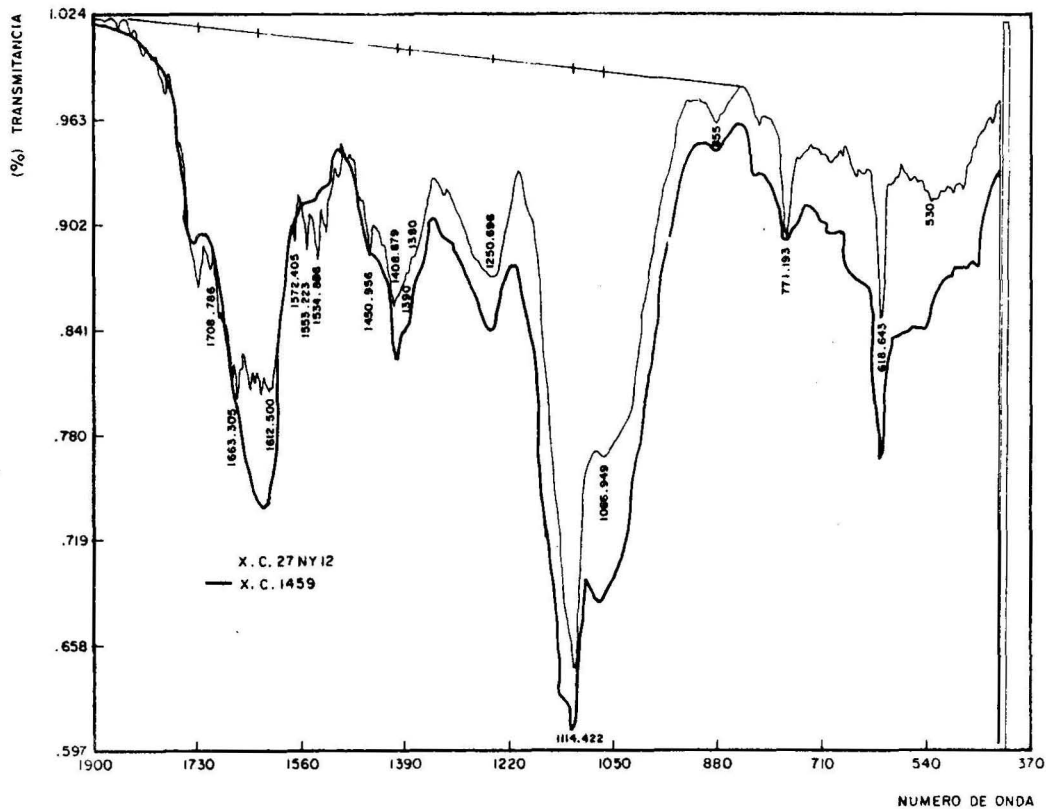
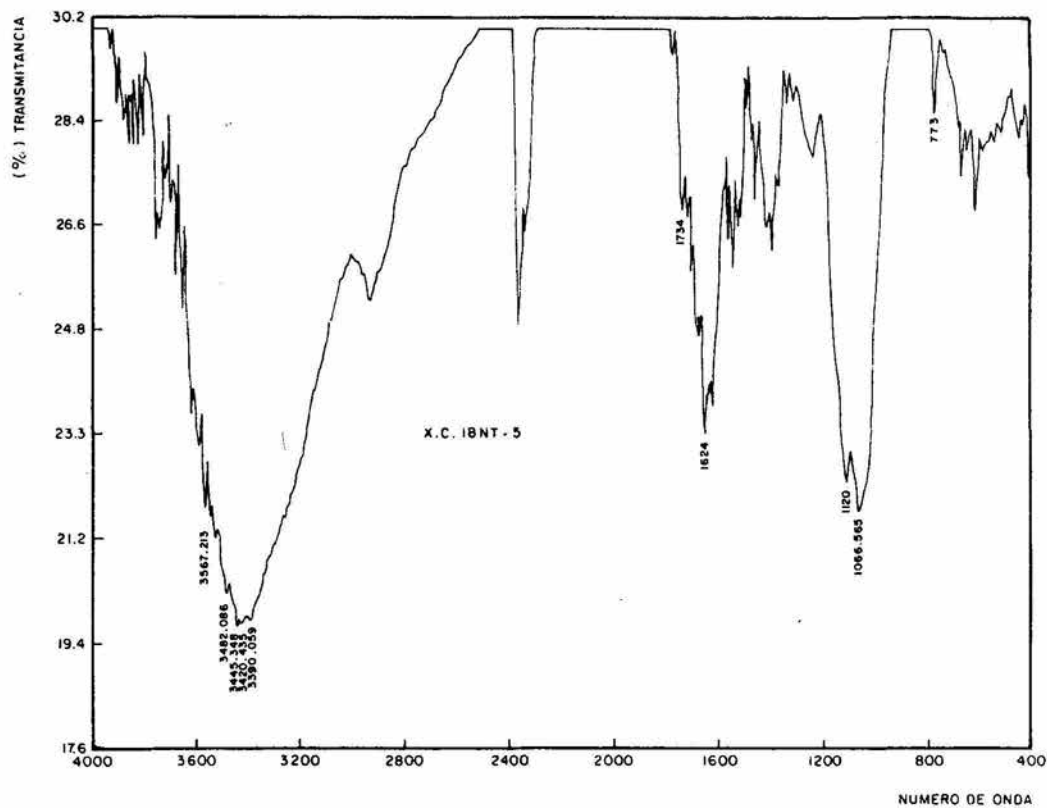


FIGURA A-3 Espectro del polímero de la mutante avirulenta X.campestris 27NY12 y su comparación con el espectro del polímero de X.campestris 1459

TABLA A- IV

PRINCIPALES DIFERENCIAS DEL E.I DEL POLIMERO PRODUCIDO
POR X.campestris 18 NT5

Número de Onda (cm^{-1})	Bandas diferentes con respecto al E.I. del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1056.56	Es de vital importancia remarcar esta banda ya que presenta mayor intensidad lo que produce una mayor asociación intramolecular entre las cadenas poliméricas.
1120	Pequeña banda, indicando menor asociación intermolecular.
1420-1511	Grupos pirúvicos distribuidos en diferentes partes de las cadenas.
773-459	Se encuentran solamente dos bandas distintas indicando la sustitución y/o presencia de 3 azúcares distintos constitutivos de las cadenas del polímero.

FIGURA A-4 Espectro del polímero de la mutante avirulenta *X.campestris* 18NT5

1459 se presenta en la figura A-V. Sus principales diferencias se encuentran consignadas en la tabla A-5. Es de hacer notar que la estructura del polímero de la mutante es muy semejante al polímero de la cepa normal, solo que la intensidad de las bandas de 1729 cm^{-1} a 1067 cm^{-1} es mayor.

En la figura A-VI se ilustra el espectro del polímero producido por la mutante X. campestris 17NT4, tal polímero presenta una gran similitud con respecto al de la cepa de comparación. En la tabla A-6 se indican las principales diferencias.

Es posible que en estos últimos espectros, en donde la intensidad de las bandas es mayor, indiquen que la concentración de los principales grupos funcionales sea elevada. Lo que puede sugerir que existan cambios en su peso molecular.

El espectro del polímero producido por la mutante X. campestris No se presenta en la figura A-VII. Como se observa, el corrido del espectro se realizó de igual forma que para la mutante X. campestris 18NT 5.

En la tabla A-7 se dan las diferencias entre el polímero de la mutante y la cepa X. campestris 1459. De acuerdo con el espectro de la mutante virulenta X. campestris 17N (figura A-VIII) se evidencia que no existen diferencias estructurales significativas, sin embargo, sus principales diferencias son las indicadas en la tabla A-8

Por último, el espectro del polímero de la mutante virulenta X. campestris 18N se muestra en la figura A-IX. Las principales diferencias se resumen en la tabla A-9.

TABLA A-5

DIFERENCIAS OBSERVADAS EN EL E.I DEL POLIMERO DE LA MUTANTE
X.campestris 17 NS1

Número de onda (cm^{-1})	Diferencias en las bandas con respecto al polímero de <u>X.campestris</u> 1459.
1067.86	Predominancia de dicha banda indicando mayor asociación intramolecular
1115.53	Banda poco intensa señalando que existe poca asociación intermolecular
1729	Mayor intensidad, por lo tanto esto indica mayor concentración de acetilo (correlacionan <u>do</u> con los datos analíticos)
1623	Mayor intensidad en donde se evidencia que el polímero tiene mayor cantidad de carboxilos libres
1248	Mayor intensidad indicando mayor ramificación y Ca_2OH libres de las partes terminales de los azúcares.

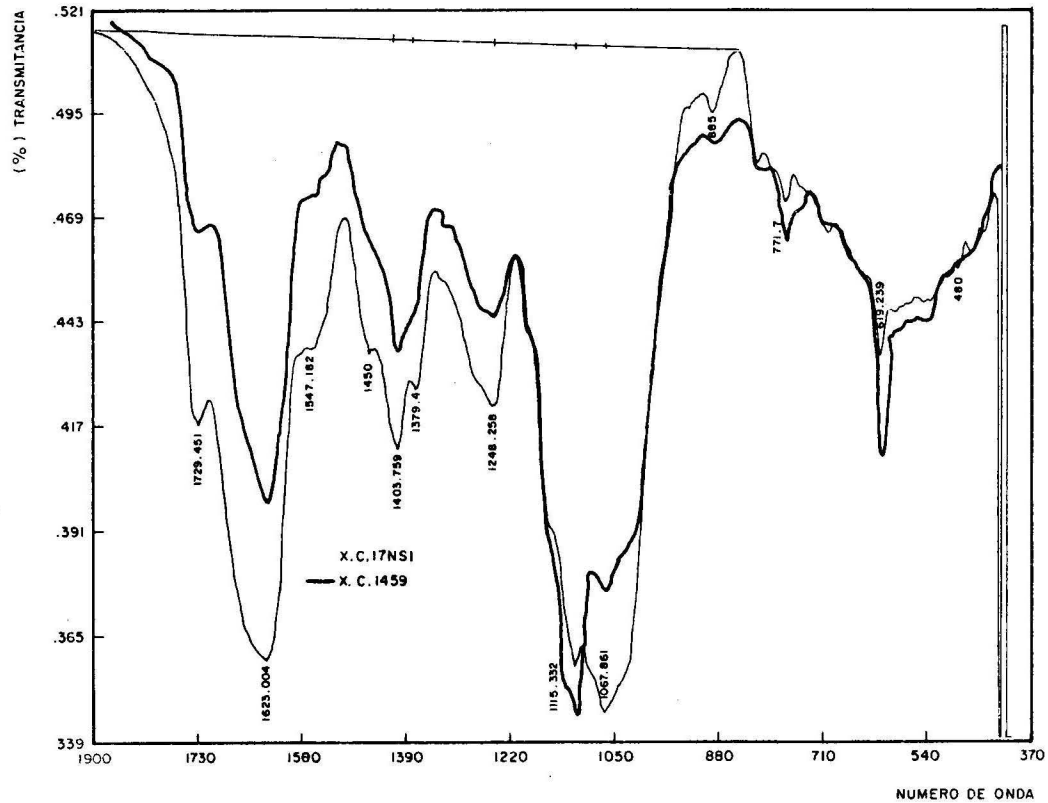


FIGURA A-V Espectro del polímero de la cepa virulenta X.campestris 17NS1 y su comparación con el espectro del polímero de X.campestris 1459

TABLA A-6

ESPECTRO DE INFRAROJO DEL POLIMERO DE LA MUTANTE
VIRULENTE X.campestris 17 NT4

Número de onda (cm^{-1})	Diferencias con respecto a las bandas del E.I del polimero de <u>X.campestris</u> 1459
1067.34	Banda predominante con mayor intensidad, lo que indica que hay una mayor tendencia de Asociación intramolecular en las cadenas poliméricas
111.4	Banda de menor intensidad que indica la asociación intermolecular de las cadenas.
1729-1247	Existe mayor intensidad en el corrido de las bandas, lo que indica mayor concentración de acetilos (coincide con datos analíticos), mayor cantidad de carbohidratos libres y la <u>ca</u> dena principal probablemente más grande.

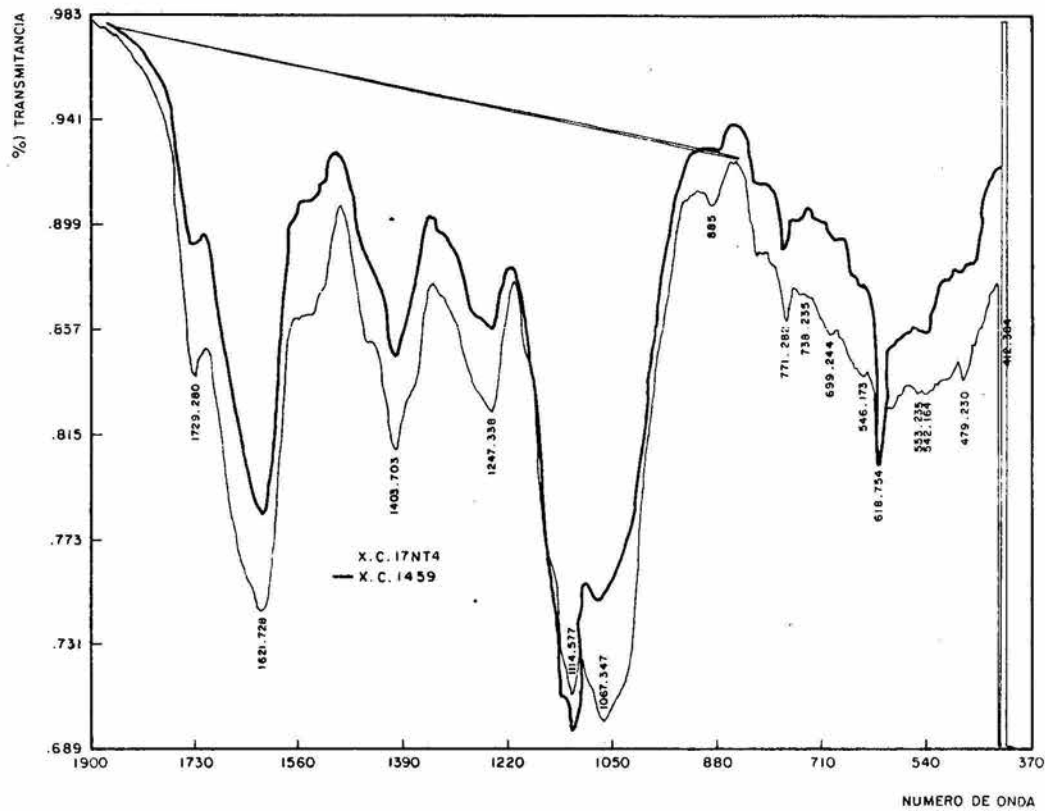


FIGURA A-VI Espectro del polímero de la cepa virulenta X.campestris 17NT4 y su comparación con el polímero de X.campestris 1459

TABLA A-7

E.I DEL POLIMERO PRODUCIDO POR LA MUTANTE VIRULENTE
X.campestris N6

Número de Onda (cm^{-1})	Diferencias con respecto a las bandas del espectro del polímero de la <u>X.campestris</u> 1459
1065	Presentándose esta única banda, lo que indica que hay un fuerte predominio de la asociación intramolecular
1724	Bandas que indican la presencia de acetilos en otras partes de la cadena polimérica
1622	Bandas que indican distintos grupos carboxilatos en las cadenas
1420-1520	Bandas que indican que los pirúvicos se encuentran en distintas partes de las cadenas del polímero
617	Banda poco intensa indicando menor presencia de manosas
890-400	Bandas diferentes, señalando la presencia de grupos cetálicos y hemicetálicos de azúcares diferentes en sustitución a los azúcares normales.

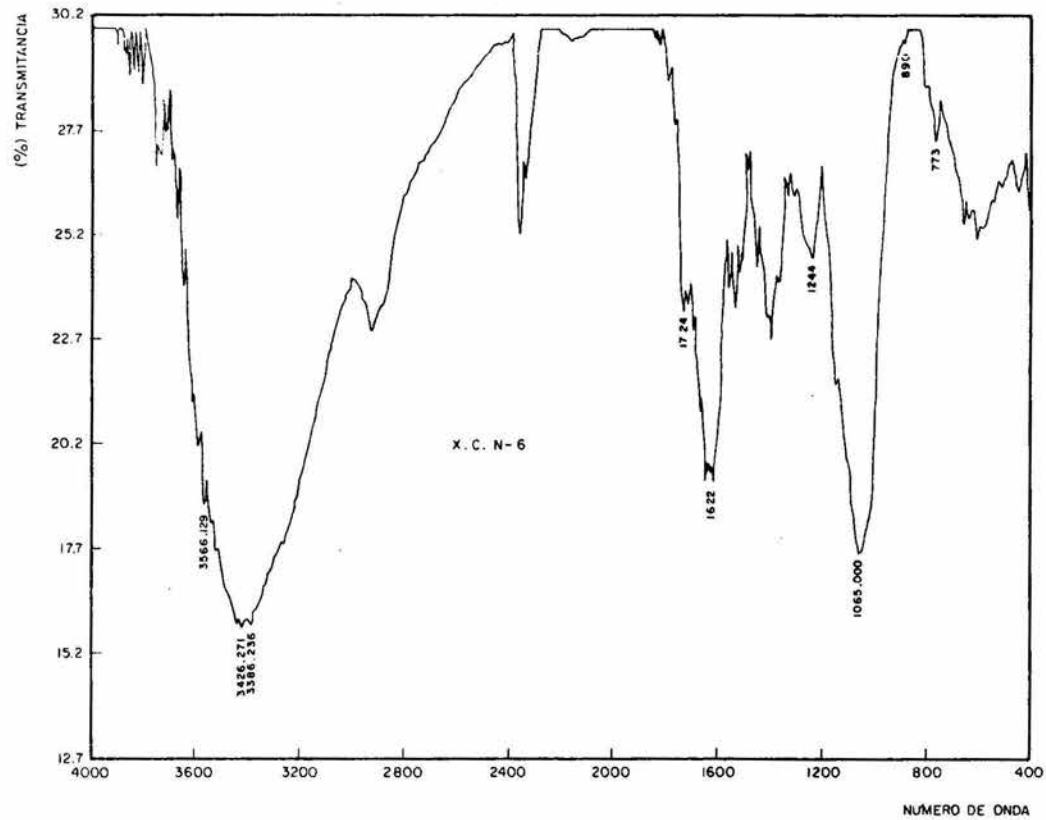
FIGURA A-VII Espectro del polímero de la cepa virulenta *X. campestris* N6

TABLA A-8

PRINCIPALES DIFERENCIAS DEL POLÍMERO PRODUCIDO POR LA
MUTANTE VIRULENTE X.campestris 17N

Número de onda (cm^{-1})	Diferencias con respecto a las bandas del E.I del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1069.24	Banda de mayor intensidad, señalando que predomina la asociación intramolecular
1114.0	Pequeñísima banda de interacción intermolecular
1728-1247	La intensidad de la banda es mayor, por lo que el polímero presenta mayor concentración de acetilos (corresponde a datos analíticos) mayor cantidad de CH_2OH libres.
480.78	Banda que indica la sustitución y/o presencia de otro azúcar diferente a los que constituyen al polímero.

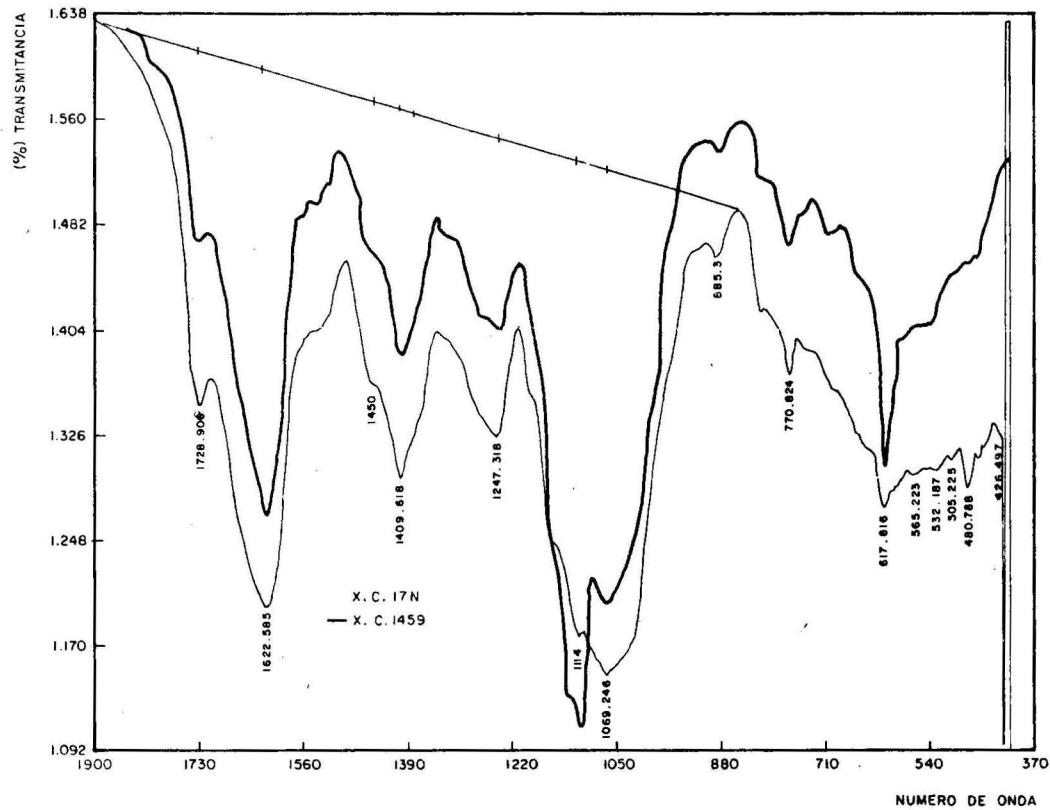


FIGURA A-VIII Espectro de infrarojo del polímero de la mutante virulenta X.campestris 17N y su comparación con el espectro del polímero de X.campestris 1459.

TABLA A-9

CARACTERISTICAS DEL E.I DEL POLIMERO PRODUCIDO POR LA
 MUTANTE VIRULENTA X.campestris 18N

Número de Onda (cm ⁻¹)	Diferencias, con respecto al E.I del polímero de <u>X.campestris</u> 1459
1068.101	Banda de mayor intensidad, predominando la interacción intramolecular
1042.4	Banda casi no perceptible en donde muestra una nula interacción intermolecular (asociación de moléculas de la misma cadena).
1520-1533	Bandas muy diferentes que indican la presencia de grupos pirúvicos en distintas partes de las cadenas poliméricas
1727 a 1248	La intensidad de las bandas es mayor indicando que la concentración de acetilo es mayor, también los grupos CH ₂ OH son mayores
820 y 481	Bandas que pueden evidenciar la presencia de azúcares diferentes a los constituyentes normales del polímero.

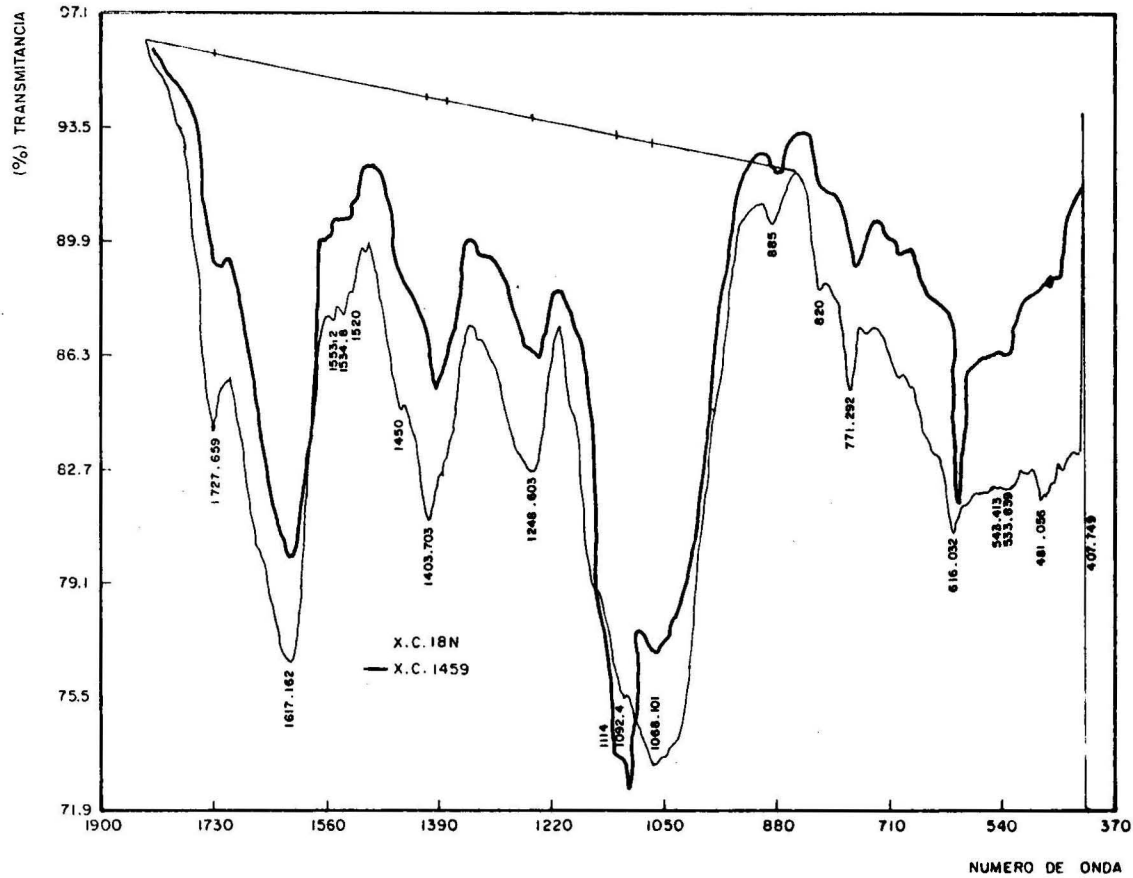


FIGURA A-IX Espectro del polímero de la mutante virulenta *X.campestris* 18N y su comparación con el espectro del polímero de *X.campestris* 1459

Bibliografía

- Adelberg, A. E., Nandori, M. Chem. Chin Chem. G. (1965). "Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina in E. coli K-12" Biochem. and Biophys. Research Communications 18(5-6): 788-795.
- Agrios, N.G. (1978). Plant pathology. 2ed. Academic Press, New York.
- Albersheim, P. y Anderson-Prouty, J. A. (1975). "Carbohydrates, proteins, cells surfaces and biochemistry of pathogenesis". Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 31-52.
- Bacon, D. S. (1979). "Factors limiting the action of polysaccharide degrading enzymes". en Microbial polysaccharides and polysaccharases. Society for General Microbiology, Academic press, New York. p. 268-284
- Bain, D. C. (1955). "Resistance of cabbage to Black rot". Phytopathology, 45: 35-37.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (editors) (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Cadmus, M. C., Rogovin, P. y Burton, K. A. (1976). "Colonial variation in Xanthomonas campestris NRRLB-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain". Can. J. Microbiol. 22: 942-948
- Clayton, E.E. (1925). "Second progres report of Black rot (Pseudomonas campestris) investigation on Long Island: seed infection and seasonal

- development" (Abstract). Phytopathology, 15:46-49.
- Cook, A.A., Walker, C. J. y Larson, H. R. (1952). "Relation of the Black rot pathogen to cabbage seed". Phytopathology, 42: 316-319.
- Cook, A. A., Walker, C. J. y Larson, H. R. (1952 a). "Studies on the disease cycle of Black rot of crucifers". Phytopathology, 42: 162-167.
- Corey R. y Starr, P. M. (1957). "Colony types of Xanthomonas phaseoli". Phytopathology, 74: 137-140
- Cottrell, I. W. y Kang, S. S. (1978). "Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications". Develop. in Ind. Microbiol. 19: 127-135
- Daniels, J. M. , Barber, E. C., Turner, C. P. Cleary, G. M y Sawczyk, K. M. (1984). "Isolation of mutants of Xanthomonas campestris pv. campestris showing altered pathogenicity". J. of Gen. Microbiol. 130: 2447-2455.
- Dea, M. C., Mckinnon, A.A. y Rees, A. D. (1972). "Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion : reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans". J. Mol. Biol., 68: 153-72.
- Dea, M. C. (1979). "Interactions of ordered polysaccharide structures-synergism and freeze thaw phenomena". en Polysaccharides in foods, 1st edition, chap 15, Butterworths, London, p. 229-247.

- Dea, M. C. y Morris, E. R. (1977). "Extracellular polysaccharides", en American Chemical Society, Symposium, Series, Sandford y Lashin, No. 45. 174-182 p.p.
- Dea, M. C., Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J., Barnes, H. A. y Price, G. (1977). Carbohy. Res. In press.
- Domen, Y. H. y Alvarez, M. A. (1978). "Detection of A. campestris in soil using a direct immunofluorescent technique". Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria I. Station de Pathologie végétale et Phytobacteriologie, Inra, Angers : 301-306.
- Douson, W. J. (1939). "On the systematic position and generic names of the gram-negative bacterial plant pathogens". Zentralblatt für Bacteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Abst. 2 100: 177-193.
- Fareed, V. y Percival, E. (1976). "Structural investigations of the extracellular polysaccharide elaborated by 519, a Xanthomonas type bacterium". Carbohydrate Research, 49: 427-438.
- Galindo, E. (1985). "Polisacáridos microbianos" en: Prospectiva de la biotecnología en México, R. Quintero (compilador) p. 65-92. Fundación Javier Barros Sierra, CONACYT, México, D.F.
- Galindo, E., Ramírez, M.E., Flores, F., Brito, E., Figueroa, S., Torres, J. y García, J. "Desarrollo de un proceso a nivel piloto para la producción de goma xantana grado alimenticio". Reporte técnico al CONACYT. Enero 1987.

- García, A.M. (1979). Patología Vegetal Fr. Activa, Ed Limusa 47-93 pp.
- Gordienko, F. I. (1946). "The nature and modes of infection of the most important bacterial diseases of cabbage". Khar'kov 120-130.
- Gorin, J. A. F. y Spencer, T. F. (1961). "Structural relationship of extracellular polysaccharides from phytopathogenic Xanthomonas sp. Part. I. Structure of extracellular polysaccharide from X. stewartii". Can. J. Chem. 39: 2282-2289.
- Goto, M. (1971). "Interrelationship between colony type, phage susceptibility and virulence in Xanthomonas oryzae". J. Appl. Bact. 35: 505-515.
- Griffin, J.M. y Baker, E. A. (1976). "Bacterial wilt of wallflowers caused by Xanthomonas campestris". Plant. Pathology, 25: 108-114.
- Hadjivassiliou, A. A. y Rieder, S. V. (1968). "The enzymatic assay of piruvic and lactic acids: a definitive procedure". Clinica Chimica Acta, 19: 357-361.
- Harding, M. A., Stewart, C. y Prucha, J. M. (1904). "Vitality of the cabbage Black rot germ on cabbage seed." N. N. State Agr. Exp. Sta. Bul. 251.
- Hodgson, R., Peterson, H. M. y Ricker, J. (1949). "The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings". Phytopathology 39: 47-62.

- Amardan, S. H., Harman, G. E., Nedrow, L. B. y Binotto, V. L. (1980). "Eradication of Xanthomonas campestris the causal agent of Black rot, from Brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite". Phytopathology, 70: 127-131.
- Hunter, E.J., Abawi, S.G. y Becker, K.F. (1975). "Observation on the source and spread of Xanthomonas campestris in an epidemic of black rot in New York". Plant. Dis. Repr. 59: 384-387.
- Husain, A. y Klean, A. (1958). "Relation of slime production to mechanism of witing and pathogenicity of Pseudomonas solanacearum". Phytopathology, 48: 155-165.
- Isaacs, F. E., Kestel, L. y Lonberg, B. (1975). "Structure of extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris". Carbohydr. Research, 45: 275.
- Jauch, C. (1973). Patología vegetal 2ed. Ateneo, p. 271
- Jean, A., Rogovin, P., Cadmus, M.C., Silman, R. W. y Knutson, G. A. (1976). "Polysaccharide (xanthan) of Xanthomonas campestris NRRL B-1459. Procedures of culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis". Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, Bulletin No. ARS-NC-51.
- Kang, K. S. y Cotrell, I. W. (1979). "Microbial polysaccharides" en Microbial technology, 2a ed. Vol. 1. Academic Press Inc.
- Kelco, Division of Merck & Co. Inc. (1981). "Goma x'antica/ Keltrol/ Kelzan. Un biopolisac'arido natural para el control cient'ifico del agua". 2 ed.

- Lalman, A. (1969). "How bacteria damage crops. Reprinted from How crops grow-A century later". Bulletin 708 of the Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven. p. 128-151
- Lenne, L. y Linderberg, B. (1973). "Bacterial polysaccharides" en The polysaccharides, vol 2, chap. 5. Academic Press Inc. p. 287-353.
- Kidby, D., Sandford F., Herman, A. y Cadmus, M. (1977). "Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability". Applied and Environmental Microbiology 33(4) : 840-845.
- Kliciewicz, M. J. y Pound, S. G. (1961). "Studies on control of Black rot of crucifers by treating seeds with antibiotics". Phytopathology, 51: 495-500.
- Knutson, C.A. (1975). (No publicado). Citado por Jeans et al., 1976.
- Komisch, J., Lasicks, J. y Hurst, M. (1977). "Production and characteristics of the exocellular polysaccharide in mutant strains". Folia Microbiologica 2: 12-18.
- Kuan L. T., Minsavage, G. V. y Shadd, N. W. (1986). "Aerial dispersal of Erwinia campestris pv campestris from naturally infected Brassica campestris". Plant Disease 70: 409-413.
- Kusay, P. G. (1972). "Preservation of microorganisms". Process Biochemistry, July: 24-26.

- Leach, G. J. Lilly, G. V., Wilson, A. W. y Purvis, R. M. (1957). "Bacterial polysaccharides: the nature and functions of the exudate produced by *A. phaseoli*". Phytopathology 47: 59-112.
- Lindenmann, J. Constantinidou, H. Barchet, A. y Upper, C.D. (1982). "Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation active bacteria". Appl. Environ. Microbiol. 44: 1059-1063.
- Mc. Comb, E.A. y Mc Cready, R. M. (1957). "Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction". Anal. Chem. 29: 819-821.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Moraine, R. A. y Rogovin, P. (1971). "Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control". Biotechnol. Bioeng. 22(3): 381-391
- Morris, E.R., Rees, D. A., Thom, D. y Welsh, E.J. (1977). "Conformation and intermolecular interactions of carbohydrate chains". J. of Supramolecular structure 6: 259- 274
- Morris, E. R., Rees, D. A., Young, G., Walkinshaw, D. M. y Darke, A. (1977a). "Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host". J. Mol. Biol. 110: 1-16.
- Naasivayam, L., Rasachandra, K. H. y Appalah, B. (1971). "Studies on the

biochemical changes in cabbage plants infected with Xanthomonas campestris (Pav.) Dow. Phytopathol. Medica 10(11): 63-67.

National Academy of Sciences (1981). Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Vol. 1. Lima.

Noda, T., Sato, I., Kobayashi, H., Iwasaki, S. y Onda, S. (1960). "Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by Xanthomonas campestris pv. oryzae". Annals. of phytopathological Society of Japan 49: 663-666.

Panopoulos, J. N. y Peel, C. R. (1985). "The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids". Ann. Rev. Phytopathol. 23: 381-419

Powell, B. A. (1979). "Structure, solution properties and biological interactions of some microbial extracellular polysaccharides" en Microbial Polysaccharides and Polysaccharides. Society for General Microbiology. Ed. Academic Press, New York 117-159 p.p.

Quintero, R., E. Galindo, L. Casas, F. Bastarrachea, M. Ruiz, F. Serrano y M. Maya. "Desarrollo de un biopolímero de xantana a partir de Xanthomonas campestris y melazas industriales". Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Reporte Técnico al IMP # 3, Febrero a Mayo de 1962 (23 pags. Confidencial).

Quintero, R., E. Galindo, L. Casas, I. Vichido, B. Torrestiana, M.E. Ramírez, M. Ruiz, F. Serrano, M. Maya, G. Maldonado, S.

- Gederborg, F. García, L. Fucickovsky, E. Brito y J. Torres.
 "Escalamiento del proceso de producción de un biopolímero"
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Reporte técnico al
 IMP # 1 Julio a Sep (1963) (106 pags. Confidencial).
- Quintero, R., E. Galindo, L. Casas, I. Vichido, B. Torrestiana, M. E. Ramírez
 A. Jaramillo, M. Ruiz, F. Serrano, M. Maya, G. Maldonado, J. Muro,
 F. García, A. García, L. Fucickovsky, E. Brito y J. Torres.
 "Escalamiento del proceso de producción de un biopolímero" Instituto
 de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Reporte técnico # 3 al IMP
 Dic. (1963) a Marzo (1964) (106 pgs Confidencial).
- Quintero, R., E. Galindo, L. Casas, B. Torrestiana, M. E. Ramírez, M. Ruiz,
 F. Serrano, M. Maya, G. Maldonado, A. Jaramillo, J. Muro,
 F. García, A. García, E. Brito y J. Torres. "Escalamiento del
 proceso de producción de un biopolímero " Instituto de
 Investigaciones biomédicas, UNAM, Reporte técnico # 4 al IMP (100 pgs
 Confidencial).
- Quintero, R., E., Galindo, L. Casas, B. Torrestiana, M. E. Ramírez, M. Ruiz,
 F. Serrano, M. Maya, G. Maldonado, A. Jaramillo, J. Muro, F. García
 A. García, E. Brito, J. Torres. "Escalamiento del proceso de
 producción de un biopolímero". Instituto de Investigaciones
 Biomédicas, UNAM. Informe único al IMP del convenio modificatorio .
 Julio a Octubre de 1964 (195 pgs Confidencial).
- Rees, D. A. (1977). Polysaccharide chains . 2nd ed. London: Chapman and
 Hall.

- Roth, I. (1951). "Physiological aspects of injury caused by Xanthomonas campestris in vascular tissue". Bull. Res. Council, Israel, 10: 271-274
- Sandvik, E. I. y Maerker, J. M. (1977). "Extracellular polysaccharides" American Chemical Society, Symposium Series 45, Sanford y Laskin (Eds.) p. 242-264
- Shaad, M. N. (1978). "Use of direct and immunofluorescence test for identification of Xanthomonas campestris". Phytopathology, 68: 249-252
- Shaad, M. N., y Donaldson, R. C. (1980). "Comparison of two methods for detection of Xanthomonas campestris in infected crucifer seeds". Seed, Sci. & Technol., 8: 363-391.
- Schaad, M. N., Gabrielson, R. L., y Milanax, M. M. (1980). "Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of Xanthomonas campestris from crucifer seeds". Applied and Environmental Microbiology, 59 (4): 803-807.
- Shaad, M. N. y White, C. W. (1974). "A selective medium for soil isolation and enumeration of Xanthomonas campestris". Phytopathology, 64: 876-880
- Shackleton, D.A. (1962). "A method for detection of Xanthomonas campestris in Brassica seed". Nature London p. 1983.
- Sharma, B. R. Swarup, V.P. y Chatterjee, S. S. (1977). "Resistance to Black rot disease (Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson, in cauliflower"

- Silverstein, M. R., Clayton, O.B., Terence, C. M. (1974). Spectrometric identification of organic compounds. 3a ed. Ed. V. Wiley. New York.
- Smith, E. F. (1897). "Pseudomonas campestris (Pammel). The cause of a brown rot in crucifers plants". Centralbl. f. Bakt., Abt. II. 3: 284-486.
- Smith, E. F. (1911). Bacteria in relation to plant diseases . Vol. III Carnegie Inst., Washington, D. C. p. 368
- Srinivasan, M.C., Neergard, P. y Marthur, S. B. (1971). "A technique for detection of Xanthomonas campestris in routine seed healthy testing of of crucifers". Seed. Sci. & Technol. 1: 853-859.
- Starr, M. P. (1946). "The nutrition of phytopathogenic bacteria. I Minimal nutrition requirements of the genus Xanthomonas". J. Bacteriology. 51: 131-143.
- Starr, M. P. y Nasuno, S. (1967). "Pectolytic activity of phytopathogenic xanthomonads". J. Gen. Microbiol. 46: 425-433.
- Staub, T. y Williams, H. P. (1972). "Factors influencing Black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage". Phytopathology, 62: 722-728.
- Staub, T. and William, H. P. (1972a). "Fluorescing materials associated with vein blackening and necrosis in leaves of Black rot -resistant

cabbage". Phytopathology 63: 858-860.

Strobel, G. A. (1977). "Bacterial phytoalexins". Ann. Rev. Microbiol. 31: 235-274.

Sutton, J. C. & Williams, P. H. (1970). "Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage". Can. J. Bot. 48: 391-401.

Sutton, J. C. & Williams, P.H. (1970a). "Comparison of extracellular polysaccharide of Xanthomonas campestris from culture and from infected cabbage leaves". Can. J. Bot. 48: 645-751.

Walker, (1953). Plant disease the yearbook of agriculture. United States Department of Agriculture, Washington, D. C.

Walker, (1957). "Black rot of crucifers". Plant Pathology. Ed. Mc. Graw Book Company. New York: 122-123.

Whitfield, C., Sutherland, I. W & Cripps, R. E. (1981). "Surface polysaccharides in mutants of Xanthomonas campestris pv. campestris". J. of Gen. Microbiol. 124: 385-392.

Wilkinson, J. F. (1958). Bacteriological Reviews. 22. p. 46.