

Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas

Jesús Caballero-Mellado*

RESUMEN. En este simposio se presentaron estudios dirigidos a la caracterización y distribución de nuevas especies de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno asociadas con el maíz y otras plantas y su uso potencial sobre el crecimiento de éstas. El simposio incluyó estudios dirigidos a la recuperación de suelos erosionados mediante la aplicación de bacterias y hongos micorrízicos asociados con plantas del desierto, y también sobre la tolerancia de los hongos micorrízicos a los metales pesados, como uno de los problemas de la contaminación ambiental. Además, se presentó un estudio en el que se identifica y caracteriza un fragmento cromosómico de 31 kb de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola involucrado en la síntesis de faseolotoxina, cuyas características lo relacionan con una isla de patogenicidad.

Palabras clave: *Burkholderia*, Fijación de Nitrógeno, Fitohormonas, Sideróforos, Solubilización de Fosfatos, Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Hongos Micorrízico Arbusculares, *Pseudomonas syringae*, Faseolotoxina.

Considerando los beneficios que representan los microorganismos para el crecimiento de las plantas y la producción de los cultivos, en este simposio se presentaron estudios dirigidos a la caracterización y distribución de nuevas especies de bacterias asociadas con el maíz y otras plantas y su uso potencial sobre el crecimiento de plantas de cultivos de interés agrícola. Además, considerando que el suelo está sujeto a múltiples alteraciones por la actividad humana y que estas alteraciones repercuten tanto sobre la pérdida del suelo como sobre los microorganismos con los cuales se asocian las plantas, en el simposio se presentaron estudios dirigidos a la recuperación de suelos erosionados mediante la aplicación de bacterias y hongos micorrízicos asociados con plantas del desierto, y también sobre la tolerancia de los hongos micorrízicos a los metales pesados como uno de los problemas de la contaminación causada por el hombre. En las interacciones microorganismo-planta conocer los mecanismos microbianos involucrados en el daño a los vegetales es de gran relevancia, por lo que la identificación

ABSTRACT. About the characterization and distribution of novel nitrogen-fixing *Burkholderia* species associated with maize and other plants and their potential use on the plant growth was presented in this symposium. The symposium included studies directed to the revegetation of eroded areas by using plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi associated with desert plants, as well as studies related with the resistance of arbuscular mycorrhizal fungi to heavy metals associated with the environmental pollution. In addition, the identification and characterization of a 31-kb chromosomal fragment from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola was presented; such a fragment, involved with the phaseolotoxin synthesis, showed characteristic features of a bacterial pathogenicity island.

Key words: *Burkholderia*, Nitrogen Fixation, Phytohormones, Siderophores, Phosphate solubilization, Plant Growth Promoting Bacteria, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Pseudomonas syringae*, Phaseolotoxin.

de genes bacterianos que codifican la síntesis de sustancias responsables de la muerte celular del vegetal es no menos importante que la identificación de genes que codifican para la síntesis de sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas.

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB, siglas en Inglés) representan numerosas especies del suelo y al igual que muchas especies de hongos, particularmente los micorrízicos, se encuentran asociados con la mayoría de las especies de plantas, sino es que con todas, y comúnmente se les encuentra en la mayoría de los ambientes. Entre las especies de PGPB más ampliamente estudiadas se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR siglas en Inglés) las cuales colonizan la rizosfera y la superficie de las raíces. Algunas de las especies de PGPR tienen la capacidad de penetrar y proliferar en el interior de las raíces, y de este órgano trasladarse a través del sistema vascular, y sin causar daño, establecerse y desarrollar poblaciones endófitas en los tejidos internos de las plantas, ya sea en el tallo, hojas u otros órganos.

Las PGPR favorecen el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos entre los que se destaca la fijación biológica de nitrógeno. La síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido indol acético, promueven el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, mejorando la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el mejor y mayor desarrollo de la

* Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca, Morelos.

planta. En forma similar, la actividad de la enzima bacteriana 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, disminuye los niveles elevados de etileno en plantas en desarrollo o estresadas al hidrolizar el ACC, precursor inmediato del etileno, y consecuentemente promueve la elongación de la raíz. No menos importante es la solubilización de compuestos insolubles como los fosfatos di- y tricálcicos y otros minerales. Diferentes especies de bacterias mejoran el crecimiento de las plantas al inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos; este mecanismo incluye la competencia por nutrientes así como la antibiosis y la síntesis de sideróforos los cuales pueden solubilizar y quelar el hierro del suelo y así inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. También hay evidencias que indican que los sideróforos producidos por las

PGPB, incluyendo a las endófitas, son iniciadores de la resistencia sistémica inducida (ISR), reduciéndose el daño causado por los fitopatógenos.

Los hongos micorrízicos no son menos importantes que las PGPB, particularmente la asociación micorrízica vesícula-arbuscular (VA). Durante el establecimiento de esta asociación los hongos desarrollan un extenso micelio extraradical que explora regiones del suelo inaccesibles a la raíz, incrementando así la captación de nutrientes como el fósforo y nitrógeno y favoreciendo el crecimiento de la planta. Además, la micorriza VA contribuye a reducir los daños a la planta ocasionados por el estrés biótico, incluidos los fitopatógenos, y el abiótico, incluyendo a los contaminantes del ambiente como los metales pesados.

Mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas expresados por nuevas especies de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno

J Caballero-Mellado,* § S Tenorio Salgado,* J Onofre Lemus,* R Castro González,* P Estrada de los Santos,* G Paredes Valdez,* JJ Peña-Cabrales,** R Díaz-Méndez,* y L Martínez-Aguilar*

* Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca, Morelos.

** CINVESTAV-Irapuato, Apdo. Postal No. 629; Irapuato, Gto.

§ E-mail: jesuscab@cifn.unam.mx.

Desde la creación del género *Burkholderia* en 1992 y durante varios años *B. vietnamiensis* fue la única especie fijadora de nitrógeno representante del género. En los años recientes nuestro grupo mostró que la fijación de N₂ (evaluada mediante ensayos de reducción de acetileno y detección de los genes *nifHDK*) es una característica común del género *Burkholderia*, y detectamos esta capacidad en la especie *B. kururiensis* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001) descrita como degradadora de tricloroetileno. Posterior a nuestra propuesta se describió por vez primera la capacidad de 2 cepas del género *Burkholderia* para formar nódulos con leguminosas (Moulin *et al.* 2001), una de las cuales fue descrita como *B. tuberum* y la otra como *B. phymatum* (Vandamme *et al.*, 2002). Numerosas cepas fueron posteriormente descritas, por nuestro grupo y en colaboración con otros, como nuevas especies del género *Burkholderia*, *B. unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004), *B. tropica* (Reis *et al.*, 2004) y *B. xenovorans* (Goris *et al.*, 2004). En estas especies así como en *B. vietnamiensis* se ha confirmado la capacidad de fijación de N₂ mediante ensayos con ¹⁵N₂ (Resultados no publicados). *B. unamae*,

B. tropica y *B. vietnamiensis* tienen la capacidad de fijar N₂ con diferentes fuentes de carbono comúnmente detectadas en la rizosfera, entre otras, sacarosa, fructosa, succinato y malato. Las especies *B. unamae*, *B. tropica* y la recientemente descrita *B. silvatlantica* (Perin *et al.*, 2006b) colonizan el ambiente rizosférico y endófito de maíz y caña de azúcar (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004; Perin *et al.*, 2006a). *B. unamae*, *B. tropica* y *B. xenovorans* han sido aisladas de la rizosfera de tomate y café (Goris *et al.*, 2004; resultados no publicados), sin embargo, una cepa de *B. xenovorans* también fue aislada de una mujer con bacteriemia (Goris *et al.*, 2004). *B. vietnamiensis*, aislada por vez primera de la rizosfera de arroz (Gillis *et al.*, 1995), ha sido encontrada en asociación con plantas de maíz, sorgo y café (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001), pero también en casos de pacientes con fibrosis quística (Coenye & Vandamme, 2003).

En general, las especies de *Burkholderia* fijadoras de N₂ tienen un genoma superior a las 7 Mb, el cual está estructurado en 3-4 replicones con tamaño superior a 1 Mb (Resultados no publicados). En *B. unamae* y *B. tropica* los

genes *nifH* se encuentran localizados en el mayor de los cromosomas con tamaño de alrededor de 3.2 Mb. La gran complejidad de los genomas de estas especies probablemente está relacionada con su gran versatilidad metabólica y fisiológica, así como su capacidad para colonizar diferentes plantas y ambientes.

Considerando que *B. vietnamiensis* es un patógeno oportunista que se encuentra muy alejado filogenéticamente de las especies *B. unamae*, *B. tropica* y *B. silvatlantica*, y que en estas especies no se han detectado marcadores moleculares de patogenicidad (Perin et al. 2006a) nuestros estudios se han dirigido a conocer si estas 3 especies expresan mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas con el objetivo de emplearlas con fines agro-biotecnológicos. En esta dirección, experimentos de inoculación con diferentes cepas de *B. unamae* y *B. tropica* mostraron efectos benéficos sobre el crecimiento de plantas de maíz, incrementando ambas especies el peso seco de las plantas en el rango de 16-30%, dependiendo de la cepa inoculada, pero a la fecha desconocemos el mecanismo responsable de los incrementos observados. No obstante, hemos encontrado que la actividad ACC desaminasa, implicada en disminuir los niveles nocivos de etileno en plantas estresadas o en desarrollo y promover su crecimiento, es característica de *B. unamae* y común entre muchas de las especies de *Burkholderia*, pero no es expresada por *B. tropica*. Es importante destacar que la actividad ACC desaminasa es expresada usando fuentes de carbono comunes encontradas en la rizosfera. También hemos detectado que *B. unamae*, *B. tropica* y *B. xenovorans* tienen la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles, expresando *B. tropica* la mayor actividad. También hemos establecido que la producción de sideróforos es otro rasgo común en *B. unamae* y *B. tropica*, pero su actividad parece no ser la responsable de la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos. Aun cuando los sideróforos pudieran no ejercer un efecto antagonista directo contra los fitopatógenos, es posible que activen la respuesta sistémica inducida (ISR) como se ha observado con los sideróforos producidos por otras bacterias reconocidas como agentes de control biológico. Además, en el caso de *B. tropica* hemos identificado sustancias volátiles con actividad antifúngica y otras diferentes a los sideróforos que estimulan la respuesta de defensa de las plantas contra fitopatógenos.

En conclusión y tomando en cuenta que tanto en *B. unamae* como en *B. tropica* no fueron detectados genes involucrados con la patogenicidad de las especies del

complejo *B. cepacia*, así como la capacidad de ambas especies para colonizar diferentes plantas y expresar diferentes actividades relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas, consideramos que tienen el potencial para ser empleadas como biofertilizantes y/o agentes de control biológico.

REFERENCIAS

1. Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez & P. Estrada de los Santos. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1165-1172.
2. Coenye, T. & P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5:719-729.
3. Estrada-de los Santos, P., M.R. Bustillos-Cristales, & J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2790-2798.
4. Gillis, M., V. Tran Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, & M. P. Fernandez. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:274-289.
5. Goris, J., P. De Vos, J. Caballero-Mellado, J.-H. Park, E. Falsen, J.F. Quensen III, J.M. Tiedje, & P. Vandamme. 2004. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677-1681.
6. Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.
7. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, R. Castro-González, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H.V. Guedes, V.M. Reis, & J. Caballero-Mellado. 2006a. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3103-3110.
8. Perin, L., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez, J.I. Baldani, P. Estrada-de los Santos, V.M. Reis & J. Caballero-Mellado. 2006b. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1931-1937.
9. Reis, V.M., P. Estrada-de los Santos, S. Tenorio-Salgado, J. Vogel, M. Stoffels, S. Guyon, P. Mavingui, V.L.D. Baldani, M. Schmid, J.I. Baldani, J. Balandreau, A. Hartmann & J. Caballero-Mellado. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2155-2162.
10. Vandamme, P., J. Goris, W.-M. Chen, P. de Vos & A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phytatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *System. Appl. Microbiol.* 25:507-512.

Uso de los microorganismos del desierto como recurso para recuperar suelos erosionados

Bashan, Yoav,^{*,§} Ma. Esther Puente,^{*} Bernardo Salazar^{*}

^{*} Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S., México.

[§] bashan@cibnor.mx

La deforestación del desierto de Sonora en Baja California Sur se debe a una agricultura marginal dando como resultado una severa erosión del suelo y por consiguiente una contaminación por polvo cuando estos campos son abandonados después de varios años de cultivo. Esta contaminación por polvo origina un problema importante de salud pública (con altos índices de enfermedades respiratorias), especialmente entre los niños.

Para dar marcha atrás a este efecto adverso en la salud pública, nuestro propósito es crear programas de revegetación para suelos abandonados por incidencia urbana y agrícola. Se proponen dos alternativas importantes para desarrollar exitosamente un programa de reforestación: (i) Simular el proceso natural de revegetación del desierto ("Islas de Recursos" por árboles leguminosos), (ii) Inoculación de árboles nativos con bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB siglas en inglés) y hongos micorrízicos arbusculares (MA), o también aprovechando la combinación de ambos.

Una fuente favorable de material microbiano para inoculación son las PGPB para uso agrícola (tales como *Azospirillum* sp, *Pseudomonas* sp, y *Bacillus* sp) y hongos MA. Muchas plantas nativas responden positivamente a la inoculación mejorando su crecimiento. Sin embargo, aquellos microorganismos nativos que crezcan y sobrevivan en suelos con alta dureza son mejores candidatos para inocular las plantas nativas. Una fuente potencial de estos microorganismos son plantas del desierto creciendo en rocas en ausencia de suelo, siendo ésta una de las condiciones que inhibe el crecimiento en la mayoría de las plantas.

La evaluación de todos los parámetros del suelo en "la isla de recursos", bajo árboles de mezquite, donde cactus jóvenes crecen naturalmente en el desierto de Sonora, revela que este suelo es rico principalmente en minerales arcillosos, permitiendo ganar más agua, obteniendo más nitrógeno, fósforo disponible y materia orgánica en comparación con suelos pobres, donde difícilmente crecen las plantas perennes.

La evaluación de acantilados y rocas en toda Baja California, muestra que varias especies de cactus y algunas especies de árboles tienen un próspero crecimiento dentro de grandes rocas donde no hay competencia con otras especies

de plantas. El análisis microscópico de las raíces de estas plantas mostraron que tanto el rizoplasma como la parte interna de las raíces están abundantemente colonizadas por bacterias, hongos y hongos MA. El análisis de estas poblaciones microbianas evidenciaron que la mayoría de estas bacterias son promotoras de crecimiento de plantas, algunas fijan nitrógeno atmosférico, algunas solubilizan fosfato inorgánico transformándolo a ortofosfato, que es una forma asimilable para las plantas. Muchas bacterias solubilizan rocas y minerales esenciales para el crecimiento de la planta vía producción de numerosos ácidos orgánicos; algunas de estas bacterias producen fitohormonas. En resumen, todo el mundo microbiano, esencial para el crecimiento de cualquier planta existe en las raíces de estas plantas. Esta nueva "simbiosis" permite a estas plantas un crecimiento normal donde otras plantas no podrían crecer. En el proceso de combinación planta-organismo se produce nuevo suelo a partir de las rocas a un índice acelerado.

La inoculación de plántulas del cactus cardón gigante con estas bacterias, frecuentemente aumenta el desarrollo de la planta sin la necesidad de alguna fertilización. La eliminación de estas bacterias reduce significativamente el desarrollo de la planta.

Para usar el conocimiento generado durante muchos años de experimentación en laboratorio e invernadero, se diseñaron experimentos de campo con estas bacterias (fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato; *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. chitinolyticus*, *Citrobacter* sp, *Staphylococcus gallinarum*, *Actinomadura oligospora* y *Actinobacter calcoaceticus*), utilizadas en combinación con hongos MA del desierto, limitada cantidad de composta (necesaria para simular el proceso natural de revegetación) y mínima cantidad de agua; como modelos se usaron varias especies de árboles de leguminosas Mezquite [*Prosopis articulata*], Palo Verde [*Cercidium microphyllum*], Palo Junco [*Cercidium floridum*] y cactus (*Pachycereus pringlei*, *Stenoceurus thurberi*, *Opuntia cholla*). Los experimentos fueron planeados a propósito en un área que fue abandonada hace aproximadamente veinticinco años, la cual era incapaz de sostener una revegetación natural, debido a la alteración del ecosistema resultado de la destrucción de la capa su-

perfidial del suelo y de su microbiota esencial para mantener la interdependencia de plantas nativas con los microorganismos; la sobrevivencia de las plantas como la comunidad estructural, están unidas inseparablemente a las asociaciones microbianas de la raíz, por lo tanto la red de los organismos del suelo se interrumpe o se destruye en áreas donde las plantas han sido removidas o por otros tipos de estrés ambientales severos. Para contrarrestar este efecto dañino, fue necesario realizar replantaciones sucesivas de plantas endémicas e inoculación de microorganismos benéficos mezclados con composta para controlar la erosión del suelo y recuperar la materia orgánica capaz de sostener las plantas. Después de dos años y medio, la mayoría de los árboles sobrevivieron bien y mostraron un crecimiento vigoroso en esta área, que de otra manera continuaría deforestada.

Estos múltiples años de estudio muestran que la acumulación de conocimientos básicos junto con recursos microbianos nativos del desierto, pueden ser utilizados como herramientas prácticas para programas de reforestación encaminados a reducir tanto la erosión del suelo como la contaminación por polvo en áreas desérticas de México.

REFERENCIAS

1. Bashan, Y., E.A. Davis, A. Carrillo-García & R.G. Linderman. 2000. Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran desert. *Appl. Soil Ecol.* 14:165-176.
2. Bashan, Y., C.Y. Li, V.K. Lebsky, M. Moreno & L.E. de-Bashan. 2002. Primary colonization of volcanic rocks by plants in arid Baja California, Mexico. *Plant Biology* 4:392-402.
3. Bashan, Y., A. Rojas & M.E. Puente. 1999. Improved establishment and development of three cacti species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. *Can. J. Microbiol.* 45:441-451.
4. Bashan, Y., H. Vierheilig, B.G. Salazar, & L.E. de-Bashan. 2006. Primary colonization and breakdown of igneous rocks by endemic, succulent elephant trees (*Pachycormus Discolor*) of the deserts in Baja California, Mexico. *Naturwissenschaften* (publicado en línea abril 2006).
5. Carrillo, A.E., C.Y. Li, & Y. Bashan. 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 89:428-432.
6. Carrillo-García, A., Y. Bashan & G.J. Bethlenfalvay. 2000. Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur. *Plant Soil* 218:207-214.
7. Carrillo-García, A., Y. Bashan, E. Díaz-Rivera & G. J. Bethlenfalvay. 2000. Effects of resource - island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Restoration Ecol.* 8:65-73.
8. Carrillo-García, A., J.-L. Leon de la Luz, Y. Bashan & G.J. Bethlenfalvay. 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran desert. *Restoration Ecol.* 7:321-335.
9. Puente, M.-E. & Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* 15:49-60.
10. Puente, M.-E. & Y. Bashan. 1994. The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbors the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Can. J. Bot.* 72:406-408.
11. Puente, M.E., Y. Bashan, C.Y. Li & V.K. Lebsky. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6:629-642.
12. Puente, M.E., C.Y. Li & Y. Bashan. 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology* 6:643-650.
13. Puente, M.E., M.C. Rodríguez-Jaramillo, C.Y. Li & Y. Bashan. 2006. Image analysis for quantification of bacterial rock weathering. *J. Microbiol. Methods* 64:275-286.

Tolerancia de la micorriza arbuscular contra los metales pesados

Facundo Rivera-Becerril*

* Departamento El Hombre y su Ambiente, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso Núm. 1100, Col. Villa Quietud, 04960 México DF, México.

La micorriza es una simbiosis mutualista que se integra entre las raíces de las plantas y grupos específicos de hongos del suelo. De los siete tipos existentes de micorriza, la arbuscular (MA) es el más común pues se encuentra en el 80% de las especies vegetales y en un amplio intervalo ecológico. Los hongos micorrízico arbusculares (HMA) coevolucionaron con las plantas desde la colonización de los ecosistemas terrestres, por lo cual se cree que jugaron un papel clave en este proceso. Se ha reconocido que estos

micosimbiontes tienen una profunda influencia directa o indirecta sobre la vida en la tierra, y son determinantes cruciales de la biodiversidad vegetal, de la variabilidad de los ecosistemas y de la productividad de las comunidades vegetales. Durante el establecimiento de la MA, los HMA incrementan la captación de elementos minerales del suelo (P, N) que son translocados a la planta gracias al desarrollo extensivo de un micelio extrarradical el cual explora regiones inaccesibles a la raíz. En contraparte, las plantas

aportan a los hongos glucosa y fructosa. La contribución de la MA en su papel de bioprotección concierne la reducción del daño ocasionado por el estrés biótico y abiótico, incluyendo patógenos del suelo y contaminantes.

Los metales pesados (MP) son liberados al ambiente como consecuencia de la mineralización natural de las rocas, pero sobre todo debido a las actividades humanas tales como la minería, industrias diversas, combustión de energéticos fósiles y uso de fertilizantes fosfatados. En México la minería es una de las principales fuentes de contaminación ambiental por MP debido a la acumulación de desechos sólidos denominados jales; se estima que tan sólo en el distrito minero de Real del Monte y Pachuca existen cien mil toneladas de jales depositados como consecuencia de la explotación de oro y plata. Los hongos y las plantas están expuestos a la contaminación por MP en los suelos, pero la simbiosis micorrízica incrementa la tolerancia a la misma (Gildon & Tinker, 1983). A este respecto, en un trabajo clásico con plantas de trébol creciendo en presencia de Cd e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, se incrementó la producción de biomasa, la captación de P y decreció la concentración total del MP en los tejidos (Gildon & Tinker, 1983). Maíz micorrizado cultivado en un suelo contaminado fue capaz de desarrollarse hasta la etapa de fructificación a diferencia de las plantas no micorrizadas (Kaldorf *et al.*, 1999). El efecto protector de la MA contra el Cd en *Pisum sativum* se vio reflejado en el nivel de la actividad fotosintética (Rivera-Becerril *et al.*, 2002).

Varias especies de HMA pertenecientes a diferentes géneros han sido aisladas de suelos contaminados mostrando que una diversidad considerable puede existir en esos ecosistemas. Por ejemplo, seis especies del género *Glomus* fueron aisladas de suelos a los que se habían adicionado lodos de tratamiento conteniendo Cd y Pb, pero se observó un decremento en el número total de esporas, así como en la riqueza y diversidad de especies fúngicas cuando se incrementaron las concentraciones de MP en el sustrato (del Val *et al.*, 1999). En condiciones naturales se ha visto que el desarrollo de la MA es afectado en algunos suelos contaminados con MP pero en otros no hay un efecto aparente. Por ejemplo, en residuos mineros contaminados con $863 \mu\text{g Cd g}^{-1}$, sólo el 35% de las raíces de trébol creciendo naturalmente estuvieron micorrizadas, mientras que altos niveles de colonización micorrízica fueron consistentemente observados en *Euphorbia cyparissias* y *Fragaria vesca* establecidas en residuos conteniendo Zn. (Turnau, 1998). Estos resultados contrastantes pueden ser explicados por el hecho de que, como para las plantas, los diferentes aislados de HMA exhiben niveles variables de tolerancia dependiendo del metal y de su concentración (del Val *et al.*, 1999).

Se han propuesto diferentes estrategias para explicar el efecto protector de la MA contra los MP. La primera de ellas se atribuye al mejor estado nutricional favorecido por las redes hifales que proveen nutrimentos del suelo a la planta (Kaldorf *et al.*, 1999). Empero, en un estudio desarrollado con plantas de *P. sativum* micorrizadas y no micorrizadas creciendo en presencia de Cd, las concentraciones de P no fueron significativamente diferentes, lo que sugiere que la nutrición fosfatada no explica este efecto de atenuación (Rivera-Becerril *et al.*, 2002). Otra de las estrategias se refiere a que los organismos restringen la captación del metal (Leyval *et al.*, 1997). Por ejemplo, se ha reportado que la glomalina, una glicoproteína insoluble producida y excretada en forma abundante por las hifas de los HMA, secuestra elementos tóxicos (González-Chávez *et al.*, 2004). Asimismo, las células fúngicas tienen una alta capacidad de adsorción de metales gracias a la presencia de grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, así como a la quitosana y quitina. Cepas tolerantes de HMA parecen tener una capacidad de adsorción considerable (Joner *et al.*, 2000).

El secuestro de metales en el citoplasma fúngico y vegetal por metalotioneínas (MT) y fitoquelatinas (FQ) se ha propuesto como otro mecanismo posible de tolerancia en la MA (Leyval *et al.*, 1997). En este sentido, la acumulación de transcritos de dos genes vegetales codificadores de MTs fue cuantificada en raíces micorrizadas de *P. sativum* y *Lycopersicon esculentum*, respectivamente, pero la MA no estimuló esta acumulación (Ouziad *et al.*, 2005; Rivera-Becerril *et al.*, 2005). Asimismo, recientemente fue aislado el primer gen codificador de una MT (*GmarMT1*) en un HMA, *Gigaspora margarita* (Lanfranco *et al.*, 2002), mismo que codifica para un polipéptido funcional capaz de conferir tolerancia contra el Cd y el Cu, por lo que se considera que puede tener un papel relevante contra el estrés por MP durante el establecimiento de la MA. Con relación a las FQ, estudios moleculares y bioquímicos realizados en *P. sativum* y *L. esculentum* sugieren que esta vía de detoxificación no juega un papel relevante en el efecto protector de la MA contra los MP (Ouziad *et al.*, 2005; Rivera-Becerril *et al.*, 2005).

El éxito del uso de las plantas para extraer metales a partir de suelos contaminados requiere de un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en su captación, translocación y acumulación en los tejidos. La mayoría de los trabajos con MP se han hecho con plantas no micorrizadas o no han evaluado los niveles de colonización de las mismas; esto resulta grave si consideramos que el 80% de los vegetales están asociados con HMA, microorganismos que pueden modificar significativamente la respuesta vegetal contra los MP. Al respecto, las herramientas moleculares comienzan a apor-

tar conocimientos valiosos y este campo está en crecimiento. Asimismo, es urgente incrementar esfuerzos para llevar a cabo el aislamiento y caracterización tanto de plantas como de cepas locales de HMA tolerantes a MP, e integrarlos en colecciones. Los aislados fúngicos caracterizados podrán ser utilizados para el establecimiento y supervivencia de las plantas en sitios contaminados por MP, así como constituirse como herramientas fundamentales en procesos de fitorremediación.

REFERENCIAS

1. del Val, C., J.M. Barea & C. Azcón-Aguilar. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:718-723.
2. Gildon, A. & P.B. Tinker. 1981. A heavy metal-tolerant strain of mycorrhizal fungus. *Transactions of the British Mycol. Soc.* 77:648-649.
3. Gildon, A. & P.B. Tinker. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95:247-261.
4. González-Chávez, M.C., R. Carrillo-González, S.F. Wright & K.A. Nichols. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollution* 130:317-323.
5. Joner, E.J., R. Briones & C. Leyval. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227-234.
6. Kaldorf, M., A.J. Kuhn, W.H. Schröder, U. Hildebrandt & H. Bothe. 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.* 154:718-728.
7. Lanfranco, L., A. Bolchi, E.C. Ros, S. Ottonello & P. Bonfante. 2002. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiol.* 130:58-67.
8. Leyval, C., K. Turnau & K. Haselwandter. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7:139-153.
9. Ouziad, F., U. Hildebrandt, E. Schmelzer & H. Bothe. 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162:634-649.
10. Rivera-Becerril, F., C. Calantzis, K. Turnau, J.-P. Caussanel, A.A. Belimov, S. Gianinazzi, R.J. Strasser & V. Gianinazzi-Pearson. 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J. Exp. Bot.* 53:1177-1185.
11. Rivera-Becerril, F., D. van Tuinen, F. Martin-Laurent, A. Metwally, K.-J. Dietz, S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson. 2005. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16:51-60.
12. Turnau, K. 1998. Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in Southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67:105-113.

Identificación y análisis de un fragmento cromosómico de *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola involucrado en la síntesis de faseolotoxina

Selene Aguilera-Aguirre,* Karina López-López,* José Luis Hernández-Flores,*
Ariel Álvarez-Morales*

* Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN-Unidad Irapuato, Apdo. Postal No. 629. C.P. 36500, Irapuato, Gto. México. seleagui@yahoo.com.mx.

Pseudomonas syringae comprende un grupo de bacterias patógenas de plantas de aproximadamente 45 patovares (Young *et al.*, 1992), incluyendo *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola la cual infecta el frijol causando la enfermedad conocida como "tizón de halo". Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de lesiones acuosas en el sitio de infección, rodeadas por un halo clorótico. Entre 18-20°C, esta bacteria produce una toxina inespecífica de hospedero denominada faseolotoxina, la cual es un inhibidor reversible de la enzima ornitina carbamoiltransferasa (OCTasa), la cual cataliza la síntesis de citrulina a partir de ornitina y carbamoilfosfato en la ruta de síntesis de arginina. La inhibición de la OCTasa

causa acumulación de ornitina y deficiencias en las pozas intracelulares de arginina en la célula provocando clorosis en los tejidos (Smith & Rubery, 1982).

La faseolotoxina no sólo afecta a la OCTasa del frijol, sino a una gran variedad de OCTasas vegetales y bacterianas. En nuestro laboratorio se ha aislado y caracterizado el gen *argK* que codifica a una OCTasa resistente a faseolotoxina (Mosqueda *et al.*, 1990) implicada en la inmunidad de la bacteria contra su propia toxina y el gen *amtA*, el cual codifica para una amidinotransferasa (AT) que cataliza la transferencia de un grupo amidino de la arginina a la lisina para producir homoarginina y ornitina (Hernández-Guzmán & Álvarez-Morales, 2001).

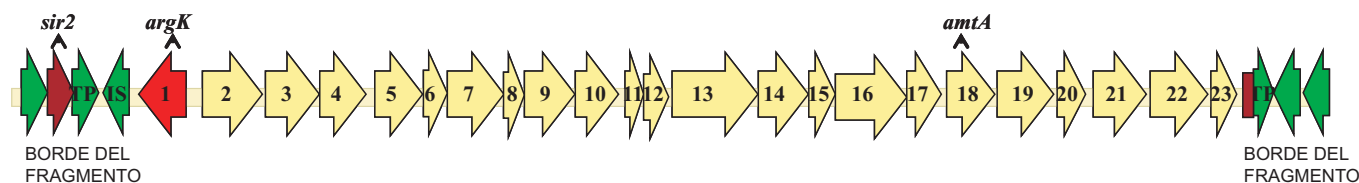


Figura 1. Esquema del fragmento cromosómico de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121, que contiene genes involucrados en la síntesis de faseolotoxina.

Los genes *argK* y *amtA* se localizaron en un fragmento de 270 kpb del mapa físico de *P. syringae* pv. *phaseolicola* lo cual sugirió que el grupo completo de genes requeridos para la síntesis de faseolotoxina e inmunidad pudieran estar agrupados en esta región. Por otra parte, un contenido diferente de G+C del gen *argK* y *amtA* comparado con el resto del cromosoma de la bacteria sugiere que estos genes pudieron ser adquiridos de manera horizontal a partir de otro microorganismo. En muchos casos, los genes de virulencia se encuentran en el cromosoma bacteriano agrupados en grandes bloques contiguos, estas regiones son conocidas como islas de patogenicidad (IPs).

Recientemente hemos caracterizado regiones adyacentes a los genes *amtA* y *argK* de *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 en busca de otros genes involucrados en la síntesis de esta fitotoxina. A la fecha hemos clonado, secuenciado y caracterizado un fragmento de alrededor de 31 kpb. En este encontramos varios marcos de lectura abiertos (ORFs), de los cuales algunos poseen similitud con elementos móviles como transposasas y secuencias de inserción. Además se localizó un ORF truncado con similitud al regulador transcripcional *sir2* (Fig. 1). A través de un análisis computacional del fragmento y de fusiones transcripcionales de regiones intergénicas al gen reportero *uidA*, hemos identificado 23 ORFs, los cuales se encuentran distribuidos en por lo menos 5 operones. Se generaron 17 mutantes afectadas en varios de los ORFs. Estas mutantes son incapaces de producir faseolotoxina, lo cual nos revela su

participación en este proceso. El análisis de las características del fragmento como contenido de G+C (52%), que es diferente con respecto al resto del genoma de la bacteria y la presencia de elementos genéticos involucrados en transposición y movilización localizados en los límites del fragmento, sugiere que este fragmento es una isla de patogenicidad.

REFERENCIAS

1. Hernández-Guzmán, G. & A. Álvarez-Morales. 2001. Isolation and characterization of the gene coding for the amidinotransferase involved in the biosynthesis of phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Mol. Plant Microbe Interact. 14:545-554.
2. Mosqueda, G., G. V. Den Broeck, O. Saucedo, A. M. Bailey, A. Álvarez-Morales & L. Herrera-Estrella. 1990. Isolation and characterization of the gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* encoding the phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase. Mol Gen Genet. 222:461-466.
3. Smith, A. G. & P. H. Rubery. 1982. Investigation of the mechanism of action of a chlorosis-inducing toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Plant Physiol. 70:932-938.
4. Young, J. M., Y. Takikawa, L. Gardan & D.E.Stead. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 30:67-105.

Correspondencia:

Jesus Caballero-Mellado.
Yoav Bashan.
Facundo Rivera-Becerril.
Selene Aguilera-Aguire.