



# **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.**

**INGENIERIA BIOQUÍMICA**

## **PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

*Caracterización fenotípica y molecular de bacterias  
diazótrofas para su uso como biofertilizante.*

**FECHA DE INICIO**

10/Agosto/2011

**FECHA DE TÉRMINO**

10/Diciembre/2011

**ASESOR INTERNO**

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli.

**REVISORES**

Dr. Reiner Rincón Rosales.

Dra. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe.

**PRESENTA ALUMNO**

Betsy Anaid Peña Ocaña.

**NÚMERO DE CONTROL**

07270258

Tuxtla Gutiérrez Chiapas a 10 de diciembre del 2011

## I.- INTRODUCCION

Las plantas requieren de nutrientes para su crecimiento y desarrollo, siendo el nitrógeno uno de los más importantes, al igual que el potasio y el fósforo (Huda, 2007). En los sistemas agrícolas el nitrógeno es suplementado en forma de fertilizantes nitrogenados, tales como la urea o sales de nitrato, pero desafortunadamente, esta práctica agrícola tiene sus desventajas y lamentablemente efectos adversos al medio ambiente, ya que la aplicación constante de químicos al suelo, ocasiona que estos presenten alteraciones fisicoquímicas importantes, que finalmente provocan que los suelos pierdan su fertilidad y se convierten en suelos erosionados, es decir suelos que han perdido sus nutrientes (Räsänen, 2002). Por este motivo, actualmente, en muchas partes del mundo, se está empleando la biofertilización, como una alternativa eficaz, de bajo costo y que no ocasiona daños a los ecosistemas (Brockwell *et al.*, 1995). La biofertilización es mundialmente aceptada como una fuente alternativa de nitrógeno y sustancialmente puede suplementar el requerimiento de N, mientras favorece la captación de agua y nutrientes minerales por las plantas en los cultivos (Baset *et al.*, 2009). Los biofertilizantes son definidos como aquellos microorganismos benéficos, parte de ellos o sustancias que producen y que al ser aplicados a las plantas influyen positivamente en su crecimiento y producción (Sutherland, 2000), y además como existe una relación directa con el suelo, estos microorganismos contribuyen en su regeneración y recuperación de la fertilidad.

Dentro de los microorganismos fijadores de N más empleados como biofertilizantes, están los simbioses (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*), el hongo micorrizico (*Glomus*) y la bacteria de vida libre (*Azospirillum*, *Azotobacter*). Recientemente, se han aislado de la rizósfera del banano y papaya en plantaciones ubicadas en la costa de Chiapas, bacterias diazótrofes que han mostrado características muy singulares, tales como: capacidad de fijación de nitrógeno y producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, tales como auxinas, giberelinas. etc. (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2008), que las convierten en bacterias con potencial para su empleo como biofertilizantes. Este trabajo tuvo como objetivo principal estudiar las características fenotípicas, genotípicas y el potencial simbiótico de estas bacterias diazótrofes, con la finalidad de determinar el potencial de estas cepas para su empleo como biofertilizantes, para su empleo como biofertilizantes en varios cultivos de importancia agrícola, forestal y ecológica.

## II.- JUSTIFICACION

Las bacterias del suelo son muy importantes en los ciclos biogeoquímicos y se han utilizado para la producción agrícola durante décadas. Las interacciones planta-bacteria en la rizósfera son los determinantes de la salud de las plantas y de la fertilidad del suelo. En la naturaleza, muchas plantas establecen interacciones mutualistas con bacterias con la finalidad de mejorar sus condiciones de vida y estabilidad biológica. En la rizósfera existe una diversidad de bacterias benéficas que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a una forma orgánica más adecuada para la utilización de las plantas. Mucho del nitrógeno fijado proviene de la simbiosis: *Leguminosas-bacterias rizobianas*, en este caso en las raíces de la planta hospedera se forma una estructura especializada denominada "nódulo" o simbiosoma", lugar en donde ocurre la fijación. Sin embargo, existe otro tipo de bacterias que no forman nódulos en las raíces, que se asocian a las raíces de las plantas y desde ahí fijan el nitrógeno, y también tienen la capacidad de sintetizar sustancias reguladores del crecimiento, tales como; auxinas y giberelinas, que contribuyen positivamente al crecimiento del vegetal. Considerando la capacidad de estas bacterias para fijar nitrógeno, en los últimos años, se ha venido realizando trabajos relacionados con el aislamiento, caracterización y selección de bacterias diazótroficas con el propósito de emplearlas como biofertilizantes. En el sur del estado de Chiapas, México, específicamente en la región fisiográfica denominada "Sonoconusco", se han realizado aislamientos de bacterias diazótroficas a partir de plantaciones comerciales de plátano, café, papaya, mango, entre otros, que son considerados los principales cultivos económicos de la región. (INEGI, 2009) Así tenemos que, de la rizósfera del banano, variedad Gran

Clon Enano se logró aislar la cepa 11B y de la raíz de la papaya se obtuvo la cepa Pachaz 008, ambas con capacidad para fijar nitrógeno y sintetizar auxinas. En experimentos a nivel de laboratorio, la cepa 11B fue inoculada en plántulas de papa y se observó efectos positivos sobre la sobrevivencia, y el crecimiento de las plantas (Palacios *et al.*, 2009) y cuando se aplicó a plantas de maíz, el principal efecto fue observado sobre peso fresco total y en el porcentaje de micorrización. Recientemente, Ruiz *et al.* (2011), reportaron que la biofertilización de la cepa 11B y Pachaz 008, sobre plantas micropropagadas de *Agave tequilana* ocasiono efecto positivo, principalmente sobre el peso fresco de las plantas e influyo sobre la producción de enzimas hidrolíticas. Interesante fue observar el efecto positivo de la cepa 11B sobre el crecimiento, desarrollo y la producción de fenoles en la planta medicinal *Hypericum silenoides* (Mendoza *et al.*, 2011). Por otro lado, también se han aislado bacterias simbióticas diazótrofes de los nódulos de la leguminosa arbustiva *Acaciella angustissima*. La cepa *Sinorhizobium mexicanum* (Lloret *et al.*, 2007) y la *S. chiapanecum* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009) fueron aisladas de esta leguminosa y de acuerdo al estudio filogenético usando genes cromosomales 16S rDNA y *rpoB*, ambas cepas resultaron ser dos nuevas especies rizobianas y en experimentos de biofertilización, estas cepas demostraron alta capacidad de fijación de N y de nodulación (Rincon-Rosales *et al.*, 2009); por tal motivo son consideradas como cepas con alto potencial para su empleo como inoculantes en diferentes plantas de importancia agrícola, forestal y ecológica. Por todo lo anterior, este trabajo fue realizado con la finalidad de estudiar las características fenotípicas de las cepas diazótrofes 11B, Pachaz 008 y *S. chiapanecum* ITTG S70 y conocer las propiedades simbióticas de estas bacterias; como base para determinar su potencial empleo como biofertilizantes.

### III.- OBJETIVOS

#### *Objetivo General:*

Estudiar las características fenotípicas, genotípicas y las propiedades simbióticas de bacterias diazotróficas y determinar su potencial empleo como biofertilizantes.

#### *Objetivos Específicos:*

1. Caracterizar fenotípicamente las cepas bacterianas diazótrofes 11B, Pachaz 008 y *Sinorhizobium chiapanecum* ITTG S70.
2. Utilizar herramientas de Biología Molecular para la caracterización genética y la clasificación taxonómica de las cepas bacterianas diazótrofes 11B y Pachaz 008.
3. Evaluar el rango de hospedero, el potencial de nodulación y la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas diazótrofes 11B, Pachaz 008 y *S. chiapanecum* ITTG S70.
4. Determinar el efecto de la biofertilización de las cepas diazótrofes 11B, Pachaz 008 e ITTG S70, sobre el crecimiento de la leguminosa hospedera *Acaciella angustissima*.
5. Seleccionar las cepas bacterianas con alto potencial de fijación de nitrógeno para su empleo como biofertilizantes.

## IV. GENERALIDADES

### ***Bacterias fijadoras de nitrógeno***

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. La fijación de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa es de considerable importancia en agricultura, porque causa un aumento significativo del nitrógeno combinado en el suelo. La bacteria que nodula la raíz y tallos pertenece casi exclusivamente al alfa-subclase de proteobacterias. Los principales rizobios son actualmente divididos en cerca de 30 especies dentro de seis géneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Wang & Martínez-Romero, 2000). Sin embargo, recientemente nuevos tipos de rizobios han sido aislados de leguminosas tropicales. La bacteria perteneciente al género *Methylobacterium*, exhibe ambas: habilidad de nodulación y propiedades metiltrópicas (crece facultativamente. en metanol), fue aislada de la leguminosa (*Crotalaria Papilionoideae*); herbácea y arbustiva; (Sy et al, 2001). *Devosia* sp fue aislada de nódulos de tallos asociados de la leguminosa acuática *Neptunia natans* (Mimosoideae) (Rivas et al., 2002). Sin embargo, la nodulación de leguminosas tropicales por *Burkholderia* sp. (Moulin et al., 2001) y *Ralstonia* sp. (aislada de *Mimosa* spp.; Chen et al., 2001) miembros de la beta-subclase de

proteobacteria, indica el amplio-rango de bacterias que pueden formar simbiosis con leguminosas. Tradicionalmente, los rizobios han sido dividido dentro de los grupos de rápido y lento crecimiento (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) pero, incluso esta idea general puede cambiar. El término "meso" significa habito de crecimiento intermedio entre crecimiento lento y rápido; y entonces, el nombre *Mesorhizobium* denota ambas, posición filogenética y rango de crecimiento (Chen *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1997). Estudios con rizobios en Kenia demuestran que las cepas pertenecientes a *Bradyrhizobium* spp exhiben crecimiento muy lento a intermedio, y aquellas pertenecientes al género *Mesorhizobium* spp muestran intermedio a rápido crecimiento y las cepas pertenecientes a *Rhizobium* spp y *Sinorhizobium* spp crecen rápido o muy rápido (Odee *et al.*, 2002).

### ***Bacterias de vida libre***

Los microorganismos fijadores de nitrógeno incluyen dos variantes: los fijadores simbióticos que fijan nitrógeno en asociación con plantas, y los no simbióticos (asimbióticos) o de vida libre que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio, aprovechados por los vegetales (Hernández, 1998; Zuberer 1998). Numerosas bacterias de los géneros *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno contribuyendo sustancialmente a que los agricultores economícen en fertilizantes nitrogenados conservando el ambiente (Martínez, 1999).

La fijación biológica del nitrógeno por bacterias diazotróficas ha contribuido a incrementar el rendimiento en las cosechas, reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el N<sub>2</sub>O, obteniendo beneficios económicos y ambientales en los cultivos. Trabajos realizados con cepas diazotróficas señalan que se ha observado un efecto de sinergia entre las bacterias



inoculadas y las nativas en el suelo donde se encuentra la planta. El aumento de la producción de materia seca en las raíces posiblemente se relaciona con la producción de fitohormonas por las bacterias inoculadas, lo que puede inducir el crecimiento de las raíces.

Los resultados de investigaciones sobre la incorporación a los suelos de esta clase de microorganismo (biofertilizantes) han originado altos rendimientos en las cosechas de una gran diversidad de cultivos, como arroz, maíz, frijol, tomate, etc. (Hernández 1998). Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum* sp., se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon & Labandera González, 1994).

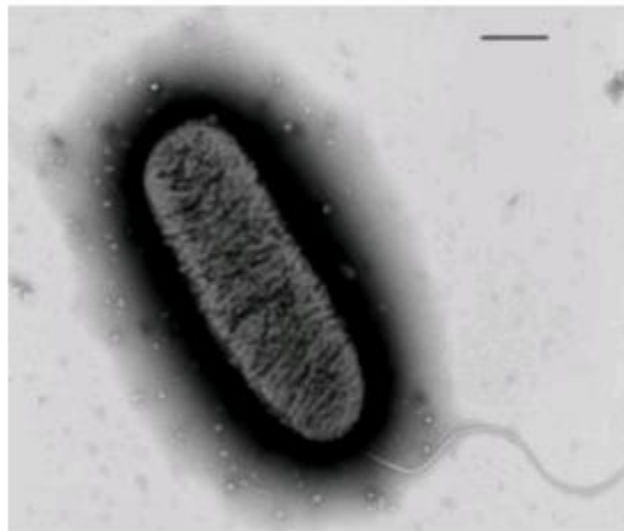


Figura 1. Fotografía electrónica de *Azospirillum* mostrando la morfología celular de aislado de maíz, 0.06 mm (Mehnaz et al., 2007)

### ***Bacterias simbióticas***

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. En esta simbiosis en los nódulos, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria (rizobios) y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Esta simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos.

La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable. Hasta la fecha se han propuesto 6 géneros, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Con base en las secuencias de genes de 16S rRNA, todos los rizobios definidos son miembros de la subdivisión  $\alpha$  de las Proteobacterias. En esta misma subdivisión se encuentran bacterias del género *Agrobacterium* que forman tumores en plantas. Los 6 géneros de los rizobios son 6 grupos filogenéticos entremezclados con otros géneros de las alfa-Proteobacteria. En el árbol filogenético los géneros *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* son dos ramas separadas de los otros géneros de rizobia. Los géneros *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* son dos grupos distintos pero relacionados con los géneros *Allorhizobium* y *Rhizobium*. El género *Rhizobium* está compuesto de dos subramas: (1) las especies *R. galegae* y *R. huautlense* junto con *Allorhizobium* y tres especies de *Agrobacterium* forman la primera subrama; (2) el

resto de las especies, incluyendo la especie tipo *R. leguminosarum*, y *Agrobacterium rhizogenes* forman la otra subrama. Hay bacterias no-simbióticas cercanamente relacionadas con cada uno de los géneros de rizobios

#### Género *Sinorhizobium*

Son bacilos que miden (0.5-1.0) X (1.2-3.0)  $\mu\text{m}$ . El nombre genérico *Sinorhizobium* fue propuesto por primera vez para designar a las bacterias de rápido crecimiento aisladas en China que nodulan a la soya. Posteriormente se separó este género de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las secuencias de genes 16S rRNA sin embargo no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan estos dos géneros. Las ocho especies dentro de este género crecen rápidamente y producen ácido en medio YMA. Se han identificado tres copias del gen ribosomal en ellas. Plásmidos grandes e incluso megaplásmidos son comunes en estas especies y en algunos casos los genes simbióticos están localizados en un megaplásmido. La especie tipo, *S. meliloti* fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente. En esta especie son comunes dos megaplásmidos; megaplásmido 1 (plásmido Sym) y megaplásmido 2 (plásmido Exo), con respectivos pesos moleculares de 1700 y 1400 kbp. En varios laboratorios se obtuvo las secuencias completas del cromosoma y los megaplásmidos. Además de la especie tipo, otras especies de este género son: *S. arboris*, *S. fredii*, *S. kostiense*, *S. medicae*, *S. saheli*, *S. teranga* y *S. xinjiangense*. Las diferencias entre estas especies radican en el análisis filogenético de las secuencias de genes 16S rRNA, patrones de proteínas y enzimas, parecidos entre secuencias de ADN, caracterización fenotípica y especificidad de huésped. Algunos grupos de rizobia de suelo mexicano asociados a la leguminosa *Leucaena leucocephala* han sido clasificados como *Sinorhizobium*. Se ha secuenciado el plásmido simbiótico de una cepa de *Sinorhizobium* con un amplio espectro de huéspedes, NGR234, y se ha descubierto que tiene una estructura de mosaico parecida a algunas secuencias del plásmido Ti

de *Agrobacterium tumefaciens* o a genes de otras bacterias. También se ha reportado que el plásmido simbiótico de NGR234 puede integrarse en un megaplásmido o dentro del cromosoma en condiciones de laboratorio.

### **Proceso de infección y formación de nódulos**

El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie del rizobio se localiza una proteína específica de la adherencia, la ricadesina. Es una proteína que se une al calcio y puede actuar captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias, como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células del rizobio. Después de la unión, los pelos radicales se enroscan debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria, que se conocen como factores Nod (Figura 2). Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360° formando una estructura a la que se llama "cayado de pastor". La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana peribacteroidal (MPB). A continuación, hay una división continua y sincronizada de los rizobios rodeados de MPBs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides, éstos quedan rodeados, individualmente o en pequeños

grupos por la MPB; a la estructura que contienen estos grupos de bacteroides rodeados por la MPB se les llama simbiomasas. Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 4 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los bacteroides (Räsänen *et al.*, 2001).

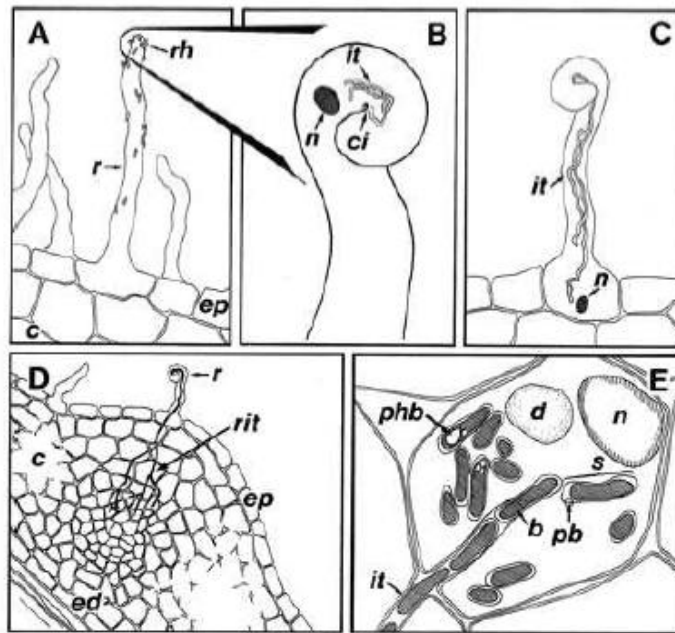


Figura 2. Proceso de infección pelos radicales de leguminosas por *Rhizobium*. A).-Las bacterias de rhizobio (*rh*) coloniza la rizósfera y se adhiere al pelo radical (*r*). B).- Los Factores Nod inducen el ensortijamiento del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (*ci*). El núcleo del pelo radical (*n*) precede el crecimiento del hilo de infección (*it*). C).- El hilo de infección alcanza la base del pelo radical (*it*), aún acompañado del núcleo (*n*). D).- El pelo radical (*r*) se ramifica (*rit*) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (*b*) son liberados desde el hilo de infección (*it*) y forman simbiosomas (*s*) donde se acumulan gránulos de poly-β-hidroxibutarato (*phb*) rodeados por la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaturas: *c*, corteza; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis (Perret *et al.*, 2000).

### **Señalización química entre la planta leguminosa y *Rhizobium***

Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radiculares (Bowen y Rovira, 1999) abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos. Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona) (Figura 3), cuya composición va a variar dependiendo de la especie, y que además de ser metabolizados, desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes apropiados, como la activación de los genes *nod* (Figura 3.a). Cada *Rhizobium* expresa constitutivamente un grupo de factores de transcripción hélice-lazo-hélice de la familia LysR (Schell, 1993) conocidos como NodD (Figura 3.b) cuyo número y regulación va a depender de la especie de *Rhizobium*. NodD se encuentra normalmente unida a unas regiones de ADN de 49 pb conocidas como "nod boxes", que se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la nodulación, sólo se produce la inducción de estos genes cuando NodD se une a sus activadores. Entre los genes activados por NodD se encuentran los genes *nod*, que codifican todo un paquete de enzimas encargadas de la producción de los factores Nod. Los factores Nod están compuestos por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 sintetizado por NodA, NodB y NodC, que presenta una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe de *Rhizobium* y que van a otorgar cierta especificidad al proceso de nodulación (Hirsch, 1992).

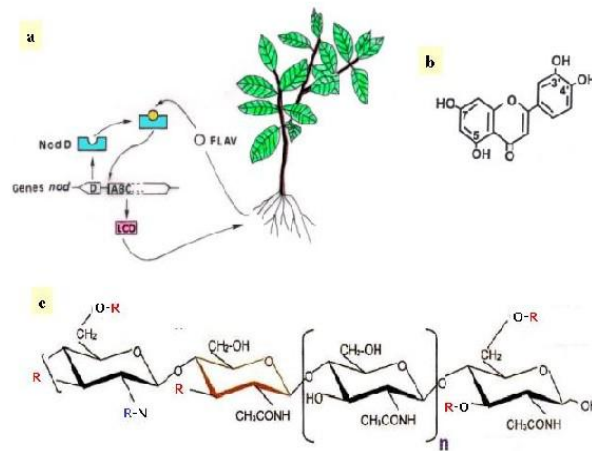


Figura 3. Esquemización del intercambio de señales entre los dos componentes de la simbiosis. a) La planta libera flavonoides, de distinta naturaleza según la especie de que se trate, que se unen al producto del gen *nodD* que se activa de esta forma para inducir la transcripción del resto de los genes *nod* que conlleva la síntesis del factor Nod correspondiente. b) luteolina, un flavonoide exudado por la alfalfa. c) Estructura general de un factor Nod, *n* se refiere al número de residuos de glucosamina (Hirsch, 1992).

Ahora bien, existen entre las diferentes especies de leguminosas preferencias a nodular con bacterias que sintetizan un determinado tipo de decoración en el factor Nod, aunque también existen plantas que son promiscuas, las cuales no son tan selectivas para establecer simbiosis, sin embargo, también esta selectividad por el factor Nod lo tienen plantas como frijol que es capaz de reconocer un amplio rango de estructuras de factores Nod pero presenta una preferencia por la acetilfucosa en el extremo reductor sobre cualquier otra modificación (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

### ***Factores genéticos, fisiológicos y ambientales que controlan la nodulación***

La nodulación de leguminosas por rizobios es un proceso complejo que requiere la producción de flavonoides vegetales específicos que inducen genes bacterianos involucrados en la biosíntesis de moléculas señales específicas, los lipo-oligosacaridos (LOS), que representan el primer paso de la formación de nódulos (Toro, 1996).

Entre los factores fisiológicos determinantes para que tenga lugar la fijación de N<sub>2</sub> está la continua disponibilidad de fotosintatos como energía y como esqueleto de carbono. La fijación de N en las leguminosas se empieza a detectar aproximadamente a los 10 días, después de la inoculación y alcanza su máxima tasa entre los días 20-30 después de la infección (Pueppke *et al*, 1999). La disminución en la fijación de N<sub>2</sub> coincide con el llenado de las vainas cuando la semilla se está desarrollando; esto se debe en gran parte a la disminución en el flujo de fotosintatos hacia los nódulos. En relación a los nutrientes, se ha observado que la presencia de amonio o nitrato inhibe la unión de los rizobios en la raíz, la infección y la formación de nódulos. Si el fertilizante se adiciona una vez formado el nódulo se inhibe casi inmediatamente la fijación de N<sub>2</sub>, desaparece la actividad de la glutamina sintetasa y de otras enzimas de la asimilación de amonio y se induce en general la senescencia prematura del nódulo. Las principales condiciones ambientales que influyen en la fijación de nitrógeno son: La temperatura, la humedad y el pH del suelo principalmente. Estudios realizados en condiciones de invernadero señalan que a temperaturas de 30 a 35°C la eficiencia de la nodulación es baja en comparación con temperaturas de 25 a 30°C, en donde se mejora considerablemente; estableciéndose que la mayoría de los rizobios se desarrollan



en forma óptima entre 29-30°C. El pH óptimo de crecimiento es entre 5.0 y 6.0. Los suelos alcalinos favorecen la nodulación y en suelos ácidos, generalmente, son muy escasos o ausentes estos microorganismos y por ello la fijación de nitrógeno se ve afectada y a su vez es el principal factor limitante para el crecimiento de la planta, esto sucede a medida que el suelo se acidifica. La acidez del suelo tiene influencia en todos los estados de nodulación y fijación de  $N_2$ , desde la multiplicación de los rizobios en el suelo, la infección y formación del nódulo, hasta la fijación de  $N_2$ . El pH del suelo, la toxicidad del aluminio y manganeso y la disponibilidad del fósforo,  $Ca^{2+}$  y  $Mo^{2+}$  pueden estar involucrados en este fenómeno, no obstante la importancia individual de cada uno de ellos varía de suelo a suelo y entre cepas de rizobio. Otros factores tales como: salinidad, presencia de nitrato, baja concentración de calcio o fósforo y la presencia de pesticidas afectan los eventos iniciales del proceso de nodulación (Toro, 1996).

### ***Fijación biológica de nitrógeno***

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$  por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes (Sprent & Sprent, 1990).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr *et al.*, 1998). Dichas bacterias comprenden organismos fototrofos, como bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Chlorobiaceae y Cyanobacteriae; organismos quimioautotrofos, como bacterias de

los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y organismos heterótrofos como las bacterias pertenecientes a la familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent & Sprent, 1990). Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos.

Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae (Madigan *et al.*, 2000). Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de nitrógeno: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* que bien son conocidas como *Rhizobium*.

A diferencia de las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*, las rizobiáceas no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por si mismas. Para llevar a cabo el proceso estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- 1) Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.
- 2) Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- 3) Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- 4) Diferenciación de la bacteria a forma especializada.

### ***Empleo de bacterias diazotróficas para biofertilización de leguminosas***

Entre los sistemas biológicos que participan más directamente en el suministro de nutrientes de los cultivos, la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* ha sido la más estudiada (Álvarez-Solís & León-Martínez, 1991). La inoculación de leguminosas con *Rhizobium* es una práctica agrícola común en muchos países y es usada para incrementar la producción de cultivos sin adición de fertilizantes nitrogenados.

La infección y la nodulación de leguminosas por las cepas apropiadas de *Rhizobium* pueden estimular substancialmente incrementos en el crecimiento y producción vegetal. Los grandes incrementos en los cultivos son usualmente obtenidos con inoculantes usados en áreas con un historial pobre de leguminosas. Los suelos plantados previamente con leguminosas invariablemente contienen poblaciones indígenas de *Rhizobium* (quienes pueden ser ineficientes en fijación de nitrógeno) que compiten con cepas inoculadas para ocupar los nódulos (Toro, 1996).

La importancia del uso y aplicación de los inoculantes microbianos se puede apreciar en trabajos realizados en cultivos comerciales utilizando leguminosas arbustivas tales como: *Leucaena leucocephala*, *Acacia farnesiana*, *Acacia mangium* en donde se han reportado aumentos mayores al 60 % en su crecimiento y producción. Asimismo, se reporta que la especie africana *Acacia auriculiformis* biofertilizada con *Rhizobium* fue capaz de fijar 170 Kg de N ha<sup>-1</sup> por año en un cultivo comercial (Bernhardreversat, 1996). Por otro lado, Singh *et al.* 1997, reportaron, que suelos pobres utilizados para la práctica agrícola y forestal, recuperaron su productividad, sustentabilidad y economía, cuando se introdujeron leguminosas arbustivas.

### **Caracterización de bacterias fijadoras de Nitrógeno**

La caracterización fenotípica junto con la genotípica continua jugando un sobresaliente papel en la descripción de nuevas especies, ya que el rol ecológico puede decidir el estatus de especie

### **Caracterización fenotípica**

Para evaluar las características fenotípicas de una cepa se compara con especies previamente definidas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Las pruebas de morfología, son las características fenotípicas clásicas, que pueden ser utilizadas para suministrar la información descriptiva de una especie (Vandamme *et al.*, 1996). En diversas investigaciones recientes donde se han descrito especies de *Rhizobium* se han realizado pruebas como la resistencia a antibióticos, a metales pesados, a salinidad, a acidez y a temperaturas elevadas, así como la capacidad de crecer en medio (PY)

carente de calcio, de acidificar o alcalinizar el medio YM, entre otras más (Valverde *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Rincon-Rosales *et al.*, 2008).

La taxonomía polifásica (Colwell, 1970), tiene por objeto incorporar diferentes tipos de datos e información fenotípica, genotípica y filogenética de los microorganismos. Este enfoque permite una mayor fiabilidad y mejor resolución de la interrelación entre los microorganismos. Los métodos fenotípicos incluyen técnicas donde no interviene directamente el material genético del organismo de interés, como las proteínas y sus funciones o características expresadas (Vandamme *et al.*, 1996).

### ***Caracterización genotípica.***

El análisis genotípico corresponde a todos los métodos destinados a la investigación de los ácidos nucleídos dentro de la célula. La diversidad genética de las cepas puede ser revelada con el uso de métodos moleculares, tales como AFLP y REP-PCR (*fingerprinting*). La posición filogenética de una bacteria puede ser determinada por el uso de la total o parcial secuencia del gen 16S ARNr y otros genes conservados (Figura ). Sin embargo, la secuencia completa de bases de ADN se considera un estándar de referencia absoluta para la estimación de las relaciones entre las bacterias.

### ***Análisis filogenético***

Un árbol filogenético es un esquema que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común. Los árboles filogenéticos se construyen tomando en cuenta la teoría de la evolución, que nos indica que todos los organismos son descendientes de un ancestro común: la protocélula. Así, todos los organismos, ya sean vivos o extintos, se encuentran emparentados en algún grado.

Cuando las secuencias de los dos ácidos nucleicos que se encuentran en dos organismos diferentes son similares, es probable que hayan sido derivados de un ancestro común. Existen varios métodos de alineación que deben ser aplicados a un conjunto de secuencias relacionadas antes de un análisis filogenético. Un alineamiento de secuencias revela cuales posiciones se conservaron y cuales divergieron de la secuencia de dicho ancestro común. Cuando se está completamente seguro de que dos secuencias comparten una relación evolutiva, las secuencias se denominan homólogas. El método más común de alineamiento múltiple de secuencias es el de adaptación progresiva (Figura 4). En dicho método se alinea primero las dos secuencias más relacionadas y a continuación, se agregan secuencias más alejadas o conjuntos de secuencias de esta alineación inicial. Una vez que el alineamiento de secuencias múltiples se ha obtenido, cada columna corresponde a un sitio individual que ha ido evolucionando de acuerdo a la variación de la secuencia. La mayoría de los métodos de análisis filogenéticos, suponen que cada posición en la secuencia de ácido nucleído ha cambiado de forma independientemente de los otros. Cuando se alinean las secuencias, se requiere insertar espacios en la alineación, estos representan una inserción o



basados en examinar todas las topologías posibles o un cierto número de topologías que están cerca del verdadero árbol y elegir uno que muestra la menor cantidad de cambio evolutivo total para ser el árbol final. El método de máxima parsimonia encuentra el árbol en menos pasos y se obtiene sumando el número de cambios en cada sitio informativo de cada árbol y selecciona aquel que requiere el menor número de cambios.

Un método para validar un árbol filogenético es el de Bootstrap, en el cual los datos se muestrean al azar produciendo nuevos alineamientos de la misma longitud, realizando repeticiones, así los árboles se predicen a partir de muchas de estas alineaciones de secuencias muestreadas. Por cada rama del árbol se predice la frecuencia con la que se repiten las mismas ramas (Felsenstein, 1988).

### ***Identificación bacteriana con la secuenciación de genes conservados y su análisis filogenético***

La secuencia de los ácidos nucleicos cambia con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas (Woese, 1987). El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Woese, 1987), se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procarionte, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y como consecuencia, en la clasificación



e identificación bacteriana (Figura 5). Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al 16S ADNr, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarlo. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento como el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés). Sin embargo, este método es incapaz de resolver la situación de cepas estrechamente relacionadas de una especie, ya que los acontecimientos recientes de evolución no son detectados por este gen (LeBlond-Bourget *et al.*, 1996). Es evidente entonces que los árboles filogenéticos basados en datos de la secuencia 16S ADNr deben utilizarse con cautela ya que además, en rizobios de rápido crecimiento existen hasta tres copias de este gen, las cuales podrían tener distintas secuencias (mosaicismo) por eventos de transferencia horizontal, como ya se ha reportado (Eardly *et al.*, 2005). Para resolver este problema se han seleccionado otros genes cromosomales los cuales se encuentran involucrados en funciones celulares más conservadas y antiguas como son el flujo de información genética: replicación de ADN, su transcripción a RNA y su traducción a las proteínas, que contribuyan a definir la posición taxonómica de las nuevas especies que se describen (Brown y Doolittle, 1997; Stackebrandt *et al.*, Estos genes han sido previamente usados en la filogenia de rizobios demostrando la capacidad de resolver congruentemente las posiciones taxonómicas de estos (Lloret, 2007). El uso de varios genes conservados incluyendo el *rrs* ha sido recomendado en el más reciente reporte del comité *ad hoc* en el 2002 para la definición de especies bacterianas (Stackebrandt *et al.*, 2002).

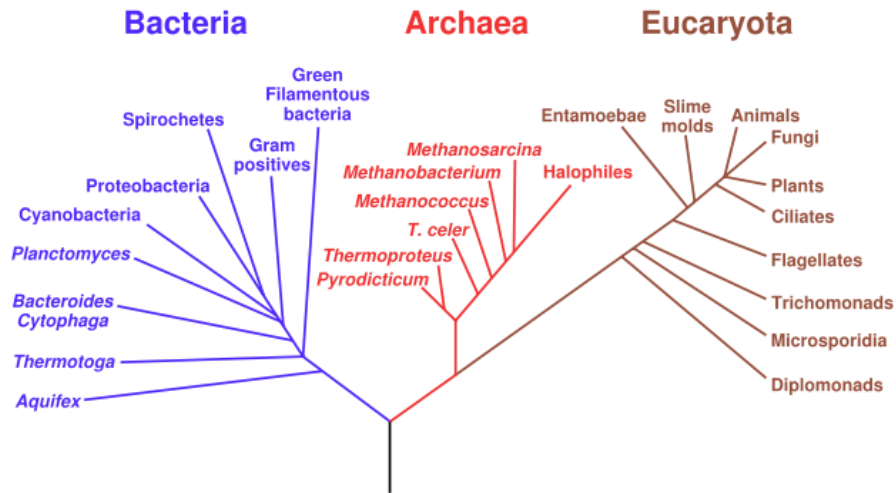


Figura 5. Árbol filogenético de todos los organismos existentes, llamado el árbol de la vida, está construido con secuencias de los genes 16S ARNr. Muestra la historia evolutiva de los tres dominios de la vida, bacterias, arqueas y eucariotas (Woese, 1987).

### **Análisis de genes simbióticos**

Los genes involucrados en la fijación biológica del nitrógeno, son más antiguos que los genes *nod*, pero en su historia más reciente, probablemente ambos evolucionaron juntos en los rizobios agrupándose en operones que se localizan en bloques cercanos unos de otros, cuya ubicación puede ser cromosomal en islas simbióticas o extracromosomal en los plásmidos simbióticos. Algunos de los genes de la nodulación parecen haber sido reclutados del cromosoma y codifican para funciones celulares comunes (Lloret y Martínez-Romero, 2005). La historia evolutiva de los genes simbióticos codificados en plásmidos (Martínez-Romero *et al.*, 1990) o

islas simbióticas (Gottfert *et al.*, 2001) dependen de su interacción con el ambiente y debe ser interpretada de forma independiente a la de los genes cromosomales. La secuenciación de los genes simbióticos (genes de la fijación del nitrógeno y los genes de nodulación) se ha utilizado en la identificación y asociación de rizobios. Los árboles construidos a partir de las secuencias de *nod* que codifican para los factores de nodulación y *nifH* que codifica para la enzima nitrogenasa-reductasa responsable de la fijación biológica del nitrógeno, están más relacionados con la taxonomía y la distribución geográfica de las plantas hospederas a diferencia de los árboles filogenéticos construido a partir de 16S ADNr, por lo que las filogenias construidas con los genes simbióticos son incongruentes con las filogenias del 16S rRNA y con otros genes conservados (Guo *et al.*, 1999).

## **V. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### **V.I Ubicación del experimento**

La caracterización fenotípica y pruebas de biofertilización fueron desarrolladas en laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, y la caracterización molecular fue realizada en el laboratorio de química analítica y biología molecular, ambos ubicados en el edificio Z del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG) Chiapas-México.

### **V.II Material Biológico**

#### **V.II.I Planta hospedera**

Se utilizaron plantas de *Acaciella angustissima*, *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala* y *Lysiloma acapulcensis*. Las plantas fueron propagadas a partir de semillas, las cuales fueron obtenidas del banco de semillas de leguminosas tropicales del ITTG. Las semillas fueron seleccionadas y se conservaron en bolsas de papel conteniendo cenizas naturales a una temperatura de 20°C hasta su posterior empleo.

#### **V. II. II Cepas bacterianas**

Las bacterias diazótrofes empleadas en esta investigación fueron las siguientes: La cepa *Sinorhizobium chiapanecum* ITTG S70, aislada de la leguminosa arbustiva *Acaciella angustissima* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009), proporcionada por el cepario del ITTG; la cepa diazotrofa 11B, aislada de la rizosfera de la banana (*Musa*

*comminata*), así como la cepa diazotrofa PZ-008 aislada de papaya (*Carica papaya*) estas últimas proporcionadas por el cepario del Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas-UNACH (campus Tapachula, Chiapas).

### **V.III Cultivo y manejo de microorganismos**

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en el medio PY<sup>++</sup>. (3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína, 15 g de agar bacteriológico, 10 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> al 0.7 M (Toledo *et al.*, 2007) todo esto diluido en 1 L de agua destilada; a pH final 6.8). Las cepas fueron colocadas en tubos de Eppendorf de 1.5 mL conteniendo una solución de glicerol al 60 %, conservados a -20°C (Rincón-Rosales *et al.*, 2009) y depositadas en el cepario del ITTG para su colección y conservación. Por aparte un set de estas cepas fue cultivado en medio PY<sup>++</sup> para su empleo rutinario.

### **V.IV Caracterización fenotípica de las cepas**

Para la caracterización fenotípica de las cepas bacterianas se realizaron las siguientes pruebas:

**V.IV.I Morfología colonial** Se inocularon cajas de Petri conteniendo medio sólido PY<sup>++</sup> con cada una de las cepas bacterianas para el estudio de la morfología de sus colonias (Vandamme *et al.*, 1996).

**V.IV.II Morfología microscópica** Las características microscópicas de las bacterias y el tamaño de la célula fueron analizados por medio de un microscopio electrónico de barrido de la marca TOPCON modelo SM-5100. Empleando el programa ORION 6.53-4 para las mediciones celulares.

**V.IV. III Tinción de Gram** Las características morfológicas de las células bacterianas de cada una de las cepas evaluadas en este experimento fueron analizadas mediante la tinción diferencial de Gram (Gamma-Ramírez, 1989). Las preparaciones fueron observadas al microscopio compuesto marca Carls Zeiss K4, empleando el objetivo de inmersión (100X).

**V.IV.IV Cultivo en medio sólido LB y PY** Cada una de las cepas se inoculó en el medio LB (Luria Bertani), (Anexo 1). Las cepas fueron incubadas a 28° C durante 48 h, al término de este tiempo fue observada la capacidad de crecimiento de las cepas bacterianas en este medio específico. De la misma manera se evaluó el crecimiento de las cepas en medio sólido PY sin la adición de calcio. (Anexo 2).

**V.IV.V Prueba de acidez/alcalinidad** La producción de acidez ó alcalinidad se determinó adicionando el indicador azul de bromotimol al 0.5 %. (Anexo 3). Según el vire de este indicador, las cepas se calificaron como productoras de alcalinidad y acidez. (Hungria, et al 2001)

**V.IV.VI Prueba de tolerancia a la salinidad** Para estudiar la tolerancia de cepas bacterianas a la salidad, las bacterias fueron cultivadas en medio PY<sup>++</sup> conteniendo las siguientes concentraciones de NaCl, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% y 6%. (Hungria, et al 2001)

**V.IV.VII Prueba de tolerancia a la temperatura y diferentes valores de pH** Con la finalidad de conocer la capacidad para tolerar temperaturas altas, las cepas fueron cultivadas en el medio PY<sup>++</sup> e incubadas a 37°C, durante 48 hrs. Para esta prueba se considera que la temperatura óptima de crecimiento de una bacteria rhizobiana es de 28° C. La variable de respuesta evaluada fue la capacidad de crecimiento, misma que fue clasificada como: escaso, normal, abundante y sin desarrollo, de acuerdo a la recomendación de Somasageran. Así también, se evaluó la capacidad para tolerar diferentes niveles de pH. Para este fin las bacterias fueron cultivadas en medio PY<sup>++</sup> ajustado a los siguientes valores de pH a 4.0, 7.0, 9.0 y 11. (Han *et al.*, 2008)

**V.IV.VIII Resistencia intrínseca a antibióticos** Para esta prueba cada una de las cepas fueron sembradas en el medio PY<sup>++</sup>. Bajo condiciones asépticas se colocaron los discos antibiogramas (Cuadro 1) específicos para bacterias Gram negativas de la marca Biorad® y fueron incubadas a 28 °C, durante 48 horas. Al término este periodo se midió con ayuda de un Vernier el halo de inhibición producido por los antibióticos al crecimiento de la bacteria. (Lloret *et al.*, 2007)

Cuadro 1. Características de los antibiogramas utilizados para evaluar la resistencia intrínseca de las cepas bacterianas diazótrofes.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración del disco (µg/ml)</b>
Amikacina	30
Ampicilina	10
Carbencilina	30
Gentamicina	10
Cefalotina	30
Cefotaxima	30
Netilmicina	30
Ciprofloxacina	30
Norfloxacina	30
Cloranfenicol	30
Trimetoprima-sulfametoxazol	25
Nitrofurantoína	300

**V.IV.IX Prueba de tolerancia a metales pesados** Las cepas fueron cultivadas en medio sólido PY<sup>++</sup> a 28°C enriquecido con metales pesados. Un grupo de cepas fue cultivado en presencia de Al<sup>+3</sup> (500 ug/ml de AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) y el otro grupo fue tratado con Cu<sup>+2</sup> (100 ug/ml de CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O). Las cepas fueron incubadas a 28°C y la capacidad de crecimiento en estos medios fué evaluada después de 72 hrs de cultivo. (Wang et al., 2002)



## ***V.V Caracterización genética de las cepas***

### ***V.V.I Extracción de ADN***

El ADN fue extraído de cada una de las cepas obtenidas usando el Kit para aislamiento de ADN de la marca Roche®. Se tomaron alícuotas de 200µL de las suspensiones bacterianas previamente conservadas en microtubos conteniendo medio líquido PY<sup>++</sup> mezclado con glicerol al 30% y se centrifugaron a 13000 rpm por 1.5 min, para separar el sobrenadante del paquete celular (pellet). El pellet fue resuspendido con 150 µL de solución de lisis con agitación suave. Las muestras se mezclaron vigorosamente con ayuda de un equipo vortex por 3 segundos, para luego ser incubadas a 80°C durante 40min, posterior a la incubación se adiciona a cada muestra 0.5 µl de RNAsa en solución (10mg/ml), nuevamente las muestras se mezclaron con ayuda de un vortex por 3 segundos. Se incubaron a 37°C por 30 min, se les agregó 60 µl de una solución salina amortiguadora para la precipitación de proteínas y se mezcló por 10 seg. Las muestras fueron incubadas en hielo por 10 min, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min a 25°C, cuidadosamente se separó el sobrenadante de cada muestra de las proteínas precipitadas y se pasó a tubos Eppendorff estériles de 0.6 ml. Posteriormente se adicionaron 200 µl de isopropanol a cada muestra, para ser mezcladas suavemente. Se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm y el sobrenadante fue decantado, de esta forma se obtuvo una pastilla de ADN en los tubos y se les agregó 200 µl de etanol al 70 % para lavar el ADN de cada muestra y se homogenizó por vortex, estas muestras nuevamente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min y el etanol se desechó dejando únicamente la pastilla de ADN en el

fondo del tubo. Estas pastillas fueron secadas dejando destapado el tubo por 30 min, el ADN así obtenido de cada muestra fue resuspendido con 25  $\mu$ l de solución hidratadora y se calentaron a 65°C por 30 min. Las muestras fueron guardadas a -20°C para su posterior uso. (Barnes et al., 1994)

### ***V.V.II Electroforesis de ADN extraído***

El gel para electroforesis fue preparado, disolviendo previamente 1.0 g de agarosa (Sigma®) en 100 mL de amortiguador TAE IX. (Anexo 4). El gel fue colocado en la cámara electroforesis conteniendo este mismo amortiguador. Los pozos del gel fueron cargados con una mezcla conteniendo 3  $\mu$ L de ADN extraído de cada una de las cepas analizadas, 2.5  $\mu$ l de amortiguador de carga (10ml de ficol al 15% con 5mg de azul de bromofenol y xilencianol), También, 2  $\mu$ L ADN-marcador 1 Kb fue colocado en el primer pozo como referencia de peso molecular. La electroforesis se corrió a 110 Volts y 400 mA por 35 min. Al terminar la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio al 1 %. Las bandas de ADN fueron observadas en un sistema de transiluminación usando fuente de luz UV a una longitud de onda 260 nm. (Selander et al., 1986)

### **V.V.III Amplificación de genes cromosomales y plasmidicos por PCR**

#### **V.V.III.1 Estudio de genes cromosomales:**

En este trabajo se estudio la ubicación taxonómica de las cepas 11B y PZ empleando las secuencias de los genes cromosomales 16S rDNA descritas por Weisburg et al,1991 y del gen rpoB (Khamis et al. 2003).

El gen 16S rDNA fue amplificado de acuerdo a las siguientes condiciones.

Cuadro 2. Mezcla de Reacción para el gen 16S.

Reactivo	1x(μl)
fD1	1
rD1	1
Mg (50 mM)	3
Amortiguador 10x	10
dNTP's (10 mM)	0.8
Taq polimerasa	0.5
DNA total	1
H2O miliQ	82.7
Total	100

El gen rpoB es un gen que codifica para la subunidad beta de la polimerasa fue analizado a partir del ADN total extraído de las cepas siguiendo el método empleado por Khamis *et al.* 2003, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mezcla de Reacción para rpoB.

Reactivo	1x(μl)
BR3200F	1
BR3950R	1
Mg (50 mM)	3
Amortiguador 10x	10
dNTP's (10 mM)	0.8
Taq polimerasa	0.5
DNA total	1
H2O miliQ	82.7
Total	100

Posterior a estas mezclas de reacción se amplificaron los genes por medio de PCR bajo el siguiente programa (Figura 6)

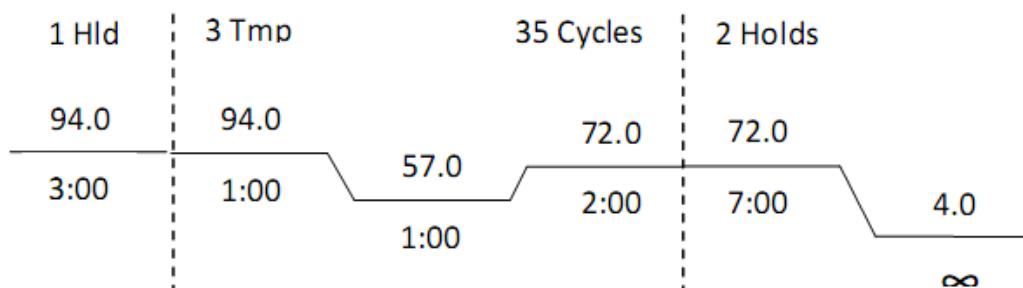


Figura 6. Programa utilizado para amplificar genes cromosomales.

### **V.V.III.II Electroforesis PCR**

El producto de PCR fue colocado en un gel de agarosa al 1% y se corrieron en una cámara de electroforesis a 110v por 30 min. Posteriormente el gel se tiñó en 300 ml de agua destilada con 40 µl de bromuro de etidio (5mg/ml) en agitación constante durante 5 minutos. Las bandas fueron observadas en un sistema de transiluminación usando fuente de luz UV a una longitud de onda 260 nm. (Selander et al., 1986)

### **V.V.III.II ESTUDIO DE GENES PLASMIDICOS**

Los genes plasmídicos fueron estudiados a través del gen nodA (Haukka et al, 1999) y el gen nifH (Lloret et al 2007), a partir del ADN total extraído de las cepas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mezcla de Reacción para nifH y nodA.

Reactivo	1x(µl)
Primer F	1
Primer R	1
Mg (50 mM)	3
Amortiguador 10x	10

dNTP's (10 mM)	0.8
Taq polimerasa	0.5
DNA total	1
H2O miliQ	82.7
Total	100

Posterior a la preparación de la mezcla de reacción se amplificaron los genes, por medio de PCR con el siguiente programa (Figura 7)

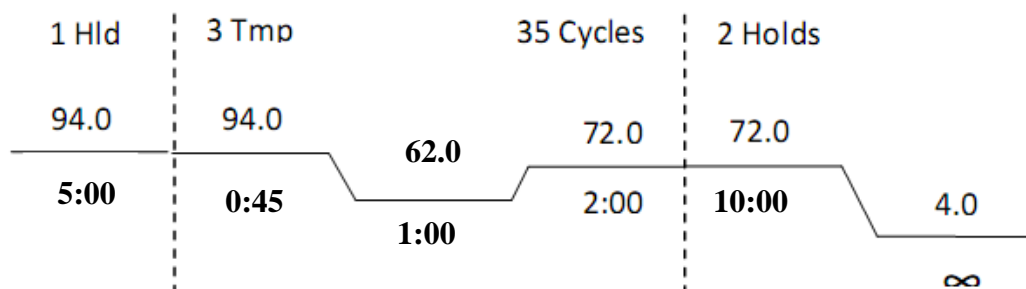


Figura 7. Programa de PCR utilizado para la amplificación de genes plasmídicos.

### ***V.V.III.III Electroforesis PCR de genes plasmídicos.***

Los productos de PCR fueron colocados en un gel de agarosa al 1% y se corrió en una cámara de electroforesis a 110v por 30 min. Posteriormente el gel se tiñó en 300 ml de agua destilada con 40 µl de bromuro de etidio (5mg/ml) en agitación constante durante 5 minutos. Las bandas fueron observadas en un sistema de transiluminación usando fuente de luz UV a una longitud de onda 260 nm. (Selander et al., 1986)

#### ***V.V.IV Purificación y secuenciación de genes 16S ADN<sub>r</sub> y rpoB.***

Los productos de PCR 16S y rpoB fueron purificados, para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit "PCR product purification system" de la marca Roche<sup>TM</sup>. Cada producto de PCR fue ajustado a un volumen de 100µl, al cual se le adicionaron 500µl de solución amortiguadora de unión (Binding Buffer) y fue mezclado cuidadosamente, posteriormente se pasó esta mezcla a un tubo con un filtro de columna insertado sobre un tubo recolector y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto. La solución que pasó a través del filtro fue descartada. Este proceso se repitió dos veces mas adicionando en la primera 500µl de buffer de lavado (Wash Buffer), y en la segunda 200µl de la misma solución. A continuación el tubo con el filtro se trasladó a un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.5ml y se colocaron 85µl de buffer de elución (Elution Buffer) y se centrifugó nuevamente durante un minuto para obtener el ADN purificado.

Las muestras de ADN purificado fueron cuantificadas utilizando espectrofotometría y enviados para su secuenciación a la empresa MACROGEN. (Lee et al., 2003)

#### ***V.V.V Análisis filogenético e identificación de especies bacterianas***

Las secuencias sentido y antisentido ("forward" y "reverse") de cada cepa fueron editadas con el programa BIOEDIT v.7.0.0 (Hall, 1999). Se editaron los cromatogramas de forma manual corroborando visualmente la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le asigna un pico de color distinto) con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del cromatograma. Una vez editadas las secuencias, se procedió a realizar un BLAST para determinar la

homología con las secuencias previamente reportadas en el GenBank en la página web de NCBI (National Center for Biotechnology Information) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Se analizaron por el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) con el modelo de Tamura-Nei utilizando el software MEGA v.4 (Kumar et al., 2004).

### ***V.V.VI Visualización de plásmidos a través de la técnica de Eckhardt***

Para observar el patrón de plásmidos de las bacterias aisladas se utilizó la técnica de Eckhardt (1978) modificado por Hynes (1990), para ello las cepas fueron cultivadas en medio PY<sup>++</sup> líquido y se incubaron a 28°C durante toda la noche. Se tomaron de éste cultivo 200µL en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, para luego adicionarle 600µL de solución de sarkosyl al 0.3% preparado en amortiguador Tris Boratos 1X (*Anexo 5*), esta suspensión se mezcló en un vórtex y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min, el sobrenadante fue desechado y el pellet resuspendido en 20 µL de solución E1 (la solución E1 contiene sacarosa al 10% en TB 1X mas 0.4 mg/mL de RNAsa). Antes de resuspender las células se les adicionó 5 mg/mL de lisozima a la solución E1, inmediatamente se procedió a cargar el gel, éste se preparó con 0.7% de agarosa en tris boratos (TBE) al 1X que contiene SDS a una concentración de 10%. La electroforesis fue realizada en TB 1X, a 10 Volts por 15 min, para posteriormente correr a 80 Volts por 4h, esto se realizó a una temperatura de 15°C. Finalmente el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.



## **V.VI Pruebas de competencia entre las cepas bacterianas diazótrofes.**

### **V.VI.I Desinfección y escarificación de semillas.**

En los casos de *Acaciella angustissima*, *Leucaena leucocephala* y *Lysiloma acapulcensis* se escarificaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y después desinfectadas en cloralex® al 25 % y lavadas varias veces con agua destilada esterilizada para eliminar trazas del cloro (Rincón *et al.* 2003). Las semillas de *P. vulgaris* se sumergieron previamente en una solución de etanol al 70% y posteriormente se desinfectaron en cloralex al 25% y se lavaron varias veces para eliminar residuos del desinfectante. Las semillas fueron germinadas en cajas Petri conteniendo medio Agar-Agua (anexo 6) bajo condiciones asépticas en una cámara de germinación a 28°C. Las plántulas recién germinadas fueron seleccionadas y sembradas bajo condiciones de cámara bioclimática humedecidas periódicamente con agua tridestilada esterilizada (Lloret *et al.* 2007). y utilizadas en las diferentes pruebas de crecimiento, fijación de nitrógeno y nodulación.

### **V.VI.II Condiciones de cultivo**

Para la evaluación del crecimiento y la cantidad de nitrógeno fijado, las plantas de *A. angustissima* fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 300 ml y las plantas de *P. vulgaris*, *L. leucocephala* y *L. acapulcensis* fueron cultivadas en tubos de vidrio (20 x 200 mm). En estos sistemas de cultivo fue adicionado como sustrato vermiculita® (previamente esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min) y enriquecido con una solución nutritiva libre de nitrógeno (Farhaeus, 1957). Las plantas se mantuvieron en condiciones de cámara bioclimática a 25°C bajo condiciones asépticas.

### **Tratamientos**

Los tratamientos que se evaluaron en este experimento se presentan en el cuadro 5..

Cuadro 5. Tratamientos empleados en la prueba de nitrógeno fijado y evaluación del crecimiento.

No.	Tratamiento	Clave
1	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	11B
2	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	PACHAZ-8
3	<i>Sinorhizobium chiapanecum</i> ITTG S70	ITTG S70
4	<i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	(11B+S70)
5	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	(PZ+S70)
7	<i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	(11B+PZ)
8	Control negativo	Sin-inoculo y sin N

### **V.VI.III Diseño experimental.**

Se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Este diseño estuvo conformado por 8 tratamientos (Cuadro 5) con 3 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental consistió de un matraz o un tubo conteniendo una planta cada uno. En total fueron evaluadas 24 plantas de cada leguminosa. (Rincón et al., 2008)



Fig 8. Sistema de cultivo de las plantas de *Leucaena leucophala* empleadas en la prueba de competencia.

#### **V.VI.IV Aplicación de los tratamientos.**

Las bacterias diazotróficas se cultivaron en el medio nutritivo PY<sup>++</sup> (anexo). Todas las bacterias se cultivaron a 28°C durante 24-48 h en agitación constante a 120 rpm. Después, mediante mediciones espectrofotométricas se determinó la concentración de células que se emplearían en los inóculos. Para todas las bacterias se empleó una concentración de  $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>. Cuando las plantas tuvieron 10 días de germinadas se inocularon en forma individual o combinadas, aplicando dos ml de inóculo directamente a la base de la planta utilizando una micropipeta. Las plantas empleadas como control negativo no recibieron ningún tipo de tratamiento.

#### **V.VI.V Evaluación de la variable de respuesta**

La competitividad entre las cepas fue evaluado con base en el número de nódulos obtenidos en cada una de las plantas inoculadas con las (*cepa-tratamiento*) en forma individual o combinada. Para este fin, los nódulos formados en las plantas leguminosas se colectaron y desinfectaron en una solución de etanol al 75% durante 2 min, y posteriormente se colocaron en una solución de cloralex al 25% por 5 min y después se lavaron varias veces para eliminar los residuos del desinfectante (Toledo *et al.* 2003). Los nódulos desinfectados fueron exprimidos y el jugo celular fue sembrado en placas de PY<sup>++</sup> e incubadas a 28°C durante 48 h. La identificación de las cepas reisladas se determinó con base en la morfología de las colonias formadas en el medio de cultivo.

#### **V.VII Prueba de rango de hospedero.**

Con la finalidad de evaluar el potencial de nodulación de las cepas bacterianas 11B, PACHAZ-8 y *Sinorhizobium chiapanecum* ITTG S70, se llevó a cabo la prueba de rango de hospedero que consistió en inocular cada una de estas cepas evaluadas en cuatro diferentes leguminosas hospederas. En el Cuadro 6, se indican las leguminosas utilizadas en esta prueba, así como los tratamientos de escarificación y desinfección aplicados a las semillas de cada una de estas especies.

Cuadro No. 6 Leguminosas, tratamientos y tiempos de escarificación para cada una de leguminosas empleadas en la prueba de rango de hospedero.				
Leguminosas	Desinfección con cloralex al 25% (min)	Tratamiento con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (min)	Tratamiento con etanol al 70% (min)	Tiempo de germinación (días)
<i>Acaciella angustissima</i>	5	5		3
<i>Phaseolus vulgaris</i>	10		10	4
<i>Leucaena leucocephala</i>	5	5		3
<i>Lysiloma acapulcensis</i>	5	5		4

Las semillas recién germinadas de cada una de las leguminosas fueron sembradas en matraces Erlenmeyer de 300 ml conteniendo vermiculita, previamente esterilizada a 120°C y humedecida con una solución nutritiva libre de N<sub>2</sub> (Fahraeus, 1957). Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de cámara bioclimática a 25°C. Los matraces fueron arreglados siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones (De la Vara y Gutiérrez, 2008). Cuando las plantas habían perdido el cotiledón fueron inoculadas con cada una de las cepas bacterianas diazotróficas (tratamientos). Cada plántula fue inoculada con 1 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de 1X10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> (Rincón *et al.*, 2009). Sesenta días después de la inoculación las plantas fueron colectadas y el número de nódulos fue determinado. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y las variables que resultaron significativas se les aplicó la prueba de LSD (diferencia mínima significativa a una p<0.05) (Rincon *et al.*, 2009).

## V.VIII Prueba de Biofertilización de *A. angustissima* inoculada con bacterias diazotróficas

### V.VIII.I Sistema de cultivo

Para el estudio del crecimiento y fijación de nitrógeno, plántulas de *A. angustissima* fueron cultivadas bajo condiciones asépticas en tubos de vidrio de 20 X 200 mm conteniendo como sustrato vermiculita®, previamente esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min y enriquecidos con solución Farhaeus nutritiva libre de nitrógeno (Farhaeus, 1957). Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio en una cámara bioclimática a 25°C.

### V.VIII.II Tratamientos

Los tratamientos que se evaluaron en este experimento se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos empleados para la prueba de biofertilización de *A. angustissima*.

No.	Tratamiento	Clave
1	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	11B
2	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	PACHAZ-8
3	<i>Sinorhizobium chiapanecum</i> ITTG S70	ITTG S70
4	<i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	(11B+S70)
5	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	(PZ+S70)
6	Control positivo	N-NO <sub>3</sub> (30 mg/planta)
7	Control negativo	Sin-inoculo y sin N

### ***V.VIII.III Diseño experimental.***

Se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Este diseño estuvo conformado por 7 tratamientos (Cuadro 7) con 4 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental contó con 2 tubos con una plántula cada uno. En total fueron evaluadas 56 plantas. (Rincón et al., 2009)



Fig 9. Sistema de cultivo de las plantas de *A. angustissima* empleadas en el experimento de co-inoculación con bacterias fijadoras de N.

#### **V.VIII.IV Aplicación de los tratamientos.**

Las bacterias 11B Y PZ-08 fueron previamente cultivadas en un caldo nutritivo denominado Nfb (ver anexo 7. Ácido málico 5 g,  $K_2HPO_4$  10% 5ml,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10% 2ml,  $NaCl_2$  10% 1 ml,  $FeSO_4$  40 mg,  $NaMoO_4 \cdot 7H_2O$  0.1% 1 ml, KOH 4.8 g,  $NH_4Cl$  200 mg, Extracto de levadura 0.3 g, todo esto aforado a 1 L de agua destilada) y la bacteria simbiótica *Sinorhizobium* fue cultivada en medio  $PY^{++}$ . Todas las bacterias se cultivaron a 28°C durante 24 h en agitación constante a 120 rpm. Mediante mediciones espectrofotométricas se determinó la concentración de células que se emplearían en los inóculos. Para todas las bacterias se empleó una dosis de  $1 \times 10^6$  cel  $ml^{-1}$ . Cuando las plantas tuvieron 10 días de germinadas se inocularon en forma individual o combinadas, aplicando 2 mL de inóculo directamente a la base de la planta utilizando una micropipeta. Las plantas empleadas como control negativo no recibieron ningún tipo de tratamiento. Las plantas empleadas como control positivo fueron fertilizadas con nitrógeno empleando  $KNO_3$  como fuente de este elemento. Cada planta recibió 2 ml de esta solución al 1.25 M.

#### **V.VIII.V Variables de respuesta.**

Las plantas fueron colectadas a los 60 días después de la inoculación y/o aplicación de los tratamientos y se procedió a la medición de las siguientes variables:

- a) Altura de planta (cm). Con la ayuda de una escala milimétrica fue medida la altura de las plantas de *A. angustissima* desde la base de la raíz hasta el meristemo apical principal.



- b) Peso seco total de planta (mg). El material vegetal completo, fue secado previamente en un horno a una temperatura de 60° a 65°C durante 48 horas, posteriormente se determinó el peso seco en una balanza analítica digital marca OHAUS.
- c) No. de nódulos efectivos. Únicamente fueron considerados aquellos nódulos enteros, completos y de color café o rojos (Galiana *et al.*, 1998).
- d) Cantidad de nitrógeno fijado en la planta (mg/planta). Las plántulas completas fueron secadas de 60 a 65°C durante 48 h. Posteriormente se trituraron hasta obtener un polvo fino. La muestra fue digerida con mezcla digestora y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 1 a 1.5 h, la cual fue diluida con agua destilada tomando 5 ml de la misma colocada en un vial o celda del espectrofotómetro y se procedió a determinar la concentración de nitrógeno fijado en la planta tomando la lectura en un espectrofotómetro marca HANNA modelo C215 ejecutando el programa 4 (nitrógeno bajo). El nitrógeno fue expresado en términos de mg/L de N-NO<sub>3</sub>.

#### **V.VIII.VI Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza empleando el software estadístico Statgraphic v.5.1. Asimismo, la comparación de medias fue realizado mediante la prueba de Tukey (P<0.05). (Rincón *et al.*, 2008)

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

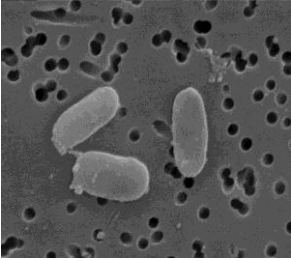


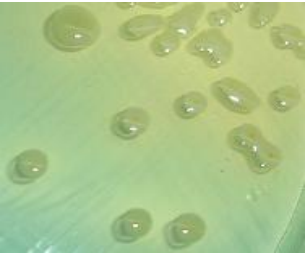
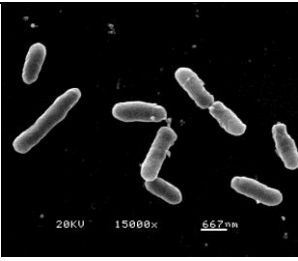

### VI.I Características fenotípicas de las bacterias diazotróficas

De acuerdo al estudio microscópico realizado a las cepas bacterianas utilizadas en este estudio, se observaron los siguientes resultados presentados en el cuadro No. 8 y figura 10.,

Cuadro 8. Características morfológicas de las colonias formadas en el medio de cultivo PY por cepas bacterianas diazotróficas.

Cepa	Características morfológicas	
	Célula bacteriana	Colonias
<i>Rhizobium sp.</i> 11B	Las células son Gram negativos, aeróbicos, móviles, bacilos no formadores de esporas, de 1-3 $\mu\text{m}$ de largo y de 0.3-0.5 $\mu\text{m}$ de ancho.	Colonias circulares, convexas, amarillas, brillosas, de 1-2 mm de diámetro dentro de 48-72 h a 28 ° C, borde liso y mucilaginoso.
<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	Bacilos cortos (1.5 x 0.8 $\mu\text{m}$ ), Gram negativos, presentan gránulos refráctiles, movilidad por flagelos polares	Colonias circulares, blancas nacaradas, brillosas, de 2.0-4.0 mm de diámetro dentro de 24-48 h a 28°C, mucilaginosas.

<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	Bacilos cortos (1.2 x 0.5 $\mu\text{m}$ ), Gram negativos, presentan abundantes gránulos refráciles, movilidad por flagelos subpolares.	Colonias circulares, blancas brillosas, ligeramente traslucidas, de 2-4 mm de diámetro dentro de 24-48 h a 28°C. Produce abundantes polisacáridos extracelulares.
-----------------------------------	---	--

 <p>Cepa <i>Rhizobium</i> sp. 11B</p>	 <p>Colonias de <i>Rhizobium</i> sp. 11B</p>
 <p>Cepa <i>Agrobacterium</i> sp. PACHAZ-8</p>	 <p>Colonias de <i>Agrobacterium</i> sp. PACHAZ-8</p>
 <p>Cepa <i>S. chiapanecum</i> ITTG-S70</p>	 <p>Colonias de <i>S. chiapanecum</i> ITTG-S70</p>
<p>Fig. 10. Características morfológicas de las cepas bacterianas empleadas en las pruebas de biofertilización.</p>	

Las cepas diazotróficas evaluadas que fueron cultivadas en el medio YMB, presentaron reacción ácida, esto se comprobó, debido a que el medio de cultivo viró de color verde-turquesa (pH 6.8) a amarillo (pH 5.0) (Fig. 10). La prueba de acidez/alcalinidad es empleada comúnmente para identificar el género rhizobiano (Hungria *et al.*, 2000). Por lo general las especies bacterianas pertenecientes al género *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* tienen una alta producción de polisacáridos extracelulares por lo que presentan reacción ácida en el medio de cultivo y el género *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* muestran una reacción alcalina y una baja producción de estos polisacáridos (Graham, 1992). También se observó que la cepa *Agrobacterium tumefaciens* PACHAZ-8 fue la que registró mayor tolerancia a la salinidad. Esta cepa creció en el medio PY<sup>++</sup> a una concentración de 3% de NaCl, esta capacidad de la bacteria se corroboró, por el hecho de que esta cepa pudo crecer en el medio LB, el cual se caracteriza por contener una concentración alta de NaCl. Varias especies de *Rhizobium* sp. han sido reportadas ser sensibles a la presencia de sal en el medio de cultivo y no pueden tolerar más que 2% de NaCl (Graham & Parker, 1964). En este trabajo encontramos, que la cepa *Rhizobium multihospitium* 11B tuvo la capacidad de crecer a una concentración del 2% de NaCl, así también pudo crecer en el medio LB y en el medio PY sin calcio. Por otro lado, la cepa *Sinorhizobium chiapanecum* ITTG S70 creció a una concentración del 2% de NaCl y no crece en LB.

La temperatura y el pH óptimo de crecimiento de las bacterias evaluadas fue de 28°C y 6.5 respectivamente; y solamente las cepas 11B y PACHAZ-8 tuvieron la capacidad de crecer a 37°C. En relación al pH solamente la cepa *A. tumefaciens* PACHAZ-8 tuvo la capacidad de crecer en un rango de pH que va desde 4.0 hasta 11.0. La mayor parte de los *Agrobacterium* aislado de leguminosas han demostrado capacidad para crecer a pH extremos (Mohamed *et al.*, 2000). Con respecto a la

prueba de antibióticos, las tres cepas rhizobianas evaluadas en este estudio, resultaron resistentes a los antibióticos: Amikacina, gentamicina y netilmicina, y sensibles a: Cefalotina y trimetoprima-sulfametoxazol. En forma específica la cepa 11B resultó resistente a la ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol y nitrofurantoina, y sensible a carbencilina, ciprofloxacina y norfloxacina, la cepa PACHAZ-8 fue resistente a Norfloxacina y sensible a ampicilina, carbencilina, cefalotina, ciprofloxacina, cloranfenicol y nitrofurantoina; y la cepa ITTG S70 mostró ser resistente a ciprofloxacina y norfloxacina y sensible a ampicilina, carbencilina, cefalotina, nitrofurantoina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol. Odee, *et al.* (1997) reportaron que bacterias del género *Rhizobium* aislados de distintas especies de *Acacia* fueron sensibles a la amikacina y kanamicina, y muy resistentes al cloranfenicol, y cefalotina. En ocasiones, se pueden presentar variaciones en relación a la resistencia a los antibióticos en algunos rhizobios, esto puede deberse, a los factores abióticos que influyen sobre la bacteria en su ambiente de crecimiento. La prueba de sensibilidad a los antibióticos es muy importante para la caracterización e identificación fenotípica de las bacterias (Jordan, 1984). En relación a la prueba de resistencia a metales pesados, la cepa *Rhizobium sp.* 11B mostró sensibilidad a la presencia del  $\text{Cu}^{+2}$  y también al  $\text{Al}^{+3}$ ; la cepa *Agrobacterium sp.* PACHAZ-8 fue tolerante a ambos metales mientras que la cepa *S. chiapanecum* ITTG S70 mostró tolerancia al  $\text{Al}^{+3}$  y más sensibilidad al  $\text{Cu}^{+2}$ . Se ha reportado la existencia de sistemas de expulsión de cationes en algunas especies de *Rhizobium* spp. mediadas por ATPasas en las membranas celulares (Cervantes *et al.*, 2006) y proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (CDF). Este sistema de expulsión es controlado por genes ubicados en plásmidos (Nies, 2003). Al parecer la cepa *Agrobacterium sp.* PACHAZ -8 utiliza este mecanismo bioquímico para tolerar la presencia de estos metales pesados.

En el cuadro 9 se puede ver un resumen selecto de la caracterización fenotípica de las bacterias diazotrofas estudiadas.

Cuadro 9. Características fenotípicas seleccionadas de las cepas rizobianas y de referencia.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	TRATAMIENTOS		
	11B	PACHAZ-8	ITTG S70
Tinción de Gram	-	-	-
Crecimiento en LB	+	+	-
Medio PY sin calcio	+	-	-
Producción de acidez en medio YEM conteniendo azul de bromotimol 25 mg L <sup>-1</sup> (p/v) como indicador de Ph	+	+	+
Tolerancia en NaCl:			
0.5 %	+	+	+
1.0 %	+	+	+
2.0 %	+	+	+
3.0 %	-	+	-
4.0 %	-	-	-
6.0 %	-	-	-
Crecimiento en medio PY sólido a diferentes pH a 28° C:			
4.0	-	+	-
7.0	+	+	+
9.0	+	+	-
11.0	-	+	-
Crecimiento en PY a 37° C	+	+	-

Resistencia intrínseca a antibióticos (ug ml <sup>-1</sup> ):			
Ampicilina	+	-	-
Amikacina	+	+	+
Carbencilina	-	-	-
Gentamicina	+	+	+
Cefalotina	-	-	-
Cefotaxima	+	-	-
Netilmicina	+	+	+
Ciprofloxacina	-	-	+
Norfloxacina	-	+	+
Cloranfenicol	+	-	-
Trimetropima-sulfametoxazol	-	-	-
Nitrofurantoína	+	-	-
Tolerancia a metales pesados			
Al <sup>+3</sup> ( 500 ug/ml) AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	+	+
Cu <sup>+2</sup> (100 ug/ml) CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	+	-



## VI.II Caracterización molecular.

### VI.II.I Electroforesis del ADN

En la fotografía del gel de electroforesis se observan las bandas del DNA total obtenido de las cepas bacterianas.

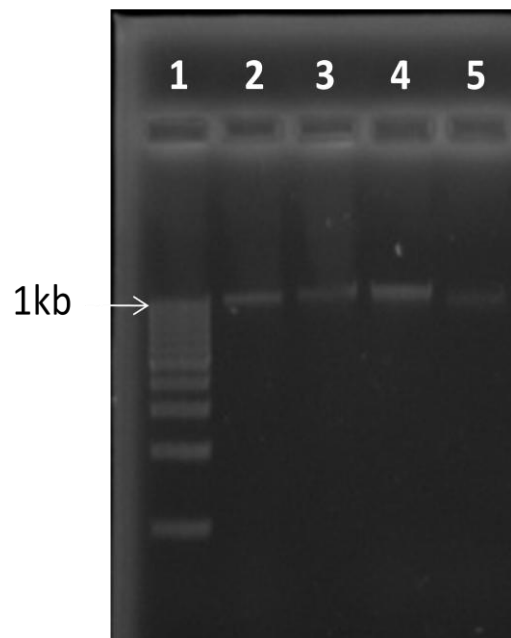


Fig 11. Fotografía de electroforesis de ADN total, observamos en el carril 1.- marcador molecular 1kb, en el carril 2.-11B, carril 3.-PZ, carril 4.-*Sinorhizobium chiapanecum* S70, carril 5.- *Rhizobium etli* CFN42 .

Este procedimiento permitió determinar la cantidad y pureza del ADN extraído. De acuerdo a la determinación espectrofotométrica. Esta información es importante para las diferentes pruebas moleculares que se realizan en la caracterización genética de las bacterias. La cantidad de ADN aislado puede variar dependiendo de la metodología de extracción, así como de la cantidad de suspensión celular que se utilice para la extracción (Selander et al., 1986).

### VI.II.II Análisis de genes 16s y rpoB

Para comprobar el éxito de la amplificación de los genes 16S y rpoB, se realizó una electroforesis para cada gen, en la figura 12 se muestra el gel correspondiente a la fracción 16S.

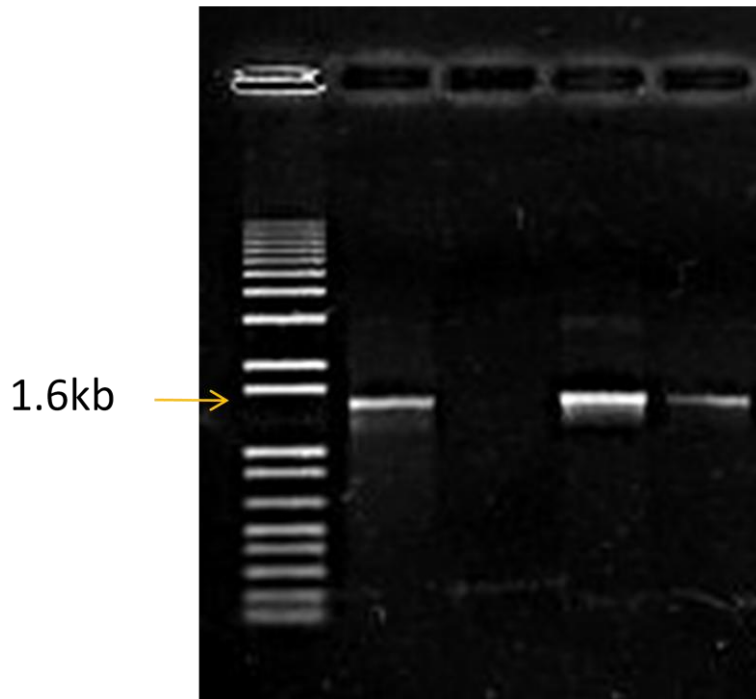


Fig 12. Electroforesis gen 16S en el Carril 1.-marcador de peso molecular, en el 2.-*Rizobium sp.11B*, 3.- control negativo, 4.- PZ, 5.-*Sinorhizobium chiapanecum S70*.

De la misma manera se realizó con el gen rpoB. Después de esto se purificó el producto de PCR para su posterior secuenciación.

### ***VI.II.III Análisis filogenético***

Las secuencias obtenidas de estas cepas fueron alineadas con otras secuencias de diferentes géneros, las cuales fueron usadas como referencias para el análisis filogenético. De este modo cada árbol filogenético fue construido por el algoritmo de Neighbor-Joining, usando secuencias de cepas tipo, continuación se presentan sus respectivos árboles filogenéticos para tener una visión más clara de su posición taxonómica (Fig. 13)

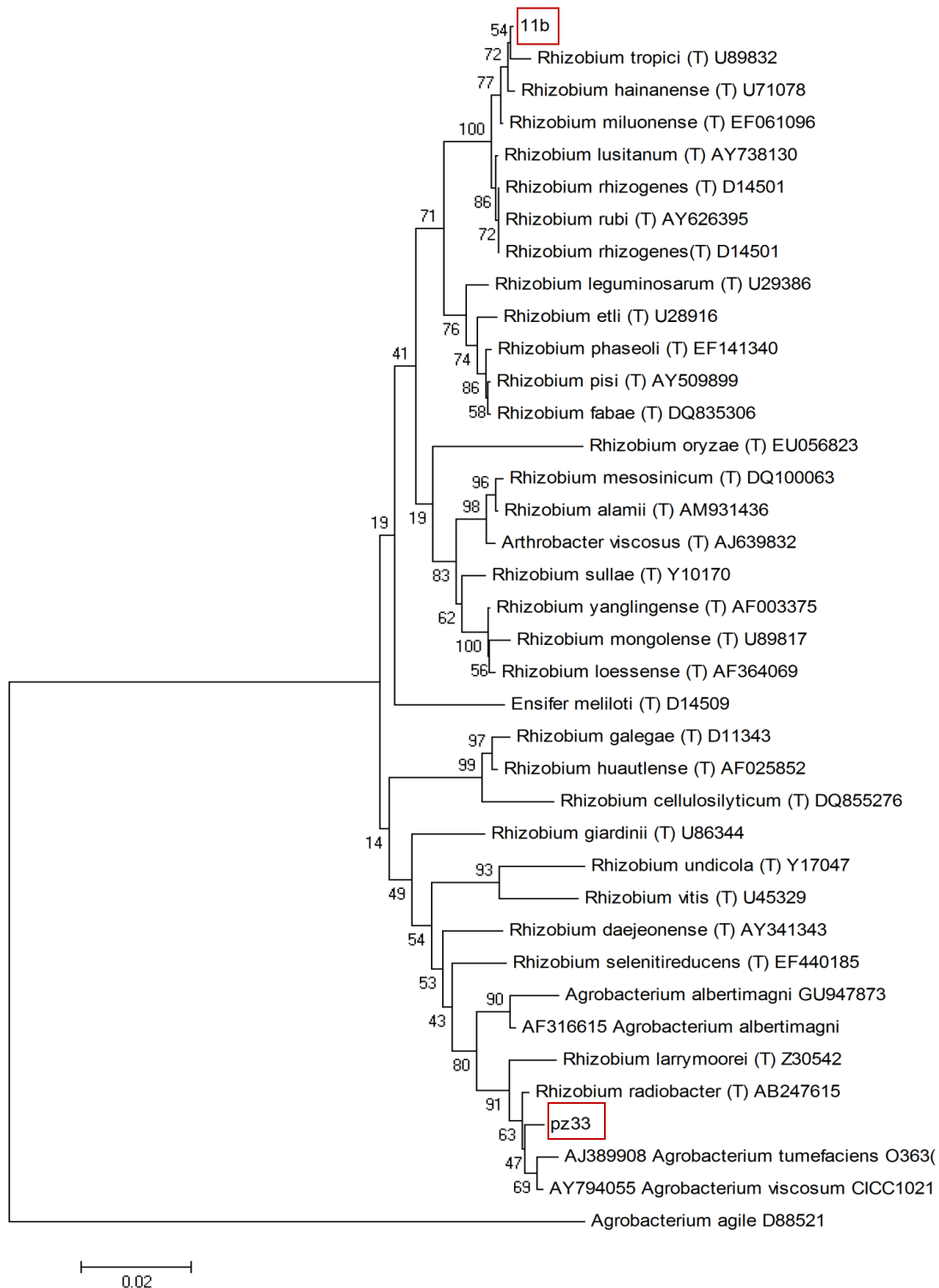


Fig 13. Árbol filogenético 16S estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S ADNr usando el modelo Tamura Nei. Las cepas 11B y PZ se encuentran en indicadas con un cuadro color rojo.

Se logró la caracterización genética de estas dos cepas fijadoras de N mediante la amplificación de genes cromosomales y el análisis filogénico indicó que la cepa **11B** corresponde a una bacteria perteneciente al género *Rhizobium* sp. filogenéticamente cercano a *Rhizobium tropici* y a *R. multihospitium*,. En el caso de la PZ demuestra cercanía con *Agrobacterium tumefaciens* y *R. radiobacter*.

Debido a la importancia y potencial de la cepa *Rhizobium* sp. 11B se realizó un análisis del gen 16S con mas especies rhizobianas de referencia, obteniendo el siguiente árbol filogenético.

## INGENIERIA BIOQUIMICA.

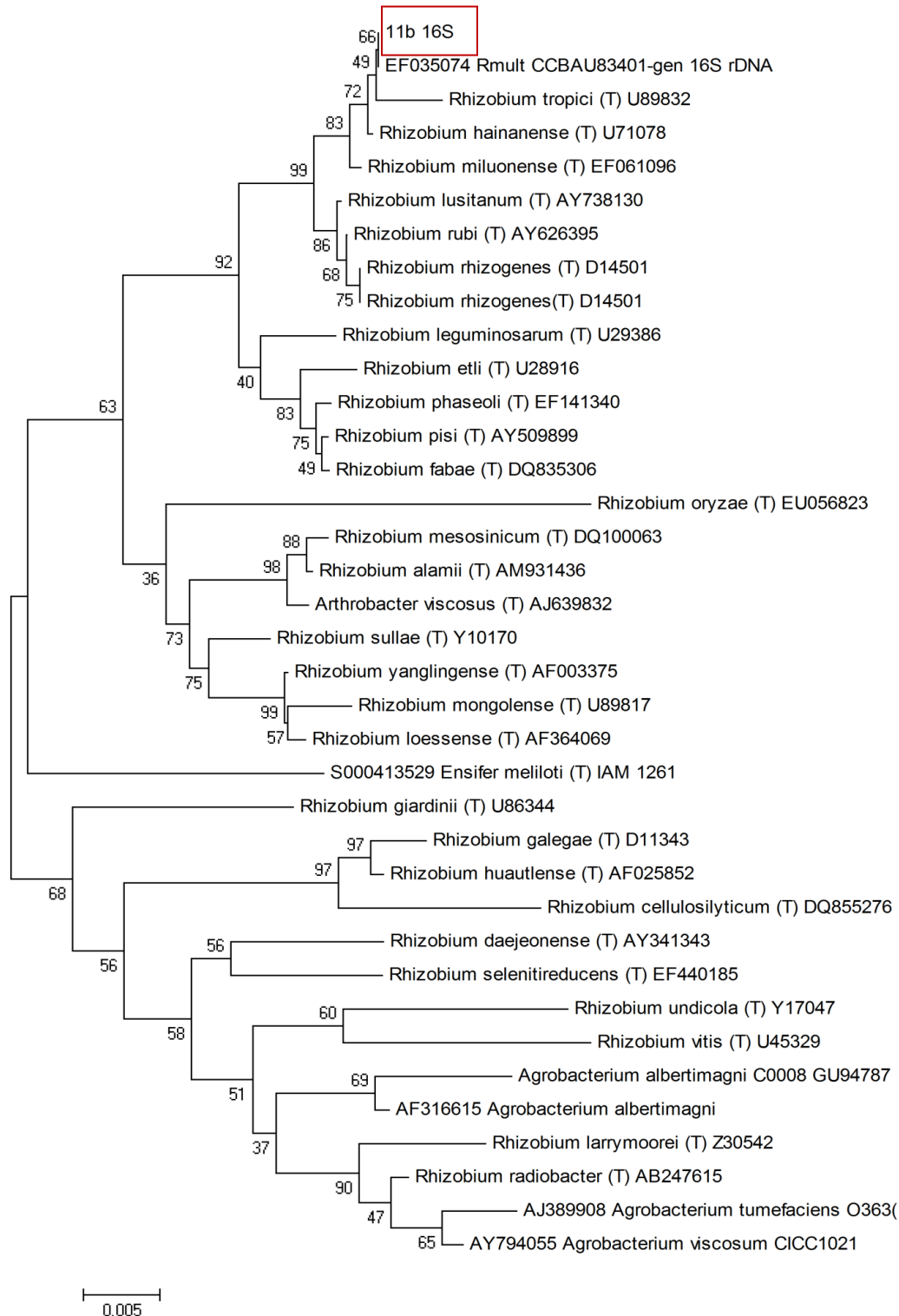


Fig 14. Árbol filogenético 16S estimado por el método NJ con la secuencia del gen 16S ADNr usando el modelo Tamura Nei. Las cepa *Rhizobium sp.* 11B se muestra indicada con un cuadro color rojo.

El análisis filogenético del gen *rpoB* corrobora que la cepa bacteriana 11B pertenece al género *Rhizobium* como se indica en la figura siguiente.

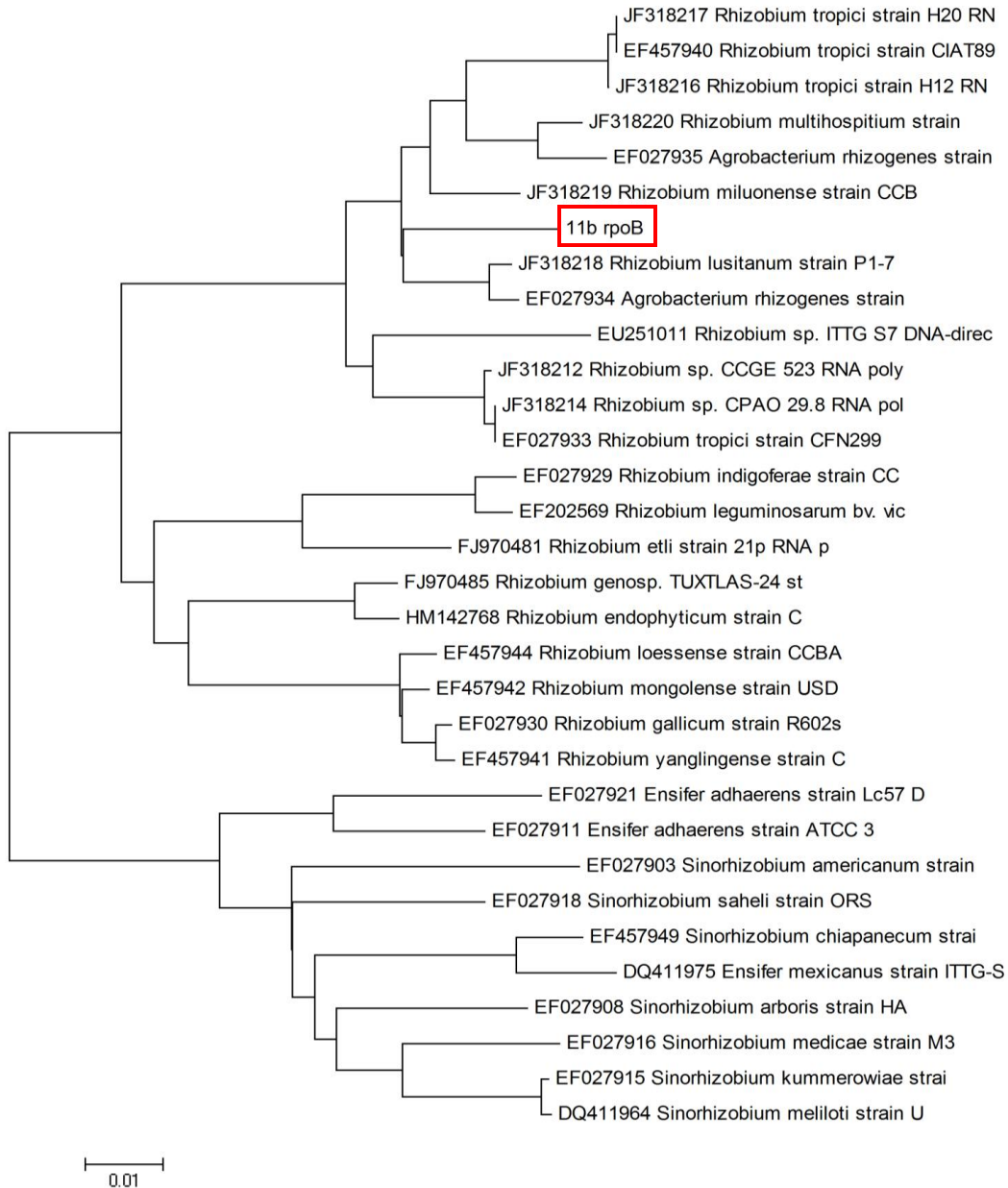


Fig 15. Arbol filogenético estimado por el método NJ con la secuencia del gen *rpoB* usando el modelo Tamura Nei. Las cepa *Rhizobium* sp. 11B se muestra indicada con un cuadro color rojo.

#### **V.II.IV Analisis genes plasmidicos.**

Se amplificaron genes plasmídicos que permiten conocer que la bacteria *Rhizobium* sp. 11B tiene potencial de fijación de nitrógeno, como se muestra en la imagen siguiente.

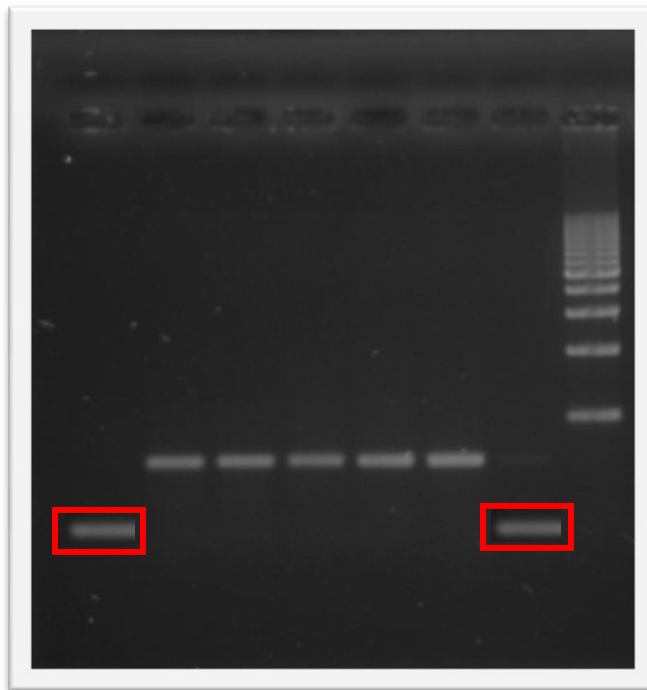


Fig 16. Fotografía gel de electroforesis del gen nifH. En el carril 1.- *Rhizobium* sp. 11b, 2.- *Sinorhizobium chiapanecum* S70, 3.- *Rizobium* sp. JM 4.- *Rhizobium etli* CFN42 5.- *Rhizobium tropici* CFN299, 6.- *Sinorhizobium mexicanum* R7 7.- *Rhizobium* sp. 11b observamos el marcador de peso molecular, en el carril 8.

En la figura 16 observamos la presencia del gen nifH el cual indica que las bacterias poseen la maquinaria genética que les confiere la capacidad de fijación de N. La diferencia entre las bandas de la cepa *Rhizobium* sp. 11B, puede deberse a la inespecificidad de los oligonucleótidos utilizados debido a que son diseñados para *Sinorhizobium* sp. A pesar de esto observamos la presencia de dicho gen.



### V.II.V Análisis del plásmido simbiótico (Eckhardt)

En especies de *Rhizobium*, los genes esenciales para la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno están regularmente localizados en un plásmido llamada plásmido simbiótico (pSym). La cepa de referencia *Rhizobium etli* CFN42 presenta este plásmido con un tamaño aproximado de 372 Kb. Comparando distancias de migración de estos plásmidos contra los de las cepas estudiadas, se determinó que la cepa 11B *Rhizobium sp.* tiene un plásmido simbiótico de aproximadamente 371kb, muy similar al de *R. etli* CFN42. Como se puede apreciar en el cuadro rojo de la figura 17.

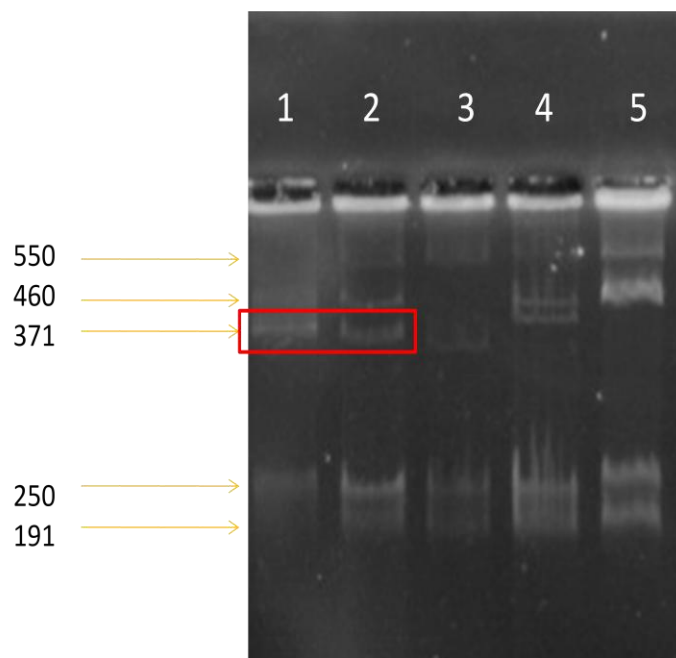


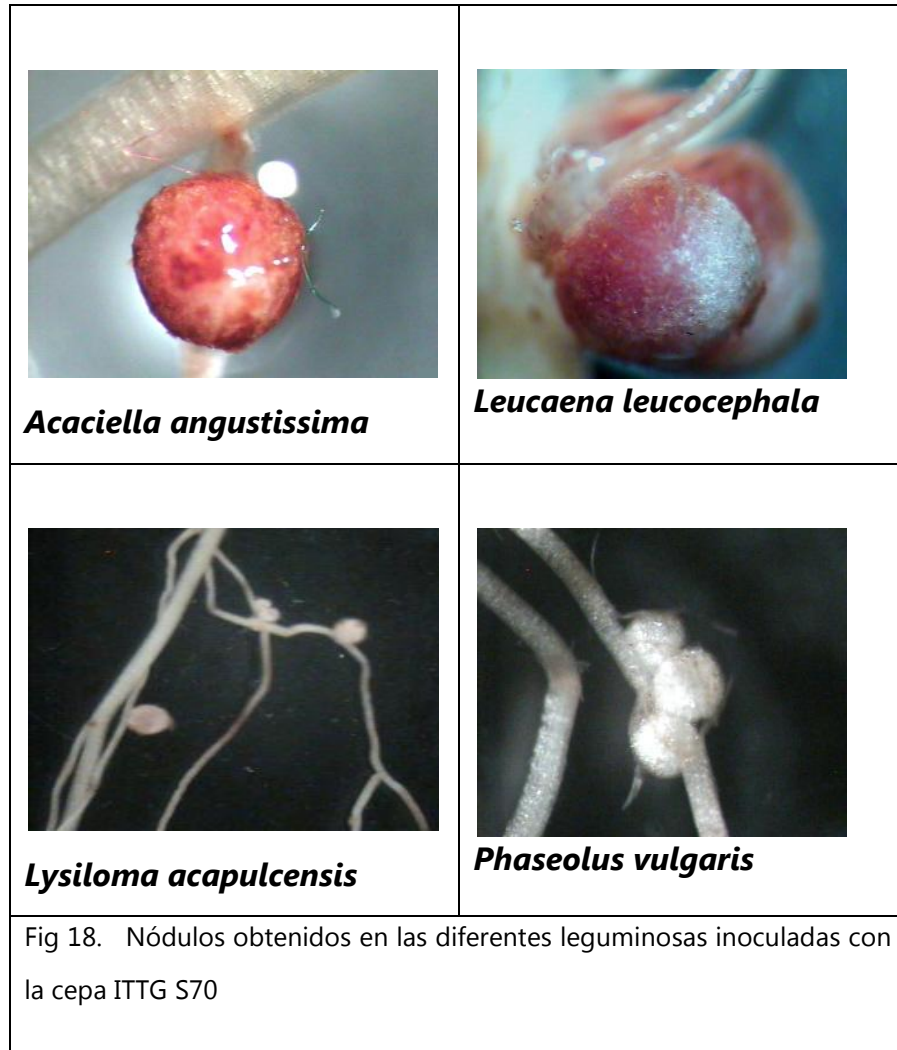
Fig 17. Electroforesis Eckhardt. En el carril 1.- *Rhizobium sp.* (11B), 2.- *R. etil* CFN42, 3.- *Rhizobium sp.* (JM) 4.- CFN299 y 5.- *Rizobium mexicanum* R7

### VI.V Rango hospedero

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba se observó que las cepas bacterianas diazotróficas pueden nodular a las leguminosas arbustivas empleadas: *A. angustissima*, *L. leucocephala*, *L. acapulcensis* y *P. vulgaris*. La cepa ITTG S70 fue la que más nódulos formó cuando estableció simbiosis con las tres leguminosas arbustivas utilizadas en esta prueba (Cuadro No. 10 ). Así mismo se observa que *P. vulgaris* es la leguminosa que más nódulos forma con las cepas evaluadas.

Cuadro No 10. Rango hospedero de las distintas cepas diazotróficas.				
Cepas Diazotróficas	LEGUMINOSAS			
	<i>Acaciella angustissima</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Lysiloma acapulcensis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium sp.</i> <b>11 B</b>	1.33* ± 1.528**	6.00* ± 2.000**	7.00* ± 2.000**	13.00* ± 3.000**
<i>Agrobacterium sp.</i> <b>PACHAZ-8</b>	2.00* ± 2.00 **	6.67* ± 2.082**	6.33* ± 1.528**	17.33* ± 5.033**
<i>Sinorhizobium chiapanecum</i> <b>ITTG S70</b>	5.67* ± 1.155**	25.33* ± 5.686**	25.33* ± 4.509**	37.00* ± 3.000**

\* Media ± desviación estándar; \*\* promedio de 3 repeticiones.



### **VI.VI Prueba de competencia**

El porcentaje de ocupación evaluado en la prueba de competencia se muestra en el cuadro No 11. En la combinación de 11B+ITTG S70, la cepa ITTG S70 mostró una más alta competitividad en las leguminosas *A. angustissima* y *L. leucophala*, a diferencia de *L. acapulcensis* y *P. vulgaris* en donde la cepa 11B resultó ser más competitiva.

En la combinación PACHAZ-8 + ITTG S70, la cepa ITTG S70 mostró un porcentaje de ocupación de nódulos mucho mayor, ya que en *A. angustissima* mostró un 75% de ocupación, en *L. leucophala* un 70%, en *L. acapulcensis* un 77% y en *P. vulgaris* un 54%.

Para la prueba de competencia entre las cepas 11B y PACHAZ-8, la cepa 11B mostró una mayor competitividad en cada una de las leguminosas evaluadas.

Cuadro No 11. Porcentaje de ocupación por las cepas bacterianas diazotróficas, inoculadas solas y en combinación en diferentes leguminosas.

Leguminosas	Tratamientos (combinaciones)	Número de nódulos (por planta)	Porcentaje de nódulos ocupados por	
			Primer cepa de la combinación	Segunda cepa de la combinación
A. <i>angustissima</i>	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	2.00 ± (2.0)		
	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	1.33 ± (1.5)		
	<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	5.67 ± (1.1)		
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	6.33 ± (0.5)	41(19)	59
	( <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	5.67 ± (0.5)	25(17)	75
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8)	5.00 ± (1.0)	68(15)	32
L. <i>leucocephala</i>	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	6.67 ± (2.0)		
	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	6.00 ± (2.0)		
	<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	25.33 ± (5.6)		
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	8.67 ± (0.5)	30(26)	70
	( <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	9.00 ± (1.0)	39(27)	61
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8)	8.00 ± (1.0)	73(24)	22
	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	6.33 ± (1.5)		

<i>acapulcensis</i>	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	7.00 ± (2.0)		
	<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	25.33 ± (4.5)		
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	7.67 ± (0.5)	69(23)	31
	( <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	8.33 ± (1.1)	23(25)	77
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8)	7.67 ± (1.1)	67(23)	33
<i>P. vulgaris</i>	<i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8	17.33 ± (5.0)		
	<i>Rhizobium sp.</i> 11B	13.00 ± (3.0)		
	<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70	37.00 ± (3.0)		
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	8.00 ± (1.0)	71(24)	29
	( <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8 + <i>S. chiapanecum</i> ITTG S70)	8.00 ± (2.0)	46(24)	54
	( <i>Rhizobium sp.</i> 11B + <i>Agrobacterium sp.</i> PACHAZ-8)	7.33 ± (3.2)	68(22)	32

## **VI.VII Prueba de Biofertilización de *A. angustissima* inoculada con bacterias diazotróficas**

### **VI.VII.I Efecto de la inoculación sobre la altura de planta de *A. angustissima***

El efecto de la inoculación de las bacterias fijadoras de nitrógeno sobre la altura de las plantas de *A. angustissima* se presenta en la figura 19. De acuerdo al análisis de varianza ( $P < 0.05$ ) se determinó que existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Las plantas que fueron inoculadas registraron mayor crecimiento (altura  $> 15.0$  cm) en comparación con las plantas no inoculadas (altura  $< 8.0$  cm). También se observó que las plantas que fueron fertilizadas tuvieron una altura final muy parecida a la registrada en las plantas inoculadas, pero superior a la registrada en las plantas no inoculadas (control negativo (c); promedio=7.8).

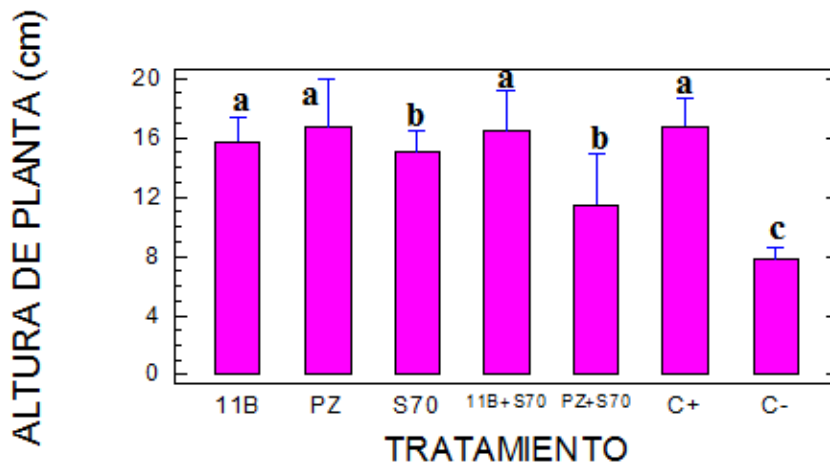


Fig 19. Efecto de la inoculación con bacterias diazotrofas sobre la altura de la leguminosa *A. angustissima*.

### VI.VII.II Efecto de la inoculación sobre el peso seco de *A. angustissima*

El peso seco total de las plantas de *A. angustissima* que fueron inoculadas con bacterias fijadoras de N, el peso de las plantas fertilizadas (*control positivo*) y el peso de las plantas no inoculadas (*control negativo*) se presentan en la Figura 20. Como se puede apreciar las plantas que fueron inoculadas solamente con la cepa **PZ (a)** (*Agrobacterium* sp) registraron mayor peso (promedio = 0.08 g) en comparación con los otros tratamientos evaluados. Sin embargo, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ), las plantas que fueron tratadas con la cepa **11B (ab)** (*Rhizobium* sp) y a aquellas que se les adicionó el fertilizante nitrogenado (N-NO<sub>3</sub>) registraron pesos estadísticamente similares o parecidos a las plantas que fueron tratadas con la cepa **PZ (a)** (promedio = 0.05 g). También podemos observar que las plantas que fueron co-inoculadas con la mezcla de bacterias (**11B+S70 (bc)** y (**PZ+S70 (bc)**) presentaron pesos similares a los obtenidos por las plantas que no fueron inoculadas (*control negativo*), pero inferiores a aquellas plantas que fueron inoculadas solo con una cepa. En este caso, las plantas que fueron inoculadas solo con la cepa **S70 (c)** (*Sinorhizobium*) registraron el menor peso seco (promedio = 0.03).

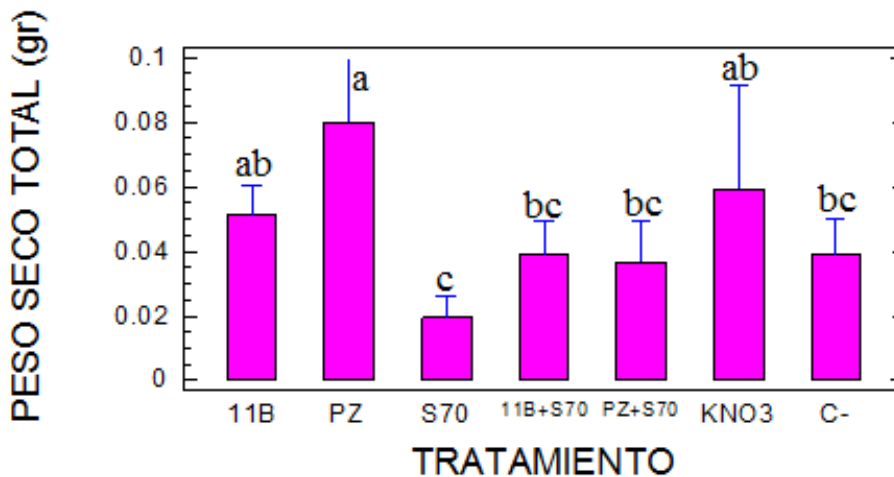


Fig 20. Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el peso seco de *A. angustissima*



El peso seco, representa la cantidad de biomasa que se acumuló durante el aumento del número de células en los diferentes tejidos de la planta (Bidwell, 1980). Mucho del nitrógeno asimilado, forma parte de los componentes químicos de la pared y membrana celular (Buchanan *et al.*, 2000). Así también, los nutrientes como el fosforo y potasio influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hudda *et al.*, 2001). Como señalamos anteriormente, la cepa **PZ**, corresponde a una especie de *Agrobacterium* muy cercana a *A. tumefaciens* de acuerdo a la filogenia del gen 16S rRNA. Existen, pocos trabajos en donde se reporten especies de *Agrobacterium* que puedan nodular efectivamente a leguminosas. Bala & Giller (2001) reportaron que las leguminosas *Acacia auriculiformis*, *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *Phaseolus vulgaris* formaron nódulos con uno o más bacterias parecidas a *Agrobacterium*. Recientemente, Rincón-Rosales *et al.*, (2009) estudiaron la diversidad genética de las bacterias que nodulan a la leguminosa *A. angustissima* y dentro de los microorganismos aisladas, se encontraron algunas bacterias parecidas a *Agrobacterium tumefaciens*. Estos aislados pudieron formar nódulos pero, de acuerdo a la prueba de reducción de acetileno (ARA), estos fijaron muy poca cantidad de nitrógeno.

#### **VI.VII.III Efecto de la inoculación sobre el número de nódulos formados en *A. angustissima*.**

Como se señaló anteriormente, la cepa **S70** es un especie de *Sinorhizobium*, **11B** corresponde a una bacteria *Rhizobium* sp. y **PZ** es un tipo de *Agrobacterium* sp., de tal manera que estas tres cepas pueden nodular las raíces de varias leguminosas, entre ellas *Acaciella angustissima*. El efecto de la inoculación sobre la formación de

nódulos en *A. angustissima* se muestran en la figura 21. Las plantas inoculadas con mezcla de las cepas (**11B+S70**) formaron el mayor número de nódulos (prom=10 nódulos/planta) en comparación con aquellas plantas que fueron inoculadas sólo con una de estas cepas bacterianas. La cepa **S70** (*Sinorhizobium*) es la que más contribuye en la formación de nódulos, esta afirmación puede ser apoyada, si se revisa nuevamente la figura 21, en donde se puede observar que las plantas inoculadas solo con la cepa **S70** formaron más nódulos (prom= 6 nódulos/planta) en comparación con la cantidad de nódulos formados en las plantas inoculadas con la cepa **11B** (prom= 1 nódulo/planta). De tal manera que la co-inoculación incrementa significativamente el número de nódulos en esta leguminosa.

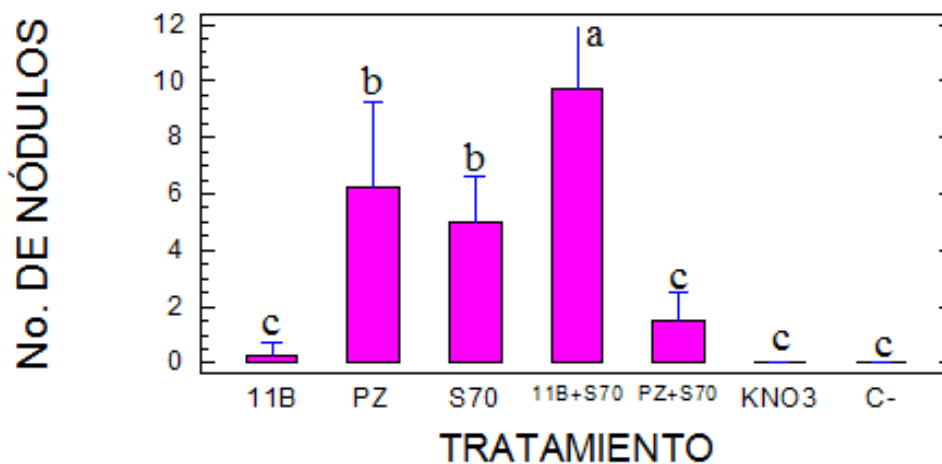


Fig 21. Efecto de la inoculación sobre la cantidad de nódulos formados en *A. angustissima*

El potencial de nodulación de cepa **S70** (*Sinorhizobium*) ha sido evaluada en pruebas de competencia entre-cepas (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Cuando **S70** fue aplicada en combinación con la cepa **SH9** (*Rhizobium tropici*), esta ocupó el 70% de los nódulos formados en *A. angustissima* y el 100 % cuando fue co-inoculada con la cepa **S2** (*Agrobacterium tumefaciens*). Algo interesante fue observar que las plantas inoculadas con la cepa PZ (*Agrobacterium sp.*) formaron una cantidad

importante de nódulos (prom=6.0), pero cuando esta agrobacteria fue inoculada en combinación la cepa **S70**, la cantidad de nódulos per planta disminuyó significativamente. Algunas especies de *Agrobacterium* ha sido aislados de leguminosas arbustivas (*Acacia*, *Prosopis*, etc) y estas bacterias pueden formar nódulos no-efectivos, es decir con poca capacidad para fijar N<sub>2</sub> (de Lajudie *et al.*, 1999). Así, también, Imshenatskii *et al.*, (1976) reportaron que varias cepas de *A. tumefaciens* formaron nódulos infectivos en el 50 % de las plantas de alfalfa inoculadas. Los nódulos que se formaron en las plantas inoculadas con la cepa S70 (*Sinorhizobium*) fueron pequeños de forma cilíndrica (3.0 largo X 1.5 mm ancho) y los formados por la cepa 11B (*Rhizobium sp. f*) y la PZ (*Agrobacterium sp.*) fueron principalmente de forma esférica (de aprox. 2.0 mm de diametro). Todos los nódulos fueron de color café-rojizo y se formaron principalmente en las raíces secundarias delgadas (Fig 22 A, B, C, respectivamente).

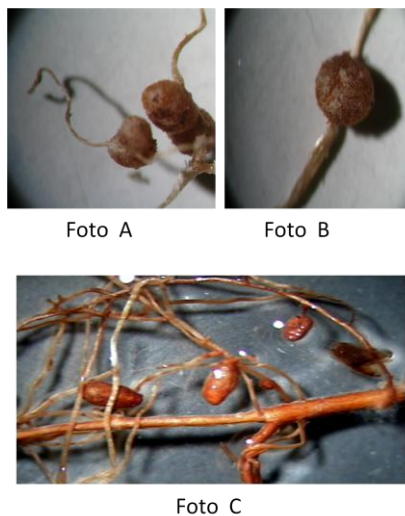


Fig 22. Nodulos formados por las cepas diazotroficas empleadas. A)Nodulos formados por *Rhizobium sp.* 11B. B)Nodulos formados por *Agrobacterium sp.* PZ. C)Nodulos formados por la bacteria *Sinorhizobium chiapanecum* S70.

#### **VI.VII.IV Efecto de la inoculación sobre el porcentaje de nitrógeno en *A. angustissima***

En la figura 22, se presentan los resultados relacionados con la fijación de nitrógeno en plantas de *A. angustissima* inoculadas con las bacterias diazótrofes. El análisis de varianza indicó que existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $P < 0.05$ ). Las plantas que fueron inoculadas con la mezcla de las cepas (**PZ+S70**) acumularon el mayor porcentaje de nitrógeno en comparación con los otros tratamientos. La cepa S70 (*Sinorhizobium*) fue aislada de los nódulos de *A. angustissima* y en pruebas de inoculación tuvo la capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno en las leguminosas *Acacia farnesiana*, *Lysiloma acapulcensis*, *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). La capacidad de fijación de nitrógeno es una característica generalmente evaluada para determinar el potencial de una bacteria rizobia para ser considerada como un biofertilizante (Hungria *et al.*, 2000; Mostazo *et al.*, 2002). Así también, la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) indicó que las plantas que fueron inoculadas sólo con la cepa **PZ** (*Agrobacterium sp.*) fijaron 75 % más nitrógeno en comparación con las plantas fertilizadas y con las plantas no inoculadas (testigo).

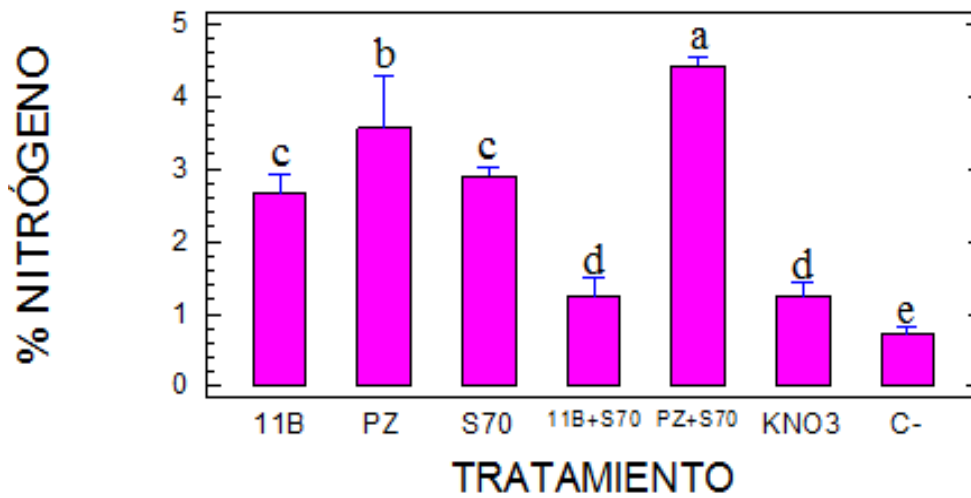


Fig 22. Cantidad de nitrógeno asimilado por las plantas de *A. angustissima* inoculadas con bacterias diazótropas.

Como se ha comentado anteriormente, varias especies de *Agrobacterium* han sido aislados de los nódulos de leguminosas (Khubaya *et al.*, 1998; Odee *et al.*, 2002; McInroy *et al.*, 2002), pero estos han demostrado muy poca capacidad para fijar nitrógeno en pruebas de nodulación a nivel de laboratorio o invernadero.

## VII. CONCLUSION

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo y a las condiciones experimentales en que se realizó, se puede concluir lo siguiente:

1.- Para el caso de las pruebas fenotípicas.

- *Rhizobium sp.* 11B.- Es Gram negativa, aeróbica, móvil, bacilo no formador de esporas, de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  de ancho.
- *Agrobacterium sp.* PACHAZ-8.- Es bacilo corto (1.5 x 0.8  $\mu\text{m}$ ), Gram negativo, presenta gránulos refráctiles, movilidad por flagelos polares.
- *S. chiapanecum* ITTG S70.- Es bacilo corto (1.2 x 0.5  $\mu\text{m}$ ), Gram negativo, presenta abundantes gránulos refráctiles, movilidad por flagelos subpolares.
- Cada cepa es perteneciente a dicho género ya que presentaron reacción ácida y alta producción de polisacáridos extracelulares.
- Las tres cepas rizobianas evaluadas en este estudio, son resistentes a los antibióticos: Amikacina, gentamicina y netilmicina, y son sensibles a: Cefalotina y trimetoprima-sulfametoxazol.

2.- Caracterización genotípica.

- La cepa 11B tiene amplia capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, no así para nodular.
- La cepa 11B pertenece al género *Rhizobium sp.* y la bacteria PZ al género *Agrobacterium*, esto lo indica la filogenia de los genes 16s y rpoB.
- La cepa *Rhizobium sp.* podría ser una nueva especie debido a su baja similitud con especies filogenéticamente cercanas a ella.

3.- Con respecto a la prueba de rango hospedero.

- Las cepas bacterianas diazotróficas pueden nodular a las leguminosas arbustivas empleadas: *A. angustissima*, *L. leucocephala*, *L. acapulcensis* y *P. vulgaris*.
- La cepa *S. chiapanecum* ITTG S70 forma mayor cantidad de nódulos cuando establece simbiosis con *A. angustissima*, *L. leucocephala*, *L. acapulcensis*.

4.- En cuanto a la prueba de competencia.

- La cepa *S. chiapanecum* ITTG S70 es la más competitiva para la ocupación de nódulos cuando establece simbiosis con las leguminosas evaluadas en este trabajo, cuando dichas leguminosas son inoculadas de manera combinada.
- Las cepas *Rhizobium sp* (11B) también tiene una capacidad elevada para la ocupación de nódulos cuando esta es inoculada en las leguminosas.

5.- En cuanto a las pruebas de biofertilización en *Acaciella angustissima*:

- Por lo general para las variables evaluadas, la asociación de bacterias, es decir la co-inoculación de ITTG S70 con las bacterias *Agrobacterium sp.* (PACHAZ-8) y *Rhizobium sp.* (11B) resultó ser benéfica para el desarrollo de las plantas estudiadas, por lo consiguiente podría suponerse que el mejor tratamiento es el de ITTG S70 + PZ, el cual aunque fue uno de los que tuvo menor cantidad de nódulos, con la aplicación de la técnica de microkjeldahl-modificada, presentó la mayor cantidad de nitrógeno.

## **VIII. PERSPECTIVAS**

Sin embargo, ya que como anteriormente se menciona, en investigaciones donde se han aislado especies de *Agrobacterium*, los nódulos encontrados han demostrado poca capacidad para la fijación de nitrógeno, por ello es importante considerar las siguientes recomendaciones para trabajos posteriores:

- 1.- Realizar la prueba de reducción de acetileno (ARA), para así conocer la actividad de la enzima nitrogenasa en la cepa, determinando de esta forma el potencial de fijación de nitrógeno de la misma.
- 3.- Además de la realización de pruebas de hibridación DNA-DNA para corroborar a *Rhizobium sp* 11B. como una nueva especie.
- 4.- Evaluar el potencial de nodulación de estas cepas en un mayor número de leguminosas para conocer su eficiencia para nodular, así como para ver su efecto sobre los parámetros morfométricos y bioquímicos evaluados.
- 5.- Para las pruebas de competencia: Utilizar herramientas moleculares tales como el perfil de plásmidos o el empleo de enzimas de restricción para identificar con mayor precisión las bacterias que ocupan los nódulos cuando son aplicadas en una mezcla o consorcio.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Solís JD, Leon-Martinez NS (1991). Inoculation of Phaseolus coccineus L. with Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli strain under glasshouse conditions. Tropical Agriculture 68: 219-224.
- Bala, A., and Giller, K. (2001). Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. New Phytologist 147: 495-507.
- Bala A, Murphy P & Giller KE (2003) Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. Mol Ecol 12: 917–929.
- Barnes W. M. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. Proc. Natl Acad. Sci. USA 91 2216-2220.
- Barnett Y. M. & Catt P C 1991. Distribution and characteristic of root-nodule bacteria isolated Australian Acacia spp. Plant Soil 135: 109-120.
- Baset Mia MA, Shamsuddin ZH, Wahab Z. Marziah M. (2009). The effect of rhizobacterial inoculation on growth and nutrient accumulation of tissue-cultured banana plantlets under low N-fertilizer regime. African Journal of Biotechnology. 60:579-598.
- Bernhardreversat F 1996). Nitrogen cycling in tree plantations grows on a poor sandy savanna soil in Congo. Applied soil ecology 4:161-172.
- Bremner J.M. 1996. Nitrogen-total. In: Sparks D.L. (ed), Methods of Soils Analysis, Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America Inc, American Society of Agronomy. Inc, Madison, WI, pp. 1085-1122.

- Brockwell, John, Bottomley, Peter J. & Thies, Janiece E. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. Australia.
- Chappill J. A. & Maslin B R 1995. A phylogenetic assessment of tribe Acaciae. In *Advances in legume Systematics 7: Phylogeny*. Eds, M Crisp and JJ Doyle, pp 77-95, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Chen, W., Wang E., Wang S., Y. Li, Chen X. & Li. Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium thianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid and saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 153-159.
- Chen, W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M. & Vandamme P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystitis . brosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1729-1735.
- De Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M. D., Lindström K., Dreyfus B. & Gillis M. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* 48: 369-382.
- De la Vara SR, Gutiérrez PH (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos*. McGraw-Hill. 587 pp.
- Dzwolla, B.H. 1994. *Acacia angustissima* a Central American Tree that's goings places. *Agroforestry Today*. 6(3):13-14.
- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S., and Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* 61, 507-512.

- Eardly, B.D., Nour S.M., van Berkum and Selander K. (2005). Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: Mosaicism and uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galeae*. *Appl. Environ Microbiol* 71: 1328-1335.
- Espinosa-Culebro, R.N. 1999. "Propagación de especies vegetales de importancia industrial en Chiapas. SAG. México. P: 12-26.
- Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxiribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
- FACT sheet (1999). *Acacia angustissima* a promising species for agroforestry. Winrock International. Forest, Farm & Community Tree. Network. USA. P: 199-201.
- Farhaeus G (1957). The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *Journal of General Microbiology* 16: 374-381.
- Galiana, A., Gnahoua, G.M., Chaumont, J., Lesueur, D., Prin, Y., Mallet, B., 1998. Improvement of nitrogen fixation in *Acacia angustissima* through inoculation with *Rhizobium*. *Agroforestry Systems* 40, 297-307.
- Gama-Ramírez RM (1989). *Manual de prácticas de microbiología general*. UNAM. México. P: 15-72.
- Graham P H & Parker C A 1964 Diagnostics features of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* 20, 383-396.
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., De Ley, D. J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B. y otros autores (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41: 582-587.
- Geniaux, E., Flores, M., Palacios, R., and Martínez, E. (1995). Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences

between the two *R. tropici* subtypes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 392-394.

- Gutteridge R.C. and Shelton H.M. 1994. *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK.
- Gutierrez-Miceli FA, Moguel-Zamudio B, Abud M, Gutierrez-OLIVA VF, Dendoveen L. 2008. Sheep manure vermicompost supplemented with a native diazotrophic bacteria and mycorrhiza for maize cultivation. *Bioresource technology*. 99. 7020-7026.
- Hall, T. A. (1999). Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hayat Rifat, Ali Safdar, Amara ummay, Khalid R, Ahmed Iftikhar.(2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals Microbiology*. 60:579-598.
- Hernández Y. 1998. La fijación biológica del nitrógeno. *Rev. Cubana de Ciencias Agrícola*, núm. 32.
- Huda S.M.S., Sujauddin M., Shafinat S., Uddin M. S.. 2007. Effects of phosphorus and potassium addition on growth and nodulation of *Dalbergia sissoo* in the nursery. Bangladesh.
- Hungria M, Andrade DS, Chuerie LM, Probanza A, Guttierrez-Mañero FJ, Megías M (2000) Isolation and Characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry* 32:1515-1528.
- Jarvis, B.D.W., P. van Berkum, W.X. Chen, S.M. Nour, M.P. Fernandez, J.C. Cleyet-Marel & M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 895-898.

- Khamis, A., Colson, P., Raoult, D., and La Scola, B. (2003). Usefulness of rpoB Gene Sequencing for Identification of Afipia and Bosea Species, Including a Strategy for Choosing Discriminative Partial Sequences, *Environ. Microbiol.* 69 (11): 6740 -6749.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150–163.
- Lara Mantilla, Cecilia. Villalba Anaya, Mara. Oviedo Zumaqué Luis Eliécer. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia.
- Lee, J.H., Park H. S. Jung K. D. Jang W. J. Koh S. E. Kang S. S., (2003). *Microbiol Immunol.* 47 (4) 3001-304.
- Lloret, L., Ormeño-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernandez, M. A. and Martínez-Romero, E. (2007). *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol* 30: 280–290.
- Martinez, M. 1999. Seminario Microbiología de suelos, Memorias, Cooperativa de Profesionales para el desarrollo de Tecnología Ambiental LTDA. Santander, Colombia.
- M. da Silva Brasil\*, V. L. Divan Baldani\*\*, J. Ivo Baldani\*\*, e S. Manhães Souto\*\* Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal
- Mendoza-Urbina A., Ayora-Talavera T. R., Gutierrez-Miceli F., Rincon-Rosales R. (2011). Biofertilización de la planta medicinal *Hypericum silenoides* Juss. Empleando bacterias diazotrofas. *Acedemia Journal* Vol. 3 No. 2 on line 1948-2353.

- Miranda, F. 1975. Vegetación de Chiapas. Tomo I y II. Gob. Edo. Chiapas. México.
- Mohamed SH, Smouni A, Neyra M, Kharchaf D & Filali-Maltouf A (2000) Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant Soil* 224: 171–183.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the the betasubclass of Proteobacteria. *Nature*. 411, 948-950.
- McInroy S. G., Cambell C. D., Haukka K. E., Odee D. W., Sprent J. I., Wang W. J., Young J. P. W. & Sutherland J. M. 1999. Characterization of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog™ and partial 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 111-117.
- Mc Vaugh. R. 1987. Flora Novo-galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico. Anderson, R.W. (ed). *Leguminosae*, Vol. 5. University of Michigan Press USA. 786 pp.
- Nick G., de Lajudie P., Eardly B. D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M. & Lindström K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1359-1368.
- Njiti C. F. & A. Galiana. 1996. Symbiotic properties and Rhizobium requeriments for effective nodulation of five tropical dry zone acacias. *Agroforestry Systems* 34:265-275.
- Odee, D.W, Sutherland, J.M, Makatiani, E.T., McInroy, S.G and Sprent, J.I. 1997. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and soil* 188: 65-75.

- Odee, D.W., Haukka, K. McInroy, S.G. Sprent, J.I. Sutherland J.M. & Young J.P.W. 2002a. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil. Biol. Biochem.* 34, 801-811.
- Palacios g, Abud m, Adriano L, Dendoveen I, Gutierrez, FA. (2009). Influence of arbuscular mycorrhizal fungies and a native diazotrophic bacteria in survival and tuberization of ex-vitro potato plans. *Gayana Botanica.* 66:2: 127-133.
- Peoples M. B. & Herridge D. F. 1990 Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture, *Adv. Agron.* 44, 155-223.
- Pueppke G S & Broughton W J 1999. Rhizobium sp. strain NGR234 and R. fredii USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 293-318.
- Räsänen L. A. & Lindström K. 1999. The effect of heat stress on the symbiotic interaction between Sinorhizobium sp. and Acacia senegal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 63-74.
- Räsänen A., Leena., Janet Sprent I. & Lindström Kristina, 2001. Symbiotic properties of Sinorhizobia isolated from Acacia and Prosopis nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil.* 235: 193-210.
- Rico Arce, M. L. 1980. El genero Acacia (Leguminosae) en Oaxaca. Tesis licenciatura. UNAM. Dirigida por Palma, F. México. 126 pp.
- Rincón-Rosales R & Gutiérrez-Miceli FA (2008) Características biológicas de Acaciella angustissima (Mill.) Britton, Rose, en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia* 42: 129–137.
- Rincón, R. R., Lloret, Lourdes, Ponce, Edith & Martinez, R. E. 2008. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate Acaciella angustissima in México including Sinorhizobium chiapanecum sp. Nov. that has common

symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. México. FEMS Microbiology Ecology 67:107-117

- Rincón, R. R., Morales, F. A. & García, L. A. 2000. Efectos de la biofertilización sobre el crecimiento y desarrollo del timbre (*Acacia angustissima* Mill Kuntze). Revista InGenio, Ciencia y Tecnología. No. 3: 9-19.
- Rincón-Rosales R, Lloret L, Ponce RE, Martínez-Romero E (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acacia angustissima* in Mexico including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. that has common symbiotic genes with *S. mexicanum*. FEMS Microbiology Ecology 64:1-14.
- Rivas, R., E. Velazquez, A. Willems, N. Vizcaino, N.S. Subba-Rao, P.F. Mateos, M. Gillis, F.B. Dazzo and E. Martinez- Molina. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5217-5222.
- Ruiz S, Adriano L, Ovando I, Navarro C, Salvador M. (2011). Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*; Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. African Journal of Biotechnology. 10:47:9623-9630.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Toro, M. 1996. Nodulation competitiveness in the Rhizobium-legume Symbiosis". World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12: 157-162.
- Toledo, I., Lloret, L., Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanum* sp. Nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. In Mexico. Syst Appl Microbiol 26: 54-64.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.



- Salazar, V. I. 1996. Evaluación de la producción de sustancias tanicas en plantas de timbre (*Acacia angustissima* Mill Kuntze ) crecidas bajo condiciones naturales. Tesis licenciatura, ITTG. Dirigida por Espinosa-Culebro, N.R. México. 63 pp.
- Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H., Musser J. M., Gilmour M. N., (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics, *Appl. Environ Microbiol* 51 873-884.
- Singh G, Singh NT, Dagar DC, Singh H, Sharma VP (1997). An evaluation of agriculture, forestry and agroforestry practices in a moderately alkali soil in northwestern India. *Agroforestry systems*. 37: 279-295.
- Sprent J. I. & Faria S. M. de 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil*. 110, 157-165.
- Sprent J. I. 2001. Nodulation in legumes. Great Britain.
- Sutherland J. M., Odee D. W., Muluvi G. M., McInroy S. G. & Patel A. 2000. Single and multi-strain rhizobial inoculation of African acacias in nursery conditions. *Soil Biol. Biochem*. 32: 323-333.
- Sy, A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin & Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. and Dreyfus B.. 2001. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbioses with legumes. *J. Bacteriol*. 183, 214-220.
- Tian Xu Han, En Tao Wang, Li Juan Wu, Wen Feng Chen, Jin Gang Gu, Chun Tao Gu, Chang Fu Tian & Wen Xin Chen. 2008. *Rhizobium multihospitium* sp. Nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol Rev*. 60: 407-438.

- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res.* 19: 1011-1021.
- Wang, E.T., Tan Williems, M. Fernandez-Lopez, E. Martinez-Romero. (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. Nov. a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J. Syst. Evol Microbiol.* 52 1687-1693.
- Wang, E.T., van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X., MartínezRomero, E. (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 51–65.
- Wang, E. T. & Martinez-Romero E., 2000. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes, p. 237-250. In Triplett, E.W., (ed), *Prokaryotic Nitrogen-Fixation. A model system for the analysis of a biological process.* Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J., (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Zhang X., Harper R., Karsisto M. and Lindoströn K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 104-113.
- Zuberer, D. 1998. *Biological Dinitrogen Fixation: introduction and Nonsymbiotic.* En *principles and applications of soil microbiology.* New Jersey: Prentice Hall.

## IX. ANEXOS

### 1. Medio LB (Luria-Bertani).

COMPONENTES	CANTIDAD (g)
Extracto de levadura	0.5
Peptona de caseína	1.0
Cloruro de sodio	1.0

Agar bacteriológico	1.5
Agua destilada a pH 7.0	100

## 2. Medio PY (Peptona-Extracto de levadura) para cultivo de *Rhizobium*.

COMPONENTES	CANTIDAD (g)
Extracto de levadura	0.3
Peptona de caseína	0.5
Agar bacteriológico	1.5
Agua destilada a pH 7.0	100 ml

Disolver y calentar perfectamente el medio. Esterilizar en autoclave a 120° C/ 15 min. Enfriar el medio y adicionar 1 ml de CaCl<sub>2</sub> al 0.7 M, previamente esterilizado con la ayuda de una micropipeta en la campana de flujo laminar. Llenar las cajas de Petri y esperar la gelificación.

## 3. Caldo PY-calcio, para 100 ml de medio.

COMPONENTES	CANTIDAD (gr)
Extracto de levadura	0.3
Peptona de caseína	0.5

Nota: Este medio se utiliza para la producción de inóculo. También debe agregarse 1.0 ml de CaCl<sub>2</sub> al 0.7 M previamente esterilizado.

#### 4. Medio YMB – Azul de Bromotimol

COMPONENTES	CANTIDAD (gr/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.5
Manitol	10
Azul de bromotimol*	5 ml
Agar	15

\*El azul de bromotimol se agrega ya cuando todos los componentes del medio estén totalmente disueltos y proceda a ajustar el pH a 7.00

#### Preparación de Amortiguadores para electroforesis

##### 5. Preparación del Amortiguador Tris Acetato (TAE) 10X

REACTIVOS	CANTIDAD
Tris Base	40.4 g
Acido Acético glacial	11.42 mL
EDTA 0.5 M (pH 8)	20 mL
Agua tridestilada	1000 mL

Para preparar EDTA al 0.5 M

REACTIVOS	CANTIDAD
EDTA	26.6 g
Agua tridestilada	100 mL

### 6. Preparación del Amortiguador Tris Boratos (TBE) 10X

REACTIVOS	CANTIDAD
Tris Base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M (pH 8)	40 mL
Agua tridestilada	1000 mL

### 7. Medio AGAR-AGAR para germinación de semillas de leguminosas.

INGREDIENTES	CANTIDAD
Agar bacteriológico	9.0 g
Agua destilada	1000 ml

### 8. Composición del medio Nfb

COMPUESTOS	PARA 1 Lt.
Ac. Málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 %	5 ml
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O 10 %	2 ml
NaCl <sub>2</sub> 10 %	1 ml
FeSO <sub>4</sub>	40 mg
NaMoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.1 %	2 ml
MnSO <sub>4</sub> 1 %	1 ml
KOH	4.8 g
NH <sub>4</sub> Cl	200 mg
Extracto de levadura	0.3 g
pH	6.8-7.0

### 9. Composición de la solución Farhaeus libre de nitrógeno:

SOLUCIÓN	COMPUESTO
A	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
C	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
D	CaCl <sub>2</sub>

E	Citrato Férrico
ELEMENTOS TRAZA	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
	NaMoO <sub>4</sub>

Para el caso del control positivo se adicionó solución de KNO<sub>3</sub> al 1.25M

### 10. Composición química del medio Fahradeus :

#### Para soluciones madre:

INGREDIENTES	CANTIDAD (g/l)
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
CaCl <sub>2</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12
Fe Citrato	0.5
Soluciones traza	mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2860
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2030
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	220
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	80
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	80

#### Para 1L de medio, a partir de la solución madre:



INGREDIENTES	PARA 1 L. DE MEDIO
NaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml
CaCl <sub>2</sub>	10 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 ml
Fe Citrato	10 ml
Soluciones traza	Para 1 litro de medio
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 ml
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1 ml
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 ml
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1 ml
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 ml

## 11. Análisis de varianza.

### a) Altura de planta.

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	81,8571	6	13,6429	2,38	0,0650

Intra grupos	120,25	21	5,72619
--------------	--------	----	---------

---

Total (Corr.)	202,107	27	
---------------	---------	----	--

**b) Peso seco total de planta**

## Análisis de la Varianza

---

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00907236	6	0,00151206	3,29	0,0193
Intra grupos	0,0096605	21	0,000460024		
Total (Corr.)	0,0187329	27			

**c) No. de nódulos efectivos**

## Análisis de la Varianza

---

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	337,857	6	56,3095	19,63	0,0000
Intra grupos	60,25	21	2,86905		
Total (Corr.)	398,107	27			

**d) Cantidad de nitrógeno fijado**

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	44,9743	6	7,49571	70,51	0,0000
Intra grupos	2,2325	21	0,10631		
Total (Corr.)	47,2068	27			

**12. Técnica Microkjeldahl-modificado**

El método se inicia con la digestión de la materia orgánica con una mezcla catalizadora más ácido sulfúrico concentrado.

1. Moler la muestra seca (es decir, la planta total seca de cada tratamiento) hasta malla 100 y colocar a un matraz microkjeldahl (por triplicado).

2. Agregar 2 g de catalizador tipo microkjeldahl (1.9 g de  $K_2SO_4$  + 40 mg de HgO) y 2 ml de  $H_2SO_4$  al matraz microkjeldahl; el ácido digerirá la materia orgánica.
3. Digerir la muestra de 1 a 1.5 horas después de que toda el agua ha sido evaporada y el ácido inicia su ebullición. Evitar proyección del material al inicio de la digestión. La placa de digestión debe alcanzar entre 360 y 390 °C para permitir la ebullición de la mezcla de ácido con sales que se adicionan a la materia seca de las plantas.
4. Cuando la solución sea transparente o verde claro, detener la digestión.
5. Enfriar y adicionar un poco de agua para disolver los sólidos.
6. Lavar el matraz de 5 a 6 veces con porciones de agua destilada de 1-2 ml. Transferir la solución a un matraz aforado de 100 ml.
7. Aforar a 100 ml con agua destilada y tomar una alícuota de 5 ml de muestra y agregar a la cubeta de un espectrofotómetro marca Hanna modelo C215 para su determinación. Ejecutar el programa 4 (nitrógeno bajo) y la muestra en cubeta se coloca en el porta cubeta del espectrofotómetro para calibrarse y presionar el botón "ZERO"
8. Vaciar 1 sobre de reactivo para determinar Nitrato/ $NO_3$  en la cubeta de reacción, se agita 5 veces de arriba a bajo y de forma circular durante 1 minuto. Después reinsertar la cubeta en el espectrofotómetro.
9. Presionar el botón "Timer" y esperar 3 minutos 30 segundos, pasado el tiempo presionar el botón "READ DIRECT" tomar la lectura correspondiente que se muestra en pantalla en mg/L de N- $NO_3$ .

## ANEXOS DE PRIMERS

Cuadro 12. Primer's y condiciones para amplificar de genes cromosomales y plasmídicos.

Gen	Primers	Temperatura de annealing (Tm)	Referencia
-----	---------	-------------------------------	------------

16S	fD1 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' rD1 5'AAGGAGGTGATCCAGCC3'	57 °C	Weisburg et al. (1991)
rpoB	BR3200F 5'TGAAGATGGTCAAGGTCTTCGT3' BR3950R 5'GTCCGACTTSACSGTCAGCAT3'	45 y 57 °C	Khamis et al. (2003)
nifH	nifH1 5'AAGTGCGTGGAGTCCGGTGG3' nifH2 5'GTTCGGCAAGCATCTGCTCG3'	62 °C	Eardly et al. (1992)
Eric			Versalovic et al. (1991)