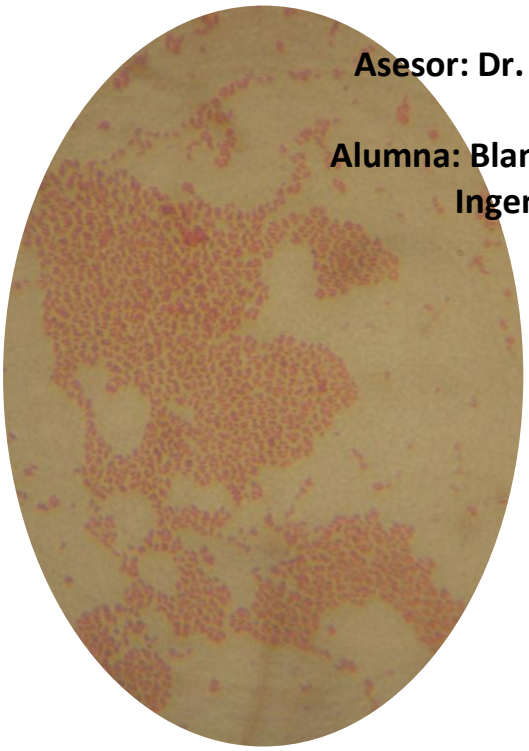
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ.

“BACTERIAS DIAZOTROFAS ASOCIADAS CON LEGUMINOSA ARBUSTIVAS CON CAPACIDAD PARA TOLERAR CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL”



Asesor: Dr. Reiner Rincón Rosales.

Alumna: Blanca Elena Torres Sánchez.
Ingeniería Bioquímica

Tuxtla Gutiérrez Chiapas, a 11 de Enero del 2013

INDICE

	Paginas
I. INTRODUCCIÓN……	**1**
II. JUSTIFICACIÓN……	**2**
III. OBJETIVO……	**3**
IV.CARACTERIZACION DE LA LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO……	**4**
VI. PROBLEMA A RESOLVER……	**5**
VI. ALCANCES Y LIMITACIONES……	**6**
VII. FUNDAMENTO TEORICO……	**7**
7.1. Características biológicas de las leguminosas……	**7**
7.1.1. Aspectos botánicos……	**8**
7.1.1.1. Estructura botánica……..	**9**
7.1.1.2 Subfamilias……..…	**11**
7.2. Características biológicas de las bacterias diazótrofas simbióticas……	**14**
7.2.1. Bacterias simbióticas……..	**15**
7.2.2. Importancia biológica……..	**16**
7.3. Simbiosis: Leguminosa-rizobio……	**17**
7.3.1. Proceso de infección y formación de nódulos……	**18**
7.3.1.1 Señalización entre la planta y Rhizobium……	**18**
7.3.1.2 Invasión y formación del canal de infección.....	**20**

7.3.1.3 Desarrollo del Nódulo……. 21

7.3.1.4. Tipo de Nódulos…… 22

7.4. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)…… 24

7.5. Factores que controlan la nodulación y fijación de N_2 ….. 24

7.5.1. Genes de función Temprana…… 25

7.5.2. Genes Reguladores……. 25

7.5.3. Genes Estructurales…….. 25

7.5.4. Genes de función Tardía…… 26

7.6. Factor Nod…….. 27

7.7. Tolerancia al stress ambiental por rizobia…… 28

7.7.1. Stress a la acidez…… 29

7.7.2. Tolerancia a la Salinidad……. 30

7.7.2.1. Efecto de la salinidad sobre las leguminosas… 30

7.7.3. Tolerancia a la presencia de metales pesados…… 31

7.8. Marcadores moleculares para el estudio filogenético de bacterias simbióticas…….. 32

7.8.1. Tipo de Técnicas para el análisis de ADN…….. 33

7.9. Huellas genómicas…… 35

7.9.1. REP-PCR……. 36

7.9.2. ERIC_PCR…… 36

7.9.3. Perfiles de ARDRA……. 36

7.10. Gen cromosomal 16S rDNA……... 37

VIII.- MATERIALES Y METODOS

8.1. Ubicación de los sitios de colecta…….. 39

8.2. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas…… 39

8.2.1 Aislamiento de las Cepas……. 40

8.3. Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas….. 40

8.3.1 Conservación de las cepas puras en glicerol…….. 40

8.5. Caracterización genotípica de las cepas bacterianas….. 41

8.5.1. Extracción de ADN…… 41

8.5.2 Electroforesis de ADN……. 42

8.5.3 Análisis de huellas Genómicas (Box_PCR)…… 43

8.5.4 Amplificación del gen 16S ADNr por PCR……. 44

8.5.5 Análisis de restricción del gen 16S rDNA amplificado (ARDRA)……..... 45

8.5.5.1 Electroforesis de ARDRA…… 45

8.6. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr…….. 45

IX. RESULTADOS Y CONCLUSION.

9.1. Caracterización de la localización del área de estudio… 46

9.1.1. Tipo de leguminosas encontradas en cada sitio de colecta…… 47

9.2. Características fenotípicas de las cepas bacterianas…… 48

9.3 Extracción de ADN…… 51

9.4. Patrones de huellas genómicas…….. 52

9.4.1 ERIC_PCR…….. 52

9.4.2 BOX_PCR…….. 53

9.5. Amplificación del gen 16s ADNr…… 54

9.6. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr…… 55

9.7. ARDRA…….. 56

Conclusión y Recomendaciones…… 57

BIBLIOGRAFIA…….. 58

BACTERIAS DIAZOTROFAS ASOCIADAS CON LEGUMINOSAS ARBUSTIVAS CON CAPACIDAD PARA TOLERAR CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL.

Introducción.

La evolución biológica ha originado la increíble variedad de formas de vida que habita el planeta. La diversidad biológica de México es una de las mayores en el planeta, lo que ha llevado a su inclusión entre los hoy llamados países poseedores de gran diversidad. Una gran parte de esta diversidad se encuentra en Chiapas y, por ello, es ampliamente reconocido como poseedor de una de las más vastas riquezas naturales del país, basta decir que se encuentran una de cada tres especies de plantas vasculares de la flora mexicana. De tal manera surgió el interés por estudiar a los organismos en su propio ambiente y analizar las presiones de selección que producen los cambios evolutivos. En los últimos años se han acrecentado los estudios empíricos y experimentales.

Chipas es uno de loes estados con una gran diversidad vegetativa y rica biológicamente, esta entidad es reconocida por su enorme diversidad cultural, y el uso de la diversidad biológica, que en algunos casos han resultado en la domesticación de especies, principalmente plantas medicinales para emplearlas en el tratamiento de la cura de muchas enfermedades.

El estado como ya se mencionó posee una amplia riqueza vegetativa, dentro de ella una gran producción de leguminosas arbustivas y gramíneas, ya que son utilizadas para el alimento para animales de corral y para consumo humano. Dentro de las leguminosas que se encuentran son las *Mimosaceae sp, Acacias angustivas,* entre otras familias y especies.

El interés surgido por las leguminosas es que poseen características importantes, ya que este tipo de plantas tiende a realizar simbiosis con algunos microorganismos que favorecen a la fijación de nitrógeno y al de metabolizar compuestos necesarios para remediar los efectos causados por la no rotación de los suelos. Son estas formas simbióticas, concretamente las establecidas entre las rizobiáceas y las leguminosas, las que antiguamente eran aprovechadas para la renovación de los suelos mediante la práctica de la rotación de cultivos; hoy en día sin embargo, desde la aparición de la “revolución verde” en agricultura, esta práctica se ha sustituido por la utilización de fertilizantes químicos a pesar del elevado coste energético y ambiental que supone

Para superar este problema es posible utilizar microorganismos fijadores de nitrógeno, o bacterias promotoras de crecimiento, como biofertilizantes, las cuales pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper & Schroth, 1978), debido a la producción de fitohormonas, solubilizacion de fosfatos inorgánicos, supresión de fitopatógenos (Podile & Kishore, 2006), entre otros beneficios.

Se desconoce la diversidad de bacterias diazótrofas asociadas a las plantas de leguminosas encontradas en Chiapas que se desarrollan bajo condiciones de estrés por lo que es necesario llevar a cabo un estudio para la identificación de estos microorganismos utilizando diferentes herramientas moleculares y genéticas, que permiten una mayor confiabilidad para su identificación.
.

En este trabajo nos enfocaremos primordialmente al estudio de las poblaciones bacterianas que se encuentran asociadas con leguminosas que crecen en condiciones de estrés con factores de alta concentración de salinidad, alto pH (acidez) y la presencia de metales que encarecen al suelo y provoca esterilidad en la producción. De tal manera, en una segunda etapa se pretende evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de cada cepa y generar un biofertilizantes para su empleo en diversos cultivos incluyendo esta especie.

I. Justificación.

El éxito del trabajo depende de una buena selección de plántulas de las leguminosas y de la localización de un suelo con los factores que favorezca las condiciones de estrés ambiental. En la mayoría de los sistemas agrícolas, los nutriente son los más importantes para la producción y la calidad de los productos; por lo tanto, surge como una efectiva solución el uso de fertilizantes químicos nitrogenados ya que debido a su uso excesivo de siembra y el de no efectuar una remedición paulatina del área de siembra estos se van empobreciendo en algunos factores que delimitan una buena producción y aumentando algunos factores que perjudican e estos.

A pesar del uso indiscriminado de estos fertilizantes para mejorar los rendimientos en algunas regiones del mundo, su elevado costo de producción y la creciente contaminación ambiental, hacen que se manifieste la urgente necesidad de desarrollar alternativas que minimicen el impacto negativo sobre el ambiente. Una herramienta tecnológica al alcance de la ciencia está representada por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) (Curá, 2005). Algunas de éstas pueden transformar el nitrógeno atmosférico en amonio (Fijación Biológica del Nitrógeno - FBN), una especie química fácilmente aprovechable por las plantas (Okon, 1994) y que además permite remediar suelos pobres y con déficit de algunos componentes necesarios para una buena cosecha.

Por eso complementar y, eventualmente, sustituir de manera parcial el uso de fertilizantes sintéticos mediante el uso de fertilizantes de origen biológicos, representaría un beneficio económico y reduciría el impacto negativo de la producción agropecuaria sobre el medio ambiente (Alexandratos, 2003). Por todo lo anterior, es necesario estudiar la diversidad genética de las bacterias asociadas a plantas de leguminosas, para desarrollar un biofertilizantes biológico que permita

sanar (remediar) los efectos provocados por el uso inadecuado y sobre explotado de los cultivos, y así garantizar el éxito de diversos cultivos.

II. Objetivos.

- Objetivo general.

Aislar, caracterizar y seleccionar bacterias con alto potencial de fijación de N y capacidad para tolerar condiciones de estrés ambiental mediante el empleo de marcadores moleculares para su empleo como biofertilizantes en cultivos de importancia agrícola.

- Objetivos específicos.
  1. Aislar e identificar fenotípicamente las cepas de las bacterias aisladas en las leguminosas (*leguminosae*) nativas del estado de Chiapas.
  2. La aplicación de Marcadores moleculares para su identificación genotípica de las cepas de las leguminosas.
  3. Aplicación de las pruebas especiales de Factores de estrés, para la selección de bacterias que pueden servir como biofertilizantes para reparar los suelos agrícolas

III. CARACTERIZACION DE LA LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO.

La colecta de las leguminosas se realizaron en dos municipios de la región centro y uno de la región Frailesca del estado de Chiapas; en la localidad de Emiliano Zapata 1, municipio de Chiapas de corzo sus coordenadas geográficas son 16º 42' N y 93º 00' W, su altitud es de 406 msnm con un clima cálido subhúmedo ; la localidad de El Parral, municipio de Villa Corzo ubicado a 620 m de altitud sus coordenadas geográficas son 16º 11' N y 93º l6' W y la localidad de Alfredo Bonfil, municipio de Ocozocoautla de Espinoza sus coordenadas geográficas son 16° 45' N y 93° 22' W su altitud es de 820 m con un clima cálido subhúmed (INAFED).

Fig. 1. Localización de los municipios donde se realizaron las colectas de leguminosas

La localización de estos lugares fueron debido a la edafología del suelo ya que se buscaba suelos con presencias de metales y con carencia de nutrientes, suelos que se han explotado agrícolamente.

El aislamiento de las bacterias se realizó en el laboratorio de Cultivo vegetal y el análisis de biología molecular en el laboratorio de Química Analítica que se

encuentran dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez .

IV. Problema a Resolver

A pesar de que los suelos contienen un alto contenido de minerales, debido a la alta explotación de suelos se degradan los minerales aumentando los compuestos no necesarios y que solo influyen limitando el crecimiento de las plantas. Esto se debe a que componentes como el nitrógeno atmosférico que existe como nitrógeno molecular (N2), es indispensable una forma del elemento que es inaccesible para todos, el nitrógeno para ser incorporado dentro de los organismos vivos debe primero ser convertido a amonio o nitrato, un proceso que no puede ser llevado a cabo por animales y plantas superiores en la ausencia de diferentes tipos de bacterias.

Dentro estas bacterias se encuentran las bacterias diazótrofas, los cuales se encuentran en estado de simbiosis con algunas especies de plantas en forma de nódulos, que tienen la capacidad necesaria para realizar la síntesis de nitrógeno de otros compuestos de la fotosíntesis o de la oxidación de productos orgánicos del suelo. En la actualidad han demostrado gran capacidad para sustituir a los fertilizantes nitrogenados y contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas realizando la conversión requerida de nitrógeno molecular a amonio o nitrato (Roberts, 2007)Por todo lo anterior, es necesario conocer cuáles son los géneros y especies de estas bacterias encontradas en las leguminosas, para posteriormente obtener un biofertilizantes, que potencialice su desarrollo y el de otros cultivos del estado.

V. ALCANCES Y LIMITACIONES.

ALCANCES.

Se logró conocer la diversidad de bacterias asociadas a las leguminosas endémicas del estado de Chiapas ,utilizando herramientas tanto microbiológicas como moleculares, es decir, el aislamiento de las bacterias encontradas así como la aplicación de huellas genómicas y la utilización de marcadores moleculares para conocer las características genotípicas de la bacteria , y la realización de su respectivo análisis filogenético.

LIMITACIONES.

Teniendo como principal objetivo el de identificar bacterias diazótrofas con tolerancia de a soportar los efectos del estrés abiótico presentado por el medio ambiente actual, sin embargo, la falta de equipo existente en los laboratorios, para identificar el tipo y especie de bacterias del microorganismo aislado limito cumplir con nuestro objetivo.

Además de sumarle la falta de material, así también como reactivos, provoco la pérdida de tiempo aumentando más tiempo delo planteado, y retrasando la obtención de los resultados finales así como la aplicación de las pruebas a las condiciones de estrés, indicando que estas bacterias son tolerante a las condiciones extremas ambiental y que podrán servir como biofertilizantes para el suelos explotados en condiciones de deterioro.

VII. FUNDAMENTO TEORICO

7.1. Características biológicas de las leguminosas

Las Leguminosas constituyen un grupo que en forma y estructura varía poco a pesar del alto número de especies y de que sus poblaciones son con frecuencia muy numerosas. Incluyen árboles, arbustos, hierbas y lianas, de hojas generalmente pinnadas, con folíolos opuestos o alternos o que se dividen en ejes de segundo orden (bipinnadas) (Leon, 2000).

La familia de plantas cuenta con 727 géneros y 19 325 especies, constituyen el grupo con flores más grande del planeta, después de las orquídeas y compuestas. La familia presenta una distribución cosmopolita y ocupa una amplia diversidad de ecosistemas de tierras bajas y medias de todo el mundo (Roberts, 2007).

Sus especies poseen una compleja estructura, tanto en los estadios vegetativos como en los reproductivos, lo cual permite diferenciarlas fácilmente de las otras familias e platas que florecen, se caracterizan por ser hierbas anuales o perennes. Ello cobra particular importancia durante la etapa de fructificación, periodo en las que estas difieren sensiblemente de los restantes del reino vegetal, gracias a su cualidad particular de presentar semillas contenidas en legumbres y además, por la presencia de nódulos bacterianos de *Rizobios* en sus raíces, capaces de transformar el nitrógeno atmosférico, que las plantas no pueden utilizar, en nitrato (NO_3-), que sí pueden utilizar.

Debido a la importancia que poseen las especies de las leguminosas en el ámbito agropecuario, como mejoradoras de los sistemas, desde el punto de vista del suelo: propiedades fisicoquímicas; de la dieta animal; elevado valor nutritivo; de sus altas fijaciones de N2; remplazadoras de fertilizantes inorgánicos y mejoradoras del ambiente en general, utilizadas en asociaciones bimodales, bancos de proteínas o multiasociasiones .

7.1.1. Aspectos botánicos

Algunos investigadores consideran Las leguminosas como un orden, otros las consideran como una familia con tres subfamilias.

Orden :	Rosales (Fabales)
Familia:	Leguminoseae
Subfamilia:	Mimosoideae
	Caesalpainioideae
	Papilionoideae
	(Posada, 2005)

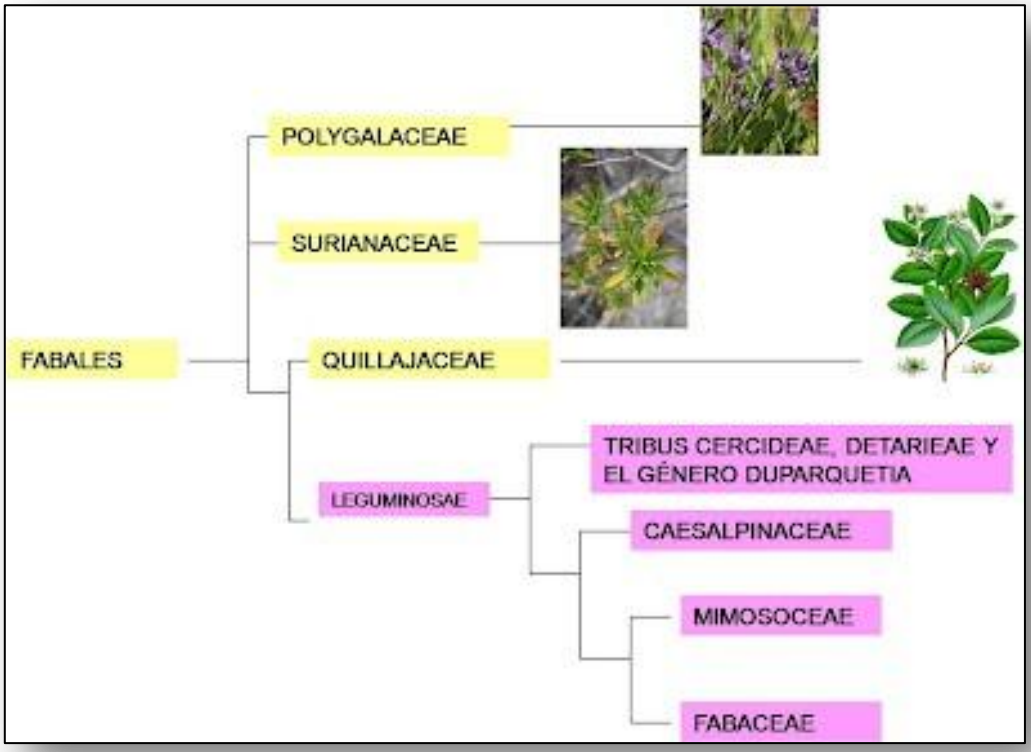


Figura 1. **Clasificación Taxonómica de las leguminosas.**

7.1.1.1. Estructura botánica.

Morfología de la Raíz

Las leguminosas se desarrollan a partir de una radícula grande del embrión y forma un pivote fuerte capaz de penetrar suelos duros, el que a su vez se ramifica y forma raíces laterales, y una amplia red de pelos radicales. El Sistema vascular de las leguminosas lo constituyen el floema (externo), el xilema (interno) y la medula, formada por la transformación de las células del meristema básico. La raíz de la leguminosa se caracteriza por la presencia de nódulos, que son excrecencias laterales de origen parenquimatoso, con sistema vascular suplementario que se conecta al sistema vascular (Posada, 2005).

Morfología de Hojas y Tallos.

- Hojas:

La hoja es un órgano lateral que brota del tallo o rama de manera exógena y en general lleva una ramificación o una yema justo por encima de ella (axilar). Generalmente son alternas, a veces opuestas, estipuladas o no, pecioladas o sésiles.

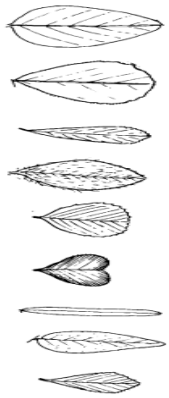


Figura 2. Diferentes formas de foliolos

Entre las leguminosas perenes predominan las hojas compuestas, con un número variable de foliolos.

Las hojas compuestas están formadas por un eje o raquis, de donde salen los foliolos, unidos al raquis por los peciolulos. Estos foliolos pueden ser enteros, dentados, aserrados, etc., y de diferentes formas, ovado, lanceolado, elíptico, obcordado, romboide, linear y oblongo.

La hoja compuesta, por la nervadura generalmente, puede ser:

- Pinnaticompuest: Si los foliolos salen a lo largo del raquis en forma de peine (Figura 2. a)).
- Palmaaticompuesta: Si todos sus foliolos surgen del apice del peciolo comun, estos pueden ser 3 y tenemos en el caso particular de las hojas triffoliadas (Figura 2. b)).
- Hojas Scorpiurus. Tamien llamadas smples o reducidas a folidios, peciolos dilatados y laminar que sustituye a la lamina de la hoja (figura 2. c)).

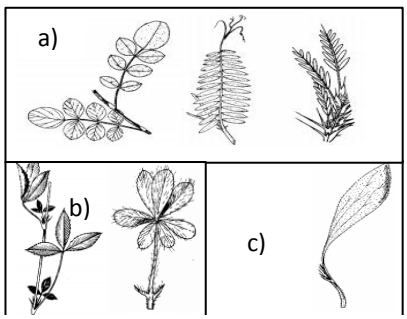


Figura 3. Tipo de hojas; a) Pinnaticompuesta, b) Palmaaticompuesta y c) Simple

- Tallo:

El tallo se origina de la plúmula, que por división de sus células hace posible el crecimiento del eje principal de la plántula, el cual da origen a las ramas laterales a partir de las yemas. Los tallos crecen en longitud debido a la división celular del tejido meristematico en el punto de crecimiento de una yema, y al alargamiento de las células producidas. El engrosamiento del tallo y las raíces en las especies perenes de tallos leñosos e debe al aumento de volumen a causa de la división de las células del *cambium,* donde se diferencia la zona de crecimiento. Esta diferenciación no existe en las especies de tallos herbáceos, las cuales presentan un tallo meduloso ramificado y nutritivo (Posada, 2005).

La Flor y la Inflorescencia.

Los caracteres florales difieren en las tres familias.

- Inflorescencia:

Las flores normalmente no se sitúan de forma aislada sino en inflorescencias, que generalmente proceden de pedúnculos axilares de las hojas. Las más comunes entre las leguminosas son:

- Inflorescencia en espiga: Cuando las flore están sentadas directamente sobre el eje floral (figura 5. a)).
- Inflorescencia en racimo: Cuando las flores se insertan sobre el eje floral a través de un pedúnculo o pedicelo (figura5. b)).
- Inflorescencia en umbela: Cuando las flores tienen pedicelos de la misma longitud que arranca del ápice del eje floral, en forma de radios.
- Inflorescencia en capitulo: Cuando las flores están sentadas directamente sobre un receptáculo cortó y dilatado del eje floral (figura 5.d)).
- Otra forma de inflorescencia en las leguminosas son los Glomérulos y Fascículos, que son cimas muy contraídas (figura 5.e)).

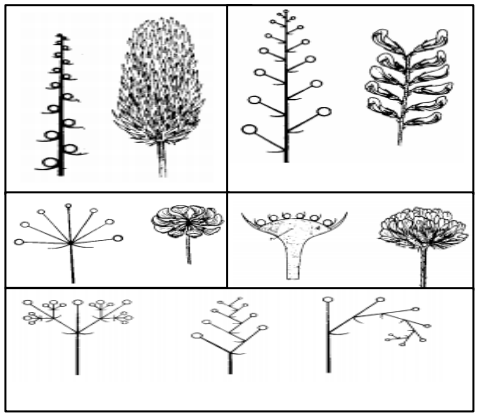


Figura 5. Tipo de inflorescencia

7.1.1.2 Subfamilias.

Mimosoideae.

- Porte: árboles, arbustos, su frútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.
- Hojas: bipinnadas, excepcionalmente pinnada (*Inga* sp.), alternas.
- Flores: agrupadas, abreviadas en cabezuelas o capítulos y éstos, en muchos casos agrupados secundariamente en racimos o panojas.
- Perianto: sépalos reducidos, 5; pétalos 4-5, generalmente, unidos en la base formando una copa hipógina.
- Estambres: infinitos, filamentos muy largos, anteras pequeñas. En esta subfamilia los estambres expertos constituyen la parte más vistosa de la flor.
- Gineceo: generalmente unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con óvulos en hilera de placentación marginal.
- Fruto: comúnmente seco y dehiscente por ambas suturas, a veces indehiscente o con dehiscencia transversal.
- Semillas: rasurada, con embrión largo.

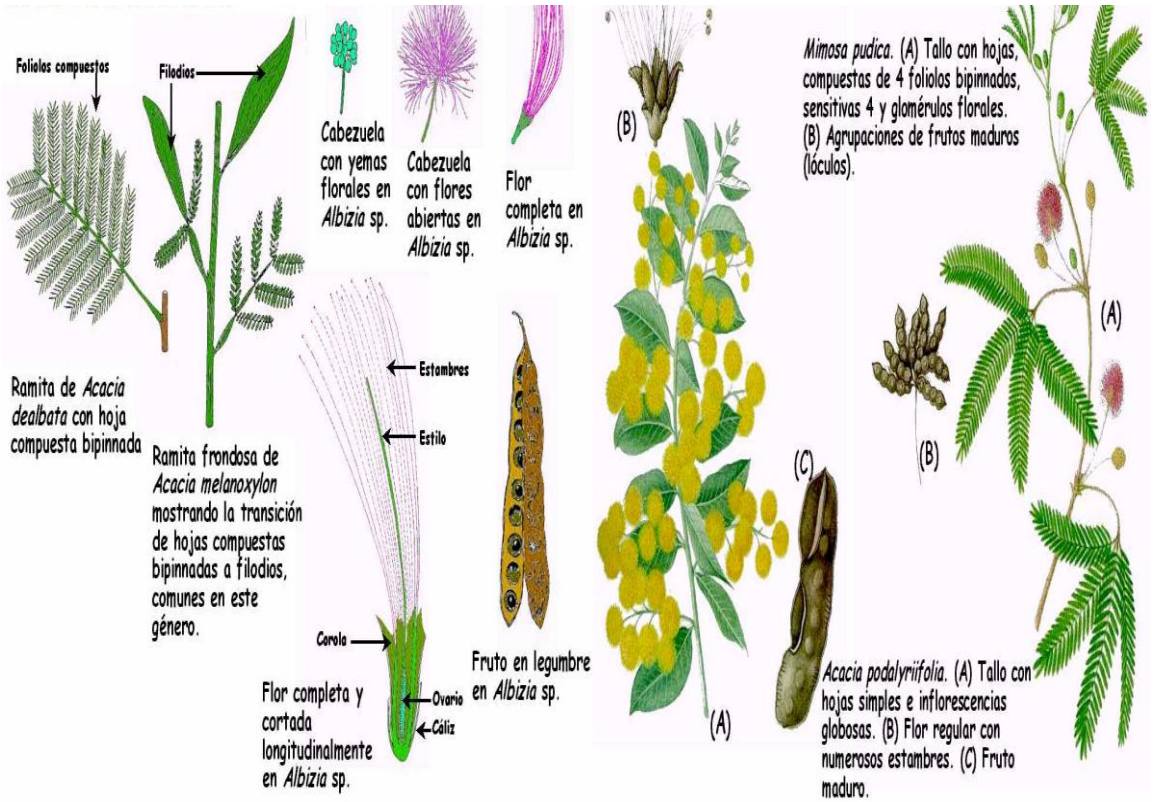


Figura 6. Familia de las mimosaseae. (valencia, 2008)

Caesalpinioideae

- Porte: árboles, arbustos, su frútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.
- Hojas: bipinnadas, pinnadas, bifolioladas.
- Flores: zigomorfas, generalmente en racimos, simples, axilares terminales.
- Perianto: sépalos 5 libres, diminutos o no; pétalos 5, 1 (de arriba o abajo) diferenciado (estandarte) y cubierto en la base por los demás.
- Estambres: generalmente 10 (o menos), libres, insertos en la copa floral.
- Gineceo: unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con numerosos óvulos de placentación parietal.
- Fruto: comúnmente seco y dehiscente por ambas suturas, a veces indehiscente o con dehiscencia transversal.
- Semillas: con funículo elongado, a veces con arilo.

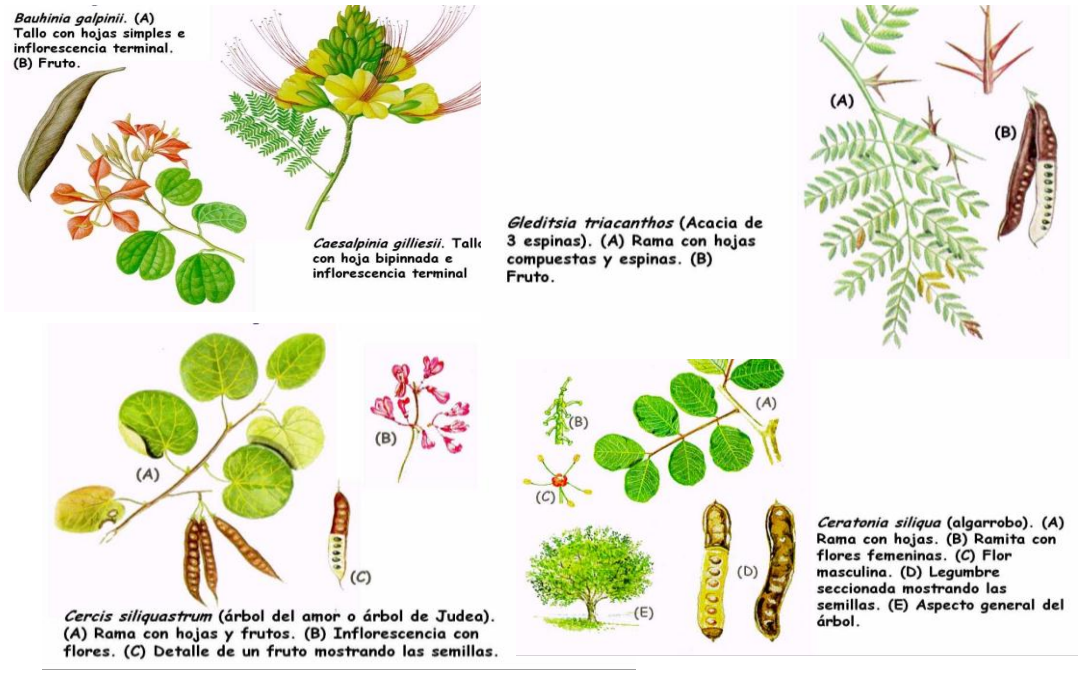
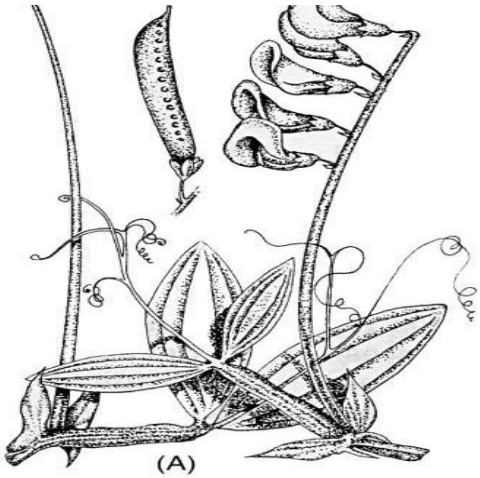


Figura 7. Familia delas Caesalpinioideae. (valencia, 2008)

Papilionoideae

- Porte: árboles, arbustos, su frútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.
- Hojas: pinnadas, trifolioladas, palmatipinnada.
- Flores: zigomorfas, dispuestas generalmente en racimos.
- Perianto: sépalos 5, más o menos unidos y frecuentemente desiguales. Corola inserta en la base del cáliz, pétalos 5, irregulares, generalmente 2+2+1, el pétalo superior diferenciado (estandarte) más grande y encerrando a los demás, 2 pétalos laterales formando las alas y 2 inferiores unidos formando la quilla que envuelve y protege a los estambres y el gineceo.
- Estambres: 10 monadelfos (9 estambres unidos por sus filamentos formando un tubo que aloja al
- gineceo +1 estambre libre), raramente 5.
- Gineceo: unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con numerosos óvulos de placentación parietal.
- Fruto: seco y dehiscente por ambas suturas, a veces folicular o indehiscente.
- Semillas: con corto funículo.



Lathyrus latifolius: (A) hojas, flores y fruto.

Figura 8.Planta de la familia delas Papilionoideae (valencia, 2008).

7.2. Características biológicas de las bacterias diazótrofas simbióticas.

Las bacterias diazótrofas simbióticas son aquellas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas. Estas raíces presentan nódulos en cuyas células se alojan las bacterias fijadoras de nitrógeno; toman ácidos orgánicos de las plantas y contribuyen con compuestos nitrogenados como los ureidos y las amidas de reserva. Este tipo de fijación de nitrógeno es muy eficiente al recibir las plantas los compuestos nitrogenados directamente de los microorganismos nitro-fijadores que viven en simbiosis (Espín, 2002). Se han descrito 40 especies en nueve géneros de bacterias que forman nódulos en leguminosas, no obstante, existen bacterias simbióticas que pueden colonizar otras plantas; por ejemplo, Rhizobium leguminosarum y cepas fotosintéticas de Bradyrhizobium sp, encontradas en raíces de arroz.

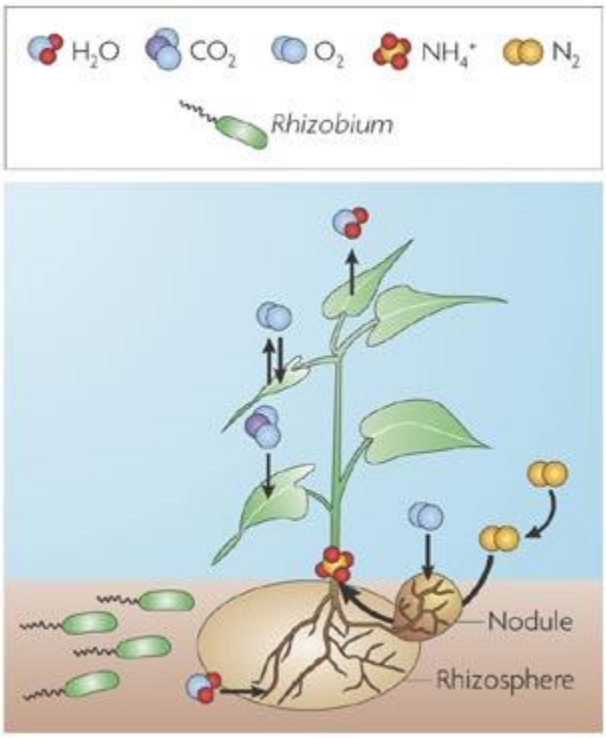


Figura 9. Simbiosis de rizobium con la leguminosas.

Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados, basada en la especificidad de los huéspedes para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*.

En esta clasificación, cada especie se componía de cepas que compartían un grupo de leguminosas huésped. Trabajos posteriores desafiaron esta designación de especies basada en la especificidad del huésped. En 1944 Wilson reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies. En 1964 Graham y en 1968 Moffett y Golwell sugirieron revisar la taxonomía basándose en resultados de la taxonomía numérica. Más tarde, en 1974, Jordán y Allen dividieron estas especies en dos grupos de acuerdo con sus tasas de crecimiento, flagelos y reacciones ácido/alcalinas en medio YMA. Además de estas seis especies, se incluyó un grupo misceláneo designado *Rhizobium* spp.

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.

De acuerdo con la definición aceptada de especie en bacteriología, cada especie de rizobios consta de un grupo de cepas que comparten características que las distinguen como grupo de otros grupos de bacterias.

7.2.1. Bacterias simbióticas.

Género Rhizobium.

La taxonomía de los rizobios ha cambiado considerablemente en los últimos 20 años; el género Rhizobium, un miembro de α-Proteobacteria, ahora se divide en varios géneros.

Rhozobium es un microorganismo predominante rizosférico, capaz de multiplicarse sobre la superficie de las raíces, tanto de no leguminosas como de leguminosas. Se sabe que las plantas ejercen una acción selectiva sobre los microorganismos que crecen en su Rhizosfera (Aguilar, José-Miguel, & Olivare, 1983).

Los rizobios son bacilos de 0,5 a 1,0 x 1,2 a 3,0 µm, Gram negativos y móviles por flagelos perítricos. Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2 a 4 mm de diámetro dentro de 3 a 5 días de incubación en medio YMA (Marques Pinto & Vincen, 1974). El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Desarrollan una pronunciada turbidez de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado (Vinuesa, Leo´n-Barrios, Silva, Willems, & Martiınez-Romero, 2005). Son aerobios, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30 ºC; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40 ºC. El pH óptimo de crecimiento está entre 6.0 y 7.0; Sin embargo, pueden predominar entre valores de 4,0 a 10,0. El tiempo de generación de las cepas de Rhizobium sp. está entre 1.5 a 5.0 horas (Vinuesa, Leo´n-Barrios, Silva, Willems, & Martiınez-Romero, 2005).

Es quimiorgano heterótrofo, utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar celulosa, almidón, caseína, quitina y agar; mientras que la peptona es pobremente utilizada. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato o ácido nicotínico (Vinuesa, Leo´n-Barrios, Silva, Willems, & Martiınez-Romero, 2005)

Mediante el estudio de plantas promiscuas hospederas dispersas geográficamente se ha constatado que son fuente de muchas especies nuevas. Recientemente, una serie de aislamientos se han registrado en los nódulos de las leguminosas, con capacidad de fijación de nitrógeno, pero filogenéticamente ubicados fuera de

los grupos tradicionales de rizobios en α-proteobacterias. Entre las nuevas líneas géneros simbiontes que presentan la fijación de nitrógeno en leguminosas se incluyen Blastobacter, Methylobacterium, Devosia, Ochrobactrum y Phyllobacterium en α-proteobacterias Burkholderia, Herbaspirrillum, Ralstonia y Cupriavidus en β--proteobacteria (Willems, 2003; Lindström y MartínezRomero, 2007).

De la filogenia del 16S rDNA está claro que Rhizobium sp. y Agrobacterium sp., están fuertemente relacionadas y sus especies están entrelazadas (Young et al., 2003). Está planteada la transferencia de todos estos taxones de Rhizobium sp. y unir a A. radiobactery A. tumefaciens en R. radiobacter; mientras que A. rhizogenes en R. rhizogenes.0 Por otra parte, A. rubi y A. vitis se transfieren a Rhizobium, como especies distintas y A. larrymoorei como R. larrymoorei.

Desde la década de los 80, con la introducción de características genéticas (ADN-ADN y las hibridaciones ADN-rARN, catálogos rARN y secuenciación del rADN) fue descubierta una mayor diversidad entre los rizobios y se hizo evidente sus relaciones con otros grupos de bacterias. Esto condujo a un aumento gradual en el número de géneros. En paralelo, también ha aumentado significativamente en el número de especies, con 48 rizobios reconocidos (Willems, 2003).

7.2.2. Importancia biológica

Las leguminosas muestran una amplia diversidad tanto morfológica como de hábitats y ecología, encontramos desde formas herbáceas anuales hasta árboles tropicales. Muchas leguminosas son noduladas por los rizobios. 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. Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas. Es por ello que leguminosas arbustivas y arbóreas se emplean como plantas pioneras en la reforestación de zonas áridas y semiáridas. Por el interés que estas bacterias representan para la agricultura, empleándose como inoculantes (bio-fertilizantes) para los cultivos se han realizado investigaciones extensas sobre este sistema simbiótico, incluyendo estudios sobre la diversidad y la taxonomía de los rizobios. *Rhizobium* fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha añadido como inoculante durante 105 años a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos (Roberts, 2007).

Por otro lado, el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en agricultura ha ocasionado graves problemas de contaminación. No todo el fertilizante que se aplica lo aprovecha la planta sino que en una cuantía importante acaba en lagos y lagunas. La fijación biológica de nitrógeno es la opción natural de fertilización química.

7.3. Simbiosis: *Leguminosa-rizobio.*

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. 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. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80 % de la fijación biológica de nitrógeno. La simbiosis es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo (Wang, Martínez Romero , & López Lara).

La simbiosis Rhizobium-leguminosa se establece como resultado de la expresión de unas características propias de la bacteria, de la planta hospedadora o de la asociación de ambas. Estas características, o propiedades simbióticas, reciben los nombres de especificidad, infectividad y efectividad. Cualquiera que sea el mecanismo de la invasión de las raíces por Rhizobium, a través de los pelos radicales o de los espacios intercelulares de la corteza de la raíz, existe un grado de especificidad variable. Ciertas leguminosas tienen unos requerimientos muy concretos para Rhizobium, mientras que otras, aceptan un espectro extremadamente amplio y, al contrario, un determinado Rhizobium puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de especies o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias

En esta simbiosis 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.

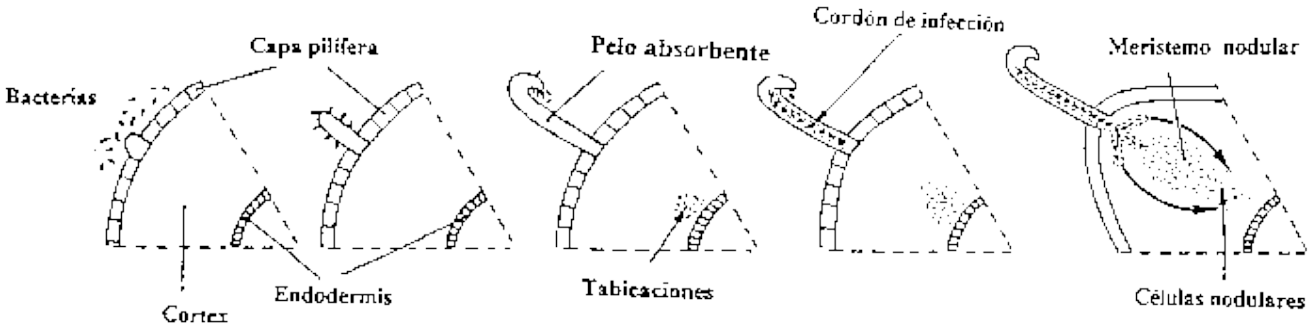


Figura 10. Mecanismo de Desarrollo de Nodulacion

7.3.1. Proceso de infección y formación de nódulos

7.3.1.1Señalización entre la planta y Rhizobium

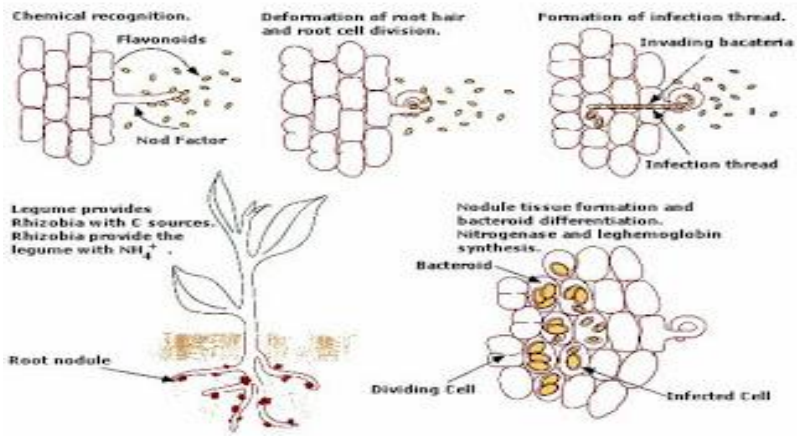


Figura 11.Proceso de Formación del nódulo.

Se puede definir como Rhizosfera a la porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. De hecho, las características fisicoquímicas de dicha región hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos (Bazin M.J. y col., 1990), de los cuales los más abundantes son las bacterias, en gran parte propiciado por la presencia de los exudados de la planta ricos, entre otros, en compuestos carbonados. Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radiculares (Bowen G.D. y Rovira A.D., 1999) abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos. Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides (derivados del 2–fenil–1,4–benzopirona) (Fig. 1) 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. Así, algunos de estos flavonoides a concentraciones nanomolar, provocan la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical (Sánchez F. y col., 1991). En cambio, estos mismos flavonoides a concentración micromolar, activan en *Rhizobium* a los genes responsables de la nodulación (genes *nod*).

Cada *Rhizobium* expresa constitutivamente un grupo de factores de transcripción hélice–lazo–hélice de la familia LysR (Schell M.A., 1993) conocidos como NodD cuyo número y regulación va a depender de la especie de *Rhizobium*. El factor 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 (Schultze M. y Kondorosi A., 1998). 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 b–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 de cierta especificidad al proceso de nodulación (Spaink H.P., 2000).

La mera presencia de los factores Nod en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radiculares (Lerouge P. y col., 1990; Heidstra R. y col., 1994) pero se necesitan niveles mayores, del orden de 10^{-7} a 10^{-9} M para provocar la formación de los pre–canales de infección, la división de las células corticales y la inducción de genes implicados en las fases previas a la nodulación, las nodulinas tempranas (Truchet G. y col., 1991).

Uno de los primeros efectos que se observa tras la percepción del factor Nod en el pelo radicular es la entrada de Ca^{2+} al citoplasma (Felle H.H. y col., 1998; Cárdenas L. y col., 1999). Ello conduce a la activación de ciertos canales aniónicos que originan la expulsión de Cl^- y por tanto la despolarización de la membrana del pelo (figura). No se conocen los mecanismos que inducen la entrada de Ca^{2+}, aunque se ha propuesto que podría estar mediado por proteínas G (Pingret J.L. y col., 1998) y mantenido por canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Esta entrada de Ca^{2+}, además de servir como mensajero para la inducción de genes y activación de proteínas implicadas en la nodulación, induce una reorganización del citoesqueleto, que contribuye a la deformación del pelo radicular hasta llegar a una forma característica del fenómeno de la nodulación, el "cayado del pastor" (*Shepherd's crook* en inglés). Esta estructura generará una pequeña cavidad en donde la bacteria puede crecer y prosperar.

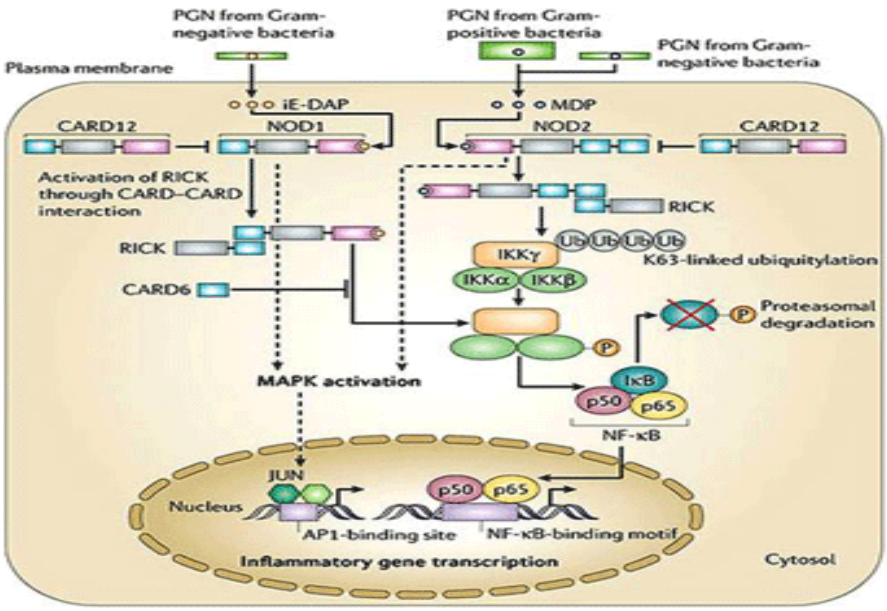


Figura 12. Mecanismo de asimilación de los factores.

7.3.1.2 Invasión y formación del canal de infección.

La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Fibrillas de celulosa producida por la bacteria pueden ayudar a enredar al rizobio en la superficie mucilaginosa de la raíz, proceso reforzado por la presencia de proteínas dependientes de Ca^{2+}, ricadhesinas, producidas por la bacteria (Smit G. y col., 1989). Es por ello que los polisacáridos y proteínas producidos por *Rhizobium* pueden jugar un papel importante en la interacción física entre la planta y la bacteria. Otro factor a considerar es el hecho de que esta matriz extracelular puede formar una estructura gelatinosa en presencia de iones de calcio (Morris V. y col., 1989).

Dicha capacidad podría servir para retirar los iones de Ca^{2+} presentes en el entorno de la pared vegetal, que normalmente son utilizados para estabilizar y organizar a las pectinas recién sintetizadas y, por tanto, debilita esa zona de la pared habilitando así un lugar propicio para la infección. Además, la presencia de un gel de naturaleza tan rígida puede servir a la bacteria como punto de apoyo para entrar en el pelo aprovechando la presión que ejercen las sucesivas divisiones de la bacteria. De este modo se origina una invaginación de la membrana del pelo por la cual las bacterias infectan a la planta.Paralelamente y coincidiendo con la entrada de la bacteria en el pelo radicular, en el interior del mismo se produce un trasiego de vesículas que volcarán su contenido en el entorno de la bacteria (Brewin N.J., 1991) formando así los primordios del canal de infección, estructura a través de la cual las bacterias van a discurrir por la planta hasta llegar al nódulo. Más tarde se detallan estos dos tipos de desarrollo del nódulo. La formación del dicho “camino” de infección está dirigida por la planta merced a la deformación del citoesqueleto que induce una invaginación en la vacuola generando los llamados puentes citoplasmáticos (van Brussel A.A.N. y col., 1992) cuya orientación comunica unas células con otras y por los cuales irá creciendo la bacteria. A lo largo de toda la luz del canal existe una matriz glicoproteína cuyos componentes proceden tanto de la planta como de la bacteria (Broughton W.J. y col., 2000). Así, por parte de *Rhizobium* nos encontramos, entre otros, glúcidos cíclicos, lipopolisacárido (LPS), fundamental para una correcta infección, succinoglucano y EPS, siendo éste último crucial para la iniciación y posterior elongación del canal de infección (Cheng H.P. y Walker G.C., 1998). La planta por su parte, entre los distintos compuestos que liberan las vesículas al canal de infección, aporta arabinogalactanos (o PsENOD5 en guisante) y proteínas ricas en prolina como ENOD12, pero el componente principal es material glucoproteico denominado glicoproteína de matriz (MGP) (VandenBosch K.A. y col., 1989), recientemente identificado como un tipo de extensiva (Wisniewski J.P. y col., 2000), que es secretada por las células del pelo radicular y del córtex y que se acumula tanto en el canal de infección como en los espacios intercelulares de células no infectadas (Rae A.L. y col., 1991). Es una glucoproteína constitutiva cuya expresión en el proceso de infección se ve incrementada y cuya presencia es

necesaria para el desarrollo del canal de infección (Rae A.L. y col., 1992). Se la ha relacionado con un mecanismo de defensa de la planta, al observar cómo plantas infectadas con bacterias mutantes en la síntesis de lipopolisacárido (LPS), aumentan su secreción (Perotto S. y col., 1994).

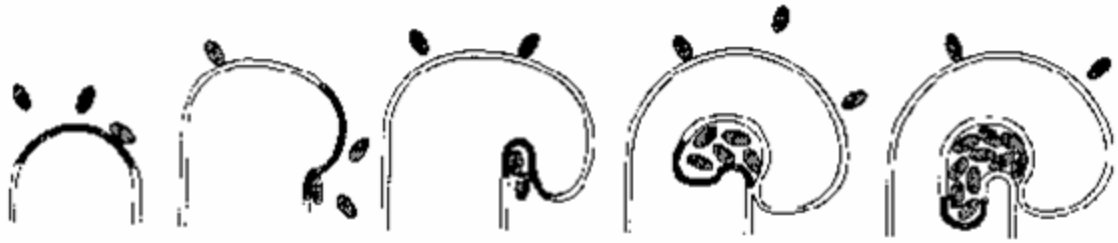


Figura 13. Desarrollo del nódulo. Invasión de la bacteria y formación del canal.

7.3.1.3 Desarrollo del Nódulo.

Dependiendo del sistema simbiótico podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados. Ello va a venir dado por el lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz. Así, si se originan en el córtex interno se originan nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos, además de presentar una estructura anatómica distinta, también difieren en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo en formación. A pesar de ello, la inducción del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación.

7.3.1.4. Tipo de Nódulos.

NODULOS DETERMINADOS.

Al igual que los nódulos indeterminados los nódulos determinados también pueden dividirse en diferentes regiones. Distinguimos así una región central o zona infectada, donde se produce la fijación de N2, de una región externa, que incluye córtex, endodermis y parénquima nodular (Manuel, 2000).

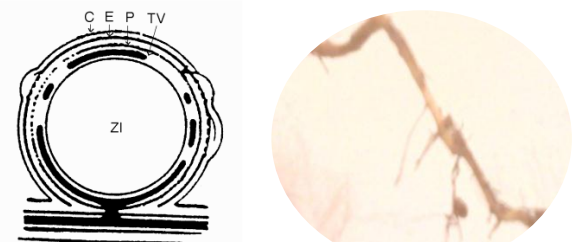


Figura 14.Nodulo Determinado.

Esta clase de nódulos tiene forma esférica y la zona infectada está formada por células que se encuentran en un estadio similar de desarrollo, las divisiones en la zona central concluyen 12-18 días después de la inoculación y a partir de ese momento el aumento del tamaño del nódulo se produce solo por incremento celular. Estos nódulos se desarrollan en el córtex externo de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de ureidos (Martin, 2009).

En los nódulos determinados existen dos regiones mersitematicas diferenciadas, y la mayoría de las divisiones en la región central del nódulo cesan entre 12 y 18 días después de la inoculación. El posterior aumento del tamaño nodular se da por crecimiento de las células ya existentes. Algunas células de esta región central son invadidas por cordones de infección. Otras, sin embargo, permanecen sin infectar, constituyendo las llamadas células intersticiales. Estas células son de menor tamaño que las infectadas y contienen gran cantidad de vacuolas. Las células intersticiales contienen en los peroxisomas una uricasa específica de nódulos (nodulina-35), y superan en número a las células infectadas en una proporción aproximada de 3 a 2. La función principal de las células intersticiales de los nódulos determinados es la síntesis de los ureidos alantoina y ácido alantoico (Martin, 2009).

NÓDULO INDETERMINADO.

Los nódulos de tipo indeterminado se caracterizan por la presencia de un meristemo nodular persistente (Zona I), constituido por un grupo de células que se dividen activamente por mitosis. Algunas de las células derivadas permanecerán como parte meristemo, mientras que otra se diferenciaran en tipos celulares específicos. La existencia de un meristemo persistente provoca que los nódulos de tipo indeterminado tengan generalmente forma alargada, ya que se forman continuamente nuevas células en el extremo distal del nódulo. Esto hace que todos los estadios del desarrollo nodular estén representados en un único nódulo, existiendo un gradiente de edad desde la zona apical o distal (células más jóvenes) a la zona basal o proximal (células viejas).

Cerca del meristemo nodular se encuentra la zona de invasión, algunas células de esta zona son invadidas por cordones de infección, y en general son células más grandes y con mayor número de vacuolas que las células meristematicas.
En el borde proximal de la zona de invasión se encuentran los bacteroides recientemente liberados de los cordones de infección. Éstos tienen forma alargada, todavía conservan la capacidad de dividirse y están rodeados por la membrana peribacteroidal, correspondiendo a los bacteroides de tipo 1 (Martin, 2009).

A continuación se encuentra una zona de células más grandes, vacuoladas y diferenciadas que las de la zona anterior, denominadas zonas de simbiosis temprana, asignándose el termino de zona prefijadora o zona II al conjunto formado por la zona de invasión y la zona de simbiosis temprana. Aquí se encuentran los bacteroides de tipo 2, mas alargados que los tipos 1 (Martin, 2009).

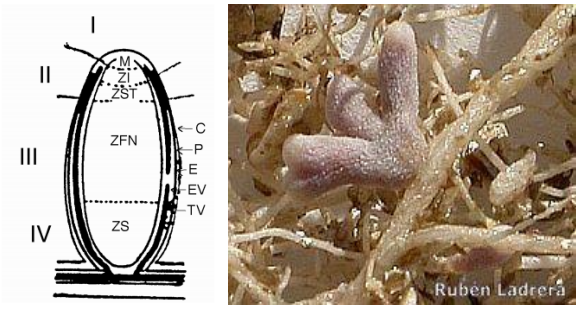


Figura 15. Nódulo Indeterminado.

En el borde proximal de la zona prefijadora se sitúa la interzona II-III, una estrecha franja de tejido de células grandes, que contiene gran cantidad de amiloplastos y bacteroides de tipo 3. La interzona II-III es una zona de transcripción en la expresión de genes necesarios para el inicio de fijación de N2. En la zona de fijación de nitrógeno o zona III existen células no infectadas y células infectadas (repletas de bacteroides). La zona III puede subdividirse en una zona fijadora y una zona ineficiente, donde la tasa de fijación de N2 se halla sensiblemente reducida. En la zona fijadora se encuentra los bacteroides de tipo

4, caracterizados por una marca heterogeneidad citoplasmática. Los bacteroides de tipo 5, presentes en la zona ineficiente, poseen en cambio un citoplasma más homogéneo. Finalmente, la zona de senescente o zona IV, en la región proximal del nódulo, contiene las células más viejas, y se caracteriza por la presencia de pigmentos de degradación (Martin, 2009).
Rodeando a la zona de invasión y al resto de la región central de los nódulos podemos encontrar otro tipo de celulares formando parte de los tejidos vasculares, endodermis y parénquima nodular (Martin, 2009).

7.4. Fijación biológica del nitrógeno (FBN).

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 procariotas (Sprent J. y Sprent P., 1990).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa. Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos.

Son estas formas simbióticas, concretamente las establecidas entre las rizobiáceas y las leguminosas, las que antiguamente eran aprovechadas para la renovación de los suelos mediante la práctica de la rotación de cultivos; hoy en día sin embargo, desde la aparición de la “revolución verde” en agricultura, esta práctica se ha sustituido por la utilización de fertilizantes químicos a pesar del elevado coste energético y ambiental que supone. Para poder disminuir la dependencia a fertilizantes nitrogenados que está adquiriendo la agricultura mundial se han propuesto varias alternativas que abarcan desde la modificación genética de las plantas a la optimización y mejora de la fijación biológica de nitrógeno (Vance C.P., 2001).

7.5. Factores que controlan la nodulación y fijación de N.

Los genes de la nodulación se definen como aquellos genes de rizobio que son necesarios para la nodulación o que se expresan cotidianamente con estos

El proceso de reconocimiento entre bacteria y la planta para la formación de nódulos y fijación de N, involucra entre otros el cambio en la expresión de varios genes de ambos sombiotes. Los genes responsables del proceso se localizan en moléculas circulares de ADN superenrollado llamados plásmidos, hasta el momento solo se conocen el plásmido pSym en el género Rhizobium donde se encuentra agrupados. Los genes simbióticos se categorizan así: lo genes “nod” que afectan a la nodulación, los genes “nif” que controlan a la nitrogenasa y los genes “fix” que afectan a la fijación simbiótica del N. La primera señal implicada en la interacción la provee la planta. Los rizobios son capaces de notar la

presencia de la raíz de la leguminosa por medio de moléculas de bajo peso molecular (flavonoides, isoflavonoides) secretadas por la raíz. Este proceso tiene especificidad hasta cierto punto ya que las leguminosas secretan flavonoides específicos para atraer a rizobios específicos. En respuesta a la señal de la planta los rizobios responden sintetizando otras señales específicas, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora.

7.5.1. Genes de función Temprana.

La mayoría de rizobios producen grandes cantidades dc exopolisacáridos lo que hace que se formen colonias mucosas en medio sólido. Se considera que estas sustancias tienen que ver con el proceso dc nodulación pero estos polisacáridos cuando están en exceso ejercen un efecto negativo en el funcionamiento del nódulo durante los últimos estados de su desarrollo, por lo que se activa un gen para inhibición de la síntesis de los polisacáridos (gen "psi") para que el funcionamiento del nódulo sea normal.

También existe otro gen el "psr" (de restauración en el polisacárido) que puede inhibir la transcripción del "psi", cuando este quede igual y no haya fijación de N. El gen "pss" (de síntesis del polisacárido) juega un papel simbiótico y se encuentra también en otros grupos de bacterias asociadas a plantas. Los genes "hsn": son importantes en la especificidad por el hospedero (Beynond et, 1980). Los genes "nod": son los responsables del encrespamiento del pelo radical, infección, formación de nódulos (Vance y Griffith, 1990). Los genes "nod" que tienen que ver con la especificidad del hospedero se conocen como genes "hsn" (Appelbaum, 1988), estos se clasifican en dos categorías: genes estructurales y genes reguladores que controlan la expresión de los estructurales. La principal función de estos genes es asegurar el intercambio de señales entre los dos simbiontes (Fisher y Long, 1992).

7.5.2. Genes Reguladores.

Algunos productos del metabolismo secundario en plantas, presentes en los exudados de las raíces, generalmente flavonoides, estimulan la producción de proteínas del gen regulador "nod"D las cuales se unen a secuencias conservadas en las regiones promotoras de los otros operones "nodD" para que se expresen los genes estructurales (Denarie et, 1913).

La transferencia de los genes "nod"D entre rizobios está asociada con cambios en el rango del hospedero (Horvath et al, 1987;Denarie et al, 1993) así los genes "nodD" son determinantes del rango de hospederos (Denarie et al, 1993).

7.5.3. Genes Estructurales

Su papel es la producción de lipo-oligosacáridos extracelulares (factores "nod"D) cuyo núcleo central lo sintetizan los genes "nod" -ABC y la síntesis de las demás partes lo hacen diferentes genes "nod" específicos para cada especie (Denarie et al, 1993). Estos factores nod desencadenan una serie de respuestas en las plantas: deformación de los pelos radicales, formación del

hilo de infección, inducción de la división celular de las células cíclicas y formación del primordio del nódulo (Denarie et al, 1993). También estimulan en las plantas la expresión de "nodulinas tempranas," proteínas del hospedero que se expresan durante la respuesta inicial a la infección por rizobio (Fisher y Long, 1992).

7.5.4. Genes de función Tardía.

De acuerdo a (Ow y Ausubel, 1983) los más conocidos son los genes

- "nif" que tienen como función principal la formación de la enzima nitrogenasa:
    - nifA: Codifica para un activador transcripcional necesario para activar la transcripción de los genes estructurales de la nitrogenasa.
    - "nif' H, D, K: codifican para la formación de los dos componentes estructurales de la enzima nitrogenasa .
    - "nif'L: Juega un papel negativo en la actividad de la enzima.
    - "nif' B,V,N,E,Q: para proteínas que actúan en la síntesis del cofactor Mo-Fe.
    - "nif' F ,J: proteínas transportadoras de electrones a la nitrogenasa .
    - "nif' M,S: proteínas que hacen parte en el procesamiento de la enzima.
    - "nif "U,X,Y: aún no se conoce su función.

7.6. Factor Nod

Los genes de la bacteria implicados en la síntesis de los factores Nod son los genes *nod* (nodulación). Estos genes, a excepción de *nodD*, no se expresan si no se encuentra la señal inductora adecuada de la planta. El gen *nodD* se expresa constitutivamente y la proteína NodD tiene la capacidad de reconocer los flavonoides específicos secretados por la planta. Los operones de los genes *nod* están precedidos por un promotor que contiene una secuencia consenso. A esta secuencia consenso se le llama caja de nodulación (o caja *nod*) y que es reconocida por la proteína NodD. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD a su vez va a activar la transcripción de los genes de la nodulación mediante su unión a las cajas *nod*.

La información detallada de la estructura de los factores Nod y su biosíntesis se encuentra en varias revisiones. Todos los factores de nodulación caracterizados tienen una estructura básica común que consiste en un oligómero de *N*-acetil-D-glucosamina unidos por enlace β 1 —> 4 que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor. Debido a la semejanza estructural del oligosacárido a quitina, polímero β 1 —> 4 de glucosamina típico de hongos y del exoesqueleto de insectos, a los factores Nod también se les llama LCOs (del inglés: lipo-chitin oligosaccharides).

Las estructuras de los factores Nod producidos por los diferentes rizobios varían en: 1) la presencia de grupos adicionales mayormente en los extremos del oligosacárido de quitina, 2) en el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor, y 3) en la longitud del esqueleto de oligosacchárido Estas variaciones son los determinantes mayores de la especificidad de hospedador.

. Aunque los llamamos de modo general como genes *nod*, comprenden a genes designados como *nod*, *nol* y *noe*. Estos genes están generalmente agrupados bien en plásmidos o en una región del cromosoma. Los plásmidos que llevan los genes *nod* se llaman simbióticos o pSym y pueden llegar a ser tan grandes como un tercio del total del cromosoma como en *S. meliloti*. En cepas de *Rhizobium* el tamaño del pSym es menor (200-600 kb) y cuando estas cepas se curan del plásmido simbiótico ya no son capaces de nodular mientras que la reintroducción de un pSym homólogo o heterólogo restaura la nodulación. Recientemente se ha determinado la secuencia total del plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234.

La biosíntesis del esqueleto de los factores Nod es catalizada por los productos de los genes *nodA*, *nodB*, y *nodC*. La proteína NodC presenta actividad *N*-acetilglucosamina β 1 —> 4 transferasa (quitina sintasa); NodB es una deacetilasa que elimina el grupo acetilo del extremo no reductor y NodA transfiere el ácido graso a esta posición. Existen muchos otros genes involucrados en la modificación específica de la estructura básica del factor Nod en las diferentes especies de rizobio.

Una de las funciones de los genes *nodABC* es formar el factor NOD, tetrapentasacárido modificado que libera la bacteria como respuesta en la presencia de flavonoides. Los factores NOD funcionan de una forma similar a como lo hacen las hormonas vegetales de las que son análogos estructurales.

La composición de las cadenas laterales de los factores NOD es específica de cada tipo de rizobio. Los genes *nodEF*, *nodM* y *nodPQ* modifican el factor NOD haciéndolo específico. No se sabe dónde actúa el factor NOD en la planta; pero la presencia de los factores NOD es imprescindible para que tengan lugar los cambios de la planta durante la fase temprana de la infección, aunque su sola presencia no es suficiente para que se produzcan todos los efectos de la inducción del nódulo.

En la Rhizosfera pueden existir quitinasas y otras enzimas capaces de degradar selectivamente factores NOD determinados. De esta forma se logra también una especificidad de infección.

En algunos casos se ha demostrado la inducción de la producción de nodulinas (productos génicos de las plantas responsables de la formación de los nódulos) por el factor Nod. En otros se ha visto que algunas nodulinas se expresan como consecuencia de la inhibición del transporte hormonal en la planta, por esto se ha supuesto que el factor Nod puede interferir este transporte dando lugar a desequilibrios hormonales.

7.7. Tolerancia al stress ambiental por rizobia.

La exposición de las plantas a estrés por acidez, salinidad, temperaturas extremas o metales pesados provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan negativamente al crecimiento y productividad de los cultivos. El estrés salino es uno de los factores más limitantes en la producción agrícola, afectando al 10% de la tierra cultivable. Las plantas son capaces de percibir el estrés abiótico y responder con diversas estrategias para poder sobrevivir. La tolerancia viene dada por genes ubicuos en las plantas que, al expresarse con un determinado patrón, dan lugar a un fenotipo tolerante, aunque todavía se desconocen los mecanismos. Los trabajos más recientes acerca de la respuesta a estrés hídrico y salino, pero también a otros estreses abióticos, sugieren la existencia de una vía independiente y otra dependiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

Apuntes de la FAO estiman que cerca del 15% del área de tierra total del mundo está afectada por la erosión del suelo, la degradación física y química.Los suelos de Latinoamérica se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y tener, en términos generales, niveles bajos de fósforo y un pH ácido, lo cual, además de ser factores limitantes de la productividad de las plantas, afectarían el desarrollo de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. En vista de esto, los científicos vislumbran la solución en el mejoramiento genotípico de las plantas y el fomento de

microorganismos que favorezcan la eficiente utilización de nitrógeno y otros nutrientes.

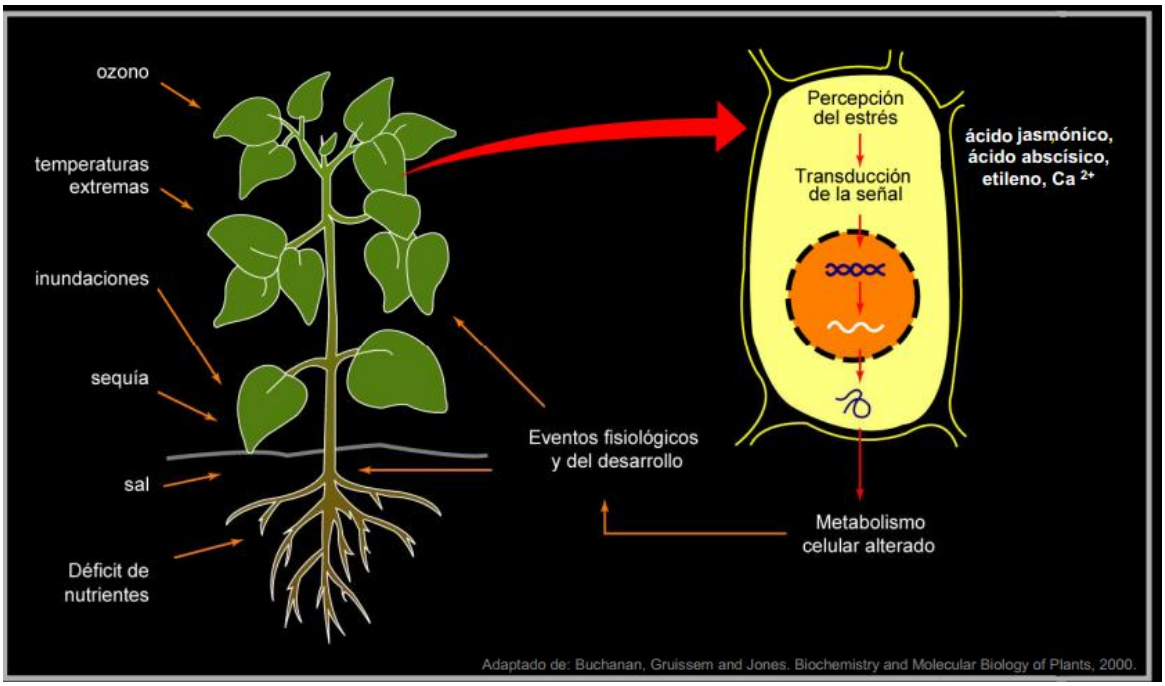


Figura 16. Efectos del estrés en las plantas.

7.7.1. Stress a la acidez

Los suelos ácidos y la acidificación de los suelos son problema de gran relevancia y en aumento en la agricultura mundial de altos rendimientos. Los suelos ácidos limitan tanto el tipo de cultivo que pueden desarrollarse, como productividad. Los cultivos afectados son aquellos que realizan asociación con bacterias radicales fijadoras de nitrógeno hacen una contribución importante al balance de nitrógeno de los sistemas agrícolas.

La acidificación es un proceso natural que ocurre muy lentamente en los suelos con alta pluviometría como consecuencia de la lenta, pero constante, perdida de bases. Sin embargo es el hombre quien tiene mayor influencia ha tenido en acelerar este proceso, al practicar una agricultura intensiva y muy extractiva, que no ha ido aparejada con una adecuada reposición de nutrientes y bases al suelo. Por otra parte, la utilización indiscriminada de fertilizantes de reacción acida, especialmente los amoniacales, sin considerar sus limitaciones de uso y la necesidad de neutralizar sus efectos acidificantes y las características de los suelos.

La acidez del suelo es un problema complejo, debido, en parte, a elevadas concentraciones de iones H, especialmente cuando el pH es inferior a 5, a toxicidad de aluminio y manganeso, y disponibilidad limitada de calcio, molibdeno y fosforo. Sin embargo, el principal factor limitante de la productividad de los cultivos en suelos ácidos es la movilización del aluminio en la solución de suelo, por descenso del pH, el que puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas y organismos del suelo.

Las leguminosas, cuyo crecimiento depende fundamentalmente del suministro de nitrógeno proveniente de la fijación simbiótica, son, aparentemente, más susceptibles a la toxicidad de aluminio que las leguminosas que reciben nitrógeno inorgánico. La toxicidad de aluminio puede tener un efecto perjudicial sobre la simbiosis Rhizobium- leguminosa, ya sea dañando directamente a la planta hospedera, reduciendo la sobrevivencia del rizobio, o interfiriendo con alguno de los estados de la nodulación y funcionamiento del proceso simbiótico.

7.7.2. Tolerancia a la Salinidad

El principal origen de la salinidad en el suelo está relacionado con la acumulación de sales durante largos periodos en zonas áridas y semiáridas, sin embargo otras causas naturales como la erosión de la roca que libera sales, principalmente cloruro de sodio, calcio y magnesio y en menor medida sulfatos y carbonatos, también contribuye a elevar la salinidad en el suelo (Martin, 2009).A parte de estos procesos naturales, la salinidad también puede ser provocada por la excesiva fertilización y la utilización de agua de riego de mala calidad, las sales introducidas por el agua de riego se acumulan en las raíces especialmente cuando la lixiviación es escasa (Martin, 2009).

7.7.2.1. Efecto de la salinidad sobre las leguminosas.

El principal efecto fisiológico de la salinidad sobre las plantas es la reducción del crecimiento a un efecto osmótico inducido por la disminución del potencial osmótico del medio; una toxicidad especifica normalmente asociada con la absorción excesiva de iones Na^+ y de Cl^-, un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y la combinación de los efectos antes indicados. Como consecuencia de estos efectos primarios también se produce un daño oxidativo (Martin, 2009)

El estrés salino puede afectar a la simbiosis de leguminosas con rizobios indirectamente, reduciendo el crecimiento de la planta hospedadora y afectando a determinados procesos fisiológicos de la planta, o directamente inhibiendo el proceso de infección delos pelos radicales por rizobio y desarrollo del nódulo. Las

etapas iniciales de la nodulación son más sensibles al estrés salino que las posteriores (Martin, 2009).

Otro factor que se inhibe es la actividad de la nitrogenasa, esta se inhibe con la salinidad y por ello, el contenido de nitrógeno total en la planta disminuye. La reducción de la actividad fijadora de N_2 por el estrés salino , es habitualmente atribuida a la reducción de la respiración del nódulo, como consecuencia de una limitación de O_2, del sustrato o a un descenso en la producción de proteína citosólica, especialmente la leghemoglobina por los nódulos (Martin, 2009).

7.7.3. Tolerancia a la presencia de metales pesados.

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino et al., 2002).

Algunos metales juegan un papel dual, al ser esenciales para el desarrollo de las plantas y a su vez pueden ser dañinos a altas concentraciones. Los elementos limitantes en el desarrollo de las plantas pueden conducirlas a la muerte, producirse por incrementos relativamente pequeños en la concentración del elemento esencial, como puede ser el caso del Zn y el Cu. Para el caso de aquellos elementos no esenciales, las bajas concentraciones de estos no ocasionan efecto alguno sobre las plantas; los daños pueden ser observados cuando la concentración llega a valores considerados tóxicos (Landero, 2010).

La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimentaria. La absorción y posterior acumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde la solución en el suelo a la raíz de la planta.

La habilidad que tiene las plantas de impedir la toma de metales, es limitada y depende del proceso de acumulación de los elementos en el suelo. La reducción en la capacidad de exclusión por parte de la planta está en función del incremento de la cantidad de estos elementos. Entre los elementos más fáciles de asimilar por las plantas están el Cd, Ni y Zn, por lo que en periodos cortos se pueden esperar efectos perjudiciales como acumulación en el tejido delas plantas y alteración de la función delos elementos esenciales que son similares desde el punto de vista químicas (Landero, 2010).

Los metales pesados como Cu y Zn son esenciales y son imprescindibles para el crecimiento normal de la planta, aunque las concentraciones elevadas de metales pueden resultar en la inhibición del crecimiento y síntomas de toxicidad. Por tanto la absorción y la toxicidad de los metales varían según las especies de las plantas, las características del suelo y las proporciones de los metales pesados presentes (Landero, 2010).

Las actividades geológicas naturales, como desgastes de cerros y volcanes, constituyen una fuente de aportaciones importante de metales pesados al suelo. También las actividades antropogénicas como la industria minera, que está catalogada como una de las actividades industriales más generadora de metales pesados. En el suelo, los metales pesados, pueden estar presentes como iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas solubles o bien, compuestos insolubles o parcialmente solubilizables como óxidos, carbonatos e hidróxidos, (Pineda, 2004).

Los metales pesados pueden incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, los que posteriormente se depositan en lagos, ríos y distintos sistemas acuíferos.

7.8. Marcadores moleculares para el estudio filogenético de bacterias simbióticas.

Los métodos que exploran la variación de los organismos a nivel de proteínas o ADN han ayudado a detectar polimorfismo a nivel individual, poblacional o específico. Esto ha favorecido la investigación de problemas ecológicos o sistemáticos como paternidad, diversidad genética, heterocigosidad, variación geográfica, hibridación, delimitación geográfica de especies, especiación y filogenias de especies entre otros.

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades.

El número de técnicas descritas es cada vez más numeroso, por lo que vamos a reunirlas en 3 categorías: RFLP, MAAP y STS. Pero antes conviene saber lo que es una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), descrita en 1988.

La PCR es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas dactilares, si bien no vale para elaborar marcadores por sí sola. La reacción básica

de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo. Hoy en día todo el proceso está completamente automatizado en un aparato llamado termociclador, y existe una batería de enzimas y condiciones que permiten polimerizar hasta 35 kpb sin errores, aunque las condiciones normales amplifican sin problemas fragmentos de 3 a 6 kpb de longitud.

7.8.1. Tipo de Técnicas para el análisis de ADN.

- **RFLP** (*Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción*).

Esta técnica, desarrollada a finales de los 70, se basa en la detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que selecciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En cambio, para moléculas de DNA de mayor tamaño, como el DNA cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP

- **MAAP** (*Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación*).

Término genérico acuñado en 1994 con el que se designan las técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios para generar huellas dactilares complejas. Entre estas técnicas cabe destacar:

- **RAPD** (DNA polimórfico amplificado al azar):

Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36°C) aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de DNA. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán una huella dactilar característica. Es muy cómoda, rápida, requiere

poco DNA que además no necesita estar muy puro, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos. Sus inconvenientes son que los fragmentos amplificados no suelen corresponder a DNA ligado a algún carácter, sino redundante, y que no da información sobre el número de copias que el DNA genómico contiene de la secuencia amplificada. Esta tecnología ha sido utilizada para la catalogación de frutos, selección de variedades, y diferenciación de líneas clónales. También se está utilizando para el análisis de las variedades de apio, uva, limón y olivo.

- **AP-PCR** (*PCR con oligonucleótidos arbitrarios*):

Los oligonucleótidos han de ser largos y la PCR consta dos de ciclos de baja astringencia (poco específicos) que permite la polimerización de una batería de fragmentos característicos de cada variedad. Esta fase va seguida de ciclos de alta astringencia para amplificar (visualizar) específicamente las bandas anteriores. Los fragmentos amplificados se pueden migrar en un gel de agarosa para observar las grandes diferencias entre especies, o bien se puede marcar radiactivamente y migrar en gel de poliacrilamida para obtener resultados mucho más finos y precisos. Existe una variación denominada **DAF** (Huellas dactilares por amplificación de DNA) que utiliza oligonucleótidos de 5 a 15 bases, pero las huellas proporcionadas suelen ser muy complejas y difíciles de interpretar.

- **AFLP** (*Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados*):

Esta técnica se desarrolló en 1995 y combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. El DNA se corta con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente, y otra de corte poco frecuente. A los fragmentos se les ligan oligonucleótidos de extremos compatibles con las enzimas usadas, y se amplifica por PCR. Jugando con la complementariedad del oligonucleótido con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. Una ventaja especial de esta técnica es que es capaz de generar muchos marcadores moleculares en una sola reacción. Por eso el resultado debe resolverse en un gel de poliacrilamida de alta resolución, puesto que no se resolverían en agarosa. Esta técnica ya se ha usado con éxito en patatas y cebada.

- **STS** (*Sitios etiquetados por la secuencia*) o **SSLP** (*Polimorfismo de longitud en las secuencias discretas*):

Desarrollada a partir de 1989, aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente. Por tanto se combinan la rapidez de la RAPD con la especificidad de la RFLP. Por la manera en que se determinan los oligonucleótidos y por la forma de analizar los polimorfismos, esta técnica ha derivado en otras que enumeramos a continuación:

- **SSR** (*Repetición de secuencias discretas*), descrita en 1989.
- **EST** (*Sitios etiquetados por la expresión*), descrita en 1991.
- **CAPS** (*Secuencia polimórfica amplificada y cortada*), descrita en 1993.
- **SCAR** (*Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas*).
- **D/TGGE** (*Geles de electroforesis en gradiente desnaturalizante/térmico*). Descrita en 1987.
- **SSCP** (*Polimorfismo de conformaciones monocatenarias*), descrita en 1989.

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, y dispersión de especies.

7.9. Huellas genómicas

Estas técnicas se fundamentan en la amplificación de fragmentos del genoma, que se encuentran entre dos secuencias repetidas. Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas: los Polindromes Extragénicos Repetitivos (REP) de 35-40 pb, la secuencia Repetitivas Intergenicas Consenso de Enterobacterias (ERIC) de 124 – 127 pb y el elemento BOX de 154 pb. Estas técnicas se han mostrado más reproducibles que las AP-PCR (*Arbitrary Primed-PCR*) y se están aplicando para el estudio epidemiológico de un gran número de especies distintas; además, son de gran utilidad por su sencillez y rapidez, pudiendo introducirse en el día a día del laboratorio (Prats, 2006).

A partir de la amplificación selectiva de estas secuencias se puede hacer un análisis tipo “fingerprint” o huella genómica con alta reproducibilidad que permite distinguir individuos o clonas.

Estas técnicas son rápidas, y sencillas en relación al PFGE (Electroforesis de campo pulsante) y aunque su reproducibilidad no es absoluta, la comparación de los resultados en un mismo gel posee extraordinario valor

7.9.1. REP-PCR.

La REP_PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencia de ADN repetidas o repetitivas (secuencias REP) que se

encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas Enterobacterias y algunas bacterias Gram positivas y hongos. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias REP, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN.

Se caracteriza por ser una técnica simple, es decir que no requiere del uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especialesa, es rápida (menos de 24 h) y su relativo bajo coste (Cuenca, 2009).

7.9.2. ERIC_PCR.

Es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación de clonas en diversa bacterias Gram negativas. Los patrones ERIC_PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante el REP_PCR.

Además, secuencias más cortas son producidas por supresiones internas, como también secuencias más largas debido a inserciones de alrededor 70 pb en sitios específicos internos (Sharp, 1997). El número de copias de la secuencia ERIC varía entre especies: se han estimado por extrapolación alrededor de 30 copias en *E. coli* K-12 y quizás 150 en *S. entérica Typhimurium* LT2 mientras que la secuencia del genoma de *Photorhabdus luminescens* ha sido reportada conteniendo alrededor de 700 copias (Cuenca, 2009).

7.9.3 Perfiles de ARDRA.

Se usa para caracterizar comunidades y poblaciones. La técnica consiste en amplificar por PCR el gen de 16S rRNA de la comunidad total, aislar las diferentes copias que se encuentran en la mezcla y posteriormente someter a cada una de las copias a digestiones enzimáticas (restricción), también puede digerirse la muestra total (sin separar las copias), 48. La manera más común de separar las diferentes copias del el 16S rRNA (o cualquier otro) de la comunidad es clonando los diferentes fragmentos en cepas especiales de Escherichia coli que son capaces de transformar e incorporar el fragmento en un plásmido con marcadores moleculares de color (operon lactosa) y resistencia a múltiples antibióticos. Esto se hace al mezclar el PCR total con bacterias susceptibles a adquirir DNA extraño (competentes), de esta manera cada bacteria adquirirá una sola copia del gen y así quedarán separadas las diferentes copias de la mezcla total. Las bacterias que contienen los fragmentos se crecen en cajas de Petri con antibióticos y posteriormente se aísla el DNA plasmídico junto con el gen de interés que se puede separar del DNA bacteriano. Cada gen obtenido de esta manera se somete a una digestión enzimática que resulta en un patrón de bandas en electroforesis en geles de agarosa (Fig. 6). Los patrones de restricción permiten identificar diferentes grupos (diferentes patrones de restricción no significan necesariamente especies diferentes) o identificar comunidades distintas. Si el ARDRA se hace con

copias separadas del gen 16S rRNA, el análisis de los diferentes patrones permite hacer estimaciones de diversidad y/o elegir representantes de los patrones distintos para obtener las secuencias e identificar los grupos taxonómicos específicos a los que pertenecen o con los que se relacionan. El problema principal de esta técnica es que dado el número de clonas que se deben de obtener por comunidad para determinar su diversidad y abundancia por restricción los costos son casi iguales que si se secuencia la comunidad (Souza, Escalante, Noguez, Espinoza, Cerritos , & Eguiarte, 2013).

Comparado con los métodos basados en la detección de RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymosphisms*), el poder discriminativo del método de ARDRA depende de la enzima de restricción seleccionada para la digestión del 16s rDNA amplificado por PCR. Los fragmentos de DNA digeridos son separados por tamaño en una electroforesis de agarosa o, cuando se usan oligos marcados fluorescentemente, un gel de poliacrilamida.

7.10. Gen cromosomal 16S rDNA.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacterias y Arqueas o bacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas.

Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos (Woese, 1987).

Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio & Mendoza, 2005).

.

La identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Rodicio & Mendoza, 2005):

- . Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.

- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.
  Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

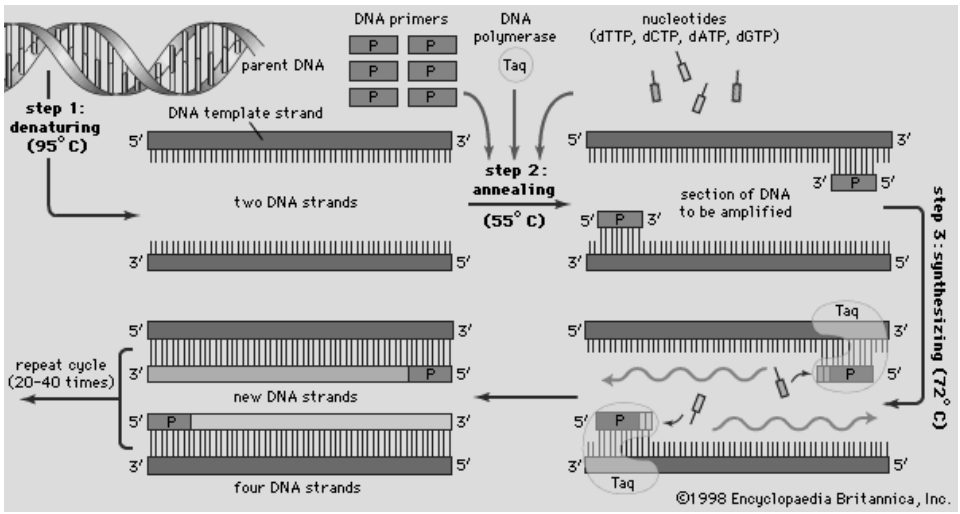


Figura 27. Mecanismo de Replicación del gen 16´s

VIII.- MATERIALES Y METODOS

8.1. Ubicación de los sitios de colecta

La colecta se realizó en 3 lugares con las características idóneas, esto fue en la región centro y frailesca del estado de Chiapas, México; donde los suelos presentaron características de erosión debido a la explotación agrícola. Estos lugares fueron Emiliano Zapata 1 perteneciente al municipio de Chiapas de Corzo, la localidad de El parral perteneciente al municipio de Villa Corzo y la localidad de Adolfo V. Bonfil perteneciente al municipio de Ocozocoautla de Espinoza.

Las muestras tomadas consistieron en la recolección de las plántulas de las leguminosas, se ubicó el área de la Rhizosfera para no dañar las raíces, ya que ahí se encuentran los nódulos radícales, si las raíces son viables se coloca en un frasco con agua para evitar la deshidratación de los nódulos, se taparon y guardaron a temperaturas bajas para evitar su deterioro.

8.2. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas

Se realizó la desinfección de los nódulos de acuerdo al protocolo utilizado por el CCG-UNAM:

1. Extraer los nódulos de la planta cuidadosamente, de preferencia que conserve parte de las raíces.
2. Colocar los nódulos cuidadosamente en una caja Petri limpia que contenga agua destilada estéril.
3. Pasar los nódulos a otra caja Petri limpia que contenga alcohol etílico, lavarlos por 1 minuto.
4. Escurrir el alcohol en un recipiente aparte, y ahora agregar cloralex al 1.5% esto por 3 minutos.
5. Escurrir el cloralex en un recipiente aparte y lavar los nódulos 5 veces con agua destilada aproximadamente por 1 min c/ nódulo.
6. Escurrir el agua del último lavado y proceder a la siembra de los nódulos con el medio.
7. La siembra se realizar en seccionando la caja Petri con el medio a utilizar de acuerdo a los tratamientos que se le va a aplicar.
8. Se incubara de 24-48 h a 28° C.

8.2.1 Aislamiento de las Cepas.

Al a ver transcurrido el tiempo de incubación de los nódulos en el medio PY^{++} se realizó una identificación de las colonias con las características representativas: colonias cremosas, circulares, de color crema, de bordes regulares, pequeñas de aproximadamente 1-5mm de diámetro; tras la identificación de las colonias se realizó una resiembra en PY^{++}, para la obtención de la cepa pura (se repitió el mimo tratamiento hasta la obtención de una sola colonia presente en el medio) posteriormente a la resiembra se incubo de 24-48 h (tiempo en que las colonias presentan crecimiento).

8.3. Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas.

La caracterización de la microscopia bacteriana se realizó por el método de Tinción de Gram, con ayuda del microscopio electrónico. Para identificar su morfología, el tipo de Gram y sus características bacteriológicas de cada una de las cepas halladas.

Figura18. Microscopio Electrónico

8.3.1 Conservación de las cepas puras en glicerol

Después de obtener cepas puras se procedió a realizar gliceroles para una mejor conservación de éstas. Se colocaron 600 µl de glicerol al 60% en un tubo eppendorf y se mezcló con 200 µl de medio de cultivo con la cepa correspondiente. Los gliceroles realizados se guardaron a -20°C.

8.5. Caracterización genotípica de las cepas bacterianas

8.5.1. Extracción de ADN

El ADN total fue extraído por dos kit de aislamiento:

El primero "*DNA Isolation Kit for Cells and Tissues*" de la marca Roche ™, donde se tomaron alícuotas de 200 µl de las cepas inoculadas en caldo PY ++ (over night 12—28 h), las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm por 30 eliminar los componentes del caldo y otro tipo de impurezas presentes en el medio ,y así obtener un pellet celular puro en el fondo del tubo, una vez obtenido el centrifugado se prosigue a eliminar el sobrenadante y así dejar el pellet celular,

Una vez obtenido el pellet se les agregó 200µl del buffer de lisis (mas 10µl de Proteína K), la mezcla fue vortexeada por algunos segundos, para luego ser incubada a 80° C por 40 min, pasado el tiempo se sacaron de la incubación para adicionarle a cada muestra 5µl de RNAsa en solución (10mg/ml), las muestras se mezclaron invirtiéndose 25 veces(arriba y así a bajo), después se les agregó 40µl de solución para precipitación de proteínas y se mezcló voltexeándolas por 20 segundos. Las muestras fueron incubadas en hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 8 minutos, cuidadosamente las muestras fueron pipeteadas para eliminar el sobrenadantes, y se pasaron a tubos de 1.5 ml nuevos estérilers. Posteriormente se adicionaron 200 µl de isopropanol al 100% a cada muestra, para ser mezcladas suavemente (invirtiéndolas muestras 50 veces, arriba y abajo).Se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante fue descartado, de esta forma se obtuvo una pastilla de ADN en los tubos y se les agregó 200 µl de etanol al 70% frio para lavar el ADN de cada muestra y se mezclaron por inversión, estas muestras nuevamente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos 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 minutos, el ADN así obtenido de cada muestra fue resuspendido con 25 µl de la solución de hidratación de DNA y se incubo a 65°C porque30 minutos. Las muestras fueron guardadas a -20°C para su posterior uso (Domminguez, 2011).

El segundo kit usado fue el de " ZR Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep ™ ", en donde el protocolo usado es el siguiente:

Se añidio 50-100 mg (peso húmedo) de células fúngica o bacterianas que se han resuspendido en hasta 200µl de agua o tapón isotónico a un tubo de lisis. Se añadió 750 µl de solución de Lisis al tubo. Posteriormente se vortexio para mezclar bien la solución, se procedió a centrifugar la ZR Bashing Bead TM tubo de lisis en una microcentrifuga a 10000 rpm esto por 1 minuto.

Después se transfirieron 400µl del sobrenadante a un filtro Zymo-Spin TM IV, con un tubo de recogida y se pasa a centrifugar a 7000 rpm durante 1 minuto. (Nota antes de usar los filtros hay que desprender la base de Zymo-Spin). Ya filtrado añadir 1200 µl de la solución de Tapón de ADN fúngico/Bacteriano y

cuidadosamente mezclarlos para posteriormente transferir 800µl de la mezcla a una columna Zymo-Spin TM CII con un tubo de recogida, y se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto. Terminado se desecha el filtrado y se repite de nuevo el procedimiento hasta concluir con la muestra.

Posteriormente se le añidio 200 µl de la solución de ADN Pre- Levado a la columna Zymo-Spin TM CII en un tubo limpio y centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto. Ya filtrado se le añidio a la columna Zymo-Spin TM CII 500 µl de la solución de lavado Fúngica/Bacteriana, volver a centrifugar a 10.000rpm durante 1 minuto. Por ultimo transferir la columna Zymo-Spin TM CII un tubo eppendor limpio de 1.5 ml y añadir a la columna 25 µl de la solución de elución de ADN y centrifugar a 10000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN.

Para obtener un ADN listo para su uso en los experimentos.

8.5.2 Electroforesis de ADN.

Para el análisis de ADN se realizó una Electroforesis en donde se preparó un gel de agarosa al 1 o 0.8% con buffer de TAE al 1X de 45 ml, el gel fue sumergido en buffer TAE 1X en una cámara de electroforesis luego de solidificar, los posos del gel fueron cargados con una mezcla de 3 l de ADN extraído de cada una de las cepas analizadas, se realizó una mezcla con el buffer de carga (colorante), 2l del marcador molecular 1Kb, eso se corrió a 100 volts por 30 minutos, después del tiempo transcurrido se lavó y se tiño con bromuro de etidio al 1%.

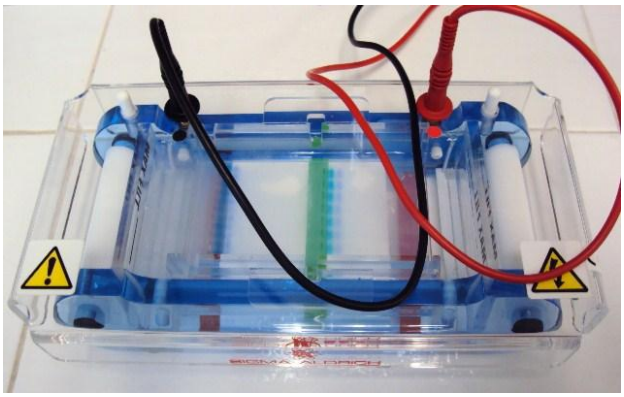


Figura19. Cámara de Electroforesis

8.5.3 Análisis de huellas Genómicas (Box_PCR).

Para conocer la huella genómica de cada cepa aislada, al ADN verificado se le aplico la técnica de BOX_PCR, en este estudio se empleó el primer BOX-A1R. Cada reacción de PCR de 10 µl estaba compuesta por 0.4 ul del primer BOX A1R, 1 µl de de ADN, 1.5 µl de MgCl++ (50mM), 1.25 µl de dNTPS (10 mM), 1 µl de Buffer 10X, 1ul DMSO y unas unidades de Taq polimerasa. El PCR de amplificación se realizó en un termociclador () con la programación de la figura. El producto fue corrido en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X a 110 V por 30 minutos. El gel obtenido fue teñido con bromuro de etidio.

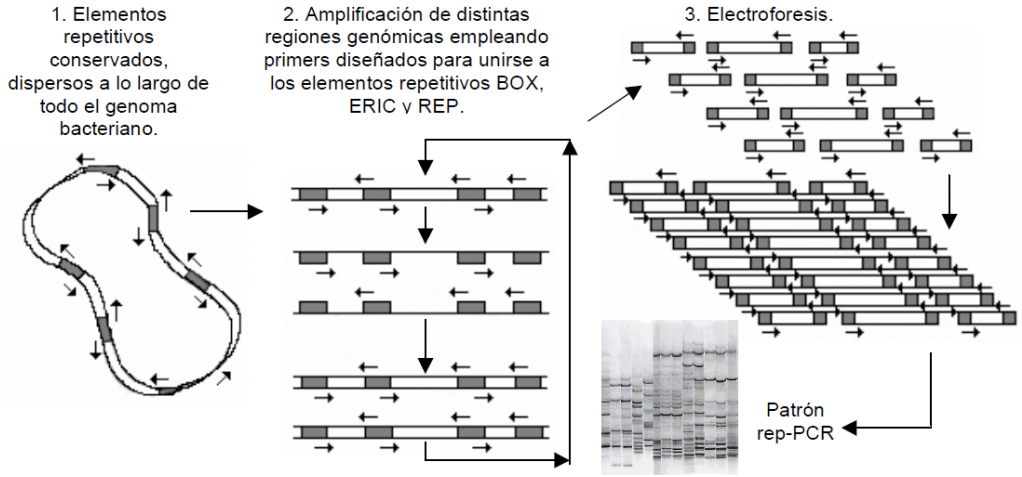


Figura 20. Mecanismo de proceso del BOX_PCR.

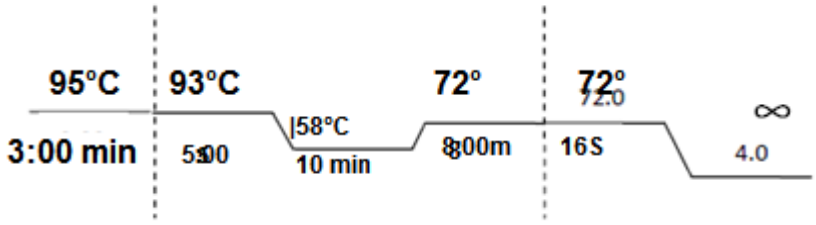


Figura 21. Programación del PCR_Box.

8.5.4 Amplificación del gen 16S ADNr por PCR

Se amplificó el gen 16S rDNA , a partir del ADN total extraído de las cepas, usando los primers rD1 y fD1, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se preparó la siguiente mezcla de reacción que se encuentra en el Cuadro(). Posteriormente se amplificó el gen 16S rDNA, usando el termociclador, con la programación siguiente.

Cuadro 1. Reactivos utilizados para realizar la amplificación del Gen 16,s.

Productos y concentración final.	1Tubo de 100 µl
dNTP'S	0.8
fD1	1.0
rD1	1.0
$MgCl^{++}$	3.0
Buffer 10X	10.0
Taq.Polimerasa	0.5
Agua MQ	83.7
Volumen final	100µl

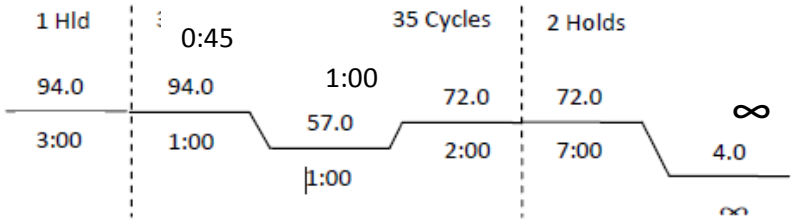


Figura22. Programa para el termociclador para 16s_PCR.

Figura 23. Termociclador

8.5.5 Análisis de restricción del gen 16S rDNA amplificado (ARDRA)

Utilizando los productos de PCR del gen 16S ADNr de cada cepa, se realizó una digestión con la enzima de restricción (MspI) para agrupar las cepas con el mismo patrón de corte. Para estas digestiones se preparó una mezcla de reacción, colocando 7.2µl de H20, 1µl de Buffer, 0.3µl de Enzima y 1.5µl del producto de PCR del gen 16S, para obtener un volumen total de reacción de 10µl. La digestión se dejó por 24 horas a 37 °C.

8.5.5.1 Electroforesis de ARDRA

Los productos digeridos enzimáticamente se colocaron en un gel de agarosa al 1% y se corrieron en una cámara de electroforesis a 110 V durante 40 minutos. Posteriormente los geles se tiñeron en 300 ml de agua destilada con 40 µl de bromuro de etidio (5mg/ml) en agitación constante durante 15 minutos.

8.6. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr.

Los productos de PCR para amplificar el gen 16S ADNr fueron purificados, para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit "*PCR product purification system*" de la marca RocheTM. Cada producto de PCR fue ajustado a un volumen de 100µl, al cual se le adicionaron 500µl del buffer de unión (*Binding Buffer*) y fue mezclado cuidadosamente, posteriormente se pasó esta mezcla a un tubo con un filtro 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. Enseguida se les adicionó 500µl de buffer de lavado (*Wash Buffer*), se centrifugaron nuevamente a 13000 por 1 minuto y el filtrado fue desechado. Se realizó un segundo lavado con 200µl del buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente, el filtrado fue desechado. 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.

Se realizó una electroforesis para verificar la calidad del purificado.

IX. RESULTADOS Y CONCLUSION.

9.1. CARACTERIZACION DE LA LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO.

Las muestras de suelos que se recolectaron, obtuvieron las siguientes características fisicoquímicas (cuadro 2).

Cuadro 2. Características Edafológicas de los sitios de colecta.

Sitios de colecta	Ubicación geográfica			Características del suelo								Tipo vegetación
	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Textura	pH (H_2O)	CIC (Cmol/Kg)	Materia Orgánica (%)					
Emiliano Zapata I (Chiapa de Corzo)	93º 03´	16º 35´	440	Arcilloso	5.5	33.5	7.5					Selva mediana subperenifolia
Las Cruces (Parral)	93º 63´	16º 36´	620	Arcilloso	6.0	----------	10.8					Selva mediana subperenifolia
Alfredo Boenfil (Ocozocoautla)	93º 48´	16º 47´	800	Arcilloso	6.3	----------	12.5					Selva mediana subperenifolia

Figura 24. Tipos de suelo. a) Emiliano Zapata I, b) Reserva "Las Cruces", EL parral. C) Alfredo V. Bonfil.

El suelo que se encontró en los lugares es arcilloso, con presencia rocosa (pirita), la vegetación era seca-húmeda, de color rojiza, con una textura chiclosa.

9.1 Tipo de leguminosas encontradas en cada sitio de colecta

Figura 25. Leguminosas encontradas en Emiliano Zapata I.

La vegetación presentes fueron identificadas dentro del grupo de las Acacias sp y de la familia de las Mimosaseae sp. Eran de aproximadamente 15 cm de alto, alguna presentaban espinas muy pequeñas y otros más grandes de aproximadamente 2.5 cm en forma de V. Las plantas son de hojas bipinadas y otras con hojas impiripinadas, con una gran cantidad de raíces.

Figura 26. Leguminosas de la localidad de Alfredo V. Bonfil.

9.2. Características fenotípicas de las cepas bacterianas.

Se obtuvieron 107 cepas puras de la colecta en campo, de las cuales se observó el fenotipo de cada una de estas cepas al ser cultivadas en medio PY++ (Cuadro 3).

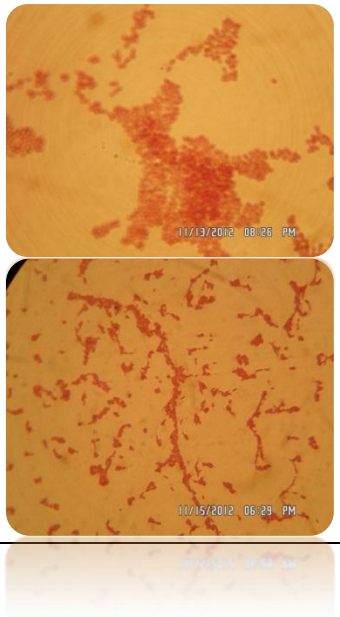
Cuadro 3. Características morfológicas de las cepas bacterianas encontradas y lugar de origen.

Sitio de colecta	Numero de muestras	N° de cepas caracterizadas	Cepa	Características celulares		Morfología de las colonias
				Forma	Gram	Características
Emiliano Zapata 1	17	11	7	Bacilos pequeños	(-)	Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			19	Bacilos pequeños	(-)	Colonias pequeñas de bordes regular, secas, planas y de color trasparente
			24	Bacilos pequeños	(-)	Colonias pequeñas con bordes regulares, planas y de color blancas cremosas, tonalidad traslucidas. De forma cóncavas.
			34	Bacilos cocos pequeños	(-)	
			36	Bacilos largos pequeños	(-)	Colonias mucilaginosas, cóncavas, de bordes irregulares semi opacas, color crema con tono blanco.
			40	Bacilos pequeños	(-)	Colonia color crema, opaca traslucida presenta excesos de mucosidad
			41	Bacilos largos pequeños	(-)	Colonia pastosa, de color crema-amarillas, pequeñas circulares.
			43	Cocos pequeños	(-)	Colonia de color crema-amarillas, traslucidas opacas de forma irregular planas.
			68	Bacilos-cocos	(-)	Colonia de color crema traslucida, seca, con formación de halos de

						coloración más intensos, borde lisos-regulares.
			80	Bacilos pequeños	(-)	Colonia color crema opaco , circulares de bordes liso, cóncavas.
			10 3	Bacilos pequeños	(-)	Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
Reserva las Cruces, El parral.	11	9	12	Bacilos cocos pequeños		Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			25	Bacilos pequeños		Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			46	Bacilos cocos pequeños		Colonias mucilaginosas, cóncavas, de bordes irregulares semi opacas, color crema con tono blanco.
			47	Bacilos pequeños		Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			50	Bacilos cocos pequeños		Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			91	Bacilos pequeños		Colonias mucilaginosas, cóncavas, de bordes irregulares semi opacas, color crema con tono blanco.
			92	Cocos pequeños		Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
			95	Bacilos pequeños		
			10 2			Colonias pequeñas, con bordes irregulares, secas, planas y de color amarillas
Alfredo V.Bonfil, Ocozocuautla	8	0	-----			

La mayoría de los aislados formaron colonias redondas, cremosas, de bordes enteros y mucoides. Con la tinción de Gram se confirmó la presencia de Microorganismos en forma de Bacilos cortos y bacilos cocos pequeños Gram negativos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Aspecto Colonial y morfológico de las bacterias.

Morfología Colonial	Morfología Bacteriana
	

La velocidad de crecimiento de incubación a 28° C y en medio PY++ fue de menos de 48 horas, por lo cual se clasifica dentro de los grupos de Bacterias Diazótrofas (Rhizobium) de rápido crecimiento.

9.3 Extracción de ADN

En las figuras (27) se presentan las electroforesis de ADN total de algunas de las cepas aisladas de las leguminosas, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los siguientes el ADN total de las cepas.

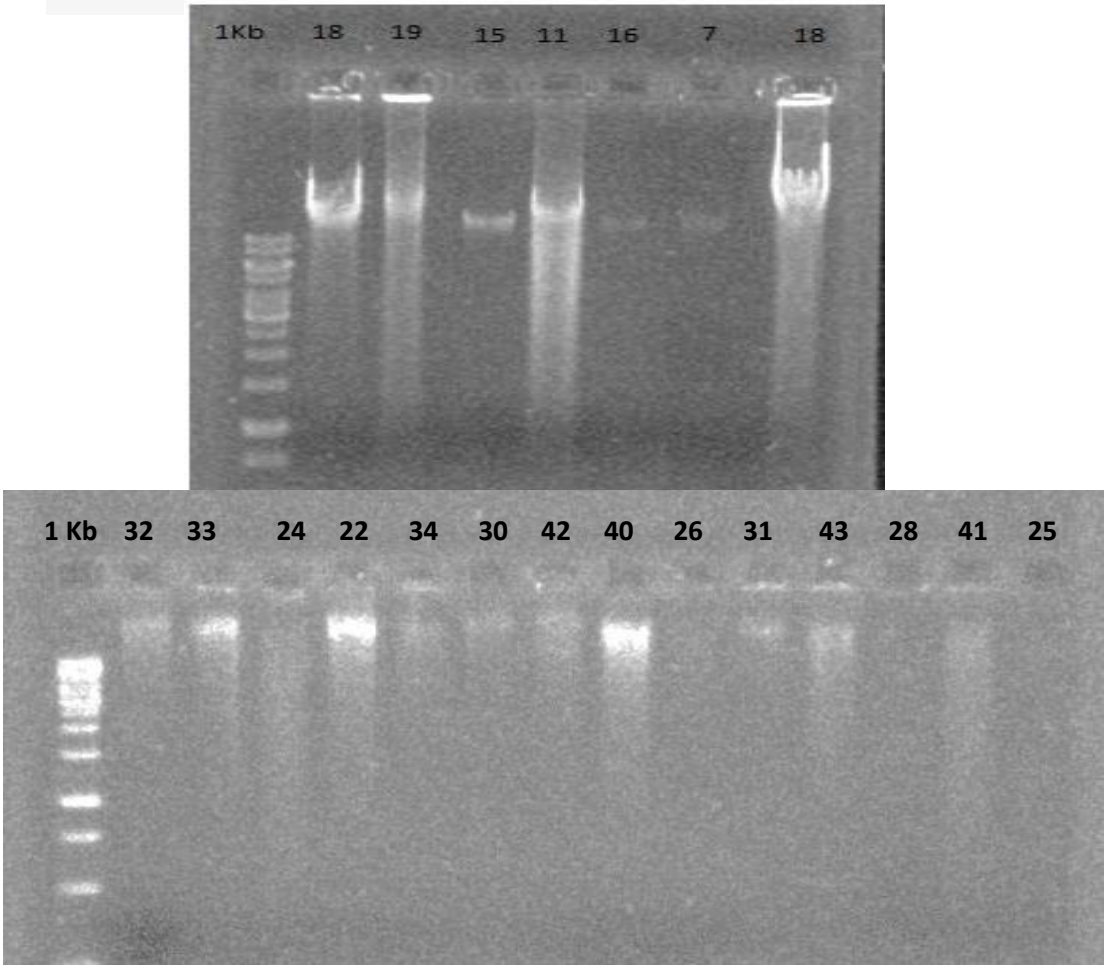


Figura 27. Electroforesis del ADN extraído.

9.4. Patrones de huellas genómicas

Las huellas genómicas generadas usando ERIC y BOX_PCR permitieron distinguir 9 y 25 patrones genómicos diferentes entre los 107 aislados de las leguminosas entro de los 34 patrones genómico, 23 son patrones únicos, y en los 21 patrones restantes. Estos resultados se muestran en la figura 28 y 29, donde las cepas coloreadas son las que se utilizaron para su análisis.

En la figura 28 y 29 se pueden observar los 20 grupos con sus respectivos perfiles de huellas genómicas en geles de agarosa al 1%. Esta prueba es altamente discriminativa a nivel de especie, permitiendo agrupar o discriminar una parte de nuestra colección de cepas bacterianas.

9.4.1 ERIC_PCR

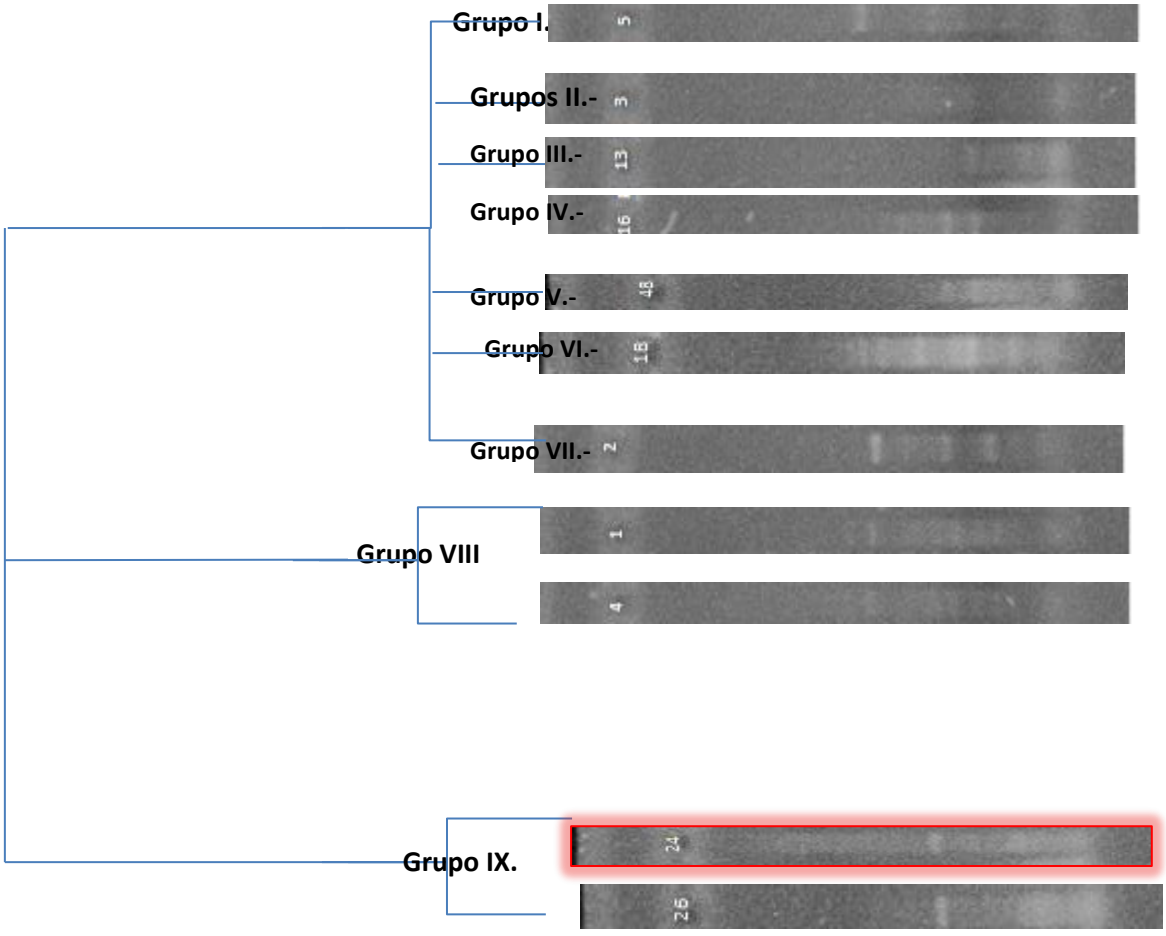


Figura 28. Electroforesis del PCR_ERIC, Grupos formados.

9 .4.2 BOX_PCR.

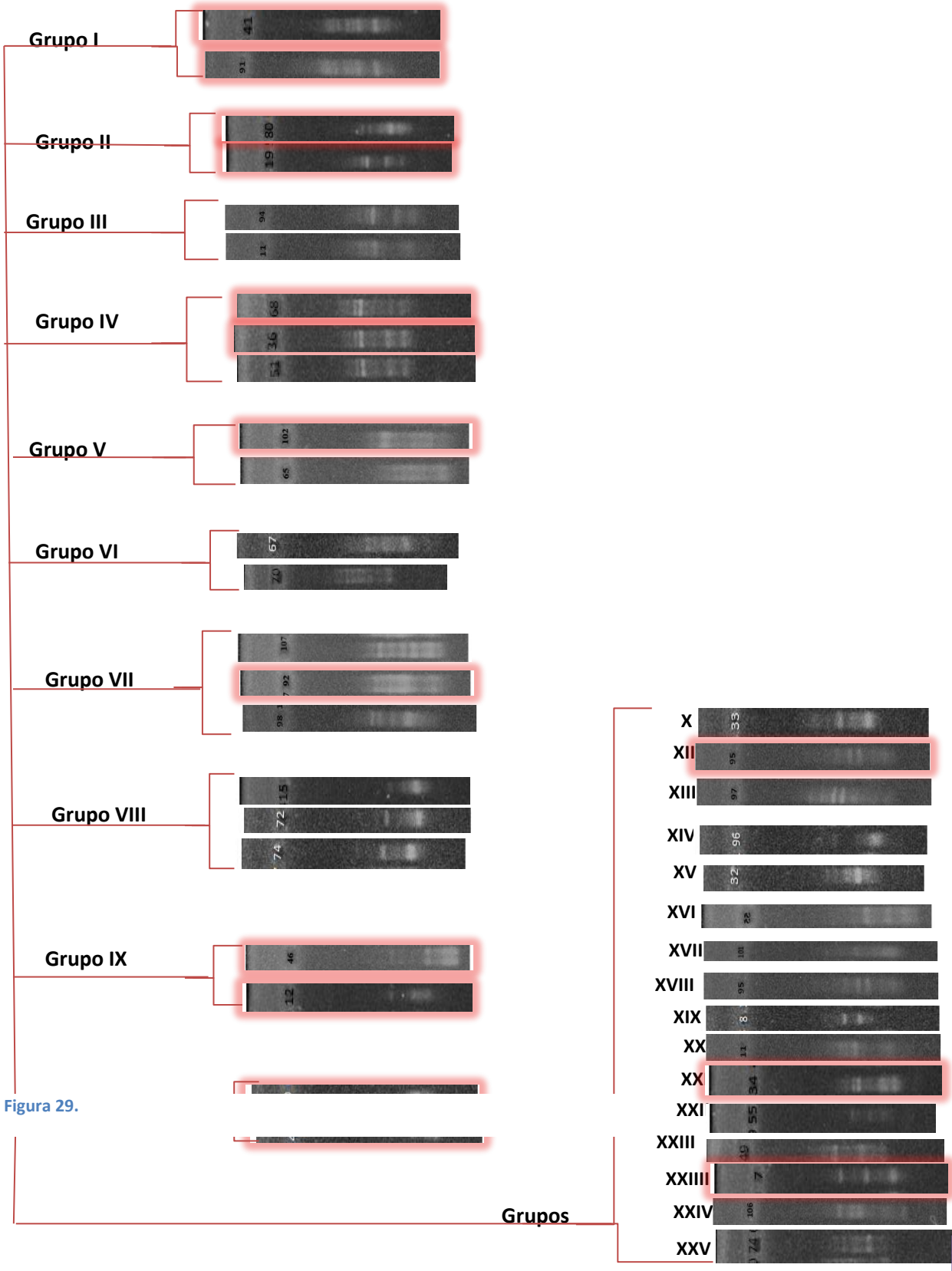


Figura 29.

9.5 Amplificación del gen 16s ADNr

A las cepas con patrones seleccionadas de ERIC y BOX-PCR, se les realizo la amplificación del gen 16's, para posteriormente someterlas a un análisis de restricción (ARDRA). Los fragmentos amplificados se muestran en las figuras (30) con un tamaño estimado de 1500 pb. En las figuras los números corresponden a las cepas con la numeración en números primos.

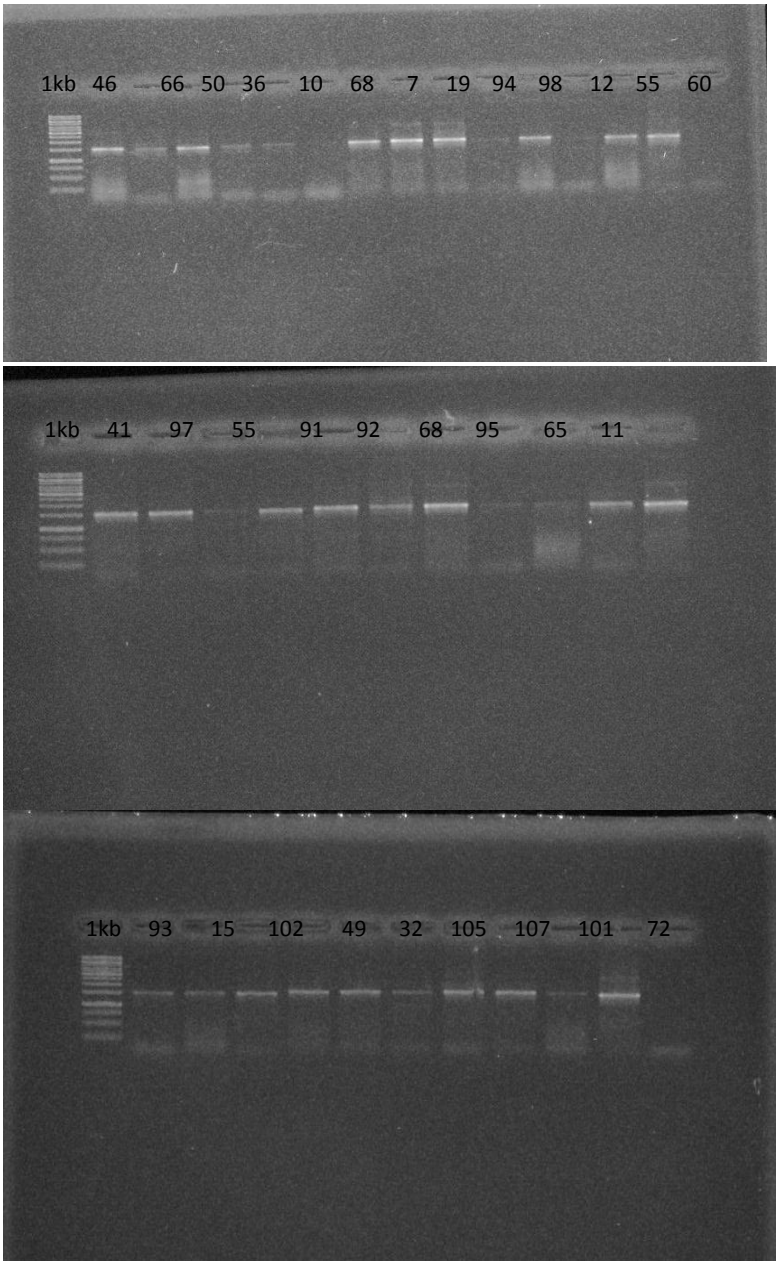


Figura 30. Electroforesis del Gen 16's

9. 6. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr.

Las muestras que amplificaron correctamente se realizó una purificación para discriminar impurezas y así enviarlas a secuenciarlas

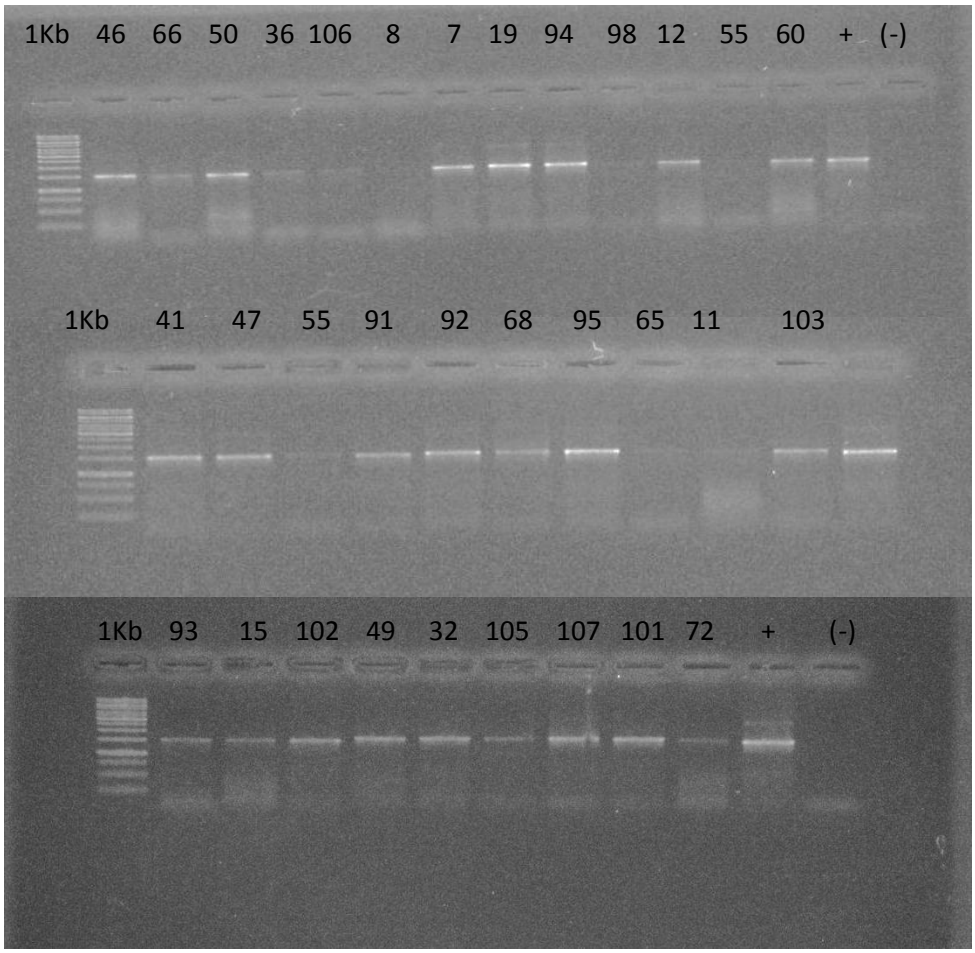


Figura 37. Electroforesis de purificación de cepas bacterianas.

9.7. ARDRA.

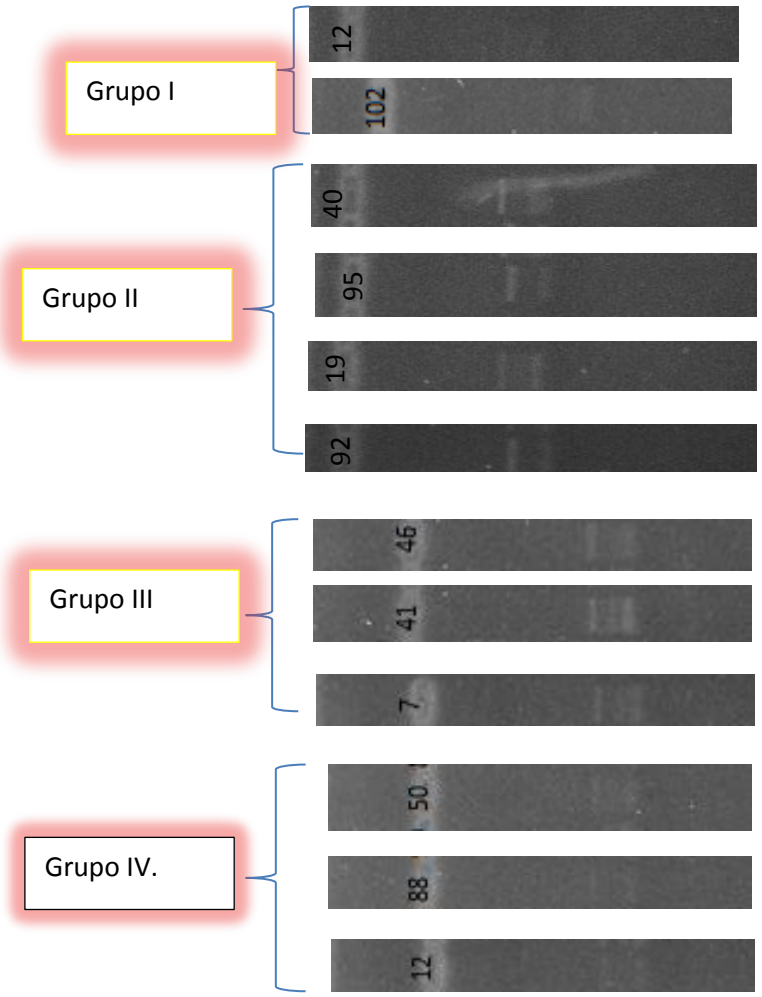


Figura 32.

Cuadro 5. Grupos encontr

Grupos	Cepa con el mismo patrón de restricción.			
I	102..Parral	12.. Parral		
II	92.. Parral	19..Emiliano Z.	95.. Parral	40..Emiliano Z.
III	7.. Emiliano Z.	41. Emiliano Z.	46.. Parral	
IV	12. Parral	68. Emiliano Z.	50.. Parral	

Conclusión y Recomendaciones

Con base a los resultados que se obtuvieron se concluyó:

1. Que existe una gran diversidad de bacterias diazótrofas que crecen en presencia de factores abióticos que afecta el suelo para los cultivos.
2. A partir de las 107 cepas aisladas de las leguminosas recolectadas en los 3 sitios con condiciones extremas, al aplicarles los análisis genéticos se pudo ver con la prueba ERIC y BOX un total 33 patrones de huellas genómicas distintas, sin embargo con la prueba de ARDRA solo se obtuvieron 4 patrones distintos de las cepas estudiadas, las cuales causan controversia ya que tienen características diferentes en sus patrones de huellas, Estos 4 patrones con un total de 20 cepas se mandaron a analizar para conocer la especie de bacterias que se estudiaran posteriormente.
3. La morfología colonial que la mayoría de las cepas presentaron fue colonias cremosas, circulares, de color crema, de bordes regulares, pequeñas de aproximadamente 1-5mm de diámetro.

Para concluir generalmente se puede decir que existe una gran diversidad de bacterias que pueden ser usadas para utilizarlas como fertilizante agrícola y así evitar daño al suelo, y mejorar la calidad del mismo.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, C. A., José-Miguel, & Olivare, J. (Julio de 1983). scribd. Recuperado el 2 de enero de 2013, de SIMBIOSIS de leguminosa- rhizobium: http://es.scribd.com/doc/56078954/SIMBIOSIS-Rhizobium-leguminosa.

Aydi S, Sassi S, Abdelly C (2008). Fijación de nitrógeno al suelo y distribución iónica en Medicago truncatula sujeto al estrés salino. Plant and Soil 312: 59-67.

BEYNOND, J.L. et al (I980). Demonstration of heterogeneity in a natural population Rhozobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. Journal of general Microbio!. 118, 437-442.

Cuenca, F. F. (enero de 2009). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología. Sevill, España.

DENARIE 1., DEBELLE F., TRUCHET G and PROME J. C. (1993). Rhizobium and legume nodulation: A molecular dialogue. En: R. Palacios et al (eds.). New horizons in nitrogen fixation, p. 19-30.

Domminguez, D. H. (2011). Protocolo para la extraccion de ADN bacteriano "METODO ROCHE MR". UNAM: Laboratorio de biologia Molecular Rhizoboster MR.

FISHER R.F. and LONG S.R (1992). Rhizobium plant signal exchange. Nature 357:655-659.

H. W. Fassbender y E. Bornemisza, "Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina", Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Eds., San José, 1994, p. 420.

INAFED. (s.f.). Enciclopedia de los municipios y delegaciones de mexico. Recuperado el 24 de 11 de 2012, de Estado de Chiapas: http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM07chiapas/index.html

Landero, N. d. (2010). Especies de Leguminosas como fitorremediadoras en suelos contaminados. Recuperado el 3 de enero de 2013, de http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/127/Cruz_Landero_N%20De%20La_DC_2010.pdf?sequence=3

Leon, J. (2000). Botanica de los cultivos tropicales. Costa Rica: Agroamerica del Lica.

Manuel, M. G. (Junio de 2000). http://digital.csic.es. Recuperado el 3 de 2013 de enero, de Sintesis de glutation y homoglutation en nodulos de leguminosas: http://digital.csic.es/bitstream/10261/3413/1/2001-TesisManuelMatamoros.pdf

Marques Pinto, C., & Vincen, J. (1974). Nodulating competitiveness amongst strains of Rhizobium meliloti and R. trifolii. CSIRO.

Martin, F. j. (2009). Respuesta inducida por acido absicico y acido salicilico en la simbiosis de judia y alfalfa en condiciones de estres salino. Granada, España. Recuperado el enero de 2013.

Odeh IOA, Onus A (2008). Spatial analysis of soil salinity and soil structural stability in a semiarid region of New South Wales, Austrlia. Environmental Management 42: 265-278.

Posada, J. O. (2005). Fundamentos de establecimientos de posturas y cultivos forrageos. Colombia: Universidad de Antoquia.

Rengasamy P (2006). Word salinization with emphasis on Australia. Journal of Experimental Botany 57: 1017-1023.

Roberts, K. (2007). Handbook of plant science. Inglaterra: wiley

Souza, V., Escalante, A. E., Noguez, A. M., Espinoza, L., Cerritos , R., & Eguiarte, L. E. (enero de 2013). Ecología microbiana: una nueva ciencia para un nuevo siglo. Mexico, Mexico.

Valencia, u. p. (enero de 2008). EUITA. Recuperado el 13 de diciembre de 2012, de http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20Angiospermas/R%C3%B3sidas/Leguminosas/Leguminosas.htm

VANCE C.P. and GRIFFITH S.M. (1990). The molecular biology of N metabolismo In: DENNIS D.T. ANO TURPIN D.H. (Eds.). Plant physiology, biochemistry and molecular biology. P.373-388

Vinuesa, P., Leo´n-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., & Martiınez-Romero, E. (2005). Bradyrhizobium canariense sp. nov., an acidtolerant endosymbiont that nodulates endemic. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 3-4

Wang, T., Martínez Romero , J., & López Lara, I. (s.f.). Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Recuperado el 3 de enero de 2013, de biblioweb: http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/

Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. Trends in plant science 6: 66-71.

Anexos.

Medios de Cultivos.

A. Medio PY $^{++}$

Componentes	
Agar Bacteriologico	15 gr
Extracto de Levadura	3 gr
Peptona de Caseina	5 gr
Solución de $CaCl_2$	10 ml
Agua Destilada	1 L

B. Medio YMA.

Componentes	
Agar Bacteriologico	7.5 gr
Extracto de Levadura	1.5 gr
Manitol	5 gr
K_2HPO_4	0.25gr
NaCl	0 .15 gr
$MgSO_4$	0 .1 gr
$CaCO_3$	1.5 gr
Agua Destilada	500 ml

Nota: La lectura del pH se realiza antes de mezclar el agar Bacteriologico.